

Menadione 処理した *Candida albicans* ROS 産生機構の解析

上野 将明, 小笠原綾子, 渡部 俊彦, 三上 健, 松本 達二

Analysis of ROS Production Mechanism in *Candida albicans* Treated with Menadione

Yukihiro UENO, Ayako OGASAWARA, Toshihiko WATANABE, Takeshi MIKAMI, and Tatsuji MATSUMOTO

(Received November 20, 2008)

Menadione shows anti *Candida* activity by promoting ROS production. However, the ROS production mechanism has not been clarified. Thus, in this study, we studied the relation between anti *Candida* activity of menadione and ROS production. Menadione inhibited the growth of *C. albicans* BWP17 strain, however, the growth of *C. albicans* JM02 strain was not inhibited. ROS production in *C. albicans* BWP17 strain was enhanced by addition of menadione. The ROS production in *C. albicans* JM02 strain was also enhanced by menadione, however, the amount of ROS was lower than that in menadione untreated *C. albicans* BWP17 strain. NDH51 is 51-kDa subunit of NADH dehydrogenase complex I, and *C. albicans* JM02 strain is deficient in NDH51 strain.

Rotenone, an NADH dehydrogenase complex I inhibitor, decreased the menadione sensitivity of the *C. albicans* BWP17 strain, indicating that NDH51 related to the menadione sensitivity of *C. albicans*. The expression of NDH51 mRNA was increased by menadione in *C. albicans* BWP17 strain.

These results indicated that menadione inhibited the growth of *C. albicans* by stimulating the ROS production system through activation of NDH51 in *C. albicans*.

Key words — *Candida albicans*; ROS; Menadione; NDH51

緒 論

Candida albicans は、ヒトに親和性が強く、皮膚や口腔、膣、消化管などの粘膜などに定着している常在菌であり、日和見感染原因菌の一つとしても知られている。^{1,2)} *C. albicans* の感染症をカンジダ症 (candidiasis) といい、一般に皮膚、爪、口腔、膣カンジダ症に代表される表在性カンジダ症 (superficial candidiasis) と、消化管、腎臓、肺、心臓、肝臓などの深部臓器に生じる深在性カンジダ症 (systemic candidiasis) に大別され、³⁾ カンジダ症の発症率は、健常人よりも食食機能が低下した患者の方が 8 ~ 10% 高いと言われている。⁴⁾ 生体内に侵入した *C. albicans* は免疫細胞に取り込まれ、活性酸素 (Reactive oxygen species: ROS) による酸化ストレスや浸透圧ストレスを受け殺菌される。⁵⁻⁷⁾ 健常人と比較して免疫機能が低下した患者においてカンジダ症の発症率が増加するのは、食食作用を示す好中球機能欠損や変形、萎縮 (好中球減少症) などが原因と考えられる。⁸⁾ カンジダ症の治療法には主に Azole 系薬が使用される。また、稀に Amphotericin B も使用されることがあるが、腎障害などの副作用が強く使用が制限される。⁹⁾

Vitamin K は脂溶性 Vitamin の一種であり、自然界に存在する Vitamin K は、Vitamin K₁ (Phylloquinone; 2-メチル-3-フィチル-1,4-ナフトキノン) と Vitamin K₂ (Menaquinone; 2-ファルネシル-3-メチル-1,4-ナフトキノン) の 2 つに分けられる。Vitamin K₁ は、主に植物に含まれ、Vitamin K₂ は、微生物が作り出す Vitamin であり、人体内の腸内細菌によっても作り出される。¹⁰⁾ これ以外に、合成 Vitamin として Vitamin K₃ (Menadione; 2-メチル-1,4-ナフトキノン) があり、止血や骨形成促進などの働きを有するビタミンの一種である。¹¹⁾

これまでに、Menadione が、*C. albicans* に対して抗菌活性を示すことが報告され、この機構が、臨床で使用される抗真菌剤の作用機構とは異なる機序、すなわち菌体内 ROS 誘導によって引き起こされることが明らかになっている。^{6,12,13)}

抗真菌剤の種類は、抗生物質に比べ少なく、耐性菌の発現を考慮した場合、従来の抗真菌薬とは作用点の異なる薬剤の開発が重要な課題となっている。Menadione の抗菌活性の解析は、抗真菌剤の新たな標的部位を解明する意味で大変興味深いのが、Menadione による ROS 産生機構に関して詳細な解析は行われていない。

本研究では, Menadione による *C. albicans* 菌体内 ROS 産生機構の解析を行ったので報告する.

