

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：12102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23657

研究課題名(和文)糸状菌を取り巻く生物間相互作用における一酸化窒素の機能解明

研究課題名(英文)Functional analysis of nitric oxide in the interaction between filamentous fungi and other organisms

研究代表者

老木 紗予子(OIKI, Sayoko)

筑波大学・生命環境系・研究員

研究者番号：40843090

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、植物由来の精油成分であるファルネソールを始めとした複数の天然抗菌物質が糸状菌*Aspergillus fumigatus*の細胞内における一酸化窒素(NO)産生を誘導し、NOがファルネソールの抗菌作用と関与することを見出した。また、*A. fumigatus*がファルネソールに対して排出ポンプCdr1Bを高発現し、細胞内のファルネソール量を低下させて適応することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、精油成分に対する糸状菌のNO産生を介した応答分子機構の一端を明らかにした。近年、広く利用される人工合成の抗真菌薬に対する病原糸状菌の耐性株出現が問題となっている。NO産生を誘導しない抗真菌薬とは異なり、NO産生を誘導する天然抗菌性ファルネソールに対する糸状菌の応答および排出機構を明らかにする本研究により、これまでの抗真菌薬とは異なる作用機序をもつ新規な薬剤開発の一助となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found that various natural antifungals such as farnesol, which is a component of plant-derived essential oils, induced the intracellular production of nitric oxide (NO) in *Aspergillus fumigatus*, and that the NO production was involved in the antifungal action of farnesol. Moreover, *A. fumigatus* was revealed to highly express the efflux pump, Cdr1B, and reduce the intracellular farnesol in response to farnesol.

研究分野：応用微生物学

キーワード：糸状菌 一酸化窒素 ファルネソール 精油成分

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

大気汚染物質として知られる一酸化窒素 (NO) が、生体内でシグナル分子として産生されることが 1980 年代に明らかになって以来、哺乳類、植物、および細菌における NO の生理機能に関する研究は国内外で盛んに行われてきた。哺乳類の細胞内で NO は血圧調節や神経伝達、生体防御などに機能する (Francis *et al.*, *Pharmacol. Rev.*, 2010)。また、植物では、形態形成、気孔の開閉、感染防御、乾燥耐性などに関わり (Takahashi and Yamasaki, *FEBS Lett.*, 2002)、細菌においては、バイオフィーム形成、抗生物質耐性、放射線耐性、抗酸化などに関与することが報告されている (Shatalin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2008)。真菌の場合、NO の生成機構や作用機構に関する研究が酵母を対象にして蓄積されつつあるが (Astuti *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2016)、糸状菌における NO の機能はほとんど分かっていない。

最近、植物由来の精油成分の一つである抗菌性のチモールが糸状菌の NO 産生と細胞死を引き起こすことが報告された (Shen *et al.*, *PLoS One*, 2016)。親油性であるいくつかの精油成分の真菌に対する作用機序として、細胞膜構造の破壊やミトコンドリアの電子伝達系の阻害によって抗菌活性を示すことが分かっている (Machida *et al.*, *J. Bacteriol.*, 1998)。一方で、1500 種以上に及ぶ多様な精油成分の詳細な作用機序について、多くは明らかにされていない。申請者は、バラやレモンガラスの精油成分であるファルネソールに着目した。興味深いことに、一部の細菌や真菌もファルネソールをクオラムセンシング分子として生産することから、生物間相互作用においてファルネソールが機能することが推察される。ヒト病原性モデル糸状菌 *Aspergillus fumigatus* における植物由来ファルネソールへの応答と NO の関与を本研究で初めて明らかにする必要があったと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、未だ明らかにされていない糸状菌における NO の作用機構を解明するとともに、精油成分に対する糸状菌の NO 産生を介した応答分子機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) NO と ROS

