

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年5月24日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18671

研究課題名(和文)トランスクリプトームによる糸状菌環境応答能の解明とその基盤情報整備

研究課題名(英文) Investigation of transcriptome responses upon exposure to diverse environmental changes in *Aspergillus fumigatus*

研究代表者

高橋 弘喜 (Takahashi, Hiroki)

千葉大学・真菌医学研究センター・准教授

研究者番号：60548460

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：微生物の環境ストレス応答を分子レベルで明らかにすることは、菌の生育を人為的に制御するための非常に有益な知見となる。本研究では、病原糸状菌アスペルギルスフミガタスの環境ストレス応答に関わる遺伝子の探索を次世代シーケンサーと情報解析を駆使して実現し、糸状菌の転写ネットワークを包括的に解明するとともに、糸状菌の遺伝子発現応答の体系化を実施した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糸状菌アスペルギルス属真菌には、本研究で対象とした医療上重要なアスペルギルスフミガタスと、発酵を中心に幅広く産業利用されている近縁種が存在している。この多面的な性質を持つ糸状菌の環境ストレス応答能の理解は、医療上及び産業応用上双方において大変重要な課題であるにも関わらず、未だ基礎的知見は限定されていた。本研究では、環境ストレス時の転写応答の解析から、様々な環境ストレスに応答する遺伝子群を新たに明らかにできた。これらの基礎的知見は、新たな治療標的の創出や、高度育種に向けた標的遺伝子の探索に有用となる。

研究成果の概要(英文)：Microorganisms have to survive in a wide variety of ecological niches through the adaptation to diverse environmental stresses. It is of great importance to reveal the responses to the environmental stresses in microorganisms. In this study, I studied the transcriptome responses in filamentous fungi *Aspergillus fumigatus* by using NGS technology. I analyzed the transcriptome upon exposure to diverse environmental stresses. In particular, I identified the stress-responsive genes as the genes with highly variable expressions, which could be prerequisite for the adaptation. Through this study, I systematically classified the co-expressed genes.

研究分野：情報生物学

キーワード：環境・細胞応答 転写ネットワーク トランスクリプトーム アスペルギルスフミガタス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

地球環境中に生息する微生物は、苛酷な環境ストレスに適応し生存している。環境ストレスに応答して生体内の多くの遺伝子発現を厳密に制御することは、生存戦略として非常に重要である。酵母を含むモデル生物では、ゲノム科学的手法によって様々なストレス条件下での遺伝子発現応答が体系化され、遺伝子発現プロファイルの相同性（共発現）情報を含む膨大なデータが多くの研究の基盤情報として重要な役割を果たしている。

糸状菌であるアスペルギルス属真菌は、ヒト及び植物の病原菌として我々の健康を脅かすことから、我々人類と切り離すことができない環境微生物である。その病原性の発現には、宿主への感染過程で晒される多様な環境ストレスに適応できるという形質が必須である。糸状菌の環境ストレス応答能を分子レベルで包括的に理解できれば、生育制御の実現に向けた重要な知見となる。これまでに同じ真菌である酵母のホモログ遺伝子を中心に、糸状菌の環境ストレス応答能の解明が進められているものの、酵母のホモログ遺伝子のみでは説明できず、未解明な部分が多い。そこで、アスペルギルス属真菌の環境ストレス応答能を包括的に理解するためには、トランスクリプトーム解析が効果的であると考えられるが、従来のマイクロアレイは、プローブ配列の設計が必要なため、ゲノムサイズが大きい微生物やゲノム情報の乏しい微生物への応用は限定され、解析が難しかった。近年急速に発達した次世代シーケンサーは、高精度かつ網羅的なトランスクリプトーム解析が糸状菌などの非モデル微生物においても容易に実現できる。次世代シーケンサーを駆使して、糸状菌の環境ストレス応答に関わる遺伝子を網羅的に明らかにすれば、真菌に普遍的転写ネットワーク、糸状菌固有の転写ネットワーク双方に迫ることができる。さらに、遺伝子発現応答の体系化は、今後の糸状菌研究を支える基盤情報となる。

2. 研究の目的

微生物の環境ストレス応答を分子レベルで明らかにすることは、菌の生育を人為的に制御するための非常に有益な知見となる。本研究では、糸状菌 *Aspergillus fumigatus* の環境ストレス応答に関わる遺伝子の探索を次世代シーケンサーと情報解析を駆使して実現し、糸状菌の転写ネットワークを包括的に解明するとともに、糸状菌の遺伝子発現応答を体系化することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ストレス付与時の菌系トランスクリプトーム解析

環境ストレスとして、熱ストレス、酸化ストレス、浸透圧ストレスを選抜した。それぞれのストレス付与時の菌系を回収し、NGSによるRNA-seq解析を行う。各ストレス付与時に、遺伝子発現がどのように変化するかを調べる。

