

令和元年5月17日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08299

研究課題名(和文) 薬剤誘導型酸化ストレスによる薬剤排出ポンプの活性および遺伝子発現の制御

研究課題名(英文) Regulation of drug efflux pump's activities and gene expression by drug-induced oxidative stress

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：フェニルプロパノイド類は、多剤耐性薬剤排出ポンプの遺伝子発現やその活性の抑制を介して相乗的な抗真菌作用を発揮する。一方、本物質群は活性酸素種も産生誘導する。本研究では、薬剤で誘導された酸化ストレスが多剤耐性薬剤排出ポンプの遺伝子発現やその活性に及ぼす影響について検討した。その結果、フェニルプロパノイド様の構造を含むショウガ由来のデヒドロジンゲロンは活性酸素種を産生させなかったが、薬剤排出ポンプの遺伝子発現やその活性を抑制し相乗的な抗真菌作用を示した。しかし、その効果はフェニルプロパノイド類よりは弱かった。以上より、活性酸素種は薬剤排出ポンプの遺伝子発現やその活性の抑制を促進することが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多剤耐性に関与する薬剤排出ポンプの遺伝子発現やその活性を抑制する薬剤には2種類あり、すなわち活性酸素種などの酸化ストレスを誘導するものとしいない薬剤があることが判明した。加えて、酸化ストレスを与える薬剤のほうがその抑制効果は強かった。以上より、真菌の薬剤耐性に打ち勝つ薬剤、さらに、真菌とヒトの薬剤排出ポンプは似ていることから、抗がん剤の薬剤耐性を抑制する薬を開発するにあたって、活性酸素種の誘導産生の有無は重要な指標となると予想される。

研究成果の概要(英文)：Phenyl propanoids exhibit synergistic antifungal effects via the restriction of drug efflux pump's activities and gene expression. In addition, these compounds induce the production of reactive oxygen species (ROS). In this study, we investigated the effect of drug-induced oxidative stress on their activities and gene expression. Dehydrozingerone, derived from the rhizomes of ginger and contains a partial structure similar to phenyl propanoids, did not induced ROS. However, this showed synergistic antifungal effects via the restriction of drug efflux pump's activities and gene expression. Furthermore, the effects were weaker than those of the phenylpropanoids. Therefore, drug-induced ROS accelerated the restriction of the restriction of drug efflux pump's activities and gene expression.

研究分野：生物系薬学

キーワード：薬剤耐性 酸化ストレス 活性酸素種 薬剤排出ポンプ 抗真菌 デヒドロジンゲロン

様式 C-19, F-19-1, Z-19, CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

20 世紀後半、人類は微生物による感染症を抗生物質により克服できると期待していた。一方、抗生物質の乱用は多剤耐性菌を頻出させてきた。1990 年代以降、新薬の開発が困難となってきており、薬剤耐性菌の抑制は未解決の課題として残されている。近年、感染症の病原体として、原核生物の細菌に加えて、真核生物の真菌が注目されてきている。真菌による日和見感染症は、エイズ、高齢化、臓器移植後の免疫抑制剤の長期投与、抗ガン剤によるガンの化学療法などにより免疫力が低下した人が増加しており、多発してきている。真菌の治療に用いられる抗真菌薬は真菌がヒトと同じ真核生物であることから副作用を伴い、より副作用の少ない薬の開発が求められている。しかしながら、その開発は細菌の薬よりも困難であり、許認可されている薬の数は細菌のそれよりずっと少ない。現在、臨床で多用されているアゾール系抗真菌薬に対する耐性菌が多発しており、耐性菌への対策が必須となっている。

薬剤耐性には様々なメカニズムが報告されているが、薬剤分解酵素の獲得、薬剤のターゲットであるタンパク質の構造変化、薬剤排出ポンプの亢進などが挙げられる。このうち薬剤排出ポンプは、構造や性質が全く異なる様々な種類の薬の排出に関わっており、一度出現した耐性菌は多剤耐性を示すことが多く、それらを抑えることは非常に困難となっている。一方、ヒトの場合、ガンが再発した時、抗ガン剤が効きにくくなることは常識となっており、それには薬剤排出ポンプの亢進が深く関与している。真菌とヒトの薬剤排出ポンプは遺伝子や構造が類似しており、真菌の薬剤排出機構を抑制できれば、それをヒトの抗ガン治療へ応用することも十分可能である。

