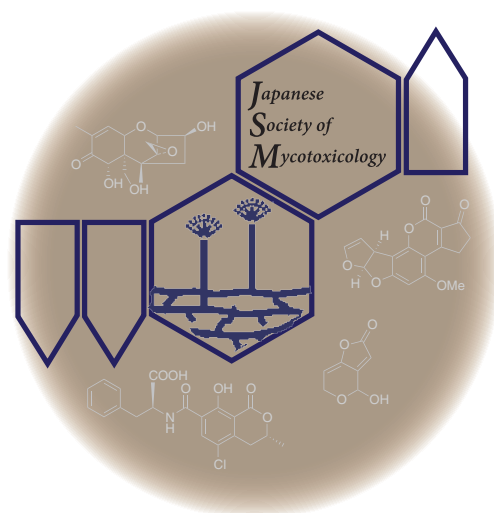


JSM *Mycotoxins*

www.jstage.jst.go.jp/browse/myco



Contribution of gliotoxin to aspergillosis

Takahito Toyotome

JSM Mycotoxins, **65**(2):109-113 (2015)

<http://dx.doi.org/10.2520/myco.65.109>

JSM Mycotoxins is issued twice a year, one volume a year, by the Japanese Society of Mycotoxicology and the purpose of the journal is to publish results and technical information regarding mycotoxins. *JSM Mycotoxins* publishes Reviews, original results (Research Papers, Technical Notes, and Notes), Proceedings of special lectures, symposia, and workshops of the meeting of Japanese Society of Mycotoxicology

Japanese Society of Mycotoxicology

(http://www.jsmyco.org/MYCONTENTS/Eng/index_eng.html)

アスペルギルス症におけるグリオトキシンの寄与

豊留 孝仁¹

¹帯広畜産大学 動物・食品検査診断センター 食品リスク分野 (〒080-8555 北海道帯広市稲田町西2線11番地)

キーワード

アスペルギルス症；
グリオトキシン；二次代謝産物；
Aspergillus fumigatus

連絡先

豊留 孝仁，帯広畜産大学 動物・食品検査診断センター 食品リスク分野，〒080-8555 北海道帯広市稲田町西2線11番地
電子メール：tome@obihiro.ac.jp

(2015年5月26日受理)

要旨

アスペルギルス属菌はアスペルギルス症の原因菌として临床上重要な病原真菌である。中でも *Aspergillus fumigatus* は最も分離頻度が高い真菌種である。アスペルギルス属菌はそれぞれ特徴ある二次代謝産物を産生するが、その感染における役割は十分に明らかになっていない。グリオトキシンは *A. fumigatus* によって産生される主な二次代謝産物の一つである。グリオトキシンを産生できないもしくは産生が低下した *A. fumigatus* 株を用いた検討で、グリオトキシンの病原性への寄与が明らかとなってきた。ここではグリオトキシンを中心に二次代謝産物のアスペルギルス症への寄与に関する報告についてまとめて考察したい。

はじめに

真菌症，特に深在性真菌症は近年の医療の高度化に伴ってその重要性を増しつつある。本邦病理剖検報における深在性真菌症の割合が年々増大していることからその重要性がわかる¹⁾。深在性真菌症の原因となる真菌はその多くが環境中に普遍的に存在もしくはヒトに常在しているが、骨髄移植などに伴う免疫抑制状態においては感染が成立する。一度感染が成立すると治療に難渋するケースも多く、その致死率も依然として高い。これら真菌症に使用される抗真菌薬も開発されてきているが、その種類は限られており、その抗菌スペクトラムも広いとはいえない。さらにアゾール系の抗真菌薬を中心に薬剤耐性真菌の出現が報告され始めており、新たなメカニズムに基づく抗真菌薬の開発が期待されている。

