

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460128

研究課題名(和文) 薬剤排出ポンプ遺伝子群の発現制御へのカルシウムシグナルの関与

研究課題名(英文) Involvement of calcium signal in gene regulation related to drug exhaust

研究代表者

藤田 憲一 (FUJITA, Ken-ichi)

大阪市立大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：10285281

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：アネトールは薬剤排出ポンプPDR5およびその転写因子PDR3の転写亢進を抑制し、相乗的な抗真菌作用を発揮する。PDR3転写亢進の抑制には、ミトコンドリアDNA欠損によるLGE1経路のPDR3およびPDR5転写亢進の抑制が関与していた。また、細胞質Ca<sup>2+</sup>の低下に関わるゴルジ体Ca<sup>2+</sup>-ATPase PMR1およびその調節因子SWI/SNF複合体関連の欠損は相乗作用を消失させた。さらに、アネトールはCa<sup>2+</sup>蓄積を促進させたが、上記の欠損株では薬剤排出は恒常的に抑制された。以上より、Ca<sup>2+</sup>調節機構が薬剤排出関連遺伝子の調節にも関与し、Ca<sup>2+</sup>レベルの上昇は副次的なものである可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Anethole expresses synergistic antifungal activity via restriction of over-expression of drug exhaust pump PDR5 and its transcription factor PDR3. We found that the restriction was involved in the restriction of PDR5 and PDR3 over-expression induced by LGE1, which is over-expressed as a result of deprivation of mitochondrial DNA. In addition, the synergy disappeared in strains lacking PMR1 and genes related to chromatin remodeling complexes SWI/SNF. Whereas anethole accelerated Ca<sup>2+</sup> accumulation, drug exhaust was constitutively restricted in the strain described above. Therefore, these results indicated that regulatory mechanism of Ca<sup>2+</sup> homeostasis was involved in regulation of genes related to drug exhaust and elevation of Ca<sup>2+</sup> levels was provably secondary effects on the gene regulation.

研究分野：生物系薬学

キーワード：薬剤耐性 カルシウムシグナル アネトール 出芽酵母

## 1. 研究開始当初の背景

新たな医薬を求める研究開発は医療分野における最重要課題の一つであるが、新薬の開発は困難を極めている。多くの生物でゲノム解析が終了し、DNA マイクロアレイなどによる網羅的な解析が広く行われ、ゲノム創薬が大いに期待されているが、その成果はまだ医療の現場にフィードバックされてきているとは言い難い。本研究申請者は、天然資源から、真核生物である真菌やヒトを含むほ乳動物細胞にそれぞれ選択性の高い生理活性物質の単離を試み続けており、さらには、新たな薬のターゲットを求めて、その活性の発現機構を詳しく解析し続けている。

その中で、我々はミトコンドリアに対して様々な障害作用を示す物質として植物由来のトランス・アネトール (trans-1-methoxy-4-(1-propenyl)benzene)、以下アネトールと略す)に着目している。本物質は、興味深いことに、多くの抗菌剤と併用することで絶大な相乗効果をもたらし、その相乗効果は多剤耐性薬剤排出ポンプ群の遺伝子発現抑制に由来することを明らかにした(すでに特許出願を行った)。

アネトールは、セリ科の果実、種子から抽出した無色～黄色のアニスオイルと呼ばれる植物精油の主成分で、そのオイルは石けんや歯磨き粉に香料として、食品にも甘味料として添加されている。一方、本物質は防虫・抗菌作用を示し、その作用は古くから知られているがその作用メカニズムが全く不明であったので、我々はその詳細について解析してきた。本研究課題申請者は、アネトールが、出芽酵母やアスペルギルス属の糸状菌に対して、核の断片化を伴うアポトーシス様の細胞死を引き起こすことを見いだした。加えて、本物質は、電子伝達の障害による呼吸障害、活性酸素産生誘導、ミトコンドリア内膜における膜電位消失、ミトコンドリア内外でのアデニンヌクレオチドの輸送を担っているアデニンヌクレオチド・トランスロケーターの障害などミトコンドリアに様々な障害を誘導することも報告してきた。その細胞死は恐らくミトコンドリアでの酸化ストレスに起因して誘導されると推察され、本物質で誘導されるアポトーシスは、ほ乳動物細胞で観察されるものをよく似たステップを経ていることをすでに明らかにしている。