我々はアニス種子より抽出したアニスオイルの主成分トランス・アネトールに、真菌である出芽酵母および病原性酵母 *Candida albicans* の薬剤排出を抑制する効果を見いだしてきた。アネトールは出芽酵母の最も主要な多剤耐性薬剤排出ポンプ *PDR5* 遺伝子をはじめとするいくつかの薬剤排出ポンプの遺伝子発現を抑制し、既承認の抗生物質と組み合わせた場合、優れた相乗効果を発揮し、薬効を長時間持続させる。

多剤耐性薬剤排出ポンプの調節機構は、意外にも、そのほとんどが未解明のままである。例えば、研究が進んでいる出芽酵母でさえ、薬剤排出ポンプ遺伝子の転写は排出ポンプに特化した二つの転写因子により促進されることが知られているのみである。本転写因子の一つは、さらにタンパク質の正常なフォールディング制御に関与する分子シャペロンや、アゾール系抗真菌薬の結合により、その転写が促進される。もう一方の転写因子は、酸素呼吸が不全であるミトコンドリア DNA 欠損株において、その転写が促進される。以上の報告から、出芽酵母の場合、何らかのストレスに対する防御機構の一つとして薬剤排出ポンプを亢進させているように思われる。

多くの生物は酸素のある環境で暮らしていることから酸化ストレスを避けることは非常に困難である。最近、我々の研究で、脂溶性抗酸化剤などで出芽酵母を処理すると薬剤排出能がアップすることがわかってきた。薬剤排出を抑制するアネトールは、呼吸阻害に起因する活性酸素種を産生させ酸化ストレスを酵母に与える。加えて、アネトールによる薬剤排出抑制は α -トコフェロールによってキャンセルされた。さらに、ミトコンドリア DNA 欠損株では、呼吸不全であるため、呼吸鎖に依存した活性酸素種の産生は認められず薬剤耐性となる。以上より、我々は酸化ストレスが薬剤排出ポンプの活性や遺伝子発現に影響を与えているという仮説を打ち立てた。すなわち、強い酸化ストレスにより薬剤排出は抑制される。逆に、酸化ストレスが弱いと薬剤排出は盛んになる。また、通常の生育条件下では適度な酸化ストレスが細胞に与えられて、薬剤排出は弱いながらも恒常的に認められる。

2. 研究の目的

抗生物質の乱用により多剤耐性真菌の頻出が問題となってきている。加えて、ガンの再発時に抗ガン剤が無効となった腫瘍の多剤耐性化はガンの化学療法を困難にしている。両者に共通するのは薬剤排出ポンプによる薬剤の排出である。本研究代表者らは「酸化ストレスの強弱が薬剤排出を制御している」という実験結果を得た。本研究では、薬剤によって誘導される酸化ストレスが薬剤排出ポンプ群の遺伝子発現や排出活性に与える影響を網羅的に調べ、酸化ストレスによる薬剤排出ポンプの抑制が一般化できるかどうかを検証し、最終的に、酸化ストレスの種類や強弱によって薬剤排出ポンプをコントロールできるかを検討する。本研究で得られた成果は薬剤耐性を抑える薬を開発する上で有益な情報を提供すると大いに期待される。

3. 研究の方法

(1) 細胞膜障害および細胞膜 H^+ -ATPase のアッセイ

・細胞膜障害

YPD 培地にて増殖させた出芽酵母を S-buffer にて洗浄し、同 buffer に 10^8 cells/mL になるように再懸濁し、薬剤を懸濁液に添加し、30 分で 2 時間インキュベーションした。その後、遠心上清に含まれるカリウムイオンおよび 260 nm 吸収物質をそれぞれ、 K^+ ion assay kit (HACH Co.) および 260 nm の吸収を利用して定量し、薬剤が細胞膜障害を引き起こすかどうか検討した。

・ H^+ -ATPase

YPD 培地で増殖させた出芽酵母の菌体を、イオン交換水で 2 回洗浄し、 5×10^7 cells/mL になるようにイオン交換水に再懸濁した。次いで、その懸濁液に薬剤を添加し、さらに 2% グルコースを加え、30 分でインキュベーションを開始し、10 分後まで経時的に懸濁液の pH を測定した。