1. アスペルギルス症とその原因真菌

深在性真菌症の一つ、アスペルギルス症は糸状菌が起す真菌症として最も重要である。原因菌種としては *Aspergillus fumigatus* が最も分離頻度が高く、半数程度もしくは半数以上を占めている^{2),3),4),5),6)}。ただし、*A. niger* や *A. flavus* といった non-*fumigatus Aspergillus* もアスペルギルス症の原因菌として知られている。Tashiroらの報告ではアレルギー性気管支肺アスペルギルス症において *A.*

niger が分離されたケースが多かったことを示している⁶⁾。さらに形態的に *A. fumigatus* と区別できない隠蔽種も原因菌となっていることが近年になって明らかとなってきた^{7),8),9)}。 *Aspergillus* 属菌は環境中において優勢な真菌種ではないが普遍的に存在している。 *Aspergillus* 属菌は孢子が非常に飛散しやすいこと、直径数 μm と小さいために肺胞にまで到達可能であること、そしてヒトの体温である 37°C においても旺盛に生育することがヒトへの病原性を示す上で重要な役割を果たしていると考えられている。

2. アスペルギルス症発症に関わる因子

主要な病原真菌である *A. fumigatus* がいかにして病原性を発揮するかについては多くの研究がなされてきた¹⁰⁾。上述の通り、飛散性の高さやヒトの体温に近い 37°C でも発育可能であることなどの形質が病原性発現に重要である。さらに病原性発現に重要な分泌性の因子（タンパク質や低分子化合物）についても興味を持たれ、世界中の研究者により盛んに研究されてきている。タンパク質性の因子としては分泌性のプロテアーゼやカタラーゼ^{11),12)}、溶血活性のあるヘモリジン¹³⁾、RNA分解活性を有するレストリクトシン¹⁴⁾などが挙げられる。詳細に後述する二次代謝産物を含めて様々な因子が候補となっているが、多くの因子は単独では病原性を失わないもしくは失っても部分的であって、菌側の多

くの要素と免疫抑制などの宿主側の要因が複合的に働くことで発症に至ると考えられている。

3. *Aspergillus*属菌が産生する二次代謝産物

*Aspergillus*属菌を含めて糸状菌が多くの二次代謝産物を産生することはよく知られている。アスペルギルス症の原因真菌においても多くの二次代謝産物が産生される。*A. fumigatus*も多くの二次代謝産物を産生しており、最近のTamiyaらの報告でも多数の菌株を用いた27種の二次代謝産物の産生プロファイルを報告している¹⁵⁾。そのほかのアスペルギルス症原因真菌である*A. flavus*ではアフラトキシンなど、*A. niger*はオクラトキシンやフモニシンなどの二次代謝産物を産生する。また、*A. fumigatus*の隠蔽種についての二次代謝産物プロファイルも明らかになってきている¹⁵⁾。これらの二次代謝産物のアスペルギルス症成立への寄与は十分にわかっていないが、*A. fumigatus*が産生するグリオトキシンがその病原性に寄与していることが明らかとなってきた。

4. グリオトキシン

グリオトキシンはepipolythiodioxopiperazineをもつ*A. fumigatus*が産生する二次代謝産物である(図1A)。環境由来株および臨床分離株のいずれにおいてもほとんどの*A. fumigatus*株でグリオトキシンが産生されている^{15),16)}。グリオトキシン産生制御および産生、分泌は生合成遺伝子クラスターに

コードされる13個の遺伝子産物によって担われている(図1B)。*A. fumigatus*の培養上清を処理されたほ乳類細胞は強くアポトーシスが誘導される(図1C)^{17),18)}が、このアポトーシスを誘導する因子がグリオトキシンである。グリオトキシン生合成遺伝子クラスターにコードされる転写因子*gliZ*遺伝子を破壊した*A. fumigatus*株の培養上清ではアポトーシス誘導能は著しく低減している¹⁹⁾。我々はGliAというグリオトキシンを排出するトランスポーターを欠いた株で検討を行い、この株では培養上清中のグリオトキシン量が低下し、細胞死誘導能が低下していることを明らかにしている¹⁸⁾。アポトーシスの誘導機構についてはBakが重要な役割を果たしていること²⁰⁾やその上流でJNKとJNKによりリン酸化を受けるBimが重要な役割を果たしていること²¹⁾などの分子レベルで解明が進んでいる。また、そのほかにグリオトキシンが及ぼす影響としてはNF- κ Bの活性化抑制²²⁾や血小板の活性化²³⁾などが知られている。

