

令和 6 年 4 月 15 日現在

機関番号：24405

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07029

研究課題名（和文）真菌の薬剤排出ポンプ過剰発現における小胞体の役割

研究課題名（英文）Role of the endoplasmic reticulum in overexpression of fungal drug efflux pump

研究代表者

藤田 憲一（Fujita, Ken-ichi）

大阪公立大学・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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、小胞体ストレス、その応答と真菌の薬剤耐性に寄与する薬剤排出ポンプとの関連について、出芽酵母のポンプによる排出が耐性の原因となっているモデル抗真菌薬のドデカノールを用いて検証した。解析の結果、ドデカノールは出芽酵母に対して活性酸素種を発生させ、その活性酸素種が小胞体ストレスを引き起こすことが分かった。また、小胞体ストレスを解消するための応答反応を開始する遺伝子IRE1の欠損株を用いた実験により、小胞体ストレス応答は薬剤排出ポンプPDR5の発現量およびドデカノールの排出量を減少させることで出芽酵母のドデカノール耐性を抑制する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞小器官は薬剤を含む様々なストレスに応答し、そのストレスに対処する。小胞体では蓄積した異常タンパク質の除去や代謝ストレスに対する適応機構が働く。一方、小胞体ストレス応答と真菌の薬剤耐性化との関連に関する報告はほとんど無い。本研究で、小胞体ストレス応答系の欠損が、薬剤耐性化を加速化させることが判明した。つまり、真菌の薬剤耐性に関しては、小胞体ストレス応答はネガティブに作用する可能性がある。このような報告は従来なく、独自性が高い。逆に、小胞体ストレス応答を誘導する薬剤は真菌の耐性化を抑制できる可能性が高く、今後、さらなる研究・開発が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, I investigated the relationship between endoplasmic reticulum stress, its response, and drug efflux pumps that contribute to drug resistance in fungi, using a model antifungal drug, n-dodecanol, whose efflux by pumps is the cause of resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. The analysis revealed that dodecanol produced reactive oxygen species in the yeast, and these reactive oxygen species induced endoplasmic reticulum stress. In addition, experiments using a strain lacking IRE1, a gene that initiates a response to relieve endoplasmic reticulum stress, revealed that the endoplasmic reticulum stress response probably restricted the drug resistance against dodecanol in the yeast by decreasing the expression level of the drug efflux pump PDR5 and the efflux of dodecanol.

研究分野：応用微生物学

キーワード：真菌 薬剤耐性 小胞体ストレス応答 薬剤排出ポンプ

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

病原性真菌の多剤耐性に関わる薬剤排出ポンプの過剰発現機構の解明は、薬剤耐性を抑制する薬の開発にとって重要である。真菌の薬剤排出ポンプ遺伝子の発現に関わる 2 つの転写因子のうち、真菌に特異な転写因子 Pdr3 タンパク質には薬剤と相互作用する部位が存在しないため、転写誘導メカニズムの詳細は未だ不明である。本研究では、小胞体ストレスに起因するシグナル伝達の遮断によって Pdr3 が転写誘導されるという想定の下に、真菌の薬剤排出に関わる転写因子の新たな活性化機構を提案することを目的とする。

2. 研究の目的

真菌の薬剤排出ポンプ遺伝子の発現に関与する 2 つの転写因子の 1 つ、真菌に特異な転写因子 Pdr3 タンパク質には薬剤と相互作用する部位が存在しないため、転写誘導メカニズムの詳細は未だ不明である。我々の先行研究において、Pdr3 が転写誘導される際に、小胞体の形態異常がおこるとともに、小胞体ストレス応答関連遺伝子欠損株は薬剤耐性となった。本研究では、薬剤が小胞体にストレスを与え真菌特異的な転写因子 Pdr3 の過剰発現を通して薬剤耐性を促進するシグナル伝達系を、生化学的、細胞生物学的および分子生物学的手法を用いて評価し、新たに提案することを目的とする。さらに、小胞体およびその周辺をターゲットとした真菌特異的な薬剤排出抑制剤・開発の提案も目的としている。

