

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790410

研究課題名(和文) 病原真菌アスペルギルスフミガタスの環境応答シグナル伝達系と病原性解析

研究課題名(英文) Functional analysis of a signal transduction system in pathogenic fungi *Aspergillus fumigatus*

研究代表者

萩原 大祐 (Hagiwara, Daisuke)

千葉大学・真菌医学研究センター・特任助教

研究者番号：20612203

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：真菌感染症は近年増加傾向にあり、その原因菌である *Aspergillus fumigatus* の環境応答メカニズム、および感染時の応答を理解することを目指し、浸透圧応答(HOG)経路の機能解析を行った。当経路因子の遺伝子破壊株を用いた解析により、NikAヒスチジンキナーゼが胞子形成、菌糸形態、浸透圧ストレス耐性、および農薬応答に重要な役割を果たすことを明らかにした。これらの知見は、当該経路を標的とした新規抗真菌薬の開発に資するものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Recently, fungal infection has increased. In order to understand how the causative fungus *Aspergillus fumigatus* survives in a stressful environment and during infection, we focused on a stress response signaling mechanism, High Osmolar Glycerol (HOG) pathway. We constructed the gene deletion mutants of each component of the pathway, and investigated the components. We found that one histidine kinase, NikA, is involved in conidiation, hyphal morphogenesis, osmotic stress resistance, and fungicide response in *A. fumigatus*. These results will be useful for further understanding of the response mechanism against extracellular stresses and also for development of new drugs targeting this signaling pathway in *A. fumigatus*.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学(含真菌学)

キーワード：情報伝達系 二成分制御系 ヒスチジンキナーゼ MAPKカスケード 浸透圧ストレス

## 1. 研究開始当初の背景

(1) アスペルギルスフミガタス (*Aspergillus fumigatus*) はアスペルギルス症の原因真菌として発生頻度および致死率が最も高い。しかしながら、使用可能な抗真菌薬が限られていることや、それら薬剤に対する耐性菌の発生がしばしばみられることなどを理由のひとつとして、治療に難渋するケースが散見される。このような背景から、さらに効果的な抗真菌薬や治療法、早期診断法の開発がのぞまれている。

(2) 本菌の感染過程において、侵入する宿主組織内部は多様なストレス環境であると考えられている。つまり、本菌は宿主内環境に巧妙に適応して感染成立に至っており、それを可能にする環境応答機構を具備していると考えられる。本菌の病原性メカニズムの解析は多くの研究者により進められているが、環境応答の分子メカニズムに焦点をあてた報告は限られており、環境応答シグナル伝達系に関する解析が求められている。

(3) 真菌の主要な環境応答機構のひとつとして、二成分制御系 (His-Asp リン酸リレー情報伝達系) がある。二成分制御系はバクテリアから酵母や植物にまで広く保存された機構で、環境応答および多様な細胞応答に関与することが示されている。真菌のモデル生物として *Saccharomyces cerevisiae* や *Aspergillus nidulans* における研究を基にすると、*A. fumigatus* の二成分制御系は 13 個のヒスチジンキナーゼ (HK)、ひとつの Hpt 因子、3 個のレスポンスレギュレーター (RR) から構成されており、下流に SakA MAPK カスケードを制御している事が推測された。

(4) 各種糸状菌や近縁の *A. nidulans* の研究成果から、二成分制御系および下流の MAPK カスケードが、浸透圧ストレスおよび農薬化合物に対する応答に関与している事が示されていた。また、MAPK カスケードの下流に制御されている AtfA 転写因子についても、胞子のストレス耐性に必須の因子である事が *A. nidulans* で示されていた。

(5) 研究開始当初、*A. fumigatus* の二成分制御系および SakA MAPK カスケードの因子のうちで、解析がなされていたものは限られていた。その中で、複数ある HK のうちのひとつ Fos-1 については、遺伝子破壊株の病原性が低下しており、本菌の病原性に何らかの役割を持つと考えられていた。