材料及び方法

1. 菌株

実験には *C. albicans* JM02 株 (*ura3* Δ :: λ *imm434/ura3* Δ :: λ *imm434 his1*::*hisG/his1*::*hisG arg4*::*hisG/arg4*::*hisG ndh51*::*ARG4/ndh51*::*URA3*, ミトコンドリア Complex I を構成する NDH51 遺伝子の欠損株) 及びその親株である BWP17 株 (*ura3* Δ :: λ *imm434/ura3* Δ :: λ *imm434 his1*::*hisG/his1*::*hisG arg4*::*hisG/arg4*::*hisG NDH51/NDH51*) を使用した. *C. albicans* は酵母エキス加液体サブロー培地 (0.5% 酵母エキス, 2.0% グルコース, 1.0% ペプトン) において 27°C, 24 時間振とう培養し, その後, 実験に使用した.

2. 試薬

Menadione (合成 Vitamin K₃) 及び Rotenone (ミトコンドリア Complex I 阻害剤) は Sigma 社製を用いた.

3. Menadione による *C. albicans* 増殖抑制効果

C. albicans (1×10^5 cells/mL in RPMI1640 培地) を RPMI1640 培地に懸濁後, Menadione (最終濃度 0, 0.1 mM in RPMI1640 培地) を添加して 37°C, 5% CO₂ 条件下で培養し, 培養開始 1 時間ごとの菌量を OD620 nm により測定した.

4. *C. albicans* 菌体内 ROS の定量

C. albicans (1×10^5 cells/mL in RPMI1640 培地) に Menadione (最終濃度 0, 0.1 mM in RPMI1640 培地) を添加して 37°C, 5% CO₂ 条件下で 9 時間培養を行った. その後, 菌懸濁液を滅菌水で 2 回洗浄し, MiniBeadbeater (直径 0.5 mm の glass beads を使用; Central Scientific Commerce, Inc.) を用いて破碎処理後, 上清を回収した. ROS 量は Peroxidetect キット (Sigma 社製) を用いて測定した. ROS は H₂O₂ 量に換算し, 結果に示した.

5. Rotenone 処理 *C. albicans* の Menadione 感受性

C. albicans (1×10^5 cells/mL in RPMI1640 培地) に Menadione (最終濃度 0, 0.1 mM in RPMI1640 培地) 及びミトコンドリア Complex I の阻害剤である Rotenone (最終濃度 0, 5.0 μ g/mL) を添加して 37°C, 5% CO₂ 条件下で培養を行い, 培養開始 1 時間ごとの菌量を OD620 nm により測定した.

6. Real-time PCR 法による mRNA の定量

C. albicans (1×10^5 cells/mL in RPMI1640 培地)

に Menadione (最終濃度 0, 0.1 mM in RPMI1640 培地) を添加して 37°C, 5% CO₂ 条件下で 9 時間培養を行った. その後, 菌液を回収し, Maq Extractor-RNA- (TOYOBO 社) を用いて Total RNA を作製した. さらにこの溶液と Cell-to-cDNA (Ambion 社) を用いて *C. albicans* cDNA library を作製した. 遺伝子配列は, National Center for Biotechnology Information (NCBI) の Entrez システムを利用して検索した. この配列を基に Primer Express を利用して PCR 用の primer を設計した.

NDH51 primer は Forward primer として, 5'-TCGTGGAGGTGCTGGTTTC-3', Reverse primer として, 5'-TTACAAGTACCTGGTTCCCCTTCA-3', Probe として, 5'-CATTATGAATCCGCCAGGTT-3' を使用した. PCR 反応は 2 \times Universal PCR Master Mix, 10 μ M Forward Primer, 10 μ M Reverse Primer, 5 μ M 20 \times Human 18s rRNA, 作製した cDNA 1 μ L を含む 25 μ L の反応液中で行った. PCR は, 初めに 50°C 2 min, 次に 95°C 10 min 処理し, その後 95°C 15 sec \rightarrow 60°C 1 min 40 cycle 行った. 増幅された DNA 含量は 7500 real-time PCR system により解析を行った.

7. 統計処理

得られた実験結果は, Student's *t*-検定により統計処理を行った.

実験結果

1. Menadione による *C. albicans* 増殖抑制

Menadione の *C. albicans* 増殖に及ぼす影響を検討した. Fig. 1 で示すように, Menadione の添加により, *C. albicans* BWP17 株の増殖は抑制されたが, NDH51 遺伝子欠損株である JM02 株においては Menadione を添加しても菌の増殖は抑制されなかった. このことから Menadione による *C. albicans* 増殖抑制効果発現には, ミトコンドリア Complex I を構成する NDH51 の有無が関係していることが推察された.