アネトールの抗菌力は、上市されている抗生物質に比べてかなり弱い。しかしながら、本物質は、単独では抗生物質や抗ガン剤などの医薬への応用性が殆どないが、アネトール自身は食品に添加されていることもあり、低濃度で使用する限りヒトの細胞への毒性はほとんどない。出芽酵母を含む真菌とヒトの多剤耐性薬剤排出ポンプ群は大変類似していることから、アネトールはガンが再発したときにみられる薬剤排出ポンプの亢進を抑制し、再び抗ガン剤をもちいた治療が有効となる可能性を秘めている。

出芽酵母における薬剤耐性ポンプの遺伝子群は主として転写因子 *PDR1* および *PDR3* によって発現制御されている。我々はアネトールによる薬剤耐性ポンプ群の遺伝子発現抑制にも、これらの転写因子抑制が関わっていることを明らかにした。しかしながら、本酵母が薬剤ストレスを感知して、その情報を伝達し、最終的に薬剤排出ポンプ遺伝子群の発現に関わる転写因子を調節するカスケードは依然不明のままである。一方、カルシニューリンを阻害する免疫抑制剤 FK-506 は相乗的抗真菌作用を発揮する、多剤耐性排出ポンプの過剰発現による抗ガン剤の耐性にはカルシウム結合タンパク質 sorcin が関与するなどの報告があり、本研究室で得られた予備実験においてもゴルジ体  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase の欠損株薬剤排出ポンプの遺伝子発現調節にはカルシウムイオンと相互作用するタンパク質が関連する可能性が非常に高い。アネトールはミトコンドリアに様々な影響を与えるが、その一時作用点は不明である。アネトールは  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase および電位依存性カルシウムチャンネルに直接、影響を与えるという報告もあり、薬剤排出ポンプの遺伝子発現制御には、何らかの形で細胞内あるいはミトコンドリア内の  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の変動が関係し、それにはカルシウム濃度の調節にかかわる、あるいはカルシウム結合性のタンパク質が関わっていると想定した。

## 2. 研究の目的

本申請研究の目的は、アネトールを用いて、薬剤排出ポンプ遺伝子群の過剰発現を抑制する機構をカルシウムイオン関連タンパク質とその調節系に焦点を絞って生化学的あるいは分子生物学的手法に解析し、最終的に、薬剤ストレスが薬剤排出ポンプ群の遺伝子発現を誘導するカスケードの一端を一般的に明らかにすることである。本実験には真菌を超えて、モデル生物として動物培養細胞も用いて、真核生物における薬剤耐性発現機構を一般化しようとする試みも含まれる。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞質 $\text{Ca}^{2+}$ イメージング

Calcium Kit-Fluo 4(同仁化学)を使用した。*S. cerevisiae* BY 4741 をモルト液体培地 5 mL を含む試験管に少量懸濁し、30 で 16~18 時間振盪培養し前培養液とした。同培地 100 mL を含む三角フラスコに、コントロールとしてジメチルホルムアミド(DMF)、アネトール処理では終濃度 320  $\mu\text{M}$ 、ドデカノール処理では終濃度 32  $\mu\text{M}$ 、両者の組み合わせ処理では終濃度 320  $\mu\text{M}$  + 32  $\mu\text{M}$  となるようにそれぞれ 1 mL ずつ加え、30、4 時間静置培養した。静置培養後、培養液より遠心分離して集菌し、そこに新しいモルト液体培地を 2 mL 加えて濁度を測った。600 nm での濁度が 2.0/500  $\mu\text{L}$  となるよう 1.5 mL エッペンドルフチューブに本培養液を加え、4、10000 rpm