## 2. 研究の目的

(1) 環境応答として重要な二成分制御系および下流の MAPK カスケードに焦点を当てた分子遺伝学的解析を行う事で、*A. fumigatus* の環境応答分子メカニズムおよび病原性について理解を深める事を主要な目的とする。

(2) 二成分制御系および MAPK カスケードにより構成される浸透圧応答経路 (HOG 経路) は、糸状菌特異的の農薬フルジオキソニル (フェニルピロル系) およびイプロジオン (ジカルボキシミド系) や抗白癬菌外用薬として使用されるピロールニトリンの作用点と考えられている。そこで、これらの薬剤に対する病原真菌 *A. fumigatus* の分子応答の理解を深めることを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) *A. fumigatus* HOG 経路の各因子の遺伝子破壊株を作製し、生育、胞子形成能、形態、各種ストレス耐性、およびシグナル伝達応答を調べる。特に、浸透圧応答および農薬応答に深く関与していると予想される、NikA (HK), YpdA (Hpt), SskA (RR), Skn7 (RR), SakA (MAPK) を優先的に対象として遺伝子破壊株を作製し解析する。

(2) 各種ストレス因子として、酸化ストレス、浸透圧ストレス、農薬化合物 (フルジオキソニル、イプロジオン)、ピロールニトリン、cell wall ストレス (カルコフラワー、コンゴレッド) などを使用し、プレート生育試験を行う。

(3) 各種ストレスに応答して SakA MAPK のリン酸化を検出して、ストレスによる経路の活性化を調べる。また、下流で制御される遺伝子候補を見出し、ストレス応答性および、経路依存性を検証する。

(4) 培養細胞 (マクロファージ細胞) との相互作用実験により、*A. fumigatus* mutant の胞子のマクロファージ耐性を調べる。

(5) 各遺伝子破壊株の病原性を評価するために、マウス感染モデルによる動物感染実験を行う。

## 4. 研究成果

(1) NikA HK の機能解析のために、遺伝子破壊株 (*nikA*) および遺伝子相補株 (*Co-nikA*) を作製した。*nikA* は野生株に比べて、YGMM (0.1% Yeast Extract 添加-グルコース最小培地) 上でのコロニー生育が若干低下していた。また、胞子径性能が低下していた (Fig. 1)。菌糸形態を観察すると、*nikA* では野生株に比べてでこぼこした形状をしており、TEM による断面観察から cell wall が薄くなっている事がわかった。細胞形態および細胞壁が異常を示した事から、cell wall ストレスに対する応答が野生株と異なると考え、プレート上におけるストレス応答試験を行った。その結果、1-3-glucan 合成酵素阻害剤であるミカファンギンや、カルコフラワー、コンゴレッドなどの cell wall ストレス因子に対して *nikA* が耐性を示す事

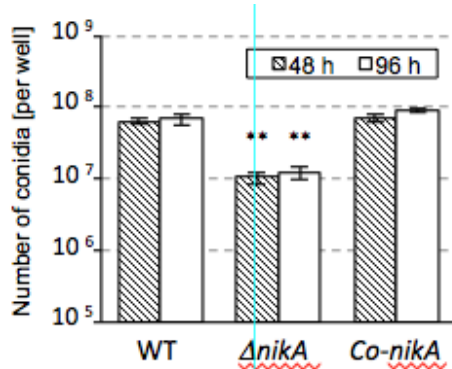


Fig. 1 胞子産性能の比較

がわかった。また、浸透圧ストレスや抗真菌化合物に対する生育試験の結果、*nikA*は浸透圧ストレスに感受性を示し、農薬化合物およびピロールニトリンには耐性を示す事が明らかとなった。

*NikA*の下流で機能すると考えられる *SskA* RRおよび *SakA* MAPKの遺伝子破壊株を作製し、同様に形態およびストレス応答を解析した。その結果、*sskA*および *sakA*は浸透圧ストレスに感受性を示すものの、*nikA*ほどの感受性ではなく、農薬化合物に対しては野生株と同様の感受性を示す事が明らかになった。また、菌糸形態の観察からは特に異常は見られず、*nikA*が示す表現型とは多くの点で異なる事がわかった。これらの結果から、*nikA*における胞子形成能低下および、菌糸形態異常、抗真菌剤耐性は、*SskA*および *SakA*と直接的に関連のない表現型である可能性が示唆された。

