

糸状菌胞子のストレス耐性能に関わる分子機構の解明

萩原 大祐

(千葉大学 真菌医学研究センター)

研究の目的

糸状菌（いわゆるカビ）の胞子は一般に温度や乾燥、紫外線照射といった様々なストレスに耐性が高く、この性質は環境中で生存する上で非常に重要である。しかし、胞子に耐性が付与される分子メカニズムの知見は乏しい。これまでに、我々および他の研究グループにより、モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* において、浸透圧応答 (HOG) 経路を構成する因子 (SskA レスポンスレギュレーター、Hog1 MAPK、AtfA 転写因子) が胞子のストレス耐性付与に重要であることが明らかにされている^{1,2)}。本研究では、医療上重要な *Aspergillus fumigatus* を対象に、AtfA 転写因子の機能解析を端緒として、胞子ストレス耐性に関する機構解明を目指した。本菌は大気中の胞子を吸い込むことにより感染し、侵襲性肺アスペルギルス症を発症する。したがって感染因子である胞子のストレス耐性を分子レベルで理解することは医療上重要であり、本研究で得られる知見は、肺に吸い込んだ胞子を効率的に除去するための薬剤（予防薬）や、医療空間における病原菌胞子の除去技術の開発に資すると考えられる。

方法

A. fumigatus AfS35 株 (*akuB::loxP*) を親株として、*atfA* 遺伝子破壊株および、遺伝子相補株を作製し解析に供した。胞子は Potato Dextrose Agar での 7 日間の培養により採集して実験に用いた。胞子内の糖類の分析は、熱水による抽出物を HPLC で解析した。mRNA 発現解析はリアルタイム PCR 法により行い、トランスクリプトーム解析は illumina 社の Miseq で RNA-sequencing を行った。データ解析は、CLC genomics workbench を用いて RPKM 値を取得した。

結果

1. *A. fumigatus atfA* 遺伝子破壊株はストレスに極めて弱い胞子を着生する

HOG 経路下に制御される AtfA の遺伝子破壊株 ($\Delta atfA$) を作製し、胞子の熱ストレスおよび酸化ストレスに対する耐性を評価したところ、いずれのストレスに対しても顕著な感受性を示した。AtfA が胞子のストレス耐性付与に重要であることが明らかになった。他の *Aspergillus* 種における報告では、胞子内には適合溶質と呼ばれる糖質が蓄積されストレス耐性に重要な役割を果たしている^{3,4)}。*A. fumigatus* の胞子内の糖類を調べた結果、トレハロースが主要な適合溶質であることが明らかになった。トレハロース生合成経路の因子として TpsA-D⁵⁾が知られているが、 $\Delta atfA$ におけるこれらの遺伝子発現は野生株と変わらなかった。一方、酸化ストレス応答に関与するカタラーゼ遺伝子 (*catA*) やデヒドリン遺伝子 (*dprA*) は、野生株では胞子形成時に発現誘導が見られるのに対し、 $\Delta atfA$ では誘導が見られなかった。これらの結果は、 $\Delta atfA$ 胞子が酸化ストレスに感受性である原因の一つと考えられた。

2. 胞子形成時のトランスクリプトーム解析

胞子ストレス耐性における AtfA の機能を包括的に理解するために、トランスクリプトーム解析を行った。その結果、胞子形成時に発現上昇する遺伝子を 738 個見出し、そのうち 54 個が AtfA 依存的な発現誘導を示した。上記 *catA*, *dprA* 以外に胞子特異的因子として知られる光応答性の *ConJ*、ヒートショックプロテイン *Scf1*(HSP9/12)の遺伝子発現上昇が見出された。これらの結果から、抗酸化作用、熱ストレス応答など、胞子が遭遇しうる環境ストレスに対する応答に、AtfA が重要な役割を果たしていることが示唆された。