2. Menadione 処理された *C. albicans* 菌体内 ROS の定量

Menadione による *C. albicans* の抗菌活性には, 菌体内で産生される ROS が関与する報告のあることから, ^{6,11,12)} Menadione 処理した *C. albicans* BWP17 株と JM02 株の菌体内 ROS 量を比較検討した. その結果, Menadione 処理した *C. albicans* BWP17 株の

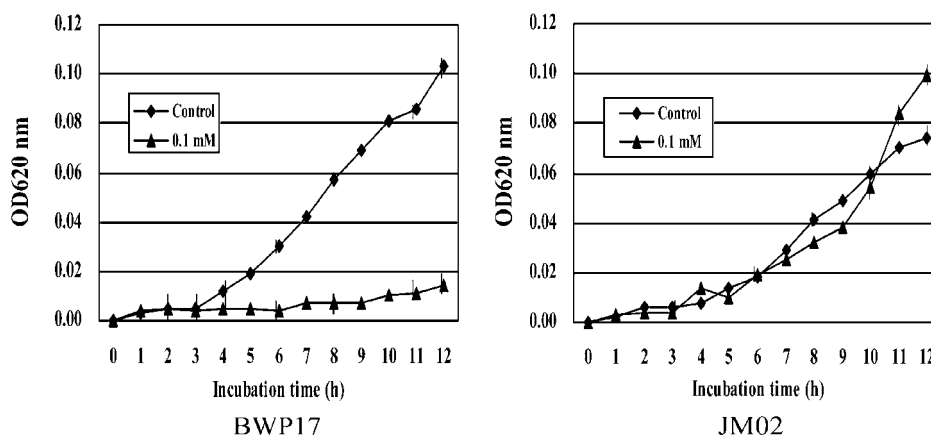


Fig. 1. Growth of *C. albicans* Stimulated by Menadione. *C. albicans* cells (1×10^5 cells/mL in RPMI1640 medium) were incubated with menadione (final concentration 0.1 mM) at 37°C in 5% CO₂. After incubation, the amount of *C. albicans* was measured as the optical density at 620 nm for every hour until 12 h.

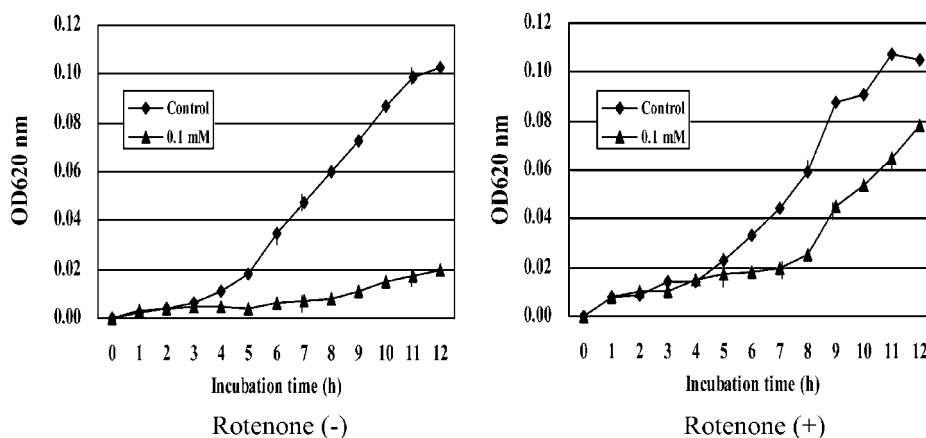


Fig. 2. Effect of Rotenone on Growth of *C. albicans* Treated with Menadione. *C. albicans* cells (1×10^5 cells/mL in RPMI1640 medium) were incubated with menadione and rotenone (final concentration 5.0 μ g/mL) at 37°C in 5% CO₂. After incubation, the amount of *C. albicans* was measured as the optical density at 620 nm for every hour until 12 h.

Table 1. Amount of ROS in *C. albicans* Treated with Menadione

	Menadione (mM)	H ₂ O ₂ (μ M)/ 1×10^5 cells
BWP17	0	1.35 \pm 0.05
	0.1	6.30 \pm 0.04
JM02	0	0.71 \pm 0.03
	0.1	1.42 \pm 0.08

C. albicans (1×10^5 cells/mL in RPMI1640 medium) was mixed with menadione at 37°C in 5% CO₂ for 9 h. After incubation, cells were washed twice with sterile water and disrupted with a Mini-Beadbeater (diameter of glass beads, 0.3 mm, Central Scientific Commerce, Inc. Canada). The amount of ROS in *C. albicans* was measured using PeroxiDetect™ kit (Sigma-Aldrich).