(2) 浸透圧ストレスおよび農薬化合物処理による、*SakA* MAPKのリン酸化をウェスタンブロットにより解析した。各遺伝子破壊株を液体培養し、ストレス処理後10 minにサンプルを回収し、*SakA*におけるリン酸化の有無を確認した。*sakA*および *sskA*ではシグナルが検出されなかったことから、浸透圧ストレスおよびフルジオキシソニル処理による *SakA* MAPKのリン酸化は *SskA*に依存していることが明らかになった (Fig. 2)。一方 *nikA*では、いずれのストレス処理時にも野生株と

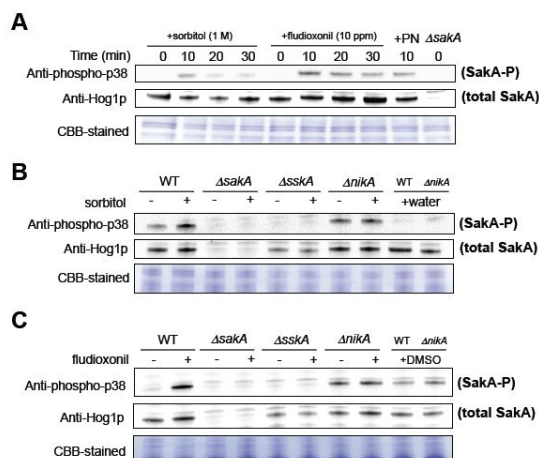


Fig. 2 Western Blot法による *SakA* MAPKのリン酸化検出

同等のシグナルが検出され、ストレス非処理時にも野生株より高いシグナルが検出されたことから、ストレス処理におけるリン酸化において必須の因子では無い事がわかった。

(3) 浸透圧ストレスおよび農薬化合物処理による、*HOG*経路依存的な転写応答の解析を行った。*A. nidulans*における当該経路の下流制御因子であるカタラーゼ遺伝子 *catA*のオゾンログ、および既報の *SakA* MAPK下流制御因子 *dprA*, *dprB*を対象としてリアルタイムPCR解析を行った。その結果、野生株では *catA*, *dprA*, *dprB*ともに浸透圧ストレスおよびフルジオキシソニル処理において顕著な発現誘導を示した。一方で、*sakA*および *sskA*ではその発現誘導が見られなかったことから、これらの遺伝子発現制御が *SskA*-*SakA* MAPKに依存している事が示された。また *nikA*では、部分的な発現誘導がなお見られることから、これらストレス刺激の感知およびシグナル伝達が、*NikA*に依存していない事が明らかになった。しかし、低濃度のフルジオキシソニルで再度検討したところ、1mg/ml以下での処理では *NikA*に依存した発現誘導であった。この点から、低濃度のフルジオキシソニル応答は *NikA* 依存的である事が示された。

(4) ここまでの結果から、高濃度のフルジオキシソニル処理および浸透圧ストレスに対して、*NikA*以外の因子が関与している事が示唆された。そこで、他のHK (12個)についてその関与の可能性を探るため、ストレス処理時の遺伝子発現挙動を調べた。その結果、*Fos-1*, *PhkA*, *PhkB*, *Fhk5*, *Fhk6*の発現が *SakA* MAPK 依存的に増大していた。そこで、これら5つのHKの遺伝子破壊株を作製し、*HOG*経路への関与を検証した。しかし、これらのHK破壊株はいずれも浸透圧ストレスおよび農薬化合物に対する生育に関して野生株と大きな違いは見られなかった。したがって、これらのHKの *HOG*経路への関与については、現時点では不明のままである。

