

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：10105

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07492

研究課題名（和文）トリアセチルフサリニンCで見いだされた鉄イオン獲得以外の新たな機能

研究課題名（英文）New Functions Other Than Iron Ion Acquisition Revealed in Triacetylphsalinin C

研究代表者

豊留 孝仁（Toyotome, Takahito）

帯広畜産大学・畜産学部・准教授

研究者番号：90422245

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではアスペルギルス・フミガツスが産生するトリアセチルフサリニンCについて、鉄獲得以外の機能を明らかとすることを目的として研究を行った。その結果、トリアセチルフサリニンCを産生することが、アスペルギルス・フミガツスにとって有害金属イオンの毒性を抑えることにつながることを明らかとした。本来の生息場所である環境中でアスペルギルス・フミガツスがこのような機構を使って毒性回避を行っている可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アスペルギルス・フミガツスはヒトや動物のアスペルギルス症の主な原因真菌であるが、その生物学的知見は十分に得られていない。本研究では本来の生息場所である環境中でアスペルギルス・フミガツスがトリアセチルフサリニンCを使って毒性回避を行っている可能性を示した。トリアセチルフサリニンCはアスペルギルス・フミガツスの病原性に寄与するとともにこの分子をアスペルギルス症の検査診断や治療に用いようとする試みもあり、本分子の新たな機能解明は基盤的知見の積み上げと共に今後の応用利用への発展が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated triacetylphsalinin C produced by *Aspergillus fumigatus* with the aim of clarifying novel functions other than iron acquisition. We found that the production of triacetylphsalinin C suppresses the toxicity of toxic metal ions to *Aspergillus fumigatus*. We were able to show that *Aspergillus fumigatus* may use such a mechanism to avoid toxicity in the outdoor environment as its natural habitat.

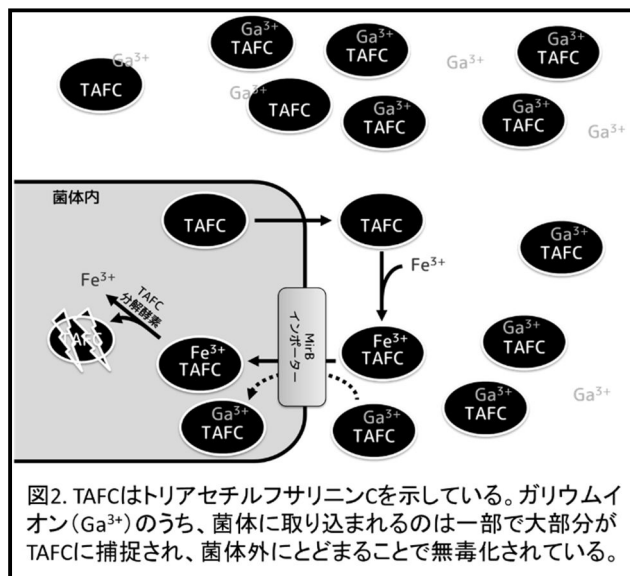
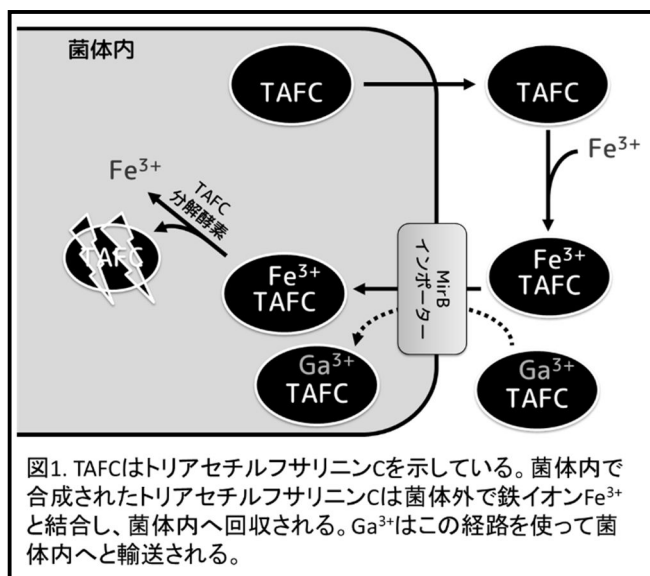
研究分野：病原真菌学

