

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K14764

研究課題名（和文）植物由来精油成分ファルネソールに対する糸状菌の応答分子機構

研究課題名（英文）Molecular mechanism of fungal response to plant-derived farnesol

研究代表者

老木 紗予子 (Oiki, Sayoko)

京都大学・農学研究科・助教

研究者番号：40843090

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、未だ明らかにされていなかった植物精油成分であるファルネソールに対する *Aspergillus* 属糸状菌の応答分子機構について、特にファルネソールの排出に着目し、その分子の同定に至った。*A. fumigatus* では ABC トランスポーター Cdr1B、*A. oryzae* では ABC トランスポーター AtrA がファルネソールの排出に機能し、いずれも転写因子 AtrR 依存的事であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

天然の抗菌物質であるファルネソールの *Aspergillus* 属糸状菌に対する作用機序の一端を明らかにしたことにより、生態系における生物間の競争的相互作用の深い理解につながる。また、多種多様な精油成分に対する糸状菌の応答機構の解明に役立つことが期待される。さらに、人工合成された抗真菌薬の持続的な利用による耐性菌の出現が問題となる中で、天然由来の新規な薬剤開発に役立つと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, a part of the molecular response mechanism of filamentous fungi to plant-derived farnesol, a component of essential oils, was clarified. In particular, two ABC transporter, Cdr1B in *Aspergillus fumigatus* and AtrA in *Aspergillus oryzae* were identified as the efflux pumps of farnesol. Cdr1B and AtrA were also demonstrated to be dependent of the transcription factor AtrR.

研究分野：応用微生物学

キーワード：糸状菌 精油成分 ファルネソール ABC トランスポーター

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

精油は植物の葉、花、根、種子などから抽出された親油性の低分子化合物の混合物であり、有用な効能が多数報告されている。害虫の忌避、有用な昆虫の誘引、および微生物に対する抗菌性が知られているが、その構成成分の複雑さから、作用機序の解明には至っていない。バラやレモングラスの主要な精油成分であるファルネソールは幅広い糸状菌に対して抗菌活性を示し、モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* のアポトーシス様の応答を誘導することや、ヒト病原糸状菌 *Aspergillus fumigatus* の細胞壁維持に関わるシグナル伝達経路の活性化を阻害することが報告されている (Savoldi M. *et al.*, *Mol. Microbiol.*, 2008; Dichtl K *et al.*, *Mol. Microbiol.*, 2010)。しかし、糸状菌にとって“有害”なファルネソールがどのように排出されるかはまったく分かっていない。現在広く使用される抗真菌薬は人工合成されており、耐性菌の出現が問題となっているため、天然の抗菌物質であるファルネソールの作用機序を特定することは新規な抗真菌薬の開発に重要である。

酵母状真菌 *Candida albicans* において、ファルネソールによって薬剤排出ポンプ ABC トランスポーターである CDR1 の発現が上昇し、細胞内のグルタチオンが減少したことから、ファルネソールがグルタチオンと抱合して CDR1 によって細胞外へ排出され、細胞内のグルタチオンが枯渇することでアポトーシスが誘発されるという仮説が提唱された (Zhu J. *et al.*, *PLoS ONE*, 2011)。これまでに、ファルネソールで処理した *A. fumigatus* の RNA-seq 解析により、*C. albicans* の CDR1 のオソログである Cdr1B を含む複数の ABC トランスポーターの遺伝子発現がファルネソールによって上昇することを見いだしており、*A. fumigatus* においてファルネソールがどのように排出されるかという「問い」への足掛かりができた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、未だ明らかにされていない植物精油成分ファルネソールに対する糸状菌の応答分子機構について、特にファルネソールの排出に着目し、分子生物学の観点からその実体を明らかにすることであり、一つの作業仮説として *C. albicans* で提唱されているグルタチオンの関与を糸状菌で検証する。天然の抗菌物質であるファルネソールの作用機序を特定することにより、生態系における生物間の競争的相互作用の深い理解につながるという点で意義深い。また、ABC トランスポーター Cdr1B は *A. fumigatus* のアゾール系薬剤を排出し、その耐性に機能するため、構造の異なるアゾール系薬剤とファルネソールを共通の輸送機構によって排出するという知見が得られれば、薬剤開発にも役立てられる。