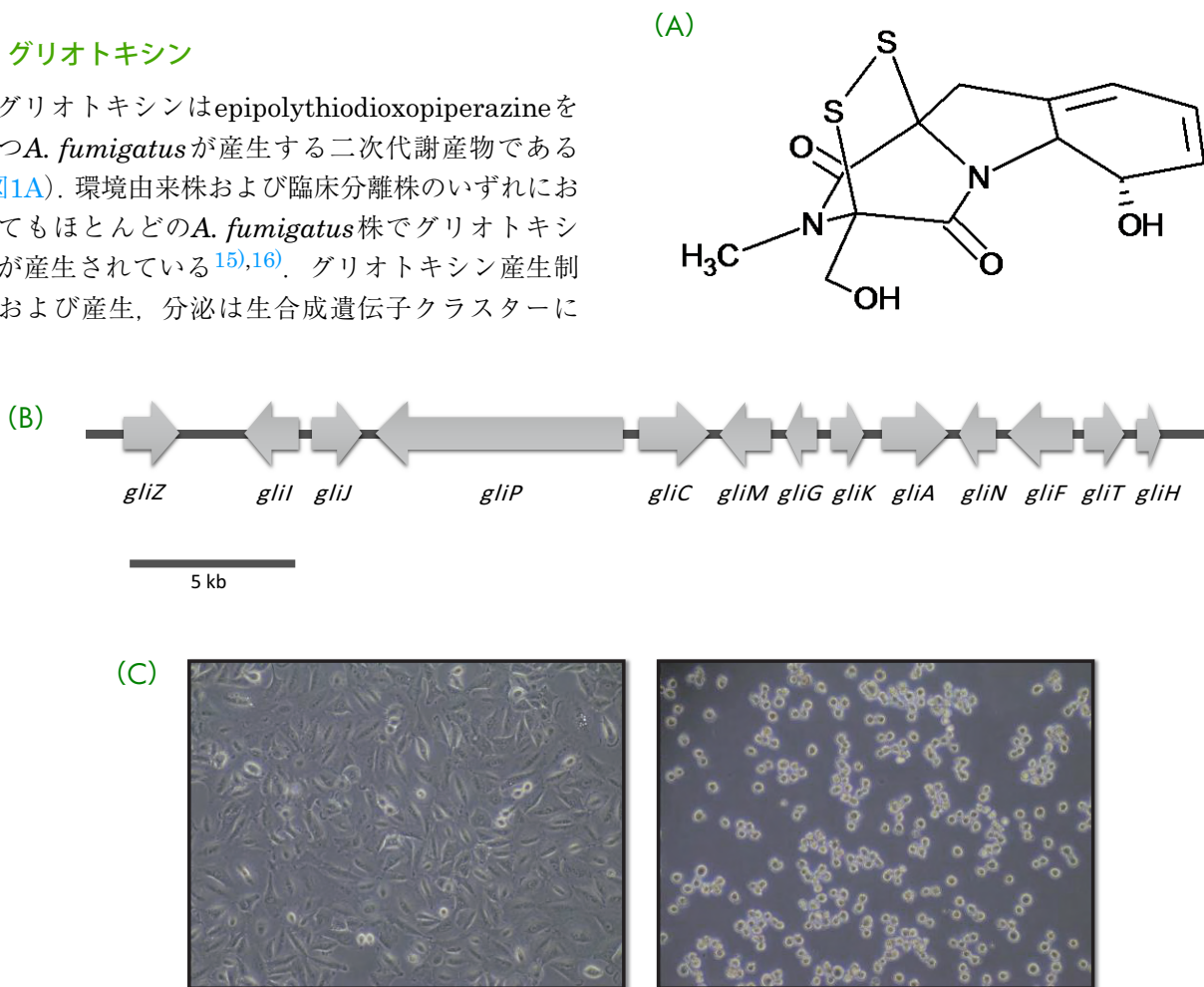


図1 グリオトキシンの構造(A)、その生合成に関わる遺伝子クラスター(B)、およびグリオトキシンにより誘導される細胞死(C)。(C)右図は肺胞上皮由来細胞株A549細胞にグリオトキシンを含む*A. fumigatus*の培養上清を2時間処理した像。左図は無処理像。

5. アスペルギルス症におけるグリオトキシンの役割

*A. fumigatus*のほとんどの株で産生されて、*in vitro*においてアポトーシスを誘導することから、アスペルギルス症発症および感染進展への寄与に興味を持たれていた。グリオトキシンの産生できない株での病原性の評価は我々を含めていくつかのグループから報告されている。非リボソーム型ペプチド合成酵素をコードしている*gliP*を破壊してグリオトキシンを産生できない*A. fumigatus*株を用いて種々のマウスへの感染実験が行われている。この中で免疫抑制手法の重要性が明らかとなってきた。シクロフォスファミドと酢酸コルチゾンの併用ではグリオトキシシン非産生株と親株である野生型株の間に差は認められなかった^{16),24),25)}が、酢酸コルチゾン単独での免疫抑制においては有意にグリオトキシシン非産生株が野生株に比べて病原性が低下していることが示された^{25),26)}。近年、我々の報告でも酢酸コルチゾン単独で免疫抑制処置を行ったマウスに*A. fumigatus*を感染させた実験において、培養上清中のグリオトキシシンが低減している*gliA*欠損株感染マウスの生存率は親株（野生株）感染マウスよりも生存率が高いことを示している（図2）¹⁸⁾。これらの結果から、免疫抑制処置に依存するなど部分的ではあるもののグリオトキシシンがアスペルギルス症の発症そして感染進展に寄与していることが明らかとなってきた。