キーワード：アスペルギルス・フミガツス トリアセチルフサリニンC 有害金属イオン

1. 研究開始当初の背景

病原真菌アスペルギルス・フミガツスはヒトや動物のアスペルギルス症の原因真菌として広く知られている。免疫機能が低下した宿主は感染のリスクが高く、一旦感染が成立すると致死率が高い予後不良の感染症である。感染成立にはアスペルギルス・フミガツスの種々の因子が機能を果たしている。よく知られた因子の一つとして、**3** 価の鉄イオンと結合するトリアセチルフサリニン **C** (**TAFC**)がある。図 1 に示したように、この分子はアスペルギルス・フミガツス菌体内で二次代謝産物として合成されて、菌体外へ放出される。菌体外で鉄イオンと結合した後、専用の取り込み機構を介して菌体内に取り込まれて、鉄イオンは菌体内で利用される。鉄イオンは生育に関わる様々な代謝経路に関わっており、鉄イオン獲得システムは鉄が制限される宿主体内でのアスペルギルス・フミガツスの生存に重要な役割を果たしている。

鉄イオンと類似の振る舞いをする金属イオンとして **3** 価のガリウムイオンがある。ガリウムイオンは **2** 価となれないために鉄イオンの酸化還元を要する酵素反応などを妨げることで微生物への生育阻害活性を示すことが知られている(参考資料欄)。研究代表者はガリウムの抗真菌活性について報告している(参考資料欄)。ガリウムイオンと **TAFC** の結合はすでに報告されており(参考資料欄) このガリウムイオンの抗真菌活性は **TAFC** を介して発揮されると推測されている。一方で、**TAFC** は菌体外に放出され、すべてが回収されるわけではないと考えられる。研究代表者は鉄を取り込む以外に、菌体外環境にある有害金属イオンを菌体外に残留させることで菌体内への金属イオン取り込みを抑えて、無毒化する効果があるのではないかとする仮説(図 2)を立てた。



2. 研究の目的

本研究では上記仮説のとおり、ガリウムイオンの毒性が菌体外 **TAFC** により減弱するかどうかを検討し、**TAFC** の鉄獲得以外の菌体外有害金属イオン捕捉分子としての機能を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では **TAFC** の生合成を司る *sidI* 遺伝子を破壊したアスペルギルス・フミガツス株 ($\Delta sidI$) と鉄イオンと結合した **TAFC** を取り込むトランスポーター **MirB** の非産生アスペルギルス・フミガツス株 ($\Delta mirB$) を作製し、用いた。これら菌株にガリウムイオンを処理することで、**TAFC** の産生や取り込みとガリウムイオンへの感受性との関係を検討した。また、 $\Delta sidI$ 株や $\Delta mirB$ 株へのガリウムイオン処理において同時に **10** $\mu g/mL$ **TAFC** を添加することでその感受性がどのように変化するかを検討した。また、他の金属イオンへの感受性が $\Delta sidI$ 株や $\Delta mirB$ 株において影響するののかも併せて検討を行った。

4. 研究成果

Δ *sidI* 株や Δ *mirB* 株を用いて、硝酸ガリウムや酢酸鉛への感受性を検討した結果、親株である **A1159** 株に比べて、**T AFC** を産生できない Δ *sidI* 株では硝酸ガリウムに感受性化することが明らかとなった（表 1）。一方で、**T AFC** が取り込めない Δ *mirB* では **A1159** 株とほぼ同等の感受性を示しており（表 1）、**T AFC** が菌体外の有害金属イオンを捕捉し、その毒性発現を抑えることに寄与していると推測された。同様の現象は酢酸鉛への感受性でも見られた（表 2）。一方で、硫酸銅や硝酸亜鉛、塩化コバルト、塩化マンガンを用いた実験ではこれらの現象は観察されなかった。 Δ *sidI* 株の硝酸ガリウム処理および酢酸鉛処理において、その培養液中に **T AFC** を添加することでそれぞれの処理に対する影響が解除される（表 3、表 4）ことから、これらの感受