(2) リアルタイム PCR による遺伝子発現量の定量

出芽酵母を、各薬剤を含む麦芽末液体培地にて30℃で72時間まで静置培養した。経時的に培養液をサンプリングし、その菌体より、RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany)を用いて、Total RNAを抽出した。なお、酵母の細胞壁はZymolyase 20T(生化学バイオビジネス社)を用いて溶解した。cDNA合成は常法により行った。その後、Sso Advanced Universal SYBR Green Supermix (BIO RAD)を用いるリアルタイムPCR(CFX-Connect (BIO-RAD))により遺伝子発現量を定量した。*PDR5*の遺伝子発現量はハウスキープ遺伝子*ACT1*の遺伝子発現量に対する相対量で示した。使用したプライマーは以下の通りである。

ACT1 Forward 5'-CGTCTGGATTGGTGGTTCTAT-3'
Reverse 5'-GGACCACTTTCGTCGTATTCTT-3'

PDR5 Forward 5'-ATTCACCAACCCTCTGCTATT-3'
Reverse 5'-TTACAACCTTCGCCCAAGTC-3'

(3) ローダミン 6G を用いる薬剤排出ポンプのアッセイ

ローダミン 6G は薬剤排出ポンプによって細胞外へ排出される蛍光低分子である。本物質を用いて薬剤排出ポンプの活性を測定した。まず、出芽酵母を麦芽末液体培地 100 mL に少量懸濁し、30℃で16~18時間振盪培養し、PBS buffer で菌体を洗浄した後、同 buffer へ再懸濁したものを、30℃で16~18時間、振盪した。その後、OD600 = 50 となるよう PBS buffer に懸濁し、10 μM となるようローダミン 6G を加え、30℃で15~20分間振盪し、菌体を染色した。染色した菌体を PBS buffer に OD600 = 15 となるよう再懸濁した。さらにグルコースを 10 mM となるよう加えた。経時的にサンプリングした懸濁液から遠心分離にて菌体を除き、上清中に含まれるローダミン 6G の量を、蛍光プレートリーダー(励起波長 485 nm, 蛍光波長 535 nm)を用いて定量した。

(4) 活性酸素種の定量

細胞内の活性酸素種は主として 2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA)を用いて行った。アセチル基のついた DCFH-DA は細胞透過性を示し、細胞に取り込まれるとエステラーゼによって脱アセチル化され、非蛍光型の 2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein (DCFH)に変化する。DCFH は活性酸素種により酸化され、蛍光性 2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein に変化する。この蛍光強度を測定することにより、細胞内の ROS レベルを測定した。まず、麦芽末液体培地を用いて OD600 = 1.0 となるよう出芽酵母の懸濁液を準備し、そこに 40 μM DCFH-DA を添加し、30℃で1時間振盪させた。さらにテストする薬剤を懸濁液に加え、30℃で1時間振盪した。その後、PBS buffer に再懸濁した細胞における DCF の蛍光量を、蛍光プレートリーダー(励起波長 485 nm, 測定波長 535 nm)を用いて定量した。

4. 研究成果

(1) フェニルプロパノイド類は、ドデカノールやフルコナゾールなど含む他の薬剤と併用すると、多剤耐性薬剤排出ポンプの遺伝子発現抑制を介して相乗的かつ持続的な抗真菌作用を発揮する。フェニルプロパノイド類の一つであるアネトールは遺伝子発現抑制に加えて、細胞膜上にある薬剤排出ポンプの酵素活性を直接抑制している可能性も示唆された。本物質群が非特異的に細胞膜および細胞膜上のタンパク質類に影響を与えている可能性があるため、本物質群が細胞膜障害作用を示すか、また細胞膜上の他のタンパク質 H^+ -ATPase の活性を抑制するのかが検討した。その結果、本物質群は細胞膜障害作用を示さず、 H^+ -ATPase の活性も全く阻害していないことが判った。以上より、フェニルプロパノイド類は薬剤排出ポンプの活性だけを特異的に阻害している可能性が強く示唆された。

(2) フェニルプロパノイド類と構造・物性が類似する物質としてウコンの根茎に含まれる脂溶性物質クルクミンが挙げられる。本物質は様々な生理活性を示す可能性が報告されている。しかしながら、微生物に対する活性についてはほとんど報告されていない。出芽酵母をクルクミンで単独処理した場合、その生育にはほとんど影響が見られなかったが、一過性の殺菌作用を示すドデカノールとクルクミンとを組み合わせた場合、相乗的な抗真菌作用を発揮すること、また、クルクミンは薬剤排出ポンプの活性を抑制していると示唆された。さらに、クルクミンが薬剤排出ポンプの遺伝子発現に影響するか検討した。その結果、ドデカノール処理することで薬剤排出ポンプ *PDR5* の発現量が增大するが、クルクミンを併用させるとその発現量が大幅に低下することが判明した。以上の結果より、クルクミンは出芽酵母の薬剤排出を抑制することでドデカノールの菌体外への排出を抑制し、相乗的抗真菌作用を示すことが示唆された。