A. fumigatus 菌糸細胞内の NO レベルを定量するため、PDB 液体培地で培養した菌糸に NO 反応性蛍光プローブ 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate (DAF-FM DA) を処理した後、各精油成分 (ファルネソール、チモール、シトラール) を添加し、細胞抽出液の蛍光強度をプレートリーダーで測定した。同様に、2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH DA) を用いて活性酸素種 (ROS) レベルも定量した。抗菌活性については、精油成分含有 PDA 固体培地で培養した *A. fumigatus* のコロニー直径を計測した。また、精油成分含有 PDA に NO 消去剤 carboxy-PTIO (cPTIO) と ROS 消去剤トコフェロールを添加して *A. fumigatus* を培養し、精油成分に対する感受性と NO および ROS の影響を評価した。

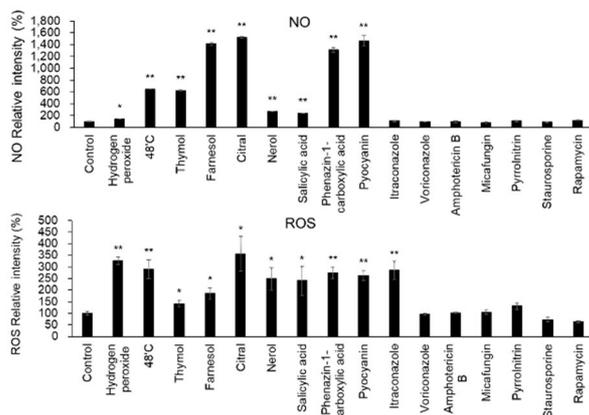
(2) ABC トランスポーター

精油成分に対する *A. fumigatus* の詳細な応答機構を明らかにするため、RNA-seq 解析を行った。RNA-seq 解析で得られた候補応答遺伝子 (*cdr1B* と *atrR*) について、その遺伝子破壊株の表現型を解析した。具体的には、遺伝子破壊株の精油成分感受性の評価と、精油成分処理時における細胞内精油成分の蓄積量の測定を行った。

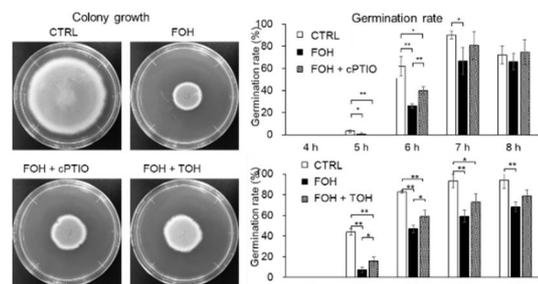
4. 研究成果

(1) 精油成分の抗菌活性と NO との関与

病原糸状菌 *A. fumigatus* において、過酸化水素や高温などの酸化ストレスに加えて、植物が産生する天然の抗菌性精油成分 (ファルネソール、チモール、およびシトラール) に応答して細胞内で NO と ROS が生成されることを見出した (図 1)。また、NO 消去剤と ROS 消去剤存在下で精油成分による生育阻害および胞子発芽遅延が部分的に減弱したことから、これらの精油成分の抗菌作用が NO および ROS の生成と関与することが示唆された (図 2)。



