

平成 22 年 6 月 19 日現在

研究種目：若手研究 (A)

研究期間：2006～2008

課題番号：18688003

研究課題名（和文） 真菌のエネルギー獲得機構のなりたちと分子進化

研究課題名（英文） Molecular mechanisms of fungal energy conservation

研究代表者

高谷 直樹 (TAKAYA NAOKI)

筑波大学・大学院生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：50282322

研究成果の概要：カビや酵母などの真菌は、醸造・発酵産業に利用され我々の生活に利益をもたらすとともに、動植物の病原菌として厄介な存在でもある。本研究では、真菌の生命の維持に必要なエネルギー代謝に注目し、これを解明することによって、真菌の生育（繁殖）の制御に関する知見を得ることを試みている。また、得られた知見を他の生物のそれと比較・検証することにより、真菌のエネルギー獲得機構のなりたちと分子進化を考察することを目指した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	10,300,000	3,090,000	13,390,000
2007年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2008年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
年度			
年度			
総計	22,900,000	6,870,000	29,770,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：エネルギー代謝、異化、発酵、ミトコンドリア、オミクス

## 1. 研究開始当初の背景

研究代表者らの研究などから、真菌（カビ）などの真核生物があたかも原核生物（細菌）のように、多様な無機・有機物を最終的な酸化剤として発酵や呼吸をすることが明らかになってきた。1996年に本邦の研究グループにより、カビ *Fusarium oxysporum* が硝酸呼吸（脱窒）を行い嫌気的条件下で生育することが、真核生物としては初めて報告された。これまでに、真核生物が酸素呼吸に依存せずに生育できること、真核生物の嫌気的エネルギー獲

得機構が多様性をもつこと、カビが低酸素条件下への適応機構をもつことが明らかとなった。この成果は、真核生物のエネルギー代謝の多様性を示す例として科学的意義が高い。一方、一連の研究がなされる以前には、これらの嫌気的なエネルギー獲得機構は原核生物固有のものであり、進化的に古い代謝であると考えられていた。最も下等な真核生物の一つであるカビがこのような嫌気代謝を行うことは、原核生物から真核生物に到る過程でのエネルギー獲得機構の進化に対する知見を知

る上でも重要である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、(1)カビの多様な嫌気代謝系（硝酸呼吸、アンモニア発酵、異化的硫黄還元）の未同定の構成成分を明らかにすること、(2)これらの代謝系の相互関係、発現制御機構を多面的に解析し、カビの嫌气的エネルギー代謝の「なりたち」を明らかにすることである。また、それにより、(3)原核生物から高等真核生物に至る「エネルギー獲得機構の変遷・分子進化」を考察することである。

## 3. 研究の方法

### (1) 使用菌株、培養

一連の研究には、*Fusarium oxysporum* JCM11502 または、*Aspergillus nidulans* (Fungal Genetic Stock Center, Kansas University 由来の各種変異株)を用いた。嫌気培養を行う際は、培養に用いるフラスコの気相と液相の空気を窒素ガスに置換しゴム栓により密閉した。培養の詳細は、発表論文を参照されたい。

### (2) 遺伝子破壊株の作製

遺伝子を導入する宿主細胞の染色体の目的遺伝子上流および下流と相同組換えを起こさせるようにデザインしたDNA断片を宿主細胞に導入した。得られた形質転換体の中から、相同組換えが起きた株を選抜することにより、遺伝子破壊株を得た。形質転換体の選抜に用いるマーカー遺伝子には、ハイグロマイシン耐性化遺伝子(*F. oxysporum*の場合)および *argB*、*pyrG* 遺伝子 (*A. nidulans*の場合)を用いた。

### (3) プロテオミクス

*A. nidulans* の無細胞抽出液を二次元電気泳動に供した。各たんぱく質に相当するスポットをゲルから回収し、トリプシンで消化後、MALDI-TOF 質量分析計を用いて、ペプチドマスフィンガープリントを得た。これを *A. nidulans* のたんぱく質のアミノ酸配列と比較することにより、たんぱく質を同定した。