ROS 産生量 (6.30 \pm 0.04 μ M/ 1×10^5 cells) は、Menadione 処理した JM02 株 (1.42 \pm 0.08 μ M/ 1×10^5 cells) に比べて有意 ($P < 0.001$) に増加していた (Table 1). また、Menadione 未処理 *C. albicans* BWP17 株の ROS 産生量 (1.35 \pm 0.05 μ M/ $1 \times$

Table 2. Relative Expressions of NDH51 mRNA in *C. albicans* Treated with Menadione

	Menadione (mM)	NDH51 / 18s rRNA
BWP17	0	14.99 \pm 1.44
	0.1	31.17 \pm 2.00

C. albicans (1×10^5 cells/mL in RPMI1640 medium) was incubated with/without 0.1 mM menadione at 37°C in 5% CO₂ for 9h. After incubation, the relative expressions of mRNAs were measured as described in Materials and Methods.

10^5 cells) と比べ、Menadione 未処理 *C. albicans* JM02 株の ROS 産生量は有意 ($P < 0.001$) に低い値であり、これらの結果から、NDH51 は ROS 産生に関与し、Menadione は NDH51 の活性化を介して ROS 産生を促進させている可能性が推察された。

3. Rotenone 処理 *C. albicans* の Menadione 感受性

Menadione による NDH51 の活性化と抗菌活性との関係を明らかにする目的で, ミトコンドリア Complex I の機能を阻害する Rotenone¹⁴⁾ で *C. albicans* BWP17 株を処理し, *C. albicans* の Menadione に対する感受性の変化を測定した. Rotenone 未添加群では, Menadione の刺激で *C. albicans* BWP17 株の増殖は著しく抑制されたが, Rotenone 添加群では, Menadione で刺激しても *C. albicans* BWP17 株の増殖は抑制されなかった (Fig. 2). この結果から, Rotenone により Complex I が不活性化された状態では Menadione の殺菌効果は発揮されないことが明らかになった.

4. Menadione 処理された *C. albicans* NDH51mRNA 発現量の変化

NDH51 の有無が Menadione による ROS 産生や, Menadione に対する *C. albicans* の感受性に影響を与えていることから, Menadione の処理によって NDH51 発現にどのような変化が起きるのかを測定した. Menadione 刺激した *C. albicans* BWP17 株の NDH51mRNA 発現量は, 未処理の *C. albicans* BWP17 株での発現量と比較して, 有意に増加していた. この結果から, Menadione による刺激が, NDH51 発現量を増加させている可能性が示唆された (Table 2).

考 察

C. albicans は日和見感染真菌の一つで, 極度に免疫機能が低下した患者に対しては, 時に致死的な症状を引き起こす病原性真菌として知られている.¹⁻⁴⁾ *C. albicans* による真菌症の治療には, Azole 系抗真菌薬が利用されているが, 耐性菌が増えつつあり, 従来の抗真菌薬とは作用点の異なる薬剤の開発や, 新たな治療法の開発が課題となっている.

Complex I を構成する NDH51 遺伝子を欠損させた *C. albicans* JM02 株とその親株である *C. albicans* BWP17 株の Menadione に対する感受性を検討したところ, Menadione は *C. albicans* BWP17 株の増殖を抑制したが, *C. albicans* JM02 株に対しては, 増殖抑制効果を示さなかった. (Fig. 1) この結果から, Menadione の抗カンジダ活性発現には, NDH51 の発現が必要であることが示唆された.

Menadione が抗カンジダ活性を示す要因として菌

体内 ROS 量の増加が報告されていることと,^{6,12,13)} *C. albicans* JM02 株の Menadione 感受性が低いことから, *C. albicans* の ROS 産生に NDH51 が関与している可能性が示唆された.

そこで, NDH51 の有無が ROS 産生に影響を与えているか否かを明らかにするために, Menadione を処理した *C. albicans* BWP17 株と JM02 株の菌体内 ROS 量を測定した. その結果, Menadione 処理 *C. albicans* BWP17 株における ROS 産生量は Menadione 未処理と比較して約 5 倍に増加していたが, NDH51 が欠損した JM02 株では Menadione の添加による ROS 産生量の増加は, 未添加群の約 2 倍程度であり, NDH51 が Menadione による ROS 産生に促進的に関与していることが明らかになった (Table 1).