3. 研究の方法

出芽酵母 BY4741 株およびそれ由来の欠損株を用い、培養は YPD 培地を用いて行った。活性酸素種の産生量は DCFH-DA 法により見積もった [1]。蛍光顕微鏡を用いて GFP-Ire1p の小胞体への集合を観察した。薬剤排出活性はローダミン 6G を用いる方法により行った [2]。遺伝子転写量はリアルタイム PCR を用いて行った [3]。

4. 研究成果

ドデカノールの抗菌活性と活性酸素種の産生量の関係について検証した。ドデカノールが出芽酵母の細胞内において活性酸素種を産生させたことと、脂溶性抗酸化剤ビタミン E とドデカノールを同時に処理した際に活性酸素種産生量が減少し (図 1)、生菌数が回復したことから、ドデカノールの抗菌活性は細胞内に産生する活性酸素種に起因する酸化ストレスによるものと示唆された。

ドデカノール処理により小胞体膜における小胞体ストレス応答タンパク質 Ire1p の集合が蛍光観察された (図 2(a)) 一方で、脂溶性抗酸化剤ビタミン E とドデカノールの同時処理により小胞体膜上に Ire1p が集合した細胞の割合が減少したこと (図 2(b)) から、活性酸素種の産生がドデカノールによって

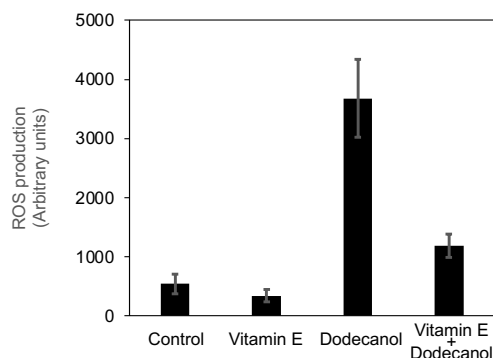


図 1. Effects of dodecanol, vitamin E and their combination on the ROS production in *S. cerevisiae* BY4741 cells.

S. cerevisiae BY4741 cells were pre-incubated in YPD liquid medium supplemented with 20 mM DCFH-DA at 30°C for 30 min. Following the pre-incubation, 31 μM dodecanol, 31 μM vitamin E or their combination were added to the culture medium. Data are means ± standard deviations of 3 independent experiments.

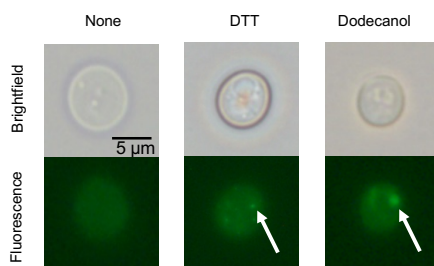


図 2 (a). Ire1p subcellular localization visualized by GFP.

S. cerevisiae Ire1-GFP cells were incubated in minimal liquid medium at 30°C in the presence of 31 μM dodecanol or 5 mM DTT for 2 h. After the incubation, GFP-Ire1p in the ER membrane was visualized using fluorescence microscopy. Arrows indicate oligomerized Ire1p.

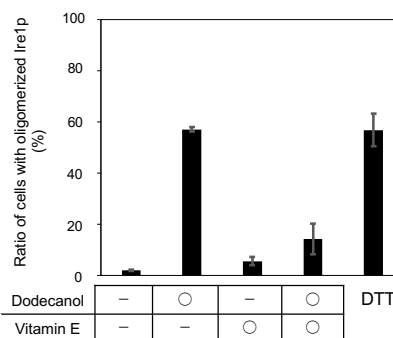


図 2 (b). Effects of vitamin E on Ire1p oligomerization in the ER membrane induced by dodecanol.