表 1. 各アスペルギルス・フミガツス株の硝酸ガリウムを含む培地での 48 時間培養後の生育スコア

Strain	硝酸ガリウム ($\mu\text{g/mL}$)									
	1.2	2.5	4.9	9.8	19.7	39.4	78.8	158	315	630
A1159	4	3.5	3	2	1.5	1	0.5	0.5	0	0
<i>sidI</i>	1	4	3.5	3	2.5	0.5	0	0	0	0
	2	4	4	3	2.5	0.5	0	0	0	0
	3	4	3.5	3	2	0.5	0	0	0	0
<i>mirB</i>	1	3.5	3.5	3.5	2.5	2	1	0.5	0.5	0
	2	3.5	3.5	3	2.5	1	1	0.5	0.5	0
	3	3.5	3.5	3.5	2.5	1.5	1	0.5	0.5	0

生育スコアは、対照ウェルに対して、スコア 0: 0% 生育、スコア 1: 20% 程度生育、スコア 2: 50% 程度生育、スコア 3: 80% 程度生育、スコア 4: 100% (ほぼ同程度) 生育とした。2 回実験を繰り返し、スコアの平均値を示した。

表 2. 各アスペルギルス・フミガツス株の酢酸鉛を含む培地での 48 時間培養後の生育スコア

Strain	酢酸鉛 ($\mu\text{g/mL}$)									
	1.2	2.5	4.9	9.8	19.7	39.4	78.8	158	315	630
A1159	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3
<i>sidI</i>	1	4	4	4	4	3.5	3	2	1.5	1
	2	4	4	4	4	3.5	2	1	1	1
	3	4	4	4	4	3.5	3.5	3	2.5	1.5
<i>mirB</i>	1	4	4	4	4	4	4	4	3.5	3.5
	2	4	4	4	4	4	4	4	3.5	3.5
	3	4	4	4	4	4	4	4	3.5	3.5

生育スコアは、対照ウェルに対して、スコア 0: 0% 生育、スコア 1: 20% 程度生育、スコア 2: 50% 程度生育、スコア 3: 80% 程度生育、スコア 4: 100% (ほぼ同程度) 生育とした。2 回実験を繰り返し、スコアの平均値を示した。

表 3. 各アスペルギルス・フミガツス株の硝酸ガリウムおよび 10 $\mu\text{g/mL}$ **T AFC** を含む培地での 48 時間培養後の生育スコア

Strain	硝酸ガリウム ($\mu\text{g/mL}$)									
	1.2	2.5	4.9	9.8	19.7	39.4	78.8	158	315	630
A1159	4	4	3.5	3	2.5	2	2	1.5	1.5	1
<i>sidI</i>	1	4	4	4	3.5	3.5	3	2.5	2.5	1.5
	2	4	4	4	3.5	3.5	2.5	2.5	2.5	1.5
	3	4	4	4	3.5	3.5	3	2.5	2.5	2.5

生育スコアは、対照ウェルに対して、スコア 0: 0% 生育、スコア 1: 20% 程度生育、スコア 2: 50% 程度生育、スコア 3: 80% 程度生育、スコア 4: 100% (ほぼ同程度) 生育とした。2 回実験を繰り返し、スコアの平均値を示した。

表 4. 各アスペルギルス・フミガツス株の酢酸鉛および 10 $\mu\text{g/mL}$ **T AFC** を含む培地での 48 時間培養後の生育スコア

Strain	酢酸鉛 ($\mu\text{g/mL}$)								
	1.2	2.5	4.9	9.8	19.7	39.4	78.8	158	
A1159	4	4	4	4	4	4	4	4	
ΔsidI	1	4	4	4	4	4	4	4	
	2	4	4	4	4	4	4	4	
	3	4	4	4	4	4	4	4	