(5) *nikA*は菌糸形態異常など多面的な表現型を示すことから、病原性および宿主細胞との相互作用に関して野生株と異なる可能性が予想された。そこでマクロファージ細胞を用いた胞子の貪食試験およびマウス感染モデルによる病原性試験を行った。しかしながら、いずれの試験においても、*nikA*は野生株と差のない結果となった。

(6) 本研究により、病原真菌 *A. fumigatus*の浸透圧応答経路が、浸透圧ストレスおよび抗真菌薬に対する応答に機能している事が明らかになった。農薬として使用されているフルジオキシソニルが病原真菌にも効果があり、植物病原菌などと同様な作用機作であることが本研究により示された。これらの知見

は、当該経路を標的とした新規抗真菌医薬の開発に役立つと考えられる。また、当該経路のシグナル伝達分子機構がさらに詳細に解明されれば、既存の農薬化合物とは異なる作用点を持ちなおかつ同様かそれ以上の効果を示す化合物の取得も期待できる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Hagiwara D, Takahashi-Nakaguchi A, Toyotome T, Yoshimi A, Abe K, Kamei K, Gono T, Kawamoto S, NikA/TcsC histidine kinase is involved in conidiation, hyphal morphology, and responses to osmotic stress and antifungal chemicals in *Aspergillus fumigatus*. 査読有り, PLoS One (2013) 8: e80881, doi: 10.1371/journal.pone.0080881.

[学会発表](計 9 件)

Hagiwara D, Suzuki S, Kamei K, Gono T, Kawamoto S, The role of AtfA in conidia stress tolerance and its regulatory pathway in pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*, 12<sup>th</sup> European Conference on Fungal Genetics, 2014, Mar, 26, Seville, Spain

Hagiwara D, Suzuki S, Kamei K, Gono T, Kawamoto S, The effects of cultivation temperature on characteristics of conidia in pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*, 11<sup>th</sup> Asperfest, 2014, Mar, 22, Seville, Spain

Hagiwara D, Shimizu K, Ohba A, Kamei K, Gono T, Kawamoto S, A novel transcriptional regulator AtrR of *Aspergillus fumigatus* is required for azole resistance, hypoxia growth, and expression of ABC transporter gene *cdr1B*. 6<sup>th</sup> Advances Against Aspergillosis, 2014, Feb, 26, Madrid, Spain

萩原 大祐, 大場 歩, 清水 公德, 川本 進, 五味 勝也, 病原真菌 *Aspergillus fumigatus* のアゾール剤耐性における AtrR の多様な機能, 第 13 回糸状菌分子生物学コンファレンス, 2013 年 11 月 21 日, つくば

萩原 大祐, カビ胞子のストレス耐性機構の解明をめざして, 糸状菌分子生物学研究会若手の会 第一回ワークショップ, 2013 年 11 月 19 日, つくば

萩原 大祐, 五ノ井 透, 川本 進, 病原真菌 *Aspergillus fumigatus* の胞子に

おけるストレス耐性機構の解析, 日本農芸化学会 2013 年度大会, 2013 年 3 月 26 日, 仙台

Hagiwara D, Takahashi H, Nakayama M, Abe K, Gono T, Kawamoto S, Repression of the phosphor-transmitter gene *ypdA* resulting in growth defect in *Aspergillus fumigatus*, 27<sup>th</sup> Fungal Genetics Conference, 2013, Mar, 14, CA USA

萩原 大祐, 五ノ井 透, 川本 進, 病原真菌 *Aspergillus fumigatus* の胞子におけるストレス耐性機構の解析, 第 7 回日本ゲノム微生物学会年会, 2013 年 3 月 9 日, 長浜

萩原 大祐, 豊留 孝仁, 高橋 梓, 亀井 克彦, 五ノ井 透, 川本 進, *Aspergillus fumigatus* の多様なストレスおよび薬剤に対する浸透圧応答経路の機能解析, 第 56 回日本医真菌学会総会, 2012 年 11 月 11 日, 東京

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

萩原 大祐 (HAGIWARA Daisuke)

千葉大学・真菌医学研究センター・特任助教

研究者番号: 20612203