S. cerevisiae Ire1-GFP cells were incubated in minimal liquid medium at 30°C in the presence of no drug, 31 μM dodecanol, 31 μM vitamin E, 31 μM dodecanol + 31 μM vitamin E or 5 mM DTT for 2 h. After the incubation, GFP-Ire1p in the ER membrane were visualized using fluorescence microscopy. More than 200 cells were selected at random to calculate the percentage of Ire1p-oligomerized cells among the total cells. Data are means ± standard deviations of 3 independent experiments.

起こる小胞体ストレスの原因となることが示唆された。

小胞体ストレス応答遺伝子 *IRE1* を欠損させると、ドデカノールに耐性となることが示唆された (図 3 (a))。一方で、*IRE1* の欠損株においてドデカノールによって産生する活性酸素種の量は減少しなかった (図 3 (b))。この結果より、*Ire1p* タンパク質による小胞体ストレス応答は、活性酸素種産生の抑制に依存することなく、他の経路によりドデカノール耐性機構の抑制に関与していることが示唆された。

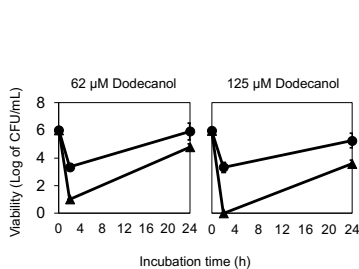


図 3 (a). Sensitivity to dodecanol in *S. cerevisiae ire1Δ* cells.

The cell sensitivity to dodecanol was determined using CFU. *S. cerevisiae* BY4741 cells of parental (filled triangles) and *ire1Δ* (filled circles) strains were incubated in YPD liquid medium at 30°C for 2 h or 24 h in the presence of 62 μM or 125 μM dodecanol. After incubation, cell suspensions were 10⁻¹- to 10⁻⁶-fold diluted, spread on YPD agar plates, and then incubated at 30 °C for 24 h. Data are means ± standard deviations of 3 independent experiments.

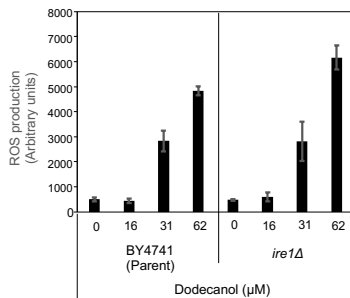


図 3 (b). Effect of dodecanol on the ROS production in *ire1Δ* cells.

S. cerevisiae BY4741 cells of parental and *ire1Δ* cells were pre-incubated in YPD liquid medium supplemented with 20 mM DCFH-DA at 30°C for 30 min. Following the pre-incubation, the indicated concentrations of dodecanol were added to the culture medium. Data are means ± standard deviations of 3 independent experiments.

ire1Δ 株は親株と比べて R6G 排出活性が高く (図 4 (a))、ドデカノールによって誘導される PDR5 の発現量が増加していることがわかった (図 4 (b))。しかし、PDR5 の転写因子である PDR1 と PDR3 の発現量には親株と差が見られなかった (図 4 (b))。これらの結果から、*IRE1* による小胞体ストレス応答は、転写因子 PDR1 と PDR3 の発現量とは関係なく PDR5 の発現量を減少させることで、薬剤排出ポンプに依存するドデカノール耐性機構を抑制する可能性が示唆された。

以上より、ドデカノールは出芽酵母に対して活性酸素種の産生を介して小胞体ストレス応答を誘発し、その小胞体ストレス応答が PDR5 発現量の減少を介してドデカノール耐性を抑制する可能性があることがわかった。

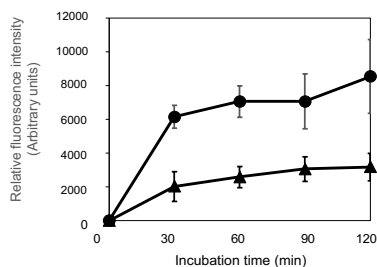


図 4 (a). Efflux of rhodamine 6G from *S. cerevisiae ire1Δ* cells.