で5分間遠心分離して集菌した。上清を捨て、PBSで細胞を洗浄した後、Loading Buffer 500  $\mu$ Lを加え、アルミホイルで遮光した。30分に保ちながら1時間超音波処理をして、細胞にFluo 4を導入させた。PBSで2回洗浄後、Recording Medium 100  $\mu$ Lを加えた。観察用のプレパレートを作成し、顕微鏡にて観察した。励起フィルターはWU (BA330-385)を、蛍光フィルターはNIBA (BA510-550)を使用し、露出時間は、Controlが20 msec、蛍光が100 msecで観察した。同様の作業を48時間薬剤処理後にも行った。

## (2) 相乗効果判定およびRT-PCR

*PDR3*を抑制するように働く*LGE1*、*PSD1*に注目し、それぞれの遺伝子欠損によって、アネトールとドデカノールとの組み合わせにおける相乗効果に影響があるのかを調べた。

*S. cerevisiae* BY4741 およびそれ由来  $\Delta$ *lge1*、 $\Delta$ *psd1* をそれぞれモルト液体培地 5 mL を含む試験管に少量懸濁し、30 で 16~18 時間振盪培養し、前培養液とした。予備実験で、*lge1* と  $\Delta$ *psd1* に対するアネトールの最小生育阻害濃度 (MIC) は両方とも 625  $\mu$ M、ドデカノールの MIC がそれぞれ 15.6  $\mu$ M と 1000  $\mu$ M 以上と明らかになっている。そこで、モルト液体培地 3 mL を含む試験管に、アネトール処理では終濃度 625  $\mu$ M から倍々希釈により 39  $\mu$ M までコントロール (DMF) を含め 6 段階の濃度で、ドデカノール処理では、*lge1* 株の場合は、終濃度 15.6  $\mu$ M から倍々希釈で 0.975  $\mu$ M までコントロール (DMF) を含め 6 段階の濃度で、 $\Delta$ *psd1* 株の場合は、終濃度 1000  $\mu$ M から倍々希釈で 62.5  $\mu$ M までコントロール (DMF) を含め 6 段階の濃度でそれぞれ 15  $\mu$ L ずつ加えた。その後、600 nm での濁度が 0.1 になるように前培養液を加え、30、48 時間静置培養した。培養後、それぞれの培養液から 100  $\mu$ L ずつ 96 穴ウェルプレートに移し、プレートリーダーにて 595 nm での吸光度を測定し、濁度を求めた。

相乗効果の判定:各濃度における MIC をプロットしたグラフを作成し、さらに FIC index を求めた。FIC index は、薬剤 A と薬剤 B を併用した場合、以下の式で求められる。この値が 0.5 以下ならば相乗効果、0.5~1 ならば相加効果、1~2 ならば不関効果、2 以上ならば拮抗作用であることを示す。

$$\text{FIC index} = (\text{薬剤 A 併用時の MIC 値} / \text{薬剤 A 単独時の MIC 値}) + (\text{薬剤 B 併用時の MIC 値} / \text{薬剤 B 単独時の MIC 値})$$

各 PDR 遺伝子の発現量測定は RT-PCR 法により行った。出芽酵母の Total RNA 抽出には QIAGEN RNeasy Mini Kit (50) を用いた。*S. cerevisiae* BY 4741 (親株) それ由来  $\Delta$ *lge1*、 $\Delta$ *psd1* はそれぞれモルト液体培地 100 mL を含む坂口フラスコに少量懸濁し、30 で 16~18 時間振盪培養し前培養液とした。モルト液体培地 200 mL を含む三角フラスコに、コ