3. 研究の方法

・ファルネソール感受性

ファルネソール含有または非含有ポテトデキストロース寒天培地において培養したコロニーの直径を計測することで、ファルネソール感受性を評価した。

・細胞内ファルネソールの定量

ポテトデキストロースブロス (PDB) で培養した菌糸細胞にファルネソールを添加し、30 分インキュベートした後、菌糸細胞を洗浄してアセトン抽出し、ガスクロマトグラフィー質量分析法 (GC-MS) により細胞内のファルネソール量を定量した。

・発現解析

PDB で培養した菌糸細胞にファルネソールを添加し、30 分インキュベートした後、菌糸細胞を凍結粉砕し、TRIzol を用いて RNA を抽出し、qRT-PCR を行った。

・細胞内グルタチオンの定量

PDB で培養した菌糸細胞にファルネソールおよび/またはグルタチオンを添加・インキュベートした後、細胞内のグルタチオン濃度を測定した。

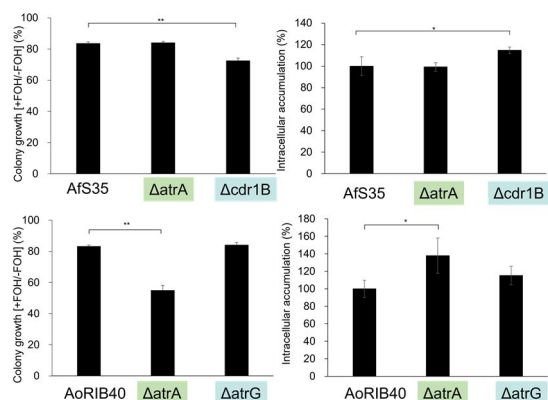
4. 研究成果

(1) ファルネソールの排出に機能する ABC トランスポーター

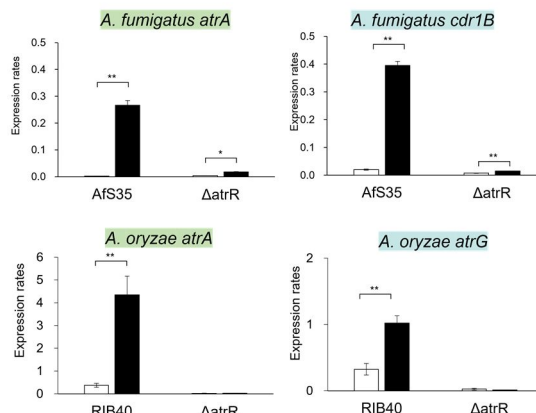
A. fumigatus の RNA-seq 解析でファルネソールに応答して発現上昇した 2 種類の ABC トランスポーター Cdr1B と AtrA について、それらの遺伝子破壊株を用いてファルネソール感受性およびファルネソール処理菌糸細胞の細胞内ファルネソール蓄積量を調べた。その結果、*cdr1B* 遺伝子破壊株は野生株と比較してファルネソールに高い感受性を示し、細胞内に多くのファルネソールを蓄積した。一方、*atrA* 遺伝子破壊株のファルネソール感受性および細胞内ファルネソール蓄積量は野生株と同程度であった。したがって、*A. fumigatus* のファルネソール応答において、ABC トランスポーター Cdr1B が機能することが示された。

A. oryzae においても同様の実験を実施した結果、*atrA* 遺伝子破壊株では野生株と比較してファルネソールに高い感受性を示し、ファルネソール処理菌糸細胞の細胞内ファルネソール蓄積量が増加した。これに対し、*A. fumigatus cdr1B* のオソログである *atrG* の遺伝子破壊株ではファルネソール感受性も細胞内ファルネソール蓄積量も野生株と同程度であった。したがって、*A. oryzae* では AtrA がファルネソール応答に機能することが示された (図 1)。

また、*A. oryzae* の転写因子破壊株ライブラリを用いてファルネソールに反応する転写因子を探索した結果、薬剤応答に機能する AtrR の遺伝子破壊株のファルネソール感受性が高くなった。そこで、*A. fumigatus* および *A. oryzae* において、ファルネソール存在下で野生株および *atrR* 遺伝子破壊株の qRT-PCR を行った結果、野生株では *cdr1B/atrG* および *atrA* はいずれも顕著な発現上昇が見られたが、*atrR* 遺伝子破壊株ではその上昇が抑えられたため、*cdr1B/atrG* および *atrA* の発現は AtrR 依存的であることが分かった (図 2)。