S. cerevisiae BY4741 cells of parental (filled triangles) and *ire1Δ* (filled circles) strains were incubated without shaking at 30°C in PBS. The fluorescence intensity of the supernatant was measured using a GENios microplate reader with 485 nm excitation and 535 nm of emission filters. Data are means ± standard deviations of 3 independent experiments.

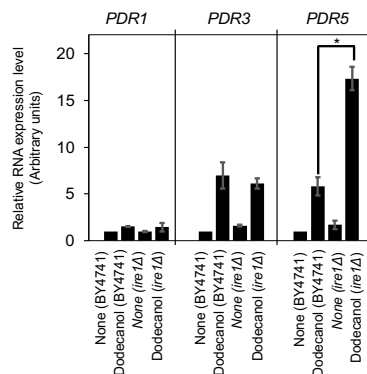


図 4 (b). Relative expression of *PDR1*, *PDR3* and *PDR5* in *ire1Δ* and their parental strain.

S. cerevisiae BY4741 cells of parental (BY4741) and *ire1Δ* cells were incubated in YPD liquid medium supplemented with 31 μM dodecanol at 30°C for 4 h. Total RNA was then extracted and analyzed by RT-qPCR. Gene expression is shown relative to *ACT1* expression. Data are means ± standard deviations of 3 independent experiments. * $p < 0.05$.

小胞体ストレスが誘導された場合、*Ire1p* タンパク質は後生動物では XBP1、出芽酵母では HAC1 の mRNA のスプライシングを触媒することにより小胞体ストレス状態を解消するための反応を活性化させる[4]。そのほか、膜タンパク質や分泌タンパク質の合成を抑制するため、*Ire1p* タンパク質は小胞体膜に局在する mRNA を直接切断する Regulated *Ire1*-dependent decay (RIDD) と呼ばれる反応を起こす[5]。RIDD は哺乳類や植物のほか、分裂酵母などでも報告されてきたが、出芽酵母では起こらないとされていた[6]。しかし、その後、出芽酵母由来の *Ire1p* が複数種の mRNA を分解する活性を持つことを確認したという報告がされている[7]。

Pdr1p と *Pdr3p* は核に局在する[8]。一方で、ABC トランスポーターである *Pdr5p* は細胞膜表面に局在する[9]ことから、タンパク質が合成される際、*PDR5* の mRNA は小胞体膜上に局在すると考えられる。よって、本研究において *ire1Δ* 株と比較した親株において *PDR1* および *PDR3* の発現量が低下せず、*PDR5* の発現量のみが低下していた原因として、*PDR1*, *PDR3* および *PDR5* の 3 つの mRNA のうち、*Ire1p* が小胞体に局在する *PDR5* の mRNA のみを切断する可能性が想定される。

また、*Hac1p* を介する小胞体ストレス応答により、複数遺伝子の発現が抑制されることが報告

されたが、そのほとんどが細胞外に分泌されるタンパク質および細胞膜を含む細胞表面タンパク質の遺伝子であった [10]。よって、PDR5 がその発現抑制のターゲットとなり、発現量が減少した可能性もある。