ントロールとして DMF、アネトール処理では終濃度 312  $\mu$ M、ドデカノール処理では終濃度 31.2  $\mu$ M、両者の組み合わせ処理では終濃度 312  $\mu$ M + 31.2  $\mu$ M となるようにそれぞれ 1 mL ずつ加えた。その後、600 nm での濁度が 0.1/mL になるように前培養液を加え、同様に十分に混ぜた。30、4 時間静置培養した。培養後、培養液より遠心分離にて集菌した。PBS で洗浄した酵母細胞より total RNA を抽出した。RT-PCR は常法にて行い、プライマーは以下の通りとした。

Primer

ACT1

Left 5'-ATGGTCGGTATGGGTCAAAA-3'

Right 5'-AACCAGCGTAAATTGGAACG-3'

PDR3

Left 5'-GTTTGGGCATGTTTGGACTT-3'

Right 5'-CCCGGTTCAACTTCTTTCAA-3'

PDR5

Left 5'-GTTGCCTAAACCCAGGTGAA-3'

Right 5'-ATTGCTACTTCCGCCAAATG-3'

## (3) 蛍光物質 Rhodamine 6G (R6G)を用いた排出活性の測定

飢餓条件における排出活性の測定

飢餓細胞の調製 (細胞内 ATP 源の除去)

*S. cerevisiae* BY4741 株をモルト液体培地 100 mL を含む坂口フラスコに少量懸濁し、30 で 16~18 時間振盪培養した。50 mL ファルコンチューブに移し、27、3700  $\times$ g で 5 分間遠心分離した後、PBS で 2 回洗浄し、改めて PBS 100 mL に懸濁した。懸濁液を坂口フラスコに移し、16~18 時間、30、貧栄養環境で振盪培養した。

R6G 染色

飢餓細胞を OD600 = 50 (菌体数  $5 \times 10^8$  cells/mL) となるよう PBS に懸濁した。終濃度 10  $\mu$ M となるよう R6G を加え、30 で 15~20 分間振盪培養した。培養の際は、完全にアルミホイルを巻き、完全に遮光した。

R6G 排出実験

染色した菌体を PBS で 2 回洗浄し、PBS に OD600 = 15 (菌体数  $1.5 \times 10^8$  cells/mL) となるよう再懸濁した。PBS が 10 mL 入った試験管に、DMF を溶媒とした試薬を 120  $\mu$ L 加えた。アネトールは 312.5  $\mu$ M、ドデカノールは 31.2  $\mu$ M とした。また、両薬剤を組み合わせた場合も、同じ濃度で作用させた。染色された菌の懸濁液を、それぞれ 2 mL ずつ加え (菌体数  $5 \times 10^7$  cells/mL) 30 で静置した。排出された R6G の蛍光測定

懸濁液を入れた直後に試薬サンプルをボルテックスミキサーでよく攪拌し、ファルコンチューブからエッペンドルフチューブに 1 mL 移し、遠心分離して菌を除いた。上清 100  $\mu$ L を 96 ウェルマイクロプレートに移し、プレートリーダーにて、蛍光量 (励起波長 485

nm、測定波長 535 nm) を測定した。

栄養条件における排出活性の測定

上記で得られた飢餓細胞を用いて R6G 排出活性を同様に測定した。ただし、R6G 排出実験の際、グルコースを 10 mM となるよう加えた。

#### 4. 研究成果

アネトールは、アニスの果実から抽出される精油の主成分であり、香辛料として食品に添加されている。本物質はドデカノールを含む他の薬剤と併用することで相乗的な抗真菌作用を発揮する。ドデカノールのストレスによって出芽酵母のコロニー形成単位(CFU)は一旦低下するが、その後 CFU は回復する。先行研究の結果より、そのストレスからの回復には多剤耐性薬剤排出ポンプ *PDR5* およびその転写因子 *PDR3* の転写亢進が関与し、アネトールはその亢進を抑制することがわかっている。