(3) フェニルプロパノイド類の多くは活性酸素種も産生誘導し、これが薬剤排出ポンプ遺伝子発現を抑制する可能性がある。フェニルプロパノイド類について活性酸素種(ROS)に関する構造活性相関を行うとともに、ROS の由来についても検討を行った。その結果、炭素数 3-6 程度の炭化水素側鎖が ROS 産生誘導と抗菌活性の発現に必須であることがわかった。また、ミトコンドリア DNA 欠損によって呼吸不全となった rho0 株に対してもフェニルプロパノイド類は ROS を産生誘導したことから、誘導された ROS は呼吸鎖由来ではないことがわかった。

(4) 上記の(2)において、フェニルプロパノイド類と構造・物性が類似する物質であるクルクミンに薬剤排出ポンプ抑制活性を見いだしていたが、高い脂溶性のため、応用の範囲に限られることが判明した。一方、ショウガの根茎に微量含まれるデヒドロジンゲロンはクルクミンの1/2の化学構造を持つ水溶性の高い分子である。出芽酵母をデヒドロジンゲロンで単独処理した場合、その生育には全く影響が見られなかったが、一過性の殺菌作用を示すドデカノールとデヒドロジンゲロンを併用した場合、相乗的な抗真菌作用を発揮すること、また、デヒドロジンゲロンは薬剤排出ポンプの活性を抑制していることがわかった。さらに、デヒドロジンゲロンが薬剤排出ポンプの遺伝子発現に影響するか検討した。その結果、ドデカノール処理することで多剤耐性薬剤排出ポンプ *PDR5* の発現量が增大するが、デヒドロジンゲロンを併用させるとその発現量が低下することが判明した。以上の結果より、デヒドロジンゲロンは出芽酵母の薬剤排出を抑制することでドデカノールの菌体外への排出を抑制し、相乗的な抗真菌作用を示すことが示唆された。

(5) フェニルプロパノイド類は活性酸素種も誘導産生することから、薬剤排出抑制と活性酸素種との関係を検討した。まず、クルクミンやデヒドロジンゲロンが活性酸素種を誘導するかどうかを検討した。その結果、クルクミンは活性酸素種の測定に用いるプローブと蛍光波長が重なっており、活性酸素種の定量は不可能であった。一方、デヒドロジンゲロンは活性酸素種を全く産生誘導しないことが判明した。従って、薬剤排出ポンプの遺伝子発現の制御には必ずしも活性酸素種の産生誘導は必須ではないことがわかった。また、薬剤排出ポンプによって直接排出される蛍光色素ローダミン 6G を用いてアッセイを行った結果、クルクミンおよびデヒドロジンゲロンは薬剤排出ポンプ遺伝子 *PDR5* の発現抑制に加えて、薬剤排出を直接抑制している可能性も示唆された。加えて、デヒドロジンゲロンの薬剤排出抑制効果はフェニルプロパノイド類やクルクミンより弱いことから、活性酸素種は薬剤排出抑制効果を増強する可能性が示唆された。一方、活性酸素種の由来について検討したが、ミトコンドリア DNA 欠損株や NADPH oxidase 欠損株においても、フェニルプロパノイド類は活性酸素種を産生誘導したことから、残念ながら、本研究の範囲では活性酸素種の由来を特定することはできなかった。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文) (計 7 件)

藤田 憲一, 家中 可奈絵, 田中 克幸「植物由来成分の安全・安心な防腐効力増強剤の探索」*科学と工業*, 2019, 93(4), 108-114. <https://osakaira.com/magazine/> 査読なし

Yamawaki C, Oyama M, Yamaguchi Y, Ogita A, Tanaka T, **Fujita K**. Curcumin potentiates the fungicidal effect of dodecanol by inhibiting drug efflux in wild-type budding yeast. *Letters in Applied Microbiology* 2019, 68(1), 17-23. 10.1111/lam.13083 査読あり