*in vitro*の検討で示されているようにアポトーシス誘導による免疫担当細胞からの攻撃回避、肺胞上皮細胞層の破壊、NF- κ B活性化抑制による免疫応答の抑制などを通じてアスペルギルス症の発症と感染進展に寄与してい

ると考えられるが詳細なメカニズムについては今後もさらなる検討が必要である。

6. そのほかの二次代謝産物の病原性への寄与

上述したように、*A. fumigatus*においてグリオトキシシン以外にも種々の二次代謝産物の産生がみられ、またいくつかの二次代謝産物ではほ乳類細胞への影響が*in vitro*で検討されている。たとえばフマギリンは細胞障害活性²⁷⁾や血管新生阻害活性²⁸⁾を持つことが知られている。しかしながら、フマギリンを含めて*A. fumigatus*の二次代謝産物のアスペルギルス症発症や感染進展への寄与については分かっていない。今後の検討が待たれる。

おわりに

アスペルギルス症原因真菌は多種多様な二次代謝産物を産生する。これまでに多くの研究によりグリオトキシシンが*A. fumigatus*の病原性に寄与していることが示されているが、そのほかの二次代謝産物では十分な証拠は得られていない。また、*A. flavus*などの*A. fumigatus*以外の*Aspergillus*属菌ではどうか、といった点は今後検討が進むと期待しており、我々も現在*A. flavus*を用いた研究を進めている。さらに病原真菌の感染において複数の因子が協働して、発症および感染進展に寄与していると考えられる。感染において複数の二次代謝産物とプロテアーゼ等のタンパク質性因子がどのように相互作用しているのかについても今後研究が必要と考える。

