

機関番号：24402

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20580113

研究課題名（和文）ミトコンドリア障害作用物質が示す薬効増強効果発現メカニズム

研究課題名（英文） Mechanism for potentiation of drug-effects in mitochondrion-disturbing agents.

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

研究成果の概要（和文）：

出芽酵母に対してドデカノールは一過性の殺真菌作用を示す。本研究では、ミトコンドリア障害物質であるアネトールをドデカノールと併用させた場合に引き起こされる持続的な殺真菌作用の発現メカニズムを解析した。その結果、ドデカノール処理によって ABC トランスポーターのうち薬剤排出ポンプ PDR5 の発現量増大が見られたが、アネトールとの併用によりその増大は抑制された。アネトールは PDR5 の遺伝子発現を抑制し、持続的な殺真菌作用を発揮することがわかった。

研究成果の概要（英文）：

Dodecanol exhibits temporary fungicidal activity against budding yeast. In this study, we investigated expression mechanism for the durable fungicidal activity of a mitochondrion-disturbing agent, anethole, combined with dodecanol. In dodecanol-treated cells of *S. cerevisiae*, increase in the gene expression of PDR5 among ABC transporters was detected. On the other hand, in cells treated with dodecanol and anethole, over-expression of PDR5 gene was restricted. These results indicated anethole expressed durable fungicidal activity via restriction of PDR5 gene expression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000円	630,000円	2,730,000円
2009年度	700,000円	210,000円	910,000円
2010年度	900,000円	270,000円	1,170,000円
年度			
年度			
総計	3,700,000円	1,110,000円	4,810,000円

研究分野：生物系薬学

科研費の分科・細目：農芸化学 生物生産化学・生物有機化学

キーワード：trans-anethole, PDR5 遺伝子, *Candida albicans*, fluconazole, 相乗的抗真菌作用, 薬剤耐性, 薬剤排出ポンプ, 出芽酵母

1. 研究開始当初の背景

多くの生物でゲノム解析が終了したが、その成果は医療の現場にフィードバックされているとは言い難い。ガンの遺伝子治療などはテスト段階であり、その一方、医療の現場では依然として多くの医薬品が活躍しており、新たな医薬品を求める研究開発は医療分野における最重要課題の一つである。本研究申請者は、以前より天然資源から真菌に特異的に作用するような、あるいはアポトーシスを誘導するような生理活性物質の単離を試み続けており、さらには、新たな医薬品のターゲットを求めて、その活性の発現機構を詳しく解析し続けている。その中で、ミトコンドリアに対して様々な障害作用を示す物質として植物由来のトランス・アネトール (*trans*-1-methoxy-4-(1-propenyl)benzene)、以下アネトールと略す)を見いだしている。本物質は、興味深いことに、他の多くの抗菌剤と併用することで絶大な相乗効果をもたらし、それには未知の薬剤ストレス耐性機構が関与していることも報告してきた。本申請研究の目的は、何故、ミトコンドリアに作用する物質が、他の抗菌剤と併用して作用させたときに絶大な相乗効果を発揮するのか、そのメカニズムの詳細を生化学的にあるいは分子生物学的に明らかにし、新薬開発のための新たなデザイン方法、あるいは活性が弱いために使用できない既知薬剤に再び脚光を当てる方法をモデル的に提示することである。

2. 研究の目的

本研究課題の目的は、まず、アネトールによる出芽酵母のアポトーシス様の細胞死が、我々が上記で明らかにしてきたミトコンドリア障害作用のいずれに起因するのか、あるいはそれ以外のミトコンドリアにおける障害作用に依存するのかを突き止めることである。次いで、アネトールとの併用によってもたらされる抗真菌剤の活性増強が、薬剤耐性機構の無力化であると思われるが、何故起こるのかというメカニズムをアネトール単独の作用と比較しながら、特にミトコンドリアの機能を中心に生化学的に解析する。さらに、構造活性相関を行い、アネトール特有の作用を保持しつつ本物質自身の活性を増強できないか、あるいは単にアネトールの相乗効果作用をさらに増強できないか検討する。最後に、動物細胞においてアネトールは細胞毒性を示さないが、アネトールと他の薬剤の併用によって相乗効果が発揮され、それによって新たにアポトーシス誘導作用が発生しないか、あるいは他の薬剤のアポトーシス誘導活性を増強しないかどうかについても検討したい。

3. 研究の方法

アネトールは *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754 株に対して嫌気条件下で殺菌作用を示す。アネトール、ドデカノール、アネトールとドデカノールの組み合わせにおいて殺菌効果の経時的変化をコロニーカウント法により明らかにした。