生育スコアは、対照ウェルに対して、スコア 0: 0% 生育、スコア 1: 20% 程度生育、スコア 2: 50% 程度生育、スコア 3: 80% 程度生育、スコア 4: 100% (ほぼ同程度) 生育とした。2 回実験を繰り返し、スコアの平均値を示した。

性化には **T AFC** 非産生が影響していることが確認できた。これらのことから、本研究で以下の 2 点が明らかとなった。(1) **T AFC** が菌体外でガリウムイオンをトラップすることでアスペルギルス・フミガツスに対する毒性を低減する (2) **T AFC** は酢酸鉛の毒性に対しても低減効果を示す。

T AFC はその鉄獲得機能の面から注目をされてきた。また、ガリウムイオンと結合させることでアスペルギルスの感染部位描出などへの応用なども検討されている (参考資料欄)。本研究では、**T AFC** の菌体外有害金属イオンを捕捉し、菌体外にとどまらせることでアスペルギルス・フミガツスへの毒性発現を抑えることを新たに見出し、**T AFC** の新たな機能を明らかとした。このような効果は宿主体内というよりもアスペルギルス・フミガツスの本来の生息場所である土壌中などで有効かもしれない。土壌中には様々な成分があり、有害金属イオンにより汚染されている土壌も存在する。このような条件下で、アスペルギルス・フミガツスが **T AFC** を産生することで有害金属イオンを菌体外にとどまらせて、その有害金属イオンの取り込みを抑えて、結果としてその毒性発現を抑えると推測される。一方で、ガリウムイオンや酢酸鉛のアスペルギルス・フミガツスへの影響は十分にわかっていない。**T AFC** 非産生株では毒性影響が強いことから、各種金属イオン化合物の処理や $\Delta sidI$ 株での網羅的遺伝子発現解析を行うことで、アスペルギルス・フミガツスの有害金属イオンへの影響についてのさらなる基礎的知見が得られると期待できる。予備的に硝酸ガリウムや酢酸鉛をアスペルギルス・フミガツスに処理して網羅的遺伝子発現解析を実施したが、残念ながら再現性のある発現変動遺伝子は見つからなかった。今後、さらなる条件での解析を行うことで、これら有害金属イオンとアスペルギルス・フミガツス、そしてその間に **T AFC** がどのように機能を果たしているかが明らかになると期待する。

< 参考資料 >

Bernstein, L. R. (1998). Mechanisms of therapeutic activity for gallium. *Pharmacological Reviews*, 50(4), 665–682.

Olakanmi, O., Britigan, B. E., & Schlesinger, L. S. (2000). Gallium disrupts iron metabolism of mycobacteria residing within human macrophages. *Infection and Immunity*, 68(10), 5619–5627.

工藤奈都, 豊留孝仁, & 亀井克彦. (2011). P-073(O2-3-5) ガリウムの抗真菌活性に関する研究. 日本医真菌学会総会プログラム・抄録集, 52y, 104.

Kaeopookum, P., Summer, D., Pfister, J., Orasch, T., Lechner, B. E., Petrik, M., Novy, Z., Matuszczak, B., Rangger, C., Haas, H., & Decristoforo, C. (2019). Modifying the Siderophore Triacetylfulvarinine C for Molecular Imaging of Fungal Infection. *Molecular Imaging and Biology: MIB: The Official Publication of the Academy of Molecular Imaging*, 21(6), 1097–1106.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	川合 佑典 (Yusuke Kawai) (10709546)	帯広畜産大学・畜産学部・准教授 (10105)	
研究分担者	久保田 彰 (Akira Kubota) (60432811)	帯広畜産大学・畜産学部・教授 (10105)	

	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
研究協力者	木村 祐太 (Yuta Kimura)	帯広畜産大学・畜産学部	
研究協力者	中川 はるか (Haruka Nakagawa)	帯広畜産大学・畜産学部	
研究協力者	由宇 安月 (Azuki Yuu)	帯広畜産大学・畜産学部	

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
---------	---------