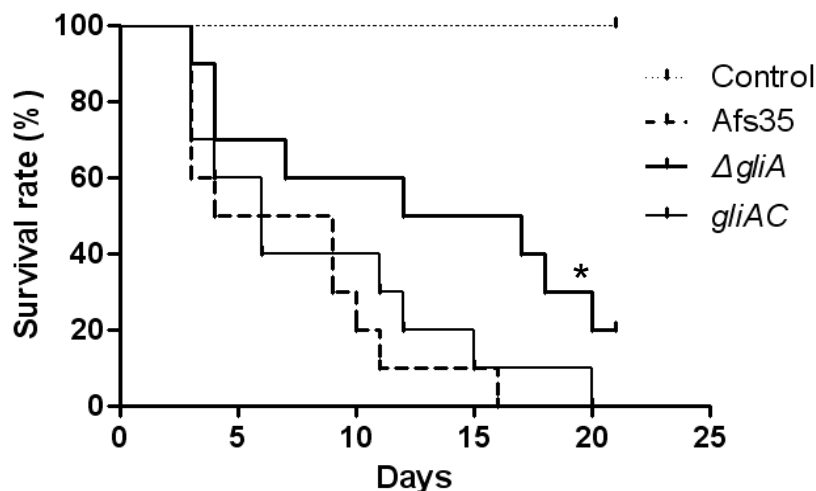


図2 野生株 (Afs35), グリオトキシシン産生量が低下している*gliA*欠損株 ($\Delta gliA$), および*gliA*遺伝子を相補した株 (*gliAC*) をそれぞれ感染させたマウスの感染後生存率¹⁸⁾。 *gliA*欠損株では野生株や*gliA*遺伝子相補株に比べて生存率が高いまま推移している。

