

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02864

研究課題名(和文) 転写因子の機能解析から迫る糸状菌の薬剤耐性機構

研究課題名(英文) Elucidation of drug resistance mechanisms in filamentous fungi by functional analyses of transcription factors

研究代表者

五味 勝也 (Gomi, Katsuya)

東北大学・農学研究科・教授

研究者番号：60302197

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：アゾール薬剤耐性に関わる2種類の転写因子AtrRとSrbAがエルゴステロール生合成酵素遺伝子のプロモーター領域の同じまたは非常に近接したDNA配列に結合することが示された。また、AtrRの構成的核局在が明らかになるとともに、BiFC法によりAtrRとSrbAが相互作用している可能性が示唆された。一方、麹菌の転写関連因子破壊株ライブラリーを用いて細胞壁合成阻害薬剤であるコンゴレッドおよびカルコフロールホワイトに感受性を示す転写因子破壊株を2種類見出すことができ、これらの転写因子が細胞壁構成成分の生合成酵素遺伝子の発現を制御していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

A. fumigatusではエルゴステロール生合成酵素遺伝子cyp51Aが高発現することによりアゾール薬剤耐性となる株があり、この高発現株ではプロモーター領域の34 bpがタンデムに重複している(TR34)ことが知られている。AtrRとSrbAが結合する配列はこの34 bpの領域に存在していることが分かったことにより、AtrRとSrbAが結合する配列がタンデムに重複することによってcyp51Aが高発現する結果、アゾール薬剤耐性を獲得するものと考えられ、アゾール薬剤耐性機構の一端を解明することができたと言える。

研究成果の概要(英文)：Two transcription factors involved in azole drug resistance, AtrR and SrbA, bind to the same or very close DNA sequences in the promoter region of the ergosterol biosynthetic enzyme gene cyp51A. A possible interaction between AtrR and SrbA was observed by Bimolecular Fluorescence Complementation method. On the other hand, by using the library of A. oryzae transcription-related factor-disrupted strains, two types of disruption strains that were susceptible to the cell wall synthesis inhibitors Congo red and Calcofluor white were identified. These transcription factors were found to regulate the expression of biosynthetic enzyme genes for cell wall constituents.

研究分野：応用微生物学

キーワード：薬剤耐性 転写因子 糸状菌 エルゴステロール生合成 細胞壁生合成

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

真菌(糸状菌)の中にはいもち病菌 *Magnaporthe grisea* のように植物に感染する病原菌や *Aspergillus fumigatus* のようなヒトや動物に感染して病気を引き起こす病原菌が多く存在する。糸状菌による感染症に有効な抗真菌薬としては、アゾール系、ポリエン系、カンディン系、ピリミジン系の4種類の薬剤が知られているが、細菌感染症に比べて効果のある薬剤の種類は前記の薬剤に限られている上に、これらの薬剤の使用に従って薬剤耐性菌の発生が報告されてきている。特に、日和見感染症の1つであるアスペルギルス症の主な原因菌 *A. fumigatus* に対する有効な抗真菌薬としてアゾール系薬剤が頻用されているが、近年この薬剤に対する耐性菌が頻繁に分離され始めており、医療上深刻な問題となっている。糸状菌の薬剤耐性機構に関しては、薬剤の作用点であるタンパク質の変異とそれらの遺伝子の高発現ならびに薬剤排出トランスポーターの亢進による薬剤不感受性化が主要因と考えられているが、これらの薬剤耐性関連遺伝子群の発現制御機構に関してはほとんど知見がなかった。近年になってアゾール系薬剤の標的酵素であるステロール-14 α -デメチラーゼ(Erg11/Cyp51)を含む複数のエルゴステロール生合成酵素遺伝子群の発現を制御する basic helix-loop-helix (bHLH) 型転写因子 *SrbA* が見出され、この転写因子破壊株がアゾール薬剤に関して超感受性になることから、*SrbA* が糸状菌において初めて薬剤耐性関連遺伝子の発現に関わる転写因子として報告された^{1,2)}。一方、研究代表者は、麴菌 *Aspergillus oryzae* のアゾール薬剤耐性自然突然変異株の単離を端緒に、糸状菌のアゾール薬剤の排出に関与する ABC トランスポーターを見出す³⁾とともに、その遺伝子発現を制御する Zn₂Cys₆ 型転写因子 *AtrR* を世界で初めて発見し、*A. fumigatus* においてもこのオソログが同様にアゾール薬剤耐性に関わっていることを明らかにした⁴⁾。RNA-seq 解析や qRT-PCR 解析から、*AtrR* は ABC トランスポーターだけでなくアゾール薬剤の標的であるエルゴステロール生合成酵素遺伝子群の発現にも関与しており、これらの遺伝子群は *SrbA* によって制御されている遺伝子群と一致しているという興味深い結果が得られ、これらの2種類の転写因子が協調的に発現を制御している機構の存在が示唆された。転写因子間の協調的な遺伝子発現制御機構を解明することにより、アゾール薬剤耐性の分子機構が明らかにできるものと考えられる。さらに、今後増加する可能性のある他の抗真菌薬(カンディン系、ポリエン系など)に対する耐性に関わる遺伝子の発現に関与する転写因子の探索と機能解析も併せて行うことにより、糸状菌の薬剤耐性に関する遺伝子発現制御ネットワークが解明できることが期待される。