3. 胞子ストレス耐性における HOG 経路の役割

AtfA は HOG 経路の下流で機能しており、HOG 経路も胞子ストレス耐性に関与していると考えられた。そこで、HOG 経路因子の遺伝子破壊株を作製し検証したところ、HOG MAPK カスケードの上流に位置する SskA レスポンスレギュレーターおよび、PbsB MAPKK の破壊株で、胞子のストレス感受性およびトレハロース蓄積量の低下が観察された。一方、SakA MAPK の破壊株では胞子ストレス耐性もトレハロース蓄積も野生株と同様であった。SakA のオーソログである MpkC MAPK が SakA を代替する可能性を考え、両 MAPK の二重破壊株を作製し検証した。その結果、二重破壊株では PbsB 破壊株などと同程度の胞子ストレス感受性やトレハロース量減少が観察された。したがって、胞子ストレス耐性付与において *A. fumigatus* では MpkC と SakA の両 MAPK が補完的に機能しており、他の *Aspergillus* 種とは異なる HOG 経路のメカニズムが示唆された。

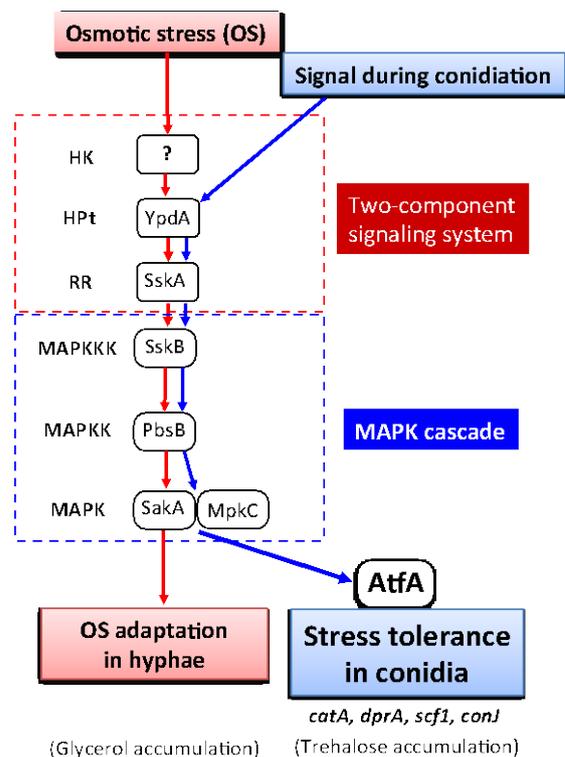


FIG. The HOG pathway of *A. fumigatus*

結論

病原糸状菌 *A. fumigatus* の HOG 経路および AtfA 転写因子はトレハロース蓄積や酸化ストレス耐性、熱ストレス耐性などを通じて胞子ストレス耐性を制御しており、多様な環境における胞子の生存に重要な生理的機能を有することが分かった。

文献

- 1) Furukawa, K., Hoshi, Y., Maeda, T., Nakajima, T., and Abe, K. (2005) *Aspergillus nidulans* HOG pathway is activated only by two-component signalling pathway in response to osmotic stress. *Mol. Microbiol.* **56**: 1246-1261
- 2) Hagiwara, D., Asano, Y., Yamashino, T., and Mizuno, T. (2008) Characterization of bZip-type transcription factor AtfA with reference to stress responses of conidia of *Aspergillus nidulans*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **72**: 2756-2760

- 3) Fillinger, S., et al. (2001) Trehalose is required for the acquisition of tolerance to a variety of stresses in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Microbiology* **147**: 1851-1862
- 4) Ruijter, G.J.G., et al. (2003) Mannitol is required for stress tolerance in *Aspergillus niger* conidiospores. *Eukaryot. Cell* **2**: 690-698
- 5) Al-Bader, N., et al. (2010) Role of trehalose biosynthesis in *Aspergillus fumigatus* development, stress response, and virulence. *Infect. Immun.* **78**: 3007-3018