本研究では、薬剤が *Pdr5* を亢進させる系を一種の薬剤ストレス応答機構としてとらえて、それらに与えるアネトールの影響を他のストレス応答機構などと比較しながら解析した。

ミトコンドリア DNA 欠損によるストレスが *LGE1* に依存して *PDR3* および *PDR5* を亢進させて薬剤耐性を示すことが報告されている。*LGE1* 欠損株は、ドデカノールに対して感受性となり相乗効果も消失していた。加えて、本欠損株において、ドデカノールは *PDR3* および *PDR5* の転写亢進を抑制し、逆にアネトールとの併用処理ではそれらの発現抑制は弱められた。

一方、相乗的抗真菌作用も示す免疫抑制剤 FK506 は細胞質  $Ca^{2+}$  の低下に関わるゴルジ体  $Ca^{2+}$ -ATPase 遺伝子 *PMR1* を抑制することが報告されている。ドデカノールは細胞質  $Ca^{2+}$  濃度を一過的に上昇させたが、アネトール共存下ではその上昇が維持されていた。さらに、*PMR1* 欠損株では長時間のドデカノール処理後も濃度上昇が維持されていた。以上の結果より、アネトールによる相乗的な抗真菌作用には少なくとも *LGE1* に依存した薬剤排出ポンプ亢進の抑制、および *PMR1* の抑制による  $Ca^{2+}$  ストレスからの回復阻害が関与していると推察された。

最終年度は、カルシウム代謝に関わる遺伝子の欠損株について網羅的にドデカノール感受性を調べ、次いで、感受性が持続する、あるいは耐性を示す株について多剤耐性排出ポンプによって排出されることが判明している蛍光プローブ・ローダミン 6G を用いて薬剤排出への影響を調べた。その結果、ドデカノールに対して持続的な抗真菌作用を示した株には *PMR1* の転写活性化にかかわる SWI/SNF 複合体のサブユニット遺伝子欠損株が数多く含まれていた。具体的には *SWI2*, *SWI3*, *SWI10*, *SNF1*, *SNF4*, *SNF6* の遺伝子欠損株であった。以上より、まず、ドデカノール

耐性の一つの要因として細胞質カルシウム濃度の低下が関与していると強く示唆された。一方、以上の欠損株については薬剤排出活性自体が親株に比べて約半分に低下しており、またその活性はアネトール処理やドデカノール処理によって大きく変動しなかったことから、ドデカノール処理によるカルシウム濃度上昇は副次的なもので、カルシウム調節機構自体が薬剤排出活性をコントロールしている可能性も指摘された。

#### 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 8 件)

Yoshioka M, Yamada K, Yamaguchi Y, Ogita A, Fujita K, Tanaka T, The fungicidal activity of amphotericin B requires autophagy-dependent targeting to the vacuole under a nutrient-starved condition in *Saccharomyces cerevisiae*, *Microbiology*, 査読有, 162, 2016, In press.  
DOI: 10.1099/mic.0.000269.

Fujita K, Chavasiri W, Kubo I, Anti-Salmonella activity of volatile compounds of Vietnam coriander, *Phytotherapy Research*, 査読有, 29(7), 2015, 1081-1087.  
DOI: 10.1002/ptr.5351.

Artanti N, Hanafi M, Andriyani R, Saraswati V, Zudin Z, Lotulung PD, Fujita K, Usuki Y, Isolation of an anti-cancer asperuloside from *Hedyotis corymbosa* L, *Journal of Tropical Life Science*, 査読有, 5(2), 88-91, 2015.  
URL: <http://www.jtrolis.ub.ac.id/index.php/jtrolis/article/view/283>

藤田 憲一, アネトールが示す相乗的抗真菌作用の発現メカニズム, *Aroma Research*, 査読無, 15(4), 2014, 362-363.  
URL: <http://www.fragrance-j.co.jp/book/b210319.html>

Fujita K, Tatsumi M, Ogita A, Kubo I, Tanaka T, Anethole induces apoptotic cell death accompanied with reactive oxygen species production and DNA fragmentation in *Aspergillus fumigatus* and *Saccharomyces cerevisiae*, *FEBS Journal*, 査読有, 281(4), 2014, 1304-1313.  
DOI: 10.1111/febs.12706.