引用文献

- 1) Kume, H., Yamazaki, T., Togano, T., Abe, M., Tanuma, H., Kawana, S., Okudaira, M.: Epidemiology of visceral mycoses in autopsy cases in Japan: comparison of the data from 1989, 1993, 1997, 2001, 2005 and 2007 in annual of pathological autopsy cases in Japan. *Med Mycol J*, **52**, 117-127 (2011)
- 2) Taccone, F.S., Van, den Abeele A.M., Bulpa, P., Misset, B., Meersseman, W., Cardoso, T., Paiva, J.A., Blasco-Navalpotro, M., De, Laere E., Dimopoulos, G., Rello, J., Vogelaers, D., Blot, S.I.: Epidemiology of invasive aspergillosis in critically ill patients: clinical presentation, underlying conditions, and outcomes. *Crit Care*, **19**, 722 (2015)
- 3) Schaal, J.V., Leclerc, T., Soler, C., Donat, N., Cirrode, A., Jault, P., Bargues, L.: Epidemiology of filamentous fungal infections in burned patients: A French retrospective study. **41**, 853-863 *Burns* (2015)
- 4) Chong, P.P., Kennedy, C.C., Hathcock, M.A., Kremers, W.K., Razonable, R.R.: Epidemiology of invasive fungal infections in lung transplant recipients on long-term azole antifungal prophylaxis. *Clin Transplant*, **29**, 311-318 (2015)
- 5) Barchiesi, F., Mazzocato, S., Mazzanti, S., Gesuita, R., Skrami, E., Fiorentini, A., Singh, N.: Invasive aspergillosis in liver transplant recipients: epidemiology, clinical characteristics, treatment, and outcomes in 116 cases. *Liver Transpl*, **21**, 204-212 (2015)
- 6) Tashiro, M., Kimura, S., Tateda, K., Saga, T., Ohno, A., Ishii, Y., Izumikawa, K., Tashiro, T., Kohno, S., Yamaguchi, K.: Pravastatin inhibits farnesol production in *Candida albicans* and improves survival in a mouse model of systemic candidiasis. *Med Mycol*, **50**, 353-360 (2011)
- 7) Balajee, S.A., Gribskov, J.L., Hanley, E., Nickle, D., Marr, K.A.: *Aspergillus lentulus* sp. nov., a new sibling species of *A. fumigatus*. *Eukaryot Cell*, **4**, 625-632 (2005)
- 8) Vinh, D.C., Shea, Y.R., Jones, P.A., Freeman, A.F., Zelazny, A., Holland, S.M.: Chronic invasive aspergillosis caused by *Aspergillus viridinutans*. *Emerg Infect Dis*, **15**, 1292-1294 (2009)
- 9) Coelho, D., Silva, S., Vale-Silva, L., Gomes, H., Pinto, E., Sarmiento, A., Pinheiro, M.D.: *Aspergillus viridinutans*: an agent of adult chronic invasive aspergillosis. *Med Mycol*, **49**, 755-759 (2011)
- 10) Abad, A., Fernandez-Molina, J.V., Bikandi, J., Ramirez, A., Margareto, J., Sendino, J., Hernando, F.L., Ponton, J., Garaizar, J., Rementeria, A.: What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis. *Rev Iberoam Micol*, **27**, 155-182 (2010)
- 11) Paris, S., Wysong, D., Debeauvais, J.P., Shibuya, K., Philippe, B., Diamond, R.D., Latge, J.P.: Catalases of *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun*, **71**, 3551-3562 (2003)
- 12) Shibuya, K., Paris, S., Ando, T., Nakayama, H., Hatori, T., Latge, J.P.: Catalases of *Aspergillus fumigatus* and inflammation in aspergillosis. *Jpn J Med Mycol*, **47**, 249-255 (2006)
- 13) Kumagai, T., Nagata, T., Kudo, Y., Fukuchi, Y., Ebina, K., Yokota, K.: Cytotoxic activity and cytokine gene induction of Asp-hemolysin to murine macrophages. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi* (in Japanese), **40**, 217-222 (1999)
- 14) Arruda, L.K., Platts-Mills, T.A., Fox, J.W., Chapman, M.D.: *Aspergillus fumigatus* allergen I, a major IgE-binding protein, is a member of the mitogillin family of cytotoxins. *J Exp Med*, **172**, 1529-1532 (1990)
- 15) Tamiya, H., Ochiai, E., Kikuchi, K., Yahiro, M., Toyotome, T., Watanabe, A., Yaguchi, T., Kamei, K.: Secondary metabolite profiles and antifungal drug susceptibility of *Aspergillus fumigatus* and closely related species, *Aspergillus lentulus*, *Aspergillus udagawae*, and *Aspergillus viridinutans*. *J Infect Chemother*, **21**, 385-391 (2015)
- 16) Kupfahl, C., Michalka, A., Lass-Flörl, C., Fischer, G., Haase, G., Ruppert, T., Geginat, G., Hof, H.: Gliotoxin production by clinical and environmental *Aspergillus fumigatus* strains. *Int J Med Microbiol*, **298**, 319-327 (2008)
- 17) Kamei, K., Watanabe, A., Nishimura, K., Miyaji, M.: Culture filtrate of *Aspergillus fumigatus* and its cytotoxic activity against leukocytes. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi* (in Japanese), **43**, 163-166 (2002)
- 18) Wang, D.N., Toyotome, T., Muraosa, Y., Watanabe, A., Wuren, T., Bunsupa, S., Aoyagi, K., Yamazaki, M., Takino, M., Kamei, K.: GliA in *Aspergillus fumigatus* is required for its tolerance to gliotoxin and affects the amount of extracellular and intracellular gliotoxin. *Med Mycol*, **52**, 506-518 (2014)
- 19) Bok, J.W., Chung, D., Balajee, S.A., Marr, K.A., Andes, D., Nielsen, K.F., Frisvad, J.C., Kirby, K.A., Keller, N.P.: GliZ, a transcriptional regulator of gliotoxin biosynthesis, contributes to *Aspergillus fumigatus* virulence. *Infect Immun*, **74**, 6761-6768 (2006)
- 20) Pardo, J., Urban, C., Galvez, E.M., Ekert, P.G., Muller, U., Kwon-Chung, J., Lobigs, M., Mullbacher, A., Wallich, R., Borner, C., Simon, M.M.: The mitochondrial protein Bak is pivotal for gliotoxin-induced apoptosis and a critical host factor of *Aspergillus fumigatus* virulence in mice. *J Cell Biol*, **174**, 509-519 (2006)