しかし、現時点では *ire1Δ* 株における PDR5 の発現量の減少の原因を明確にするすることは困難であるため、さらなる研究が必要であると考えられる。

参考文献

- [1] Fujita K, Tatsumi M, Ogita A, Kubo I, Tanaka T. Anethole induces apoptotic cell death accompanied by reactive oxygen species production and DNA fragmentation in *Aspergillus fumigatus* and *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS J.* 281(4):1304-1313. (2014).
- [2] Yamano S, Tsukuda Y, Mizuhara N, Yamaguchi Y, Ogita A, Fujita KI. Dehydrozingerone enhances the fungicidal activity of glabridin against *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Lett Appl Microbiol.* 76(4):ovad040. (2023).
- [3] Tsukuda Y, Mizuhara N, Usuki Y, Yamaguchi Y, Ogita A, Tanaka T, Fujita K. Structure-activity relationships of antifungal phenylpropanoid derivatives and their synergy with *n*-dodecanol and fluconazole. *Lett Appl Microbiol.* 74(3):377-384. (2022).
- [4] Kimata Y, Kohno K. Endoplasmic reticulum stress-sensing mechanisms in yeast and mammalian cells. *Current Opinion in Cell Biology.* 23(2):135-142 (2011).
- [5] Hollien J, Weissman JS. Decay of endoplasmic reticulum-localized mRNAs during the unfolded protein response. *Science.* 313:104-107 (2006).
- [6] Niwa M, Patil CK, DeRisi J, Walter P. Genome-scale approaches for discovering novel nonconventional splicing substrates of the Ire1 nuclease. *Genome Biology.* 6(1):1-10 (2005).
- [7] Tam AB, Koong AC, Niwa M. Ire1 has distinct catalytic mechanisms for XBP1/HAC1 splicing and RIDD. *Cell Reports.* 9:850-858 (2014).
- [8] Delahodde A, Pandjaitan R, Corral-Debrinski M, Jacq Claude. Pse1/Kap121 dependent nuclear localization of the major yeast multidrug resistance (MDR) transcription factor Pdr1. *Molecular Microbiology.* 39(2):304-313 (2001).
- [9] Egner R, Mahe Y, Pandjaitan R, Kuchler K. Endocytosis and vacuolar degradation of the plasma membrane-localized Pdr5 ATP-binding cassette multidrug transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology.* 15(11):5879-5887(1995).
- [10] Kimata K, Ishiwata-Kimata Y, Yamada S, Kohno K. Yeast unfolded protein response pathway regulates expression of genes for anti-oxidative stress and for cell surface proteins. *Genes to Cells.* 11(1):59-69 (2005).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ilhamzah, Yuka Tsukuda, Yoshihiro Yamaguchi, Akira Ogita, Ken-ichi Fujita	4. 巻 NA
2. 論文標題 Persimmon tannin promotes the growth of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> under ethanol stress	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of the Science of Food and Agriculture	6. 最初と最後の頁 In press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jsfa.13439	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Naoko Mizuhara, Moe Inoue, Hideki Kurotaki, Kazuyori Matsumoto, Akira Ogita, Ken-Ichi Fujita	4. 巻 3(3)
2. 論文標題 Pterostilbene, a natural methoxylated analog of resveratrol, exhibits antifungal activity induced by reactive oxygen species production and plasma membrane injury	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Applied Microbiology	6. 最初と最後の頁 666-674
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/applmicrobiol3030045	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 -
1. 著者名 Yamano Saya, Tsukuda Yuka, Mizuhara Naoko, Yamaguchi Yoshihiro, Ogita Akira, Fujita Ken-Ichi	4. 巻 76
2. 論文標題 Dehydrozingerone enhances the fungicidal activity of glabridin against <i>Saccharomyces cerevisiae</i> and <i>Candida albicans</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Letters in Applied Microbiology	6. 最初と最後の頁 In press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/lambio/ovad040	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 N. Yamada, W. Murata, Y. Yamaguchi, K.-I. Fujita, A. Ogita, T. Tanaka	4. 巻 72(4)
2. 論文標題 Enhancing the fungicidal activity of amphotericin B via vacuole disruption by benzyl isothiocyanate, a cruciferous plant constituent	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Letters in Applied microbiology	6. 最初と最後の頁 390-398
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/lam.13425	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yuki Ueda, Yuhei O. Tahara, Makoto Miyata, Akira Ogita, Yoshihiro Yamaguchi, Toshio Tanaka and Ken-ichi Fujita	4. 巻 10(5)
2. 論文標題 Involvement of a Multidrug Efflux Pump and Alterations in Cell Surface Structure in the Synergistic Antifungal Activity of Nagilactone E and Anethole against Budding Yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Antibiotics	6. 最初と最後の頁 537
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antibiotics10050537	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 -