Yutani M, Ogita A, Fujita K, Tanaka T, Generation of novel fungicidal activity by the combined actions of hygromycin B and

polymyxin B、 International Journal of Life Science and Medical Research、 査読有、 3、 2013、 193-199.  
DOI: 10.5963/LSMR0305002.

Murata W、 Tanaka T、 Kubo I、 Fujita K、 Protective effects of alpha-tocopherol and ascorbic acid against cardol-induced cell death and reactive oxygen species generation in *Staphylococcus aureus*、 *Planta Medica*、 査読有、 79(9)、 2013、 768-774.  
DOI: 10.1055/s-0032-1328555.

Kang C-K、 Yamada K、 Usuki Y、 Ogita A、 Fujita K、 Tanaka T、 Visualization analysis on the vacuole-targeting fungicidal activity of amphotericin B against parent strain and ergosterol-less mutant of *Saccharomyces cerevisiae*、 *Microbiology*、 査読有、 159、 2013、 939-947.  
DOI: 10.1099/mic.0.065714-0.

〔学会発表〕(計4件)

荻田 亮、藤田憲一、山口良弘、山内 賢、田中俊雄「ブロッコリー由来成分によるパラベン類の抗菌作用の増幅効果」第67回日本生物工学会大会(2015.10.26-28)城山観光ホテル(鹿児島県・鹿児島市)

前田 瑞紀、石倉 昂幸、荻田 亮、田中 俊雄、藤田 憲一「相乗的抗真菌作用を示すアネトールはフルコナゾール耐性 *Candida albicans* における Rhodamine 6G の排出を抑制する」日本農芸化学会 2015 年度大会(2015.3.26-29)岡山大学(岡山県・岡山市)

玉置 裕之、城野 由衣、荻田 亮、田中 俊雄、藤田 憲一「トランス・アネトールが薬剤排出および細胞内カルシウムイオン調節に与える影響」日本農芸化学会 2014 年度大会(2013.3.28-29)明治大学(神奈川県・川崎市)

城野 由衣、玉置 裕之、猪井 崇弘、荻田 亮、田中 俊雄、藤田 憲一「トランス・アネトールが示す相乗的抗真菌作用発現におけるカルシウムイオンの関与」日本生物工学会第65回大会(2013.9.18-20)広島国際会議場(広島県・広島市)

〔図書〕(計3件)

藤田 憲一、共著、「第7節 植物由来の薬剤排出ポンプ阻害剤による抗菌剤・防腐剤の使用量低減化への試み」、pp 256-259「食品・化粧品・医薬品への保存

料・防腐剤の最適な配合法」技術情報協会、2014.

荻田 亮、田中 俊雄、藤田 憲一、共著、「第2節 [9] 防腐剤/抗菌剤の効果増強剤としての天然由来成分の活用法」pp 92-96「食品・化粧品・医薬品への保存料・防腐剤の最適な配合法」技術情報協会、2014.

Kubo I、 Fujita K、 Shimizu K、 Anti-*Salmonella* agents from the Brazilian medicinal plant *Tanacetum balsamita* and their applications *In* Natural Antioxidants and Biocides from Wild Medicinal Plants (eds C.L. Cespedes et al.) CAB International pp. 239-253. 2013.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.sci.osaka-cu.ac.jp/biol/mchem/mchem.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤田 憲一 (FUJITA, Ken-ichi)  
大阪市立大学・大学院理学研究科・准教授  
研究者番号：10285281

(2)研究分担者

臼杵 克之助 (USUKI, Yoshinosuke)  
大阪市立大学・大学院理学研究科・准教授  
研究者番号：30244651