Yamawaki C, Yamaguchi Y, Ogita A, Tanaka T, **Fujita K**. Dehydrozingerone exhibits synergistic antifungal activities in combination with dodecanol against budding yeast via the restriction of multidrug resistance. *Planta Medica International Open*, 2018, 5(02), e61-e67. 10.1055/a-0757-7991 査読あり

Hayashi K, Yamaguchi Y, Ogita A, Tanaka T, Kubo I, **Fujita K**. Effect of nagilactone E on cell morphology and glucan biosynthesis in budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Fitoterapia*, 2018, 128, 112-117. 10.1016/j.fitote.2018.05.003 査読あり

Ikegawa C, Ogita A, Doi T, Kumazawa F, **Fujita K**, Tanaka T. Involvement of Irreversible Vacuolar Membrane Fragmentation in the Lethality of Food Emulsifier Diglycerol Monolaurate against Budding Yeast. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 2017, 65(28), 5650-5656. 10.1021/acs.jafc.7b01580 査読あり

Iida M, Yamada K, Nango Y, Yamaguchi Y, Ogita A, **Fujita K**, Tanaka T. Vacuolar H⁺-ATPase subunit Vma1p functions as the molecular ligand in the vacuole-targeting fungicidal activity of polymyxin B. *Microbiology* 2017, 163(4), 531-540. 10.1099/mic.0.000450 査読あり

Fujita K, Ishikura T, Jono Y, Yamaguchi Y, Ogita A, Kubo I, Tanaka T. Anethole potentiates dodecanol's fungicidal activity by reducing *PDR5* expression in budding yeast. *Biochimica et Biophysica Acta General Subjects* 2017, 1861(2), 477-484. 10.1016/j.bbagen.2016.09.010 査読あり

(学会発表) (計 8 件)

尾山 昌弘, 山口 良弘, 荻田 亮, 田中 俊雄, **藤田 憲一**「出芽酵母における薬剤排出ポンプ遺伝子の発現に関わる新規因子の探索」日本農芸化学会 2019 年度大会, 2019 年

尾山昌弘, 山脇千佳, 山口良弘, 荻田亮, 田中俊雄, **藤田憲一**「ショウガ由来のデヒドロジンゲロンが出芽酵母の薬剤耐性に及ぼす影響」日本生物工学会第 70 回大会, 2018 年

林 謙吾, 尾山 昌弘, 山口 良弘, 荻田 亮, 田中 俊雄, **藤田 憲一**「マキ科植物由来成分 nagilactone E が出芽酵母の細胞形態に及ぼす影響」日本農芸化学会 2018 年度大会, 2018 年

Fujita K, Kubo I. Naturally occurring antimicrobial agents and synergistic effects in their combination. BIT's 15th Annual Congress of International Drug Discovery Science and Technology-Japan 2017, 2017 年

村田 和加恵, 長谷川 真梨菜, 酒瀬川 世瑠, 荻田 亮, **藤田 憲一**, 田中 俊雄「出芽酵母における梨効果添加による経時寿命の延長」日本生物工学会第 69 回大会, 2017 年

池側 智香子, 土井 剛志, 熊澤 史貴, 村田 和加恵, 荻田 亮, 藤田 憲一, 田中 俊雄「非イオン性界面活性剤ジグリセロールモノラウレートによる不可逆的な真菌液胞膜障害作用」日本生物工学会第 69 回大会, 2017 年

山脇 千佳, 山口 良弘, 荻田 亮, 田中 俊雄, 藤田 憲一「クルクミンが出芽酵母の薬剤排出およびその関連遺伝子の発現に与える影響」日本農芸化学会 2017 年度大会, 2017 年

林 謙吾, 山口 良弘, 荻田 亮, 田中 俊雄, 藤田 憲一「マキ科植物由来成分ナギラクトン E の抗真菌作用」日本農芸化学会 2017 年度大会, 2017 年

〔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:

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:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 臼杵 克之助

ローマ字氏名: (USUKI, Yoshinosuke)

所属研究機関名: 大阪市立大学

部局名: 大学院理学研究科

職名: 准教授

研究者番号(8 桁): 30224651

(2)研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

※ 科研費による研究は, 研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため, 研究の実施や研究成果の公表等については, 国の要請等に基づくものではなく, その研究成果に関する見解や責任は, 研究者個人に帰属されます。