

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：81202

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670910

研究課題名(和文) 抗真菌剤との相乗効果が期待される食品成分の抗真菌作用の解析

研究課題名(英文) Study of food ingredients whose fungicidal activities enhance the effects of antifungal drugs.

研究代表者

矢野 明 (Yano, Akira)

公益財団法人岩手生物工学研究センター・生物資源研究部・研究部長

研究者番号：50312286

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：真菌の増殖抑制活性を有する食品、特に北東北地域に特有の素材を検討した結果、雑穀や水産物(ホヤ等)の脂溶性成分に、強い菌糸形成阻害活性が認められた。これらの有効成分が抗真菌剤の作用にどのような影響を与えるか検討を行い、相乗効果を有する場合にはその作用機序解明を目的として研究を実施した。その結果、多価不飽和脂肪酸、とくにステアリドン酸が真菌の増殖抑制活性を有し、アムホテリシンBと相乗的に作用することが判明した。出芽酵母をモデルとしてケミカルゲノミクス解析を行った結果、ステアリドン酸が細胞内輸送経路を阻害することが推測され、膜タンパク質の機能等に影響を与えることで真菌抑制作用を示すことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated fungal growth inhibitory activity of several extracts of foods, especially in the northern Tohoku region. The fat-soluble component of cereals and marine products (Hoya, etc.) showed strong inhibitory activity of hyphal formation. We identified these active ingredients and examined their effects on anti-fungal agents. The synergistic effects of fungicides and food ingredients were studied for elucidate their mechanism of action. As a result, polyunsaturated fatty acids, particularly stearidonic acid has antiproliferative activity of a fungal, it has been found to act synergistically with amphotericin B. As a result of chemical genomics analysis with the budding yeast, it is suggested that stearidonic acid inhibits intracellular trafficking pathways. The stearidonic acid might affect the functions of membrane proteins including components of membrane traffic, and strongly inhibit the growth of fungi.

研究分野：口腔微生物学

キーワード：多価不飽和脂肪酸 ステアリドン酸 アムホテリシンB

1. 研究開始当初の背景

医療現場では深在性真菌症が大きな問題となってきた。しかし近年、がんなど比較的重度の疾患治療中の患者、生活習慣病罹患者、高齢者、および要介護高齢者の増加に伴い、口腔カンジダ症に代表される表在性真菌症への対処が、問題になってきている。直接命に関わらないが、慢性化・習慣化しやすく QOL を著しく低下させ、肺炎など深在性真菌症のリスクも高まる。表在性真菌症では、病因となる真菌が常に食品や口腔細菌、唾液など多様な化学物質と直接相互作用している。免疫力が低下し、唾液分泌も減少している高齢者においては、食品等に含まれる抗菌および抗真菌成分が日和見真菌の制御に重要な役割を果たしていると予想され、その作用と作用機序の理解が重要である。作用機序解明により抗真菌剤との相互作用も予測できることから、臨床的意義も大きい。

2. 研究の目的

抗真菌剤の薬物動態や作用機序、および食品成分のヒトでの代謝情報により、血中の抗菌剤の作用への食品成分の影響はおおよそ予想されている。他方、口腔粘膜など表在性真菌症の場合、使用される抗真菌剤は食品や唾液と直接相互作用する。食品に含まれる天然抗菌成分の真菌への作用機序は詳細な情報が少なく、抗真菌剤の使用時にどのような影響を与えるのかわかっていない。高齢者等の易感染宿主の増加に伴い口腔真菌症が増加しており、介護等の現場で食品成分の活用が盛んであるため、これらの真菌への作用機序解明が必要である。そこで、モデル生物である酵母を用いた解析と、GC-MS による真菌を構成する脂質の生化学的変化を分析することにより、食品成分の作用を解析する。

3. 研究の方法

1) 既報抗菌性食品成分「茶カテキン」の作用解析

出芽酵母の欠損株ライブラリーを様々な濃度の茶カテキンを含む培地で培養する。それぞれの欠損株には目印となる DNA バーコードが導入されており、24 時間あるいは 48 時間培養後の各欠損株の量を次世代シーケンサーによる DNA バーコードカウンティングで定量評価できる。茶カテキンと相補的に致死性となる遺伝子欠損を有する株ほど増殖が抑制されるため、各株の量を調べること、茶カテキンの標的となる遺伝子(タンパク質)を推定可能である。推定には出芽酵母の合成致死データベースを活用する。出芽酵母の 9 割以上の遺伝子は単独の欠損では死にいたらない非致死性遺伝子であるが、特定の遺伝子欠損との組み合わせによって致死になる合成致死が起きることが知られている。この合成致死情報はデータベースに蓄