2. 研究の目的

麴菌 *A. oryzae* を対象として、*AtrR* と *SrbA* によるエルゴステロール生合成酵素遺伝子の協調的発現制御の分子機構ならびに他の抗真菌薬に対する耐性に関わる遺伝子の発現に関与する転写因子の探索とその機能について解析することにより、糸状菌の薬剤耐性機構に対する基盤的な知見を得ることを目的とした。具体的には、(1) 転写因子 *AtrR* と *SrbA* が結合するシスエレメントを同定するとともに、*AtrR* の細胞内局在の解明および *AtrR* と *SrbA* 間の結合の有無やシスエレメントを含む DNA 断片を介した相互作用の有無を明らかにする。(2) 麴菌の転写因子遺伝子破壊株ライブラリーを利用したカンディン系、ポリエン系、ピリミジン系等の抗真菌薬剤に対して感受性または耐性を示す破壊株のスクリーニングにより、これらの薬剤の耐性(感受性)に関わる転写因子の同定とその機能解析を行う。

3. 研究の方法

(1) *AtrR* が共通に制御する ABC トランスポーター遺伝子(*atrA*)と代表的なエルゴステロール生合成酵素遺伝子(*erg11/cyp51*)のプロモーターの欠失変異体のレポーターアッセイにより、発現に関与するシスエレメントの存在領域を特定し、それらを含む DNA 断片や塩基置換した変異型 DNA 断片をプローブに用いたゲルシフトアッセイを行う。(2) *AtrR* の N 末端側と C 末端側にそれぞれ GFP を連結した融合タンパク質の発現株を作製し、さまざまな条件下における *AtrR* の細胞内局在を蛍光顕微鏡により観察を行う。また、*AtrR* と *SrbA* の相互関係を調べるために、*atrR* および *srbA* 破壊株においてそれぞれの GFP 融合体を発現させ、細胞内局在への影響やプロセシングやリン酸化修飾などによる分子量変化の有無を調べる。(3) *AtrR* と *SrbA* のそれぞれに myc または FLAG タグを付加して宿主株に導入・発現させ、共免疫沈降法により両転写因子の複合体形成の有無を検出する。また、*AtrR* と *SrbA* のそれぞれに GFP の N 末端と C 末端を連結させたコンストラクトを麴菌に導入し、両転写因子の分子間の相互作用の有無を BiFC (Bimolecular Fluorescence Complementation) 法により検出する。(4) アゾール系、カンディン系、ポリエン系薬剤ならびに細胞壁合成阻害薬剤であるコンゴレド(CR)とカルコフロー

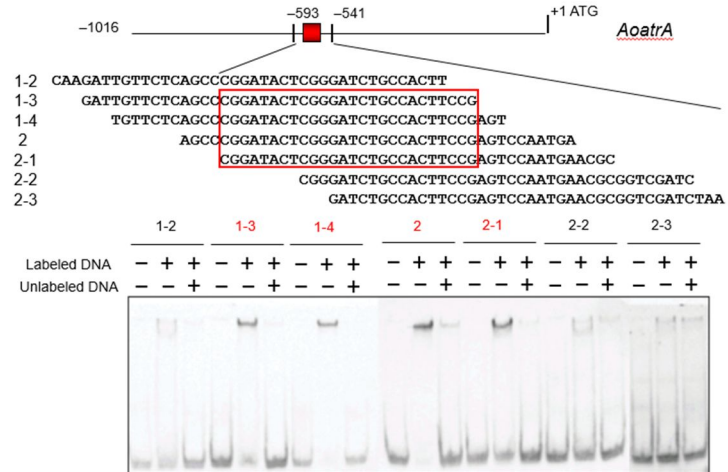
ルホワイト (CFW) を含む寒天培地に、麴菌の約 600 種類の転写因子遺伝子を網羅したライブラリーの破壊株を植菌し、超感受性または耐性を示す株をスクリーニングすることにより、これらの薬剤の耐性 (感受性) に関わる転写因子を同定する。

4. 研究成果

(1) 転写因子 AtrR と SrbA が結合するシスエレメントの同定

麴菌の ABC トランスポーター遺伝子 *atrA* のプロモーター領域の欠変異体の解析の結果、AtrR が結合する領域は翻訳開始点の上流 600 nt から 550 nt の間に存在することが予想されたことから、この領域の塩基配列をもとに分割した DNA 断片をプローブに用いたゲルシフトアッセイを行った。

ゲルシフトアッセイは DIG ラベルしたプローブに加えて同じ配列の DNA 断片をコンペティターとして用いて行った結果、CGG トリプレットを含む配列 5'-CGGN₅CGGN₁₂CCG-3' に結合することが示された (図 1)。また、この CGG トリプレット配列が発現に重要なのか明らかにするため、上流と下流の CGG (CCG) 配列を AAA に置換したプロモーターを作製し、GUS レポーターアッセイを行ったところ、いずれも *atrA* の発現に必要であることが示唆された。ただ、その中でも上流の CGG 配列の寄与度が若干弱い傾向があるように思われた (図 2)。一方、アイオワ大学などとの *A. fumigatus* の AtrR に関する国際共同研究によっても AtrR が結合するシスエレメントが同様の配列であることが示された。



AoAtrR binds to the sequence of CGGATACTCGGGATCTGCCACTTCCG.

図1 ゲルシフトアッセイによるAtrRのシスエレメント決定

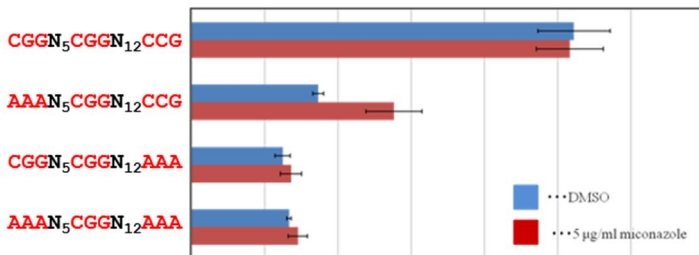


図2 シスエレメント配列の置換変異体のレポーターアッセイ

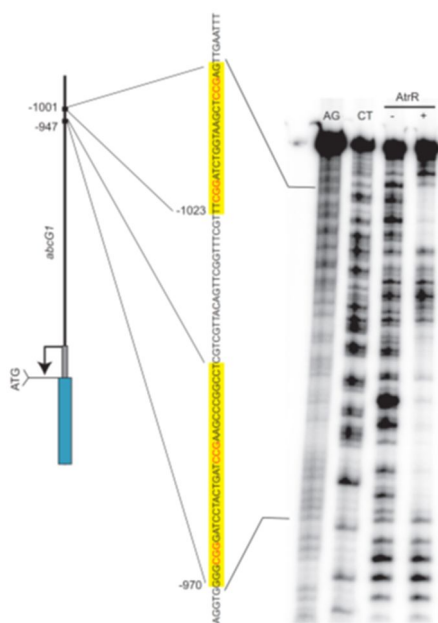


図3 *A. fumigatus abcG1* プロモーター領域の DNase I フットプリンティングアッセイ

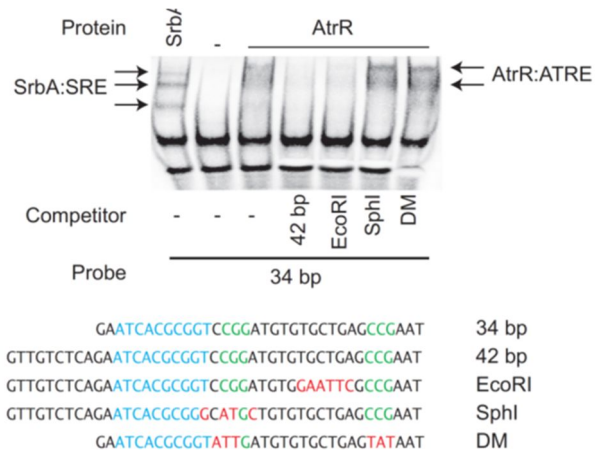


図4 *A. fumigatus cyp51A* プロモーター中の 34 bp 配列への AtrR と SrbA の結合

A. fumigatus の ABC トランスポーター遺伝子 *abcG1* のプロモーター領域の配列を用いた DNase I フットプリンティングアッセイにより、隣接する 5'-CGGN₁₂CCG-3' 配列の両方に AtrR が結合す

ることが示された(図3)⁵⁾。さらに、興味深いことに、AtrR が発現制御するエルゴステロール合成酵素遺伝子 *cyp51A* のプロモーター領域を用いて、AtrR と SrbA を使用したゲルシフトアッセイの結果、両方の転写因子が結合する領域が重複していることが示唆された(図4)⁵⁾。すなわち、AtrR と SrbA が結合する配列が近接して存在しており、*cyp51A* が発現するには AtrR と SrbA がこの領域に結合する必要がある、何らかの相互作用があることが予想される。また、*A. fumigatus* では *cyp51A* が高発現することによりアゾール薬剤耐性となる株があり、この高発現株ではプロモーター領域の 34 bp がタンデムに重複している (TR34) ことが知られている。これも興味深いことであるが、AtrR と SrbA が結合する配列はこの 34 bp の領域に存在していることが分かった。したがって、AtrR と SrbA が結合する配列がタンデムに重複することによって *cyp51A* が高発現する結果、アゾール薬剤耐性を獲得するものと考えられる。

(2) AtrR の細胞内局在の解明

AtrR の N 末端側と C 末端側にそれぞれ GFP を連結した融合タンパク質を麹菌に導入し、蛍光顕微鏡により AtrR の細胞内局在を観察したところ、アゾール薬剤の有無にかかわらず AtrR は核内に局在していることが明らかとなった(図5)。SrbA は核膜または小胞体に局在しており、アゾール薬剤存在下でゴルジ体に移行してプロセッシングを受けた後に核に移行することが分かっているため、SrbA の核移行に AtrR が関与しているか調べるために、*atrR* 破壊株で SrbA-GFP 融合タンパク質を発現させたが、SrbA の核局在には影響が認められなかった。

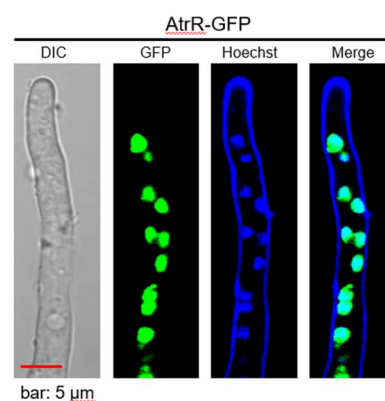


図5 麹菌のAtrRの細胞内局在を観察

(3) AtrR と SrbA の相互作用の解明

(1) で述べたように、AtrR と SrbA は *cyp51A* のプロモーター領域に存在する 34 bp の配列に結合することが示唆されたことから、両転写因子の相互作用が予想される。そこで、AtrR と SrbA のそれぞれに 3×FLAG タグと GFP を付加して麹菌に導入・発現させ共免疫沈降を行ったが、明瞭な共沈降は認められなかった。一方、AtrR と SrbA のそれぞれに GFP の N 末端と C 末端を連結させたコンストラクトを麹菌に導入し、両転写因子の分子間の相互作用の有無を BiFC 法により調べたところ、クロトリマゾール添加後に核と考えられるオルガネラに蛍光が検出できたことから、AtrR と SrbA が相互作用している可能性が示唆された(図6)。

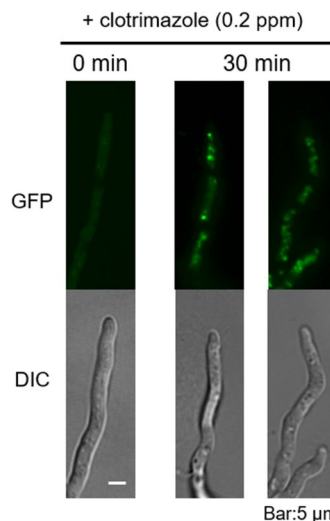


図6 BiFC法による麹菌のAtrRとSrbAの相互作用解析

(4) 薬剤感受性・耐性に関わる新規転写因子の探索とその機能解明

約 600 種類の麹菌転写関連因子遺伝子の破壊株ライブラリーを用いて、アゾール系(クロトリマゾール)、キサンディン系(ミカファンギン)、ポリエン系(アムホテリシン B) 薬剤ならびに細胞壁合成阻害薬剤である CR と CFW コンゴレード (CR) とカルコフロールホワイト (CFW) を含む寒天培地で野生株に比べて生育が抑制または旺盛になる株のスクリーニングを行った。その結果、アゾール系薬剤に対しては *atrR* および *srbA* 以外に耐性に関与する転写因子遺伝子は見出されなかった。また、ミカファンギンとアムホテリシン B に対して耐性または感受性に関わると考えられる転写因子は残念ながら見出されなかった。一方、CR と CFW については、MedA と SfgA の 2 種類の転写因子が耐性に関わっている可能性が見出された(図7)。それぞれの転写因子遺伝子の破壊株を用いて、細胞壁合成に関わる遺伝子の発現を調べたところ、*medA* 破壊株ではガラクトサミノガラクトン (GAG) の合成酵素遺伝子の発現が低下している一方で、*sfgA* 破壊株では逆に発現上昇している傾向が認められた。また、-1,3-グルカン (AG) 合成酵素遺伝子については、*medA* 破壊