【図 1. 抗菌物質による NO・ROS 産生誘導】



【図 2. NO・ROS 消去剤による生育回復】

(2) ABC トランスポーター Cdr1B

精油成分に対する *A. fumigatus* の詳細な応答を明らかにするため、RNA-seq 解析を行った (図 3)。その結果、ファルネソール処理時に、ABC トランスポーターをコードする *cdr1B* およびその転写因子をコードする *atrR* の発現が顕著に上昇した。*cdr1B* の発現上昇はチモールおよびシト랄ールによっても誘導された。そこで、精油成分存在下における *cdr1B* 遺伝子破壊株 ($\Delta cdr1B$) および *atrR* 遺伝子破壊株 ($\Delta atrR$) の生育を野生株と比較したところ、 $\Delta cdr1B$ および $\Delta atrR$ は、ファルネソールに対して高感受性を示した。一方、チモールとシト랄ールに対するこれらの遺伝子破壊株の感受性は野生株と同程度であった。また、RT-qPCR の結果、ファルネソール存在下において $\Delta atrR$ では *cdr1B* の発現が抑制されたことから、*cdr1B* の発現は *atrR* 依存的であることが分かった。したがって、ファルネソール応答における Cdr1B および AtrR の重要な機能が示唆された。Cdr1B と AtrR は、転写因子 SrbA とエルゴステロール生合成酵素 Cyp51A と共に、アスペルギルス症の主要な治療薬であるアゾール系薬剤への耐性に関与することが知られている。そこで、 $\Delta srbA$ および $\Delta cyp51A$ についてもファルネソール存在下での生育を評価したが、これらの遺伝子破壊株のファルネソール感受性は野生株と同程度であった。また、RNA-seq 解析の結果でもファルネソールによる *srbA* と *cyp51A* の顕著な発現上昇は見られなかった。これらの結果から、ファルネソールへの応答に SrbA と Cyp51A は関与せず、アゾール薬への応答とは異なる作用機序であると考えられる。

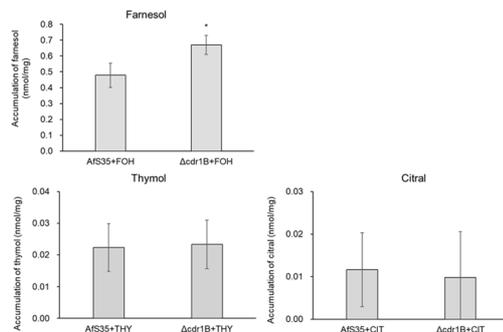
$\Delta cdr1B$ がファルネソール高感受性を示したことから、Cdr1B がファルネソールの排出に機能していると推察した。そこで、当該化合物処理時の細胞内に蓄積するファルネソール量を GCMS 解析により定量した結果、 $\Delta cdr1B$ は野生株よりも多量のファルネソールを細胞内に蓄積しており、ファルネソールの排出に Cdr1B が関与することが示唆された (図 4)。一方、チモールまたはシト랄ール処理時の細胞内当該化合物蓄積量は野生株と同程度であった。以上より、*A. fumigatus* は抗菌活性物質であるファルネソールに対して、排出ポンプ Cdr1B を高発現し、細胞内のファルネソール量を低下させる応答を示して適応すると考えられる。ファルネソールによる糸状菌の NO 産生誘導およびその抗菌作用との関与と、ファルネソールの排出に関わる分子の同定は本研究が初であり、新規な抗真菌薬の開発に役立つことが期待される。

Farnesol			
Name	Annotation	TPM	Expression ratio
AFUA_3G07300	ABC multidrug transporter, putative	794.81	41.24
AFUA_8G07050	conserved hypothetical protein	744.97	39.22
AFUA_1G14330	ABC transporter, putative (Cdr1B)	2664.46	35.75
AFUA_5G02260	ABC multidrug transporter, putative	230.47	28.85
AFUA_8G01560	aldo-keto reductase (YakC), putative	279.47	25.19
AFUA_6G03320	MFS multidrug transporter, putative	508.68	22.09
AFUA_3G01400	ABC multidrug transporter, putative	332.62	19.15
AFUA_2G08260	FMN binding oxidoreductase, putative	1271.67	18.03
AFUA_8G01300	conserved hypothetical protein	172.10	15.81
AFUA_7G00480	ABC multidrug transporter, putative	193.84	14.98