(2) Stress-responsive 遺伝子の同定

試験した各ストレスで発現応答した遺伝子群のリストを整理する。各ストレス固有の遺伝子や、全ストレスで変動を示す遺伝子群を探索する。

(3) 抗真菌薬アゾールの標的経路の遺伝発現変動の解析

Ergosterol 生合成経路は、抗真菌薬の標的である。生合成遺伝子が、環境ストレスによってどのように発現変動するかを調べる。

4. 研究成果

(1) 熱ストレス (HS1: 30 → 37、HS1: 30 → 48)、酸化ストレス (SS)、浸透圧ストレス (OS) 付与後の遺伝発現解析を行った。ストレス付与後、0分、15分、30分、60分、120分、180分の計6点でサンプリングを行い、シーケンスデータを取得した。得られたデータから遺伝子発現量を算出した。

遺伝子発現変化を俯瞰したところ、熱ストレスでは、遺伝子発現が漸進的に変動していた。それに対して、酸化ストレス、浸透圧ストレスでは、一過的な発現変動を示すことが明らかとなった (Fig. 1)。

HS1では、1,598遺伝子、HS2では、3,383遺伝子、SSでは、1,735遺伝子、OSでは、1,085遺伝子がそれぞれ発現変動していることが明らかとなった。既報のマイクロアレイによるトランスクリプトームデータと比較した結果、新たに3,000以上もの遺伝子が、熱ストレス応答因子として同定できた。

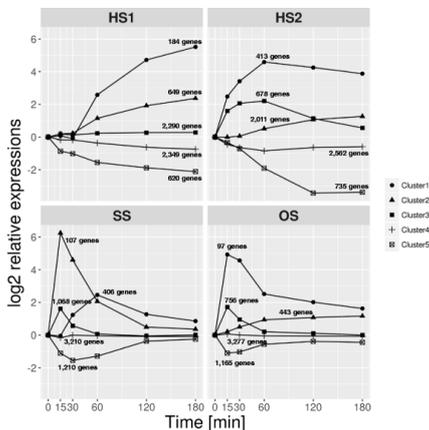


Fig. 1 遺伝子発現変化の俯瞰図(熱ストレス1:HS1、熱ストレス2:HS2、酸化ストレス:SS、浸透圧ストレス:OS)

(2) 試験したいずれの条件でも発現変動した遺伝子を探索したところ、266 遺伝子を同定することができた。これら "Stress-responsive" 遺伝子は、熱ストレス、酸化ストレス、浸透圧ストレスに晒されると、その発現を変動させ、機能を発現していると考えられる。"Stress-responsive" 遺伝子のうち、77 遺伝子が、酵母でのストレス応答遺伝子(ScESR)と相同性を示した。94 遺伝子は、酵母遺伝子と相同性を示したものの、酵母ではストレス応答因子ではないことから、*A. fumigatus*において独自にその機能を獲得したことが示唆された。95 遺伝子は、酵母遺伝子との相同性はなく、糸状菌に固有の遺伝子であった。以上のことから、*A. fumigatus*の環境応答は、酵母と共通の遺伝子セットと糸状菌固有の遺伝子セットの機能を統合して、様々な環境変動に適応していることが示唆された。

例えば、Afu5g09910 (a putative p-nitroreductase-family protein) では、特に顕著な発現変動が観測された。これまでに、ヒト好中球やグリオトキシン暴露によっても Afu5g09910 の発現変動が観察されていることから、環境ストレス応答において重要な役割を果たしているものと考えられる。今後の詳細な機能解析が求められる。

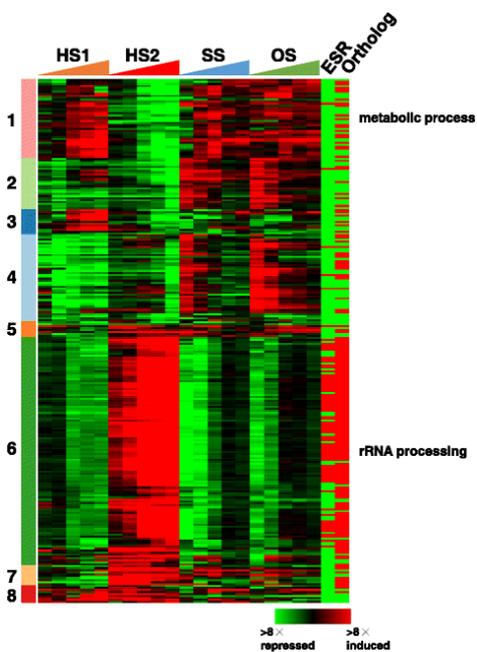


Fig. 2 Stress-responsive 遺伝子の発現プロファイル

(3) アゾール標的経路の遺伝子発現変化

酸化ストレス、浸透圧ストレスによって、Ergosterol 生合成遺伝子の発現低下が認められた (Fig. 3)。宿主内環境下では、これらのストレスが想定されることから、アゾール薬の期待されている効果が低下している可能性が示唆された。本研究で整備した遺伝子発現情報は、今後の *A. fumigatus* の研究における基礎データとして数多く利用されることが期待される。