積されており、茶カテキンと合成致死となる遺伝子欠損情報と照らしあわせることで、茶カテキンと同じ作用を示す遺伝子欠損を推定可能である。以上の解析を「ケミカルゲノミクス(CG)解析」と称する。

2) 雑穀が有する真菌抑制成分の分析

これまでに長寿食として知られる雑穀(アワ・キビ)のメタノール抽出物に、真菌の増殖抑制作用、菌糸形成阻害作用を見出していた。有効成分を明らかにするため、合成樹脂 HP20 による吸着濃縮、HPLC による分離を行い、菌糸形成阻害活性を指標とした有効成分の分取を行った。

3) 真菌抑制成分の作用機序解析

真菌抑制活性を有する雑穀の有効成分は、長鎖多価不飽和脂肪酸であることが明らかとなり、雑穀以外にもホヤ等の水産物に多量に含まれる多価不飽和脂肪酸が、効果的に真菌の増殖等を抑制することが明らかとなった。そこで、食品に含有される様々な脂肪酸を対象として評価を行った結果、不飽和結合を 4 つ持つステアリドン酸がもっとも強い真菌抑制活性を示すことが判明した。

そこでステアリドン酸の標的を解明するため CG 解析を実施した。

また、培地中に添加した脂肪酸の真菌への取り込みを確認するため GC-MS による脂質組成分析を実施した。

4) 真菌抑制成分と抗真菌剤との相乗効果の機構解析

ステアリドン酸を代表とする抗真菌活性を持つ多価不飽和脂肪酸と、フルコナゾール、ミコナゾール、アムホテリシン B との相乗作用について検討を行った。各脂肪酸とともにフルコナゾール、ミコナゾール、アムホテリシン B を加えた時の増殖抑制活性について、主に *C. albicans* を用いて検討を行った。酵母型、菌糸型の 2 形性を有し、強固なバイオフィルムを形成する *C. albicans* に対して、液体培養により酵母系真菌の増殖抑制を評価するとともに、バイオフィルム形成後に薬剤添加して AlamarBlue の代謝を指標としてバイアピリティの変化をとらえる。この時、ミトコンドリアの膜電位変化、呼吸活性の変動についても測定することで、脂肪酸の作用についての情報を得る。

C. albicans で相乗効果が見られる脂肪酸と薬剤との組み合わせにおいて、出芽酵母による CG 解析を実施し、その作用機作解明を試みる。

4. 研究成果

1) 「茶カテキン」の作用

CG 解析により、茶カテキンの作用解明を試みた。しかし、茶カテキンを酵母の培養液に添加しても増殖抑制が見られず、CG 解析に適切な濃度設定が困難であった。さらに、

期待していた「カテキンとフルコナゾールの相乗効果」についても、明確な効果が確認できなかった。真菌に関しての「茶カテキン」の効果は、誇張されているか、あるいは菌株に依存するなど特殊な条件下のみで発揮される可能性が示唆された。

2) 雑穀の真菌抑制成分

雑穀（アワ・キビ）よりメタノール抽出を行い、抽出物中に濃度依存的なカンジダの菌糸形成抑制活性を確認した。同活性を指標に有効成分の同定を行った。合成樹脂 HP20 により有効成分を濃縮し、HPLC にて活性ピークの分取を行った。予想外に多数のピークが出現し、GC-MS 等により各活性ピークの同定を行った結果、各種不飽和脂肪酸であることが明らかとなった。脂肪酸の抗真菌活性は、特に中鎖脂肪酸が有名だが、長鎖多価不飽和脂肪酸も同様の活性を有することが明らかとなった。

食品に含まれる多種の長鎖多価不飽和脂肪酸標品を用いて、真菌抑制活性の評価を行った。病原性真菌の *C. albicans* を用い、液体培養における増殖抑制作用、RPMI 培地による菌糸誘導の阻害作用、24-48 h の培養によるバイオフィーム形成の阻害、形成済バイオフィームに対する障害活性について、各脂肪酸の評価を行った。

菌糸形成およびバイオフィーム形成は多価不飽和脂肪酸の感受性が高く、リノール酸、リノレン酸、ステアリドン酸、EPA、DHA など、多くの脂肪酸が菌糸形成を抑制することが明らかとなった。酵母型カンジダの増殖抑制はステアリドン酸が最も強く、中鎖脂肪酸ウンデシレン酸と同等以上の効果が確認された。しかし、どちらの脂肪酸も 48 時間培養を継続すると菌の増殖がみられることから、静菌的作用を有すると考えられた。