### (4) 生体成分の分析

各種の生体成分の分析には、高速液体クロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィー質量分析計、比色分析を用いた。詳細は、発表論文を参照されたい。

## 4. 研究成果

### (1) *Aspergillus nidulans* の低酸素応答に関するプロテオミクス解析

糸状菌 *Fusarium oxysporum* は低酸素条件

下にさらされると酸素の代わりに硝酸を利用して呼吸する（硝酸呼吸）ことが明らかとなっている。さらに嫌气的な環境下では、*F. oxysporum* および *Aspergillus nidulans* は硝酸呼吸をせずに、細胞質における酸化的リン酸化に伴い硝酸をアンモニアへと変換することによりエネルギーを獲得すること（アンモニア発酵）が見出されている。これらの知見から、カビは低酸素条件に応答してエネルギー代謝を変化させるユニークな機構を有していることが示唆された。一方、*A. nidulans* の全ゲノム塩基配列中には少なくとも約10,000の遺伝子が存在すると予測されており、細胞内の様々な代謝において、これらが複雑な機能ネットワーク構造を形成することが予想される。

そこで、本研究では、低酸素条件下におけるカビの嫌気代謝機構を明らかにするために、プロテオミクスの手法を用いて低酸素（アンモニア発酵）条件下におけるタンパク質の発現挙動の変化を経時的に追跡した（図1）。その結果、嫌気条件下において、ペントースリン酸回路、グルタミン酸、脂肪酸、チアミン、ヌクレオチドおよび含硫アミノ酸の代謝経路の構成酵素をはじめとした種々のタンパク質の発現量が増加することが明らかとなった。特に、チアミンおよびヌクレオチド代謝とペントースリン酸回路の間のクロストークが、アンモニア発酵条件下において重要な役割を果たしていると考えられた。

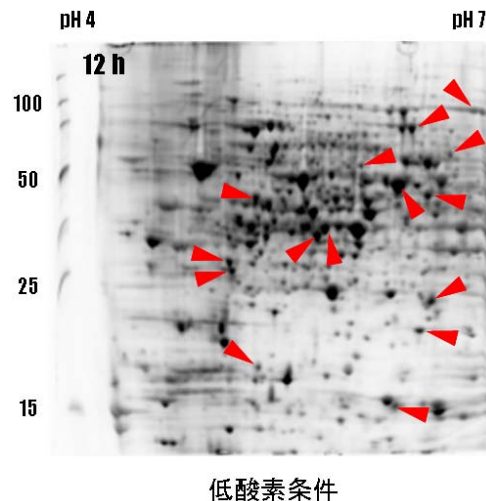


図1 *A. nidulans* のプロテオーム地図

(2) *Aspergillus nidulans* のグルタチオン還元酵素と酸化ストレス応答：グルタチオン還元酵素（GR）は酸化型グルタチオンをNADPH依存的に還元型グルタチオン（GSH）へと変換

することによって、酸化ストレス耐性や細胞内のレドックスバランスの維持に寄与する重要な酵素である (図2)。本研究では、糸状菌 *Aspergillus nidulans* の GR の機能を解明することを試みた。*A. nidulans* の GR 遺伝子破壊株 (dGR 株) では野生型株と比べて、菌体内の酸化型グルタチオン含量、スーパーオキシド含量が増加し、また、呼吸活性が低下した。また、GR 遺伝子の発現量は種々の酸化ストレス誘引剤の存在下で、1.5~6 倍上昇した。野生型株と dGR 株の菌体内タンパク質のプロテオーム解析を行ったところ、dGR 株では、チオレドキシ還元酵素、パーオキシレドキシシン、カタラーゼ、シトクロム *c* ペルオキシダーゼなどの抗酸化系酵素の発現が上昇していた。以上の結果から、*A. nidulans* の GR は、他の抗酸化系と相互作用し酸化ストレス耐性に寄与すると考えられた。また、dGR 株で発現量が上昇するカビに特異的なファミリーに属する新規のグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) を見出した。

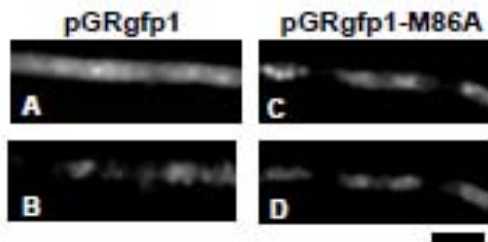


図2 *A. nidulans* の GR は細胞質(A)とミトコンドリア(C)に局在化する。B、D は、Mitotracker によるミトコンドリアの染色像。

(3) 分岐アミノ酸生合成の低酸素条件下での役割：嫌気的な環境下において、*Aspergillus nidulans* は、細胞質における酸化的リン酸化に伴い硝酸をアンモニアへと変換することによりエネルギーを獲得すること (アンモニア発酵) が見出されている。このことから、カビは低酸素条件に応答してエネルギー代謝を変化させるユニークな機構を有していると考えられた。本研究では、低酸素条件下における分岐アミノ酸生合成の役割について検討した。菌体および培地中の代謝物を GC-MS にて測定したところ、好気条件下と比較して、低酸素条件下では、乳酸および分岐アミノ酸を含む種々のアミノ酸が培地中に蓄積していた。また、分岐アミノ酸の生合成に関与する遺伝子の発現量も増加していた。一方、分岐アミノ酸の生合成の初発反応に関わる acetohydroxy acid synthase 遺伝子の遺伝子破壊株では、野生株と比較して、培地中の

乳酸の量は変化していなかったものの、バリン、ロイシン、イソロイシンの量が減少していた。低酸素条件下では、酸素呼吸ができず NAD(P)H を蓄積することから、バリン、ロイシン、イソロイシンの生合成に伴う NAD(P)<sup>+</sup> への再酸化は低酸素条件下において重要な役割を果たすことが考えられた (図3)。

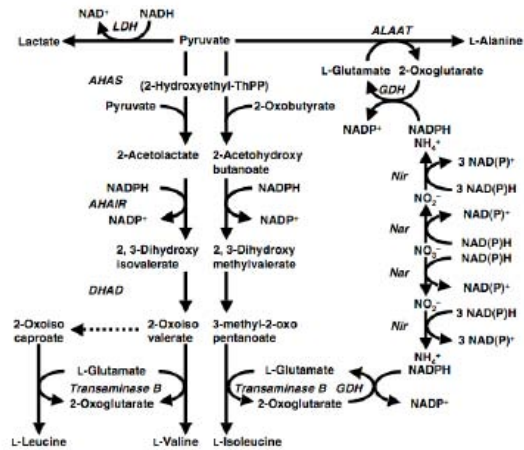


図3 解明した嫌気的な分岐アミノ酸代謝

(4) 糸状菌 *Fusarium oxysporum* の脱窒反応における *niaD* 遺伝子の役割：糸状菌の硝酸還元酵素にはミトコンドリア局在型と細胞質局在型 (NiaD) の2種が存在する。*Fusarium oxysporum* の脱窒には前者が関与し、後者は *Cylindrocarpum tonkinense* による脱窒、それら糸状菌の硝酸同化に関与する。我々は本菌の *niaD* 変異株の脱窒能の低下、これに *niaD* を導入することによる脱窒能の回復から、*niaD* が脱窒に寄与する可能性を見出した。本菌の脱窒による亜酸化窒素の生成は、培地へ硝酸に加えてペプトンの添加により初めて観察された。細胞内の NiaD 活性は、ペプトンの添加により好気条件下では低下し、嫌気条件下では上昇した。また、脱窒に必須な一酸化窒素還元酵素 (P450nor) 活性も嫌気条件下で同様の現象が見られた。さらに NiaD、P450nor 両遺伝子のプロモーター領域に  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -gal) 遺伝子を連結したレポーター解析では、ペプトン添加時の細胞内  $\beta$ -gal 活性が嫌気条件下で好気条件下のものと比較して数倍上昇し、これらの活性の発現は転写レベルで調節されていた。また、数種の炭素源を脱窒基質として用いた条件下のレポーター解析からも同様の結果が得られた。各酵素活性の発現の上昇が脱窒による亜酸化窒素の生成と相関しており、NiaD が脱窒に寄与している可能性が示された。

(5) ヒドラゾン分解菌の単離とヒドラゾン脱水素酵素の性質：ヒドラジンやその誘導体は、燃料、合成樹脂の硬化剤、各種化合物の中間体などに幅広く利用されており、これらの化合物に作用する触媒の開発と物質生産への利用が期待される。一方、これまで、ヒドラジン誘導体の特異的な基質として利用する酵素はほとんど報告されていない。そこで、本研究では、ヒドラジン誘導体の一つであるヒドラゾンを分解する微生物を取得し、得られた微生物のヒドラゾン分解に関わる酵素の単離・精製およびヒドラゾン分解機構の解明を試みた。

一連の研究に用いるヒドラゾン化合物として、adipic acid bis-(ethylidene hydrazide) (AEH)を合成した。AEHを唯一の炭素源とした培地を用いて、各種の土壌から複数のAEH資化性菌を単離した。このうち、AEH分解活性が最も高かったものを選抜し、*Candida palmiophila* MK883と同定した。各種クロマトグラフィーを用いて、本菌のAEH分解酵素を精製した。得られた酵素は、 $\text{NAD}^+$ 依存的にAEHをadipic acid hydrazideと酢酸に変換した。また、本酵素はp-nitrophenyl acetateの加水分解活性を示した。以上の結果から、本研究で見出されたAEH分解酵素はヒドラゾンの酸化的な加水分解反応を触媒するユニークなヒドラゾン脱水素・加水分解酵素であることが示された(図4)。

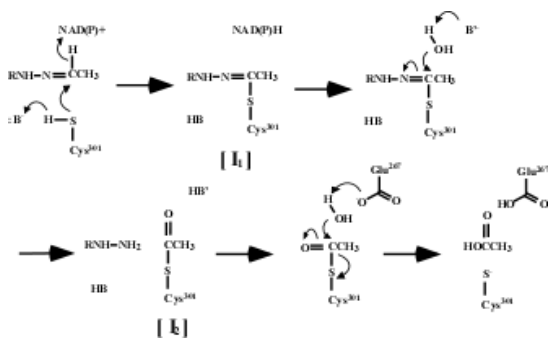


図4 ヒドラゾン脱水素酵素の反応機構

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計8件)

- ① 志水元亨、藤井達也、柘尾俊介、高谷直樹、Mechanism of *de novo* branched-chain amino acid synthesis as alternative electron sink in hypoxic *Aspergillus nidulans* cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 1507-1515

(2010)、査読有

- ② 佐藤育男、志水元亨、星野貴行、高谷直樹、The glutathione system of *Aspergillus nidulans* involves a fungal specific glutathione S-transferase. *J. Biol. Chem.* **284**, 8042-8053. (2009)、査読有
- ③ 志水元亨、藤井達也、柘尾俊介、藤田健作、高谷直樹、Proteomic analysis of *Aspergillus nidulans* cultured under hypoxic conditions. *Proteomics* **9**, 7-19. (2009)、査読有
- ④ 高谷直樹、Response to hypoxia, reduction of electron acceptors, and subsequent survival by filamentous fungi, *Biosci. Biotech. Biochem.* **73**, 1-8 (2009)、査読有
- ⑤ 伊藤英臣、鈴木哲也、星野貴行、高谷直樹、Novel dehydrogenase catalyzes oxidative hydrolysis of carbon-nitrogen double bonds for hydrazone degradation. *J. Biol. Chem.* **283**, 5790-5800 (2008)、査読有
- ⑥ 藤井達也、高谷直樹、Denitrification by the fungus *Fusarium oxysporum* involves NADH-nitrate reductase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **72**, 412-420 (2008)、査読有
- ⑦ 安部剛史、星野貴行、高谷直樹、Anaerobic elemental sulfur reduction by fungus *Fusarium oxysporum*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**, 2402-2407 (2007)、査読有
- ⑧ 高谷直樹、志水元亨、息づまる闘いーカビの生き残り戦略?、*生物工学会誌*、**85**、416 (2007)、査読有

[学会発表] (計15件)

- ① 志水元亨、柘尾俊介、藤田智也、高谷直樹：Nudix hydrolaseの低酸素条件下での役割、日本農芸化学会大会(平成22年3月27-30日)、東京
- ② 島谷佳奈果、佐藤育男、高谷直樹：*Aspergillus nidulans*の元素状硫黄還元反応に関わる酵素の機能解析、日本農芸化学会大会(平成22年3月27-30日)、東京
- ③ 柘尾俊介、志水元亨、高谷直樹：*Aspergillus nidulans*のメナジオンストレス下におけるNmrAの機能、日本農芸化学会大会(平成22年3月27-30日)、東京
- ④ 高谷直樹、伊藤英臣、佐々木康幸、池田智、矢嶋俊介、谷山浩将：*Pseudomonas aeruginosa*由来のヒドラゾン脱水素酵素の性質、日本農芸化学会大会(平成22年3月27-30日)、東京
- ⑤ Sato, I., Shimiatani, K., Shimizu, M., Takaya, N.: Roles of *Aspergillus nidulans* proteins in thioredoxin reductase superfamily, "Microbial Interactions Leading to Novel Biological Functions" (Jan. 8, 2010), Tsukuba

- ⑥ Masuo, S., Fujii, T., and Takaya, N.: Hypoxic nitrate reduction and its regulation by the fungus *Aspergillus nidulans*, “Microorganisms and Sociality: Intricate Multi-Level Interactions” Symposium (Nov.24, 2009), Tsukuba
- ⑦ 志水元亨, 榊尾俊介, 藤田智也、藤井達也, 高谷直樹: 低酸素条件下におけるNudix hydrolaseの役割、第9回糸状菌分子生物学コンファレンス (平成21年11月18-19日)、東京
- ⑧ Shimizu, M., Masuo, S., Takaya, N.: Xth International Conference of Fungal Biology (Nov. 7-10, 2009, Ensenada, Mexico)
- ⑨ Shimiati, K., Sato, I., Takaya, N.: Xth International Conference of Fungal Biology (Nov. 7-10, 2009, Ensenada, Mexico)
- ⑩ 志水元亨, 藤井達也, 榊尾俊介, 高谷直樹: 分岐アミノ酸合成の低酸素条件下での役割、日本農芸化学会(平成21年3月27-29日)、福岡
- ⑪ 鳴神寿昭, 榊尾俊介, 星野貴行, 高谷直樹: *Aspergillus nidulans*の亜硝酸耐性に関わる遺伝子の単離と解析、日本農芸化学会(平成21年3月27-29日)、福岡
- ⑫ 佐藤育男, 藤井達也, 星野貴行, 高谷直樹: *Aspergillus nidulans*のグルタチオン還元酵素と酸化ストレス応答、日本農芸化学会(平成21年3月27-29日)、福岡
- ⑬ 島谷佳奈果, 佐藤育男, 志水元亨, 藤田健作, 高谷直樹: 糸状菌による元素状硫黄還元反応におけるチオレドキシン還元酵素の役割、日本農芸化学会(平成21年3月27-29日)、福岡
- ⑭ 榊尾俊介, 藤井達也, 高谷直樹: *Aspergillus nidulans*の硝酸還元酵素遺伝子(*niaD*)の低酸素条件下での転写制御、第8回糸状菌分子生物学コンファレンス (平成20年11月17-18日)、金沢
- ⑮ 志水元亨, 藤井達也, 榊尾俊介, 高谷直樹: 低酸素条件下におけるチアミン合成の役割、第8回糸状菌分子生物学コンファレンス (平成20年11月17-18日)、金沢

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高谷 直樹 (TAKAYA NAOKI)

筑波大学・大学院生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：50282322