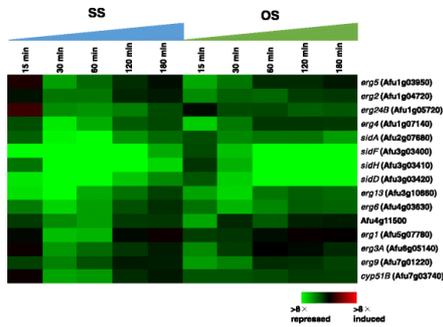


Fig. 3 Ergosterol 生合成遺伝子の発現プロファイル

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計9件）

Takahashi-Nakaguchi A, Sakai K, Takahashi H, Hagiwara D, Toyotome T, Chibana H, Watanabe A, Yaguchi T, Yamaguchi M, Kamei K, Gono T. *Aspergillus fumigatus* adhesion factors in dormant conidia revealed through comparative phenotypic and transcriptomic analyses. *Cell Microbiol* (2018) 20(3). doi: 10.1111/cmi.12802. 査読有り

Hagiwara D, Takahashi H, Takagi H, Watanabe A, Kamei K. Heterogeneity in Pathogenicity-related Properties and Stress Tolerance in *Aspergillus fumigatus* Clinical Isolates. *Med Mycol J* (2018) 59(4):E63-E70. doi: 10.3314/mmj.18-00007. 査読有り

Toyotome T, Hagiwara D, Takahashi H, Watanabe A, Kamei K. Emerging Antifungal Drug Resistance in *Aspergillus fumigatus* and Among Other Species of *Aspergillus*. *Current Fungal Infection Reports* (2018) 12(3):105-111. 査読有り

Hagiwara D, Arai T, Takahashi H, Kusuya Y, Watanabe A, Kamei K. Non-cyp51A Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus* Isolates with Mutation in HMG-CoA Reductase. *Emerg Infect Dis* (2018) 24(10):1889-1897. doi: 10.3201/eid2410.180730. 査読有り

Nakamura S, Sato H, Tanaka R, Kusuya Y, Takahashi H, Yaguchi T. Ribosomal subunit protein typing using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for the identification and discrimination of *Aspergillus* species. *BMC Microbiol* (2017) 17(1):100. doi: 10.1186/s12866-017-1009-3. 査読有り

Kusuya Y, Hagiwara D, Sakai K, Yaguchi T, Gono T, Takahashi H. Transcription factor Aftmac1 controls copper import machinery in *Aspergillus fumigatus*. *Curr Genet* (2017) 63(4):777-789. doi: 10.1007/s00294-017-0681-z. 査読有り

Takahashi H, Kusuya Y, Hagiwara D, Takahashi-Nakaguchi A, Sakai K, Gono T. Global gene expression reveals stress-responsive genes in *Aspergillus fumigatus* mycelia. *BMC Genomics* (2017) 18(1):942. doi: 10.1186/s12864-017-4316-z. 査読有り

Hagiwara D, Takahashi H, Kusuya Y, Kawamoto S, Kamei K, Gono T. Comparative transcriptome analysis revealing dormant conidia and germination associated genes in *Aspergillus* species: an essential role for AtfA in conidial dormancy. *BMC Genomics* (2016) 17:358. doi: 10.1186/s12864-016-2689-z. 査読有り

Imashimizu M, Afek A, Takahashi H, Lubkowska L, Lukatsky DB. Control of transcriptional pausing by biased thermal fluctuations on repetitive genomic sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2016) 113(47):E7409-E7417. 査読有り

〔学会発表〕（計18件）

高橋弘喜. 病原真菌アスペルギルスフミガタスの表現型解析および遺伝型解析. 感染症診断と治療におけるゲノム解析. 2019年3月15日. 伊勢原市

Takahashi H, Umemura M, Ninomiya A, Shimizu M, Kusuya Y, Urayama S, Watanabe A, Kamei K, Yaguchi T, Hagiwara D. Diversified transcriptional regulation of secondary metabolic gene clusters in closely related *Aspergillus* species. 30th Fungal Genetics Conference. 2019/3

楠屋陽子, 辺彩, 萩原大祐, 矢口貴志, 高橋弘喜. *Aspergillus fumigatus* の銅代謝転写因子 Aftmac1 及び aceA の機能解析. 第18回糸状菌分子生物学コンファレンス. 2018年11月15日-16日. 長岡市

Bian C, Kusuya Y, Hagiwara D, Watanabe A, Takahashi H. Investigation of the in vivo evolution of *Aspergillus fumigatus*. 第18回糸状菌分子生物学コンファレンス. 2018年11月15日-16日. 長岡市

高橋弘喜．病原真菌 *Aspergillus fumigatus* の環境応答能の解析．第 101 回日本細菌学会
関東支部総会．2018 年 11 月 1 日-2 日．東京

高橋弘喜．進歩が著しいマイクロバイオームおよび微生物ゲノム研究法．第 117 回日本皮
膚科学会総会．2018 年 5 月 31 日-6 月 3 日．広島

Takada S, Takaya A, Matsuoka Y, Takahashi H, Katayama Y, Taniguchi T, Igari H, Shimojo
N, Matsue H. Whole-genome sequencing for analysis of genetic diversity in a neonatal
MRSA outbreak. 第 91 回日本細菌学会総会．2018 年 3 月 27 日-29 日．福岡市

豊留孝仁, 大西賢治, 楠屋陽子, 石原潤一, 萩原大祐, 渡辺哲, 亀井克彦, 高橋弘喜．テ
ブコナゾール選択は *Aspergillus fumigatus* の医療用アゾールへの交差耐性を誘導する．
第 91 回日本細菌学会総会．2018 年 3 月 27 日-29 日．福岡市

楠屋陽子, 辺彩, 萩原大祐, 矢口貴志, 高橋弘喜．*Aspergillus fumigatus* の銅代謝機構
の解析．日本農芸化学会 2018 年度大会．2018 年 3 月 15 日-18 日．名古屋

Bian C, Hagiwara D, Kusuya Y, Watanabe A, Takahashi H. Phenotypic variations indicate
an in vivo evolution in clinical isolates of *Aspergillus fumigatus*. 日本農芸化学
会 2018 年度大会．2018 年 3 月 15 日-18 日．名古屋

Hagiwara D, Kowalski CH, Cramer RA, Takahashi H, Takagi H, Watanabe A, Kamei K.
Diversity of *Aspergillus fumigatus* clinical strains in the potential
pathogenicity-related properties. 8th Advances Against Aspergillosis. Feb 1-3, 2018,
Lisbon, Portugal

楠屋陽子, 辺彩, 萩原大祐, 矢口貴志, 高橋弘喜．*Aspergillus fumigatus* の銅代謝転写
因子 *Afmac1* 及び *cufA* の機能解析．第 17 回糸状菌分子生物学コンファレンス．2017 年
11 月 16 日-17 日．佐賀市

Bian C, Hagiwara D, Kusuya Y, Watanabe A, Takahashi H. Investigation of adaptation
to environmental stimuli in *Aspergillus fumigatus* during infection. 第 17 回糸状
菌分子生物学コンファレンス．2017 年 11 月 16 日-17 日．佐賀市

萩原大祐, 高橋弘喜, 矢口貴志, 酒井香奈江, 楠屋陽子, 渡辺哲, 亀井克彦．*Aspergillus
fumigatus* 隠蔽種におけるグリオトキシン産生能の検討．真菌症フォーラム第 23 回学術
集会．2017 年 5 月 27 日．東京

高橋弘喜．病原真菌アスペルギルスの比較ゲノム解析．国立感染症研究所 学友会共催 シ
ンポジウム 感染症とゲノム解析．2017 年 3 月 17 日．東村山市．

酒井香奈江, 楠屋陽子, 高橋弘喜, 五ノ井透．*Aspergillus fumigatus* におけるストレス
応答遺伝子の解析 第 16 回糸状菌分子生物学研究コンファレンス 2016 年 11 月 17-18 日,
京都府宇治市．

楠屋陽子, 萩原大祐, 酒井香奈江, 矢口貴志, 五ノ井透, 高橋弘喜．*Aspergillus fumigatus*
の銅代謝転写因子 *Afmac1* の機能解析 第 16 回糸状菌分子生物学研究コンファレンス 2016
年 11 月 17-18 日, 京都府宇治市．

Kusuya Y, Takahashi H. Transcriptome response to environmental changes in pathogenic
fungi *Aspergillus fumigatus*. Institute for global prominent research kickoff
symposium. Nov, 14, 2016, Chiba, Japan.

〔図書〕(計 1 件)

高橋弘喜．医薬ジャーナル社，化学療法の領域．組成解析(真菌)．2017 年 33(7):
1435-1439．

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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)研究協力者

研究協力者氏名：楠屋 陽子

ローマ字氏名：(KUSUYA, Yoko)

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。