- 21) Geissler, A., Haun, F., Frank, D.O., Wieland, K., Simon, M.M., Idzko, M., Davis, R.J., Maurer, U., Borner, C.: Apoptosis induced by the fungal pathogen gliotoxin requires a triple phosphorylation of Bim by JNK. *Cell Death Differ*, **20**, 1317-1329 (2013)
- 22) Pahl, H.L., Krauss, B., Schulze-Osthoff, K., Decker, T., Traenckner, E.B., Vogt, M., Myers, C., Parks, T., Warring, P., Muhlbacher, A., Czernilofsky, A.P., Baeuerle, P.A.: The immunosuppressive fungal metabolite gliotoxin specifically inhibits transcription factor NF- κ B. *J Exp Med*, **183**, 1829-1840 (1996)
- 23) Speth, C., Hagleitner, M., Ott, H.W., Wurznner, R., Lass-Florl, C., Rambach, G.: *Aspergillus fumigatus* activates thrombocytes by secretion of soluble compounds. *J Infect Dis*, **207**, 823-833 (2013)
- 24) Cramer, R.A. Jr, Gamcsik, M.P., Brooking, R.M., Najvar, L.K., Kirkpatrick, W.R., Patterson, T.F., Balibar, C.J., Graybill, J.R., Perfect, J.R., Abraham, S.N., Steinbach, W.J.: Disruption of a nonribosomal peptide synthetase in *Aspergillus fumigatus* eliminates gliotoxin production. *Eukaryot Cell*, **5**, 972-980 (2006)
- 25) Spikes, S., Xu, R., Nguyen, C.K., Chamilos, G., Kontoyiannis, D.P., Jacobson, R.H., Ejzykiewicz, D.E., Chiang, L.Y., Filler, S.G., May, G.S.: Gliotoxin production in *Aspergillus fumigatus* contributes to host-specific differences in virulence. *J Infect Dis*, **197**, 479-486 (2008)
- 26) Sugui, J.A., Pardo, J., Chang, Y.C., Zarembek, K.A., Nardone, G., Galvez, E.M., Mullbacher, A., Gallin, J.I., Simon, M.M., Kwon-Chung, K.J.: Gliotoxin is a virulence factor of *Aspergillus fumigatus*: *gliP* deletion attenuates virulence in mice immunosuppressed with hydrocortisone. *Eukaryot Cell*, **6**, 1562-1569 (2007)
- 27) Bungler, J., Westphal, G., Monnich, A., Hinnendahl, B., Hallier, E., Muller, M.: Cytotoxicity of occupationally and environmentally relevant mycotoxins. *Toxicology*, **202**, 199-211 (2004)
- 28) van den Heever J.P., Thompson, T.S., Curtis, J.M., Ibrahim, A., Pernal, S.F.: Fumagillin: an overview of recent scientific advances and their significance for apiculture. *J Agric Food Chem*, **62**, 2728-2737 (2014)

Contribution of gliotoxin to aspergillosis

Takahito Toyotome¹

¹Diagnostic Center for Animal Health and Food Safety, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Nishi 2-11, Inada-cho, Obihiro, Hokkaido 080-8555, Japan

Aspergillus species (spp.) are medically important pathogens that cause aspergillosis, and *A. fumigatus* is the most prevalent causative agent of the disease. *Aspergillus* spp. produce various secondary metabolites; however, the role of these metabolites in aspergillosis remains unclear. Gliotoxin is a major secondary metabolite produced by *A. fumigatus*. Several recent studies have reported that gliotoxin contributes to the virulence of *A. fumigatus*. Here I review studies related to gliotoxin and its contribution to the infection caused by *A. fumigatus*.

Keywords: aspergillosis; *Aspergillus fumigatus*; gliotoxin; secondary metabolite