Malt 液体培地 (2.5% Malt extract) 3 ml を含む試験管 (直径 10 mm) に、アネトール処理では終濃度 1250 μ M から倍々希釈により 312.5 μ M まで 3 段階の濃度で、ドデカノール処理では終濃度 250 μ M、125 μ M の 2 段階の濃度で、アネトールとドデカノールの組み合わせ処理では終濃度 312.5 μ M+125 μ M、312.5 μ M+250 μ M の濃度でそれぞれ 30 μ l ずつ加えた。両物質とも水に不溶であるので、本実験では *N,N*-dimethylformamide (DMF) を溶媒として用いた。600 nm での濁度が 0.1 になるように *S. cerevisiae* ATCC 7754 を懸濁した。濁度の測定には、SHIMADZU UV-2450 を用いた。ここで加えた *S. cerevisiae* ATCC 7754 株の前培養液は、Malt 液体培地 (2.5% Malt extract) 20 ml を 30°C 16 h 振とうしたものと同様に振とうしていないものを準備した。

試薬と培養液を含んだ Malt 液体培地から、コントロール (DMF) では更に 102、104、106 倍希釈しそれぞれ 100 μ l をシャーレ上にひろげ、コントロール以外の試薬では 1、102、104 倍希釈し 100 μ l をシャーレにひろげた。希釈には 0.9% NaCl を用いた。同様の作業を 4 h、8 h、24 h、組み合わせ処理では更に 48 h、72 h 後に行った。30°C で培養し 48 時間後の様子を観察した。

ドデカノール処理によっていったん低下した生菌数が短時間で上昇することから、生菌数の増加には薬剤耐性機構が関与している可能性が高い。*S. cerevisiae* では薬剤耐性に関する ABC トランスポーターが 30 種類知られている。ABC トランスポーターの中で本研究では pleiotropic drug resistance (PDR) 遺伝子群に注目した。RT-PCR 法を用いて薬剤排出ポンプである PDR5、PDR10、PDR11、PDR12、PDR15 遺伝子における発現量の差について検討した。これらの遺伝子の発現量を調べた結果 PDR5 の発現がドデカノール処理によって増大し、それはアネトールによって抑制されていることがわかった。従って、PDR5 の転写因子である PDR1、PDR3 においても遺伝子発現量の差を検討した。

・トータル RNA 抽出

前培養液として Malt 液体培地 (2.5% Malt extract) 20 ml を含む三角フラスコに *S. cerevisiae* ATCC 7754 を懸濁し 30°C で 16 h 振とう培養した。Malt 液体培地 (2.5% Malt extract) 100 ml を含む三角フラスコにこの前培養液を 1 ml、各試薬、すなわちコントロール (DMF)、アネトール 312.5 μ M、ドデカノ

ール 125 μM 、アネトールとドデカノールの組み合わせ 312.5 μM +125 μM を 1 ml ずつ加え 30°C、24 h 嫌氣的培養した。

600 nm での濁度が 5 になるように *S. cerevisiae* ATCC 7754 を遠心チューブにとり 5000 rpm で 5 min 遠心分離し集菌した。濁度の測定には、SHIMADZU UV-2450 を用いた。遠心分離には sakuma 社 M200-IVD を用いた。2 ml の Buffer Y1 (100 ml 滅菌水、0.1 M D-sorbitol、0.01 M EDTA \cdot 2Na を含み、使用直前に 0.1% β -ME と 250 U Immun O Yeast Lytic Enzyme を添加) に細胞を懸濁した。30°C、10~30 min 静かに攪拌しながらインキュベーターレスフェロプラストを調製した。

5000 rpm で 5 min 遠心分離しスフェロプラストをペレット化した。上清を注意深く捨てる。スフェロプラストを溶解するために 350 μl の Buffer RLT (1 ml の Buffer RLT あたり 10 μl の β -ME を添加) を添加して激しくボルテックスした。さらに、350 μl の 70% エタノールを添加しピペットでよく混和した。

サンプル 700 μl を 2 ml コレクションチューブにセッティングした RNeasy スピンカラムにアプライした。10000 rpm 以上で 15 sec 遠心操作し、ろ液を捨てた。Buffer RW1 350 μl をスピンカラムに添加し 10000 rpm 以上で 15 sec 遠心操作し、ろ液を捨てた。

DNase I stock solution 10 μl を buffer RDD 70 μl に加えた。その 80 μl をスピンカラムに添加し 20~30°C 15 min 静置した。350 μl の Buffer RW1 をスピンカラムに添加し 10000 rpm 以上で 15 sec 遠心操作し、ろ液を捨てた。

スピンカラムに 500 μl の Buffer RPE を添加し 10000 rpm 以上で 15 sec 遠心操作し、ろ液を捨てた。さらにスピンカラムに 500 μl の Buffer RPE を添加し 10000 rpm 以上で 2 min 遠心操作し、ろ液を捨てた。