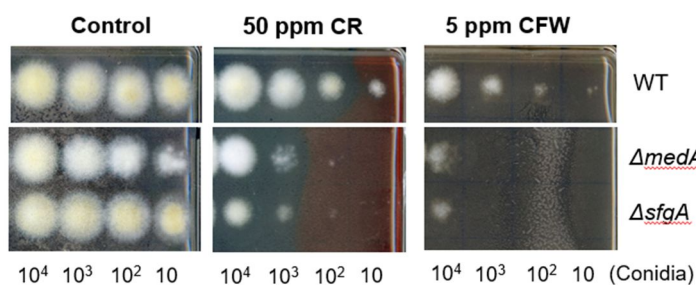


図7 CRおよびCFWに感受性を示す転写因子破壊株

株と *sfgA* 破壊株のいずれでも発現が低下していることが分かった。さらに、これらの破壊株を用いた RNA-seq 解析を行って遺伝子発現プロファイルを調べたところ、*medA* 破壊株ではアミラーゼ系酵素遺伝子の発現が低下していることが示唆され、qRT-PCR によって発現量を確認した結果、 α -アミラーゼやグルコアミラーゼ遺伝子の発現が減少していることが明らかとなった。

引用文献

- 1) Willger SD, Puttikamonkul S, Kim KH, Burritt JB, Grahl N, Metzler LJ, Barbuch R, Bard M, Lawrence CB, Cramer RA, Jr: A sterol-regulatory element binding protein is required for cell polarity, hypoxia adaptation, azole drug resistance, and virulence in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathog.*, **4**, e1000200 (2008).
- 2) Blatzer M, Barker BM, Willger SD, Beckmann N, Blosser SJ, Cornish EJ, Mazurie A, Grahl N, Haas H, Cramer RA: SREBP coordinates iron and ergosterol homeostasis to mediate triazole drug and hypoxia responses in the human fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Genet.*, **7**, e1002374 (2011).
- 3) Miura D, Sugiyama K, Itoh A, Ohba-Tanaka A, Tanaka M, Shintani T, Gomi K: The PDR-type ABC transporters AtrA and AtrG are involved in azole drug resistance in *Aspergillus oryzae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **82**, 1840–1848 (2018).
- 4) Hagiwara D, Miura D, Shimizu K, Paul S, Ohba A, Gonoi T, Watanabe A, Kamei K, Shintani T, Moye-Rowley WS, Kawamoto S, Gomi K: A novel Zn₂-Cys₆ transcription factor AtrR plays a key role in an azole resistance mechanism of *Aspergillus fumigatus* by co-regulating *cyp51A* and *cdr1B* expressions. *PLoS Pathog.*, **13**, e1006096 (2017).
- 5) Paul S, Stamnes M, Thomas GH, Liu H, Hagiwara D, Gomi K, Filler SG, Moye-Rowley WS: AtrR is an essential determinant of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *mBio*, **10**, e02563-18 (2019).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sanjoy Paul, Mark Starnes, Grace Thomas, Hong Liu, Daisuke Hagiwara, Katsuya Gomi, Scott Filler, and W. Moye-Rowley	4. 巻 10
2. 論文標題 AtrR is an essential determinant of azole resistance in <i>Aspergillus fumigatus</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 e02563-18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mBio.02563-18	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 福永 貴弘, 藤田 翔貴, 五味 勝也
2. 発表標題 麹菌の転写因子破壊株ライブラリーを利用した細胞壁構成成分の生合成制御因子の探索
3. 学会等名 糸状菌分子生物学研究会若手の会 第8回ワークショップ
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 福永 貴弘, 藤田 翔貴, 五味 勝也
2. 発表標題 麹菌の転写因子破壊株ライブラリーを利用した細胞壁構成成分の生合成制御因子の探索
3. 学会等名 2021 年度日本農芸化学会大会
4. 発表年 2021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		
米国	University of Iowa	UCLA	