Thymol			
Name	Annotation	TPM	Expression ratio
AFUA_6G09680	O-methyltransferase GIM	242.26	25.88
AFUA_6G09710	MFS gliotoxin efflux transporter GliA	2664.46	9.07
AFUA_1G14330	ABC transporter, putative	441.65	5.96
AFUA_2G11120	conserved hypothetical protein	1267.66	5.78
AFUA_6G06740	thioredoxin reductase GltI	2642.64	5.11
AFUA_6G09745	conserved hypothetical protein	66.80	4.96
AFUA_6G12780	conserved hypothetical protein	599.92	4.89
AFUA_6G09730	cytochrome P450 oxidoreductase GliF	319.12	4.59
AFUA_7G00950	MFS monosaccharide transporter, putative	332.99	3.62
AFUA_2G06370	glutathione S-transferase, putative	1072.70	3.34

Citral			
Name	Annotation	TPM	Expression ratio
AFUA_8G01560	aldo-keto reductase (YakC), putative	801.19	72.21
AFUA_8G07050	conserved hypothetical protein	1018.53	53.62
AFUA_6G03320	MFS multidrug transporter, putative	794.59	30.86
AFUA_5G01430	ThiU/PlpI family protein	789.07	24.09
AFUA_8G01050	lipase/esterase, putative	3326.42	22.70
AFUA_4G00670	nucleoside-diphosphate-sugar epimerases, putative	1247.15	19.88
AFUA_3G02100	short-chain dehydrogenase/reductase, putative	452.19	17.57
AFUA_7G00700	aldo-keto reductase (AKR13), putative	2242.96	15.13
AFUA_8G06840	oxidoreductase, short chain dehydrogenase/reductase family	720.55	13.82
AFUA_1G14330	ABC transporter, putative	430.73	5.81

【図 3. 精油成分によって発現上昇した遺伝子】



【図 4. 細胞内における精油成分の蓄積量】

< 参考文献 >

- Francis SH., Busch JL., Corbin JD., Sibley D. cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action. *Pharmacol. Rev.* 62(3), 525-563, 2010
- Takahashi S., Yamasaki H. Reversible inhibition of photophosphorylation in chloroplasts by nitric oxide. *FEBS Lett.*, 512(1-3), 145-148, 2002
- Shatalin K., Gusarov I., Avetisova E., Shatalina Y., McQuade LE., Lippard SJ., Nudler E. *Bacillus anthracis*-derived nitric oxide is essential for pathogen virulence and survival in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 105(3), 1009-1013, 2008
- Astuti RI., Nasuno R., Takagi H. Nitric oxide signaling in yeast. *J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 100(22), 9483-9497, 2016
- Shen Q., Zhou W., Li H., Hu L., Mo H. ROS involves the fungicidal actions of thymol against spores of *Aspergillus flavus* via the induction of nitric oxide. *PLoS One*, 11(5), e0155647, 2016
- Machida K., Tanaka T., Fujita K., Taniguchi M. Farnesol-induced generation of reactive oxygen species via indirect inhibition of the mitochondrial electron transport chain in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, 180(17), 4460-4465, 1998

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Oiki S., Ninomiya A., Urayama S., and Hagiwara D.
2. 発表標題 Cellular response to antifungals and the role of nitric oxide production in <i>Aspergillus fumigatus</i> .
3. 学会等名 The 8th Global Network Forum on Infection and Immunity (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Oiki S., Ninomiya A., Urayama S., and Hagiwara D.
2. 発表標題 Cellular response to farnesol and the role of nitric oxide production in <i>Aspergillus fumigatus</i> .
3. 学会等名 15th European Conference on Fungal Genetics (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Oiki S., Ninomiya A., Urayama S., and Hagiwara D.
2. 発表標題 Cellular response to farnesol and the role of nitric oxide production in <i>Aspergillus fumigatus</i> .
3. 学会等名 Satellite Workshop Asperfest 17 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 老木紗予子, 二宮章洋, 浦山俊一, 萩原大祐.
2. 発表標題 <i>Aspergillus fumigatus</i> のファルネソール応答機構における一酸化窒素の機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020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
---------	---------