RNeasy スピンカラムを新しい 1.5 ml コレクションチューブにセットした。RNase フリー水 30 μl を直接スピンカラムメンブレンに添加した。10000 rpm 以上で 1 min 遠心操作し RNA を抽出した。

・ RT-PCR

(cDNA 合成)

マスターミックス (RNase inhibitor 0.5 μl 、CDS-PRIM 0.5 μl 、Rever Tra Ace 1 μl 、5 \times Buf 4 μl 、2 mM dNTPs 10 μl) を 16 μl ずつ PCR チューブに分注した。トータル RNA 量が 0.5~5 μg となるように調製したサンプル液を 4 μl 加えた。30°C 10 min \cdot 42°C 60 min \cdot 99°C 5 min で逆転写し cDNA 合成した。PCR マシンには、Applied Biosystems 社 2720 サーマルサイクラーを用いた。

(PCR 反応)

マスターミックス (Taq ポリメラーゼ 0.05 μl 、10 \times PCR buf 1 μl 、2 mM dNTPs 1 μl 、H₂O 滅菌水 5.95 μl 、10 μM Primer-forward 0.5 μl 、10

μM Primer-reverse 0.5 μl) を 9 μl ずつ PCR チューブに分注した。cDNA 合成したサンプルを 1 μl 加えた。94°C 2 min \cdot 30 \times (94°C 30 sec \cdot Tm°C 30 sec \cdot 72°C 1 min) で PCR 反応させた。

(電気泳動)

アガロースゲルを作製した。1 \times TAE buffer に 2%アガロースを加えゲルを作成した。泳動槽にゲルと 1 \times TAE buffer を入れた。試料 10 μl に 2 μl Dye solution を加えた。マーカー 5 μl 、試料 12 μl をピペットマンでウェルに入れた。100 V、30 min 泳動した。ゲルレッド溶液 (1 \times TAE buffer 40 ml にゲルレッド 6 μl) に 30 min 浸した。UV 照射で観察し、発現量の差を見た。

Candida albicans に対するアネトールとフルコナゾールの相乗効果について検討した。

アネトールおよびフルコナゾールは N,N-dimethylformamide (DMF) に溶解させた。Malt 液体培地 (2.5% Malt extract) 3 ml を含む試験管 (直径 10 mm) に、アネトール処理では終濃度 800 μM から倍々希釈により 100 μM まで 4 段階の濃度で、フルコナゾール処理では終濃度 5000 ng/ml から倍々希釈により、156 ng/ml の 6 段階の濃度で、それぞれ組み合わせで添加した。なお、DMF の終濃度は 30 μl /3 ml すなわち 1%とした。600 nm での濁度が 0.1 になるように *Candida albicans* IFO 1061 株を懸濁した。濁度の測定には、SHIMADZU UV-2450 を用いた。ここで加えた *C. albicans* IFO 1061 株の前培養液は、Malt 液体培地 (2.5% Malt extract) 20 ml を 30°C 16 h 振とうしたものを準備した。

抗菌剤を含む培養液を 30°C で培養し 24 時間後、培養液 100 μl ずつサンプリングして 96 穴ウェルに移して、595 nm での培養液の濁りを測定し、生育阻害濃度を決定した。

4. 研究成果

コロニーカウント法で調べた結果、振とう条件下で前培養した際に、アネトールの殺菌作用が示された。ドデカノール処理では 4 h まで殺菌作用が持続するもののおそらくドデカノール耐性機構の発現により時間の経過とともに細胞数の増加がみられた。組み合わせ処理ではそのドデカノールに対する耐性機構をアネトールが抑制していると考えられた。加えて、ドデカノールに対する耐性機構は一過性のもではなく、常にはたっているものである可能性も示唆された。

コントロール、アネトール 312.5 μM 、ドデカノール 125 μM 、アネトールとドデカノールの組み合わせ 312.5 μM +125 μM の条件で 30°C、24 h で処理したのを用いた RT-PCR の結果より、ドデカノール処理では ABC トランスポーター PDR5 の発現が増幅されていることがわかった。従って、時間の経過とと

もに細胞数の増加が認められた際に機能していると考えられたドデカノール耐性機構は PDR5 タンパク質の可能性が高いと考えられた。また、組合せ処理では、その発現量増幅が抑制されていた。また PDR5 の転写因子であると考えられている PDR1、PDR3 においても組合せ処理で遺伝子発現量が抑制されていることがわかった。