また, NDH51 が欠損している *C. albicans* JM02 株でも, ROS 産生が認められていることから, *C. albicans* の ROS 産生には NDH51 が関与しない経路も存在すると考えられた. さらに, *C. albicans* JM02 株を Menadione で刺激しても ROS 産生量が増加することから, Menadione は, NDH51 非介在性 ROS 産生経路に対しても, 活性化させる作用のあることが考えられた. しかし, Menadione 処理した *C. albicans* JM02 株の ROS 産生量は, Menadione 未処理の *C. albicans* BWP17 株の ROS 産生量と同程度であることから, NDH51 を介さない経路で産生される ROS の抗カンジダ活性への関与は低いことが推察された (Table 1).

Menadione による NDH51 を介した ROS 産生経路が, Menadione の抗カンジダ活性に関与しているか否かを明らかにする目的で, ミトコンドリア Complex I の阻害剤である Rotenone を Menadione と共に *C. albicans* BWP17 株に加え, Menadione の抗菌活性にどのような変化が現れるのかを検討した. Fig. 2 に示すように Rotenone 添加群と未添加群を比較すると, Rotenone 非存在下 Menadione 刺激群では, *C. albicans* BWP17 株の増殖は Menadione 未刺激群と比較して著しく抑制されていたが, Rotenone 存在下での Menadione 刺激では, *C. albicans* BWP17 株の増殖は抑制されなかった. 以上の結果から, ミトコンドリア Complex I 機能が抑制されている状態では, Menadione の抗カンジダ活性が十分に発揮されないことが明らかとなった. この結果から, *C. albicans* JM02 株に対して Menadione が抗菌活性を示さない理由として, *C.*

albicans JM02 株では NDH51 欠損によって Complex I が機能していないことが推察された。

NDH51 の有無が Menadione による ROS 産生や抗カンジダ活性に影響を与えている可能性が示唆されることから、Menadione 処理した *C. albicans* BWP17 株の NDH51 mRNA 発現量を Real-time PCR により測定したところ、Menadione 添加群での NDH51 mRNA 発現量が、Menadione 未添加群と比較して有意に増大する結果が得られた (Table 2)。これにより、Menadione には *C. albicans* の NDH51 発現量を増加させる作用のあることが明らかになった。

以上の結果から、Menadione が示す抗菌作用は、Menadione による NDH51 発現量の増加が、*C. albicans* の菌体内 ROS 産生経路を活性化させ、これにより増加した ROS が菌に障害を与えていることによって引き起こされることが明らかになった。

REFERENCES

- 1) Orejas R. D., Moleo G, Garcia F. N., Pla J, Nombela C, Perez M. S., *Infect. Immun.*, **65**, 833-837 (1997).
- 2) Domer J. E., Human L. G., Andersen G. B., Rudbach J. A., Asherson G. L., *Infect. Immun.*, **61**, 2122-2130 (1993).
- 3) Weiner M. H., Coats-Stephen M., *J. Infect. Dis.*, **140**, 989-993 (1979).
- 4) Goswami R., Dadhwal V., Tejaswi S., Datta K., Paul A., Haricharan R. N., Banerjee U., Kochupillai N. P., *J. Infect.*, **41**, 162-166 (2000).
- 5) Enjalbert B., Nantel A., Whiteway M., *Mol. Biol. Cell*, **14**, 1460-1467 (2003).
- 6) Chauhan N., Inglis D., Roman E., Pla J., Li D., Calera J. A., Calderone R., *Eukaryot. Cell*, **2**, 1018-1024 (2003).
- 7) Martchenko M., Alarco A. M., Harcus D., Whiteway M., *Mol. Biol. Cell*, **15**, 456-467 (2004).
- 8) Hunt S. J., Nagi C., Gross K. G., Wong D. S., Mathews W. C., *Arch. Dermatol.*, **128**, 1229-1232 (1992).
- 9) Vazquez J. A., *Clin. Ther.*, **27**, 657-673 (2005).
- 10) Okano T., Shimomura Y., Yamane M., Suhara Y., Kamao M., Sugiura M., Nakagawa K., *J. Biol. Chem.*, **283**, 11270-11279 (2007).
- 11) Osada S., Tomita H., Tanaka Y., Tokuyama Y., Tanaka H., Sakashita F., Takahashi T., *Anticancer Res.*, **28**, 45-50 (2008).
- 12) Hwang C. S., Rhie G. E., Oh J. H., Huh W. K., Yim H. S., Kang S. O., *Microbiology*, **148**, 3705-3713 (2002).
- 13) Alonso-Monge R., Navarro-García F., Román E., Negrodo A. I., Eisman B., Nombela C., Pla J., *Eukaryot. Cell.*, **2**, 351-361 (2003).
- 14) Helmerhorst E. J., Murphy M. P., Troxler R. F., Oppenheim F. G., *Biochim. Biophys. Acta.*, **1556**, 73-80 (2002).