3) 真菌抑制成分の作用機序解析

ステアリドン酸を中心に、その真菌抑制メカニズムを CG 解析によって解析した。*C. albicans* と同様の増殖抑制が出芽酵母で観察されるか検討を行ったところ、出芽酵母は *C. albicans* よりも脂肪酸に対する感度が高いことから、問題なく CG 解析が実施できると考えられた。増殖促進作用を示すオレイン酸、増殖阻害作用を示すステアリドン酸を培地に添加し、欠損株ライブラリーの個々の株の増殖をコントロール溶媒のみ添加した場合と比較して解析を行った。

比活性の高い薬剤では、薬剤感受性株と耐性株の増殖が、溶媒のみを添加したコントロールと比較して 50 倍のオーダーで変化するが、脂肪酸のような様々な生物の細胞膜成分の場合、感受性株や耐性株の増殖は、コントロールの 5 倍前後にしか変動しない。そのため、脂肪酸のターゲット予測が通常の増殖変動誤差に埋もれる傾向が見られた。特に、酵母の細胞膜に多い、オレイン酸、リノール酸

については、溶媒のみの結果と比較して有意な変動は認められなかった。一方、ステアリドン酸については、ER-Golgi 間の小胞輸送、液胞輸送などの小胞輸送系がターゲットとなり、細胞の増殖が抑制されている可能性が示唆された。具体的には輸送小胞の構成タンパク質 RET2、APM3、YPT1 等の欠損株がステアリドン酸添加で強い増殖抑制を示していた。このことは、ステアリドン酸がなんらかの仕組みで、タンパク質等の細胞内輸送に強い負荷をかけていることを示している。一方、輸送は多様な経路との相互作用を持つことから、特定のタンパク質などに、脂肪酸の攻撃標的が限定されない結果となっている。

4) 真菌抑制成分と抗真菌剤との相乗効果の機構解析

フルコナゾール、アムホテリシン B などの薬剤とステアリドン酸との相互作用について検討を行った結果、フルコナゾールの作用はステアリドン酸により抑制されることが明らかとなった。フルコナゾールは細胞内に取り込まれた後にエルゴステロール合成を阻害することで、真菌特異的な薬剤として機能することが知られている。同様の作用を持つミコナゾールも阻害を受けた。これは、CG 解析により推定されたステアリドン酸の小胞輸送系への負荷が関連すると考えられる。ステアリドン酸により輸送が抑制されることから、アゾール系薬剤の細胞内への取り込みが抑制され、その効果が弱まったと考えられる。このことは、フルコナゾールの前処理時には、ステアリドン酸による阻害効果がほとんど見られないことから支持される。

一方、アムホテリシン B はステアリドン酸と相乗的に作用することが示された。アムホテリシン B は細胞膜中のエルゴステロールに結合し、細胞膜に穴を開ける、あるいは細胞外へエルゴステロールを引き抜くことで、膜障害を起こし、真菌を殺菌することが知られている。この作用には細胞内輸送系は関与しないため、脂肪酸による細胞活性の抑制とアムホテリシン B による膜障害が相乗的に真菌の増殖抑制を示したと考えられる。

アムホテリシン B の CG 解析では、特定の標的が特定されなかったが、これは薬剤標的が遺伝子にコードされるタンパク質ではなく、膜の構成成分であることが影響している。脂肪酸の標的も膜輸送系のみしか示されなかったが、脂肪酸も細胞膜中に侵入することで、細胞膜全体の性質変化を誘導している可能性があり、ターゲットが曖昧に示された可能性がある。細胞膜組成の変化が膜の流動性を変え、輸送小胞の形成そのものを困難にしたり、輸送系を構成する膜タンパク質の機能を抑制することが推定される。

2016 年 3 月時点では、これらの現象を積極的に支持するデータの取得に至らず、完全に新規な事実を証明することができていな

いため、引き続き個々のターゲット遺伝子に着目した研究を遂行し、論文発表を行っていく予定である。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

矢野 明、岸 光男、水産物および農産物の持つ機能成分を活用した地域産業支援、日本農芸化学会、2015年3月、岡山

矢野 明、八代田陽子、長鎖不飽和脂肪酸のカンジダ抑制作用と抗真菌剤との相互作用、日本歯科薬物療法学会、2015年6月、横浜

矢野 明、口腔保健に貢献する天然資源とその活用、東北口腔衛生学会、2015年11月、盛岡

矢野 明、口腔内カンジダ抑制食品の研究開発について、口腔保健用機能性食品研究会、2016年1月、仙台

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢野 明 (YANO, Akira)

公益財団法人岩手生物工学研究センター・生物資源研究部・研究部長

研究者番号：50312286

(2) 研究分担者

八代田 陽子 (YASHIRODA, Yoko)

国立開発法人理化学研究所・吉田化学遺伝学研究室・専任研究員

研究者番号：60360658

(3) 連携研究者

()

研究者番号：