1. 著者名 Y. Tsukuda, N. Mizuhara, Y. Usuki, Y. Yamaguchi, A. Ogita, T. Tanaka, K. Fujita	4. 巻 74(3)
2. 論文標題 Structure-activity relationships of antifungal phenylpropanoid derivatives and their synergy with n-dodecanol and fluconazole	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Letters in Applied Microbiology	6. 最初と最後の頁 377-384
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/lam.13613	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 村田 和加恵、山口 良弘、荻田 亮、藤田 憲一
2. 発表標題 微小管重合阻害添加細胞におけるミトコンドリアの融合・分裂異常
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 二宮 ひとみ、峰 正樹、黒瀧 秀樹、松元一頼、藤田憲一
2. 発表標題 出芽酵母に対するザクロエキスの抗真菌作用とその作用機構の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会関西支部 第524回講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 土田 泰暉, 村田 和加恵, 山口 良弘, 荻田 亮, 藤田 憲一
2. 発表標題 フルコナゾール耐性病原性真菌Candida albicansに対するアネトールの相乗的抗真菌作用
3. 学会等名 第74回日本生物工学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 村田 和加恵, 荻田 亮, 山口 良弘, 藤田 憲一
2. 発表標題 出芽酵母における微小管重合阻害とミトコンドリアの融合・分裂異常の関係
3. 学会等名 第74回日本生物工学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 村田和加恵, 黒見まい, 山口良弘, 荻田亮, 藤田憲一
2. 発表標題 出芽酵母における微小管重合阻害剤によるミトコンドリアの融合・分裂異常
3. 学会等名 日本農芸化学会 2022年度大会 2022年03月
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山口慎太郎, 荻田亮, 山口良弘, 藤田憲一
2. 発表標題 小胞体ストレス応答に着目した真菌の薬剤耐性機構の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会関西支部第519回講演会 2022年02月
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 村田和加恵, 黒見まい, 山口良弘, 荻田亮, 藤田憲一
2. 発表標題 出芽酵母におけるミトコンドリアの融合・分裂に微小管が与える影響
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度西日本・中四国・関西支部 合同大会 2021年09月
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Y. Tsukuda, N. Mizuhara, Y. Usuki, W. Murata, Y. Yamaguchi, A. Ogita, T. Tanaka, K. Fujita
2. 発表標題 Structure-activity relationships in antifungal activities of phenylpropanoid derivatives including trans-anethole and their synergy in combination with n-dodecanol
3. 学会等名 The 14th World Congress on Polyphenol Applications 2021年09月 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水原尚子, 井上萌恵, 黒瀧秀樹, 松元一頼, 藤田憲一
2. 発表標題 出芽酵母に対するプテロスチルベンの抗真菌作用機構
3. 学会等名 日本防菌防黴学会 第48回年次大会 2021年09月
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井上萌恵, 黒瀧秀樹, 松元一頼, 水原尚子, 藤田憲一
2. 発表標題 チアミンラウリル硫酸塩とプテロカルプス抽出物の併用による相乗的抗菌効果の発現
3. 学会等名 日本防菌防黴学会 第48回年次大会 2021年09月
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

大阪公立大学研究者情報
https://kyoiku-kenkyudb.omu.ac.jp/html/100000561_ja.html
大阪公立大学大学院理学研究科分子微生物学研究室
<https://www.omu.ac.jp/sci/biol-mbiol/>

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	臼杵 克之助 (Usuki Yoshinosuke) (30244651)	大阪公立大学・大学院理学研究科・准教授 (24405)	

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