【図 1. ファルネソール感受性と細胞内ファルネソール量】



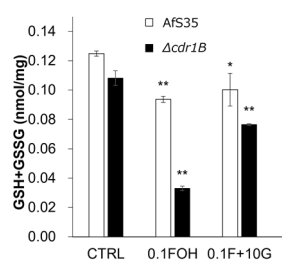
【図 2. ABC トランスポーターの発現】

(2) グルタチオン抱合モデル

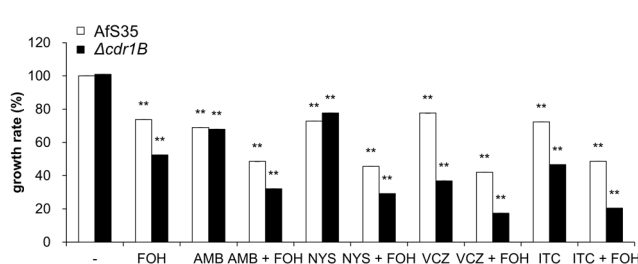
A. fumigatus において、「ファルネソールが細胞内のグルタチオンと抱合して Cdr1B によって排出される」という予測モデルを検証した。*A. fumigatus* におけるグルタチオンとファルネソール感受性の関与を調べるため、野生株と *cdr1B* 遺伝子破壊株について、ファルネソールおよび/またはグルタチオンを添加し、細胞内のグルタチオン濃度およびファルネソール感受性を測定した。その結果、野生株と *cdr1B* 遺伝子破壊株のいずれにおいてもファルネソール存在下で細胞内グルタチオン量は減少したが、野生株よりも *cdr1B* 遺伝子破壊株におけるグルタチオン量減少量の方が多く、また、グルタチオンの添加によるファルネソール感受性の緩和は見られなかった。したがって、*A. fumigatus* においてファルネソールとグルタチオンが抱合して排出される可能性は考えられるものの、Cdr1B によって排出されるのはファルネソールとグルタチオンの抱合体ではないことが示唆された (図 3)。

(3) 抗真菌薬との併用

ファルネソールはアムホテリシン、ナイスタチン、ポリコナゾール、およびイトラコナゾールと相加効果があることが分かり、ファルネソールの抗真菌剤としての利用への可能性が見いだされた (図 4)。



【図 3. 細胞内グルタチオン量】



【図 4. 抗真菌薬との併用】

< 参考文献 >

- Soriani FM, Malavazi I, Silva Ferreira ME, Savoldi M, Von Zeska Kress MR, Goldman MH, Loss O, Bignell E, Goldman GH. Functional characterization of the *Aspergillus fumigatus* CRZ1 homologue, CrzA. *Mol. Microbiol.*, 67(6):1274-1291, 2008
- Dichtl K, Ebel F, Dirr F, Routier FH, Heesemann J, Wagener J. Farnesol misplaces tip-localized Rho proteins and inhibits cell wall integrity signalling in *Aspergillus fumigatus*. *Mol. Microbiol.*, 76(5):1191-1204, 2010
- Zhu J, Krom BP, Sanglard D, Intapa C, Dawson CC, Peters BM, Shirliff ME, Jabra-Rizk MA. Farnesol-induced apoptosis in *Candida albicans* is mediated by Cdr1-p extrusion and depletion of intracellular glutathione. *PLoS ONE*, 6(12):e28830, 2011

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Oiki Sayoko, Yaguchi Takashi, Urayama Syun-ichi, Hagiwara Daisuke	4. 巻 17
2. 論文標題 Wide distribution of resistance to the fungicides fludioxonil and iprodione in <i>Penicillium</i> species	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0262521
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0262521	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 老木紗予子、浦山俊一、萩原大祐
2. 発表標題 糸状菌 <i>Aspergillus fumigatus</i> のファルネソール 応答におけるABCトランスポーターの機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 老木紗予子、矢口貴志、浦山俊一、萩原大祐
2. 発表標題 植物非病原性 <i>Penicillium</i> 属菌を対象としたFludioxonilおよびIprodione耐性株の探索
3. 学会等名 第20回糸状菌分子生物学コンファレンス
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------