一方、PDR 欠損株においてはドデカノールの最小生育阻害濃度と思われる 1000 μ M が見出された。また、野生株と PDR5 欠損株の生育の違いをコロニーカウント法で調べたことでドデカノール耐性機構には PDR5 が大きく関与していることがわかった。PDR5 欠損株でも 48 h 以降ドデカノール処理では細胞数が増加したことにより他の耐性機構もドデカノールに対してはたらいっていることが示された。しかし、アネトールを組み合わせることでその細胞数増加が抑制されていたことよりアネトールは他の耐性機構も抑制していることがわかった。

本実験では、アネトールとドデカノールを組み合わせることで少なくとも薬剤耐性機構 ABC トランスポーター PDR5、その転写因子 PDR1、PDR3 の遺伝子発現が抑制されていることが示された。しかし、その詳細な作用機構は未知である。他の PDR 遺伝子群、ABC トランスポーター遺伝子についての解析が必要である。また、他の薬剤との相乗効果についても調べるのが新たな応用につながるかもしれない。

病原性真菌 *C. albicans* IFO 1061 株に対するアネトールの最小生育阻害濃度 (MIC) は 400 μ M、*C. albicans* の代表的な抗真菌薬であるアゾール剤フルコナゾールの MIC は 2500 ng/ml であった。両者の薬剤を組み合わせた場合、すなわち、アネトール 100 μ M を培養液に添加した場合、*C. albicans* の生育を抑制するにはフルコナゾールは 250 ng/ml の投与で十分であった。以上の結果は、インビトロの実験ではあるが 1/4MIC のアネトールを組み合わせることによって高価なフルコナゾールの投与量を 1/10 にまで減らせることを意味している。

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 7 件)

1. Yutani M, Hashimoto Y, Ogita A, Kubo I, Tanaka T, Fujita K. Morphological changes of the filamentous fungus *Mucor mucedo* and inhibition of chitin synthase activity induced by anethole. *Phytotherapy Research*, 査読有 2011, In press.

2. Yutani M, Ogita A, Usuki Y, Fujita K, Tanaka T. Enhancement effect of N-methyl-N"-dodecylguanidine on the vacuole-targeting fungicidal activity of amphotericin B against the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Journal of antibiotics* 査読有 2011, In press.

3. Yutani M, Ogita A, Fujita K, Usuki Y, and Tanaka T. Evaluation of uridine 5'-eicosylphosphate as a stimulant of cyclic AMP-dependent cellular function. *General Physiology Biophysics*, 査読有, 30, 2011, 106-109.

4. Yutani M, Taniguchi Y, Ogita A, Fujita K, Tanaka T. Alliinase from *Ensifer adhaerens* and its use for generation of fungicidal activity. *AMB Express*, 査読有 1, 2011, 2-8.

5. Borjihan B, Ogita A, Fujita K, Doe M, Tanaka T. The Cyclic Organosulfur Compound Zwiebelane A from Onion (*Allium cepa*) Functions as an Enhancer of Polymyxin B in Fungal Vacuole Disruption. *Planta Medica*, 査読有, 76, 2010, 1864-1866.

6. Borjihan H, Ogita A, Fujita K, Hirasawa E, Tanaka T. The vacuole-targeting fungicidal activity of amphotericin B against the pathogenic fungus *Candida albicans* and its enhancement by allicin. *Journal of Antibiotics*, 査読有, 62(12), 2009, 691-697.

7. Fujita K, Fujita T, Kubo I. Antifungal activity of alkanols against *Zygosaccharomyces bailii* and their effects on fungal plasma membrane. *Phytotherapy Research*, 査読有, 22(10), 2008, 1349-1355

[学会発表] (計 3 件)

1. 辰巳 美紀、荻田 亮、田中 俊雄、藤田 憲一、トランス・アネトールは真菌に対して DNA の断片化を伴う細胞死を誘導する
第 62 回日本生物工学会大会 2010 年
10 月 28 日 宮崎・宮崎シーガイア・ワールドコンベンションセンターサミット

2. 辰巳 美紀、荻田 亮、藤田 憲一、田中 俊雄、糸状菌 *Aspergillus fumigatus* に対するフェニルプロパノイド類の生育阻害作用
2010 年日本農芸化学会大会 2010 年
3 月 28 日 東京大学

3. 藤田 憲一、橋本 幸恵、黒田 学、辰巳 美紀、荻田 亮、田中 俊雄. アネトールは出

芽酵母にアポトーシス様の細胞死を誘導する
第 61 回日本生物工学会大会 2009 年
9 月 24 日 名古屋大学

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：薬物排出抑制剤、抗菌活性増強剤、及び抗癌活性増強剤

発明者：藤田 憲一

権利者：公立大学法人大阪市立大学

番号：特願 2011-091645

出願年月日：平成 23 年 4 月 18 日

国内外の別：国際

6. 研究組織

(1)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

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし