

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24380041

研究課題名(和文) 真核生物の電子伝達機構の多様性と分子進化

研究課題名(英文) Diversity and molecular evolution of eukaryotic electron transfer mechanisms

研究代表者

高谷 直樹 (TAKAYA, Naoki)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：50282322

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：糸状菌は、新規かつ多様な細胞外電子シャトルを用いて、細胞内のレドクス恒常性を調節し、その調節には、細胞内NAD⁺/NADH量の調節が関わる。本研究では、*Aspergillus nidulans*をモデルとして、この解明を目指した。具体的には、Nudix hydrolaseであるAnNUDT1 (NdxA)が細胞内のNAD⁺/NADHを加水分解することでチアミン生合成や解糖系代謝が調節されることを見出した。また、サーチュインを介したヒストンアセチル化による二次代謝産物の生合成も調節することも明らかにできた。得られた成果は真核生物の電子伝達反応の多様性の理解と糸状菌の産業利用の効率化に貢献する。

研究成果の概要(英文)：The filamentous fungus *Aspergillus nidulans* controls intracellular redox homeostasis by shuttling electron equivalents through cell membrane. Cellular NAD⁺/NADH level maintains the homeostasis and various fungal cell functions. This study employs *A. nidulans* as a model fungus, and revealed novel controlling mechanism of cellular redox state. I revealed that the Nudix hydrolase AnNUDT1 (NdxA) is a key controlling protein of cellular redox state. NdxA hydrolyzes NAD⁺/NADH, which affects rates of cellular thiamine biosynthesis and glycolysis, both of which use NAD⁺ as a substrate. NAD⁺ level also affects function of NAD⁺-dependent histone deacetylase isozyme (sirtuin A), and histone acetylation level, and hence fungal secondary metabolisms. These results shed light novel NdxA and NAD⁺/NADH function in the cellular processes, and contribute improved use of filamentous fungi in industry.

研究分野：応用微生物学

キーワード：NAD NADH Nudix hydrolase

1. 研究開始当初の背景

ごく一部の例外を除いて、菌類からヒトに至る真核生物は生育に酸素を要求する。これは、ミトコンドリアでの酸素呼吸により生育に必要なエネルギーを獲得するとともに、ステロールやヘムなどの生育に必須な分子の生合成に酸素が必要であるためである。従って、酸素欠乏(低酸素)環境に陥った真核生物は、様々な応答・適応機構を発現させ生き残ろうとする。近年の分子生物学はモデル生物を利用して発展してきたといっても過言でないが、モデル真核生物として最もポピュラーなパン酵母は酸素欠乏(=低酸素条件)ではアルコール発酵により生育するという真核生物としては極めて特異な性質を示すため、低酸素環境への適応の真核生物モデルとなりえない。一方、虚血やガンとの関連から低酸素応答についての研究が進められているが、これは、分類学上きわめて限定された種(ヒトやマウス)についてのみである。従って、パン酵母や哺乳類とは異なる新たなモデル生物を設定することによって、真核生物の低酸素応答・適応を俯瞰的に理解するための突破口を切り開くことができると期待され、これにより多くの新発見が得られると期待される。

2. 研究の目的

本研究では、古くから遺伝学の研究対象とされゲノム解析も終了したカビ(真菌・糸状菌)*Aspergillus nidulans* を真核生物の新たなモデルとして用いて、その低酸素環境への応答・適応機構を解明する。申請者のこれまでの研究から、*A. nidulans* の低酸素応答・適応は以下のような複雑な現象の組み合わせであることが明らかとなりつつある。即ち、(1) 酸素以外の代替電子受容体の利用、(2) 細胞内のペントース・核酸代謝の改変、(3) 酸化還元ストレス応答系の亢進、(4) 転写・翻訳のグローバルな抑制、(5) 細胞内小器官の機能調節(オートファジーの誘導)である。本研究では、(1)~(3)に着目し、特に、近年、申請者が見出した「新規かつ多様な細胞外電子シャトル(輸送)によるレドックス恒常性の調節」および「細胞内 NAD^+ / NADH 総量の調節による細胞機能の制御」の分子機構との解明に焦点を当てた新たな研究にチャレンジし、真核生物の電子伝達反応の多様性と分子進化の理解を目指す。

具体的内容は以下のとおりである。 NAD^+ と NADH は、細胞内では酸化型および還元型の形態をとる。これらは、細胞内の酸化還元反応を担う酵素の補酵素として働くとともに、細胞内のレドックスの恒常性を維持し解糖などの代謝を制御する重要な分子である。また、最近では、 NAD^+ がヒストンの脱アセチル化酵素の基質としてエピジェネティックな制御に関わることが注目されている。一方、最近、申請者は、*A. nidulans* が低酸素環境に応答して速やかに細胞内の NAD^+ / NADH を分解する

ことにより細胞内の酸化還元バランスを維持することを初めて見出した。そこで、この分解因子の同定と NAD^+ / NADH の総量調節のメカニズムを解明することを目指す。

3. 研究の方法

(1) *A. nidulans* の培養

寒天培地での培養: 最少培地に 1.5% 寒天を加え、*A. nidulans* の分生子を植菌した。
好気条件下での培養: 最少培地を 500 ml 容の三角フラスコに 200 ml 入れ、これに寒天培地から回収した分生子を 2×10^7 個加え、37、120 rpm で 16 時間あるいは 24 時間培養を行った。
低酸素条件下での培養: 好気培養後、気相を窒素で置換し、プチルゴム栓で封をして、37、120 rpm で所定の時間培養した。

(2) 全 RNA の抽出および cDNA の調製

湿重量 100 mg の凍結菌体から RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用い、説明書に従って全 RNA を抽出した。RNA 量は、 $1.0 \text{ D.} = 40 \mu\text{g ml}^{-1}$ として 260 nm の吸光度により算出した。得られた RNA 10 μg 、oligo dT20 1 pmol を混和し、70 で 2 分間保温した。得られた溶液を 2 分間氷冷した後、Reverse Transcriptase XL を用い、42 で 90 分間逆転写反応を行い、cDNA 溶液を得た。

(3) *A. nidulans* の形質転換

YAG 培地 40 ml に *A. nidulans* の分生子を 1×10^9 個添加し、37、250 rpm で 6 時間振盪培養した。顕微鏡で分生子の形態を観察し、分生子の発芽が見られた段階で遠心分離により菌体を回収した。得られた菌体を 30 ml の酵素液(90 mg Yatalase、9 mg Lysing Enzyme、30 mg ウシ血清アルブミン、pH 6.0)に加え、30、250 rpm で 30 分間振盪した後、振盪の回転数を 180 rpm に下げ、2 時間振盪した。これを集菌して 50 ml の 0.4 M 硫酸アンモニウム、1% スクロース、50 mM クエン酸に懸濁し、菌体を遠心分離によって回収してもう一度同じ溶液に懸濁した。これを 2 回繰り返すことにより菌体を洗浄し、洗浄後の菌体を 1 ml の 0.6 M 塩化カリウム、50 mM 塩化カルシウム、10 mM 3-morpholinopropanesulfonic acid、pH 6.0 に懸濁し、懸濁液を 100 μl ずつエッペンに分注して 10 μg の遺伝子破壊用カセットと 50 μl の 25% PEG6000、0.1 M 塩化カルシウム、0.6 M 塩化カリウム、10 mM Tris-HCl、pH 7.5 を加えて 20 分間氷上に静置した。次に、同溶液を 1 ml 加えて室温で 20 分間静置した後、あらかじめ 45 で保温した 1 M スクロース・0.75% 寒天を含む最少培地に懸濁し、これを 1 M スクロース・1.5% 寒天を含む最少培地に重層して 37 で 3 日間培養した。

(4) Tandem Affinity Purification (TAP) 解析

18 時間培養後に得られた菌体を吸引濾過により回収し、速やかに液体窒素で凍結させた。この菌体を液体窒素存在下で粉碎し、HEPES 緩衝液に懸濁した後、遠心とフィルター濾過によって上清を得た。この上清のタンパク質濃度を調整したのち、抗 FLAG M2 affinity gel (Sigma) を終濃度 40 $\mu\text{l}/\text{mg}$ protein で加え 45 分間、4 °C で保温した。溶液からビーズを遠心分離によって回収し、これを HEPES 緩衝液 1 ml で 3 回洗浄した後、ビーズの 5 倍量の 0.25 mg/ml FLAG peptide (Sigma) - HEPES 緩衝液を加え、5 分間氷上に静置し、ビーズからタンパク質を溶出させた(2 回)。得られたタンパク質溶液に終濃度 25 $\mu\text{l}/\text{mg}$ protein の pro bond resin (Invitrogen) を加え、同様に保温・回収・洗浄をしたのち、ビーズの 3 倍量の 300 mM imidazole- HEPES 緩衝液を加え、5 分間氷上に静置し、ビーズからタンパク質を溶出した(2 回)。得られたタンパク質を SDS-PAGE により分析し、得られたゲルを Silver Stain MS Kit (Wako) を用いて付属のプロトコルに従って染色した。

(5) その他の方法

PCR、大腸菌を用いた組換え DNA、高速液体クロマトグラフィーによる化合物の同定、Western 解析などは、一般的な方法に従った。その他の実験と詳細は、5 の項を参照。

4. 研究成果

(1) NADH の加水分解活性を有する酵素として Nudix hydrolase (NUDT) が報告されている。*A. nidulans* のゲノム中を精査したところ、12 種の Nudix hydrolase (AnNUDT) が存在していた。系統解析を行なったところ、AnNUDT1, 2, 3 は、すでに NADH を基質とすることが明らか他の生物由来の NUDT と同一のクラスターを形成した。AnNUDT1, 2, 3 のリコンビナントを調製し検討したところ、AtNUDT1, 3 は NADH を加水分解した。そこで、AnNUDT1, 2, 3 遺伝子の遺伝子破壊株を作製しさらに検討した。作製した遺伝子破壊株および野生株を低酸素条件下で培養後、無細胞抽出液を調製し NADH hydrolase 活性を測定した。AnNUDT2 と AnNUDT3 の遺伝子破壊株では野生株と同程度の活性が検出されたのに対して、AnNUDT1 の遺伝子破壊株では活性が 36%まで減少した。次に、菌体内の NAD⁺/NADH 量を測定したところ、NAD⁺の量はすべての株で同程度であった。一方、DAnNUDT1 株でのみ NADH の減少が大きく抑制されていたことから、AnNUDT1 (論文中では NdxA と表記) が低酸素条件下における NADH の分解に関わることが示された。

サーチュインはヒストンのアセチル化レベルを調節することによって遺伝子発現を抑制することが知られ、その活性には NAD⁺を要求する。そこで、AnNUDT1 による細胞内 NAD⁺濃度の制御が、サーチュインの活性に及ぼす影響を検討した。まず、本菌の二次代謝産物

であるペニシリン G やステリグマトシシンの生合成遺伝子の発現制御機構に着目した。その結果、これらの遺伝子発現が本菌のサーチュインアイソザイムの一つである SirA によって抑制されることを見出した。DAnNUDT1 株と SirA の遺伝子破壊株を組み合わせた遺伝子発現解析、ヒストンアセチル化レベルの定量、クロマチン免疫沈降、二次代謝産物の定量などを通して、細胞内 NAD⁺が SirA の働きを調節することを見出した(発表論文)(図 1 下パネル)。即ち、AnNUDT1 は、培養後期に蓄積する NAD⁺を分解することによって SirA の働きを弱める。それにより上記の二次代謝系遺伝子のプロモーター領域のヒストン H4 のアセチル化レベルが増加することでこれらの遺伝子の発現が増加する。これによって二次代謝産物の高生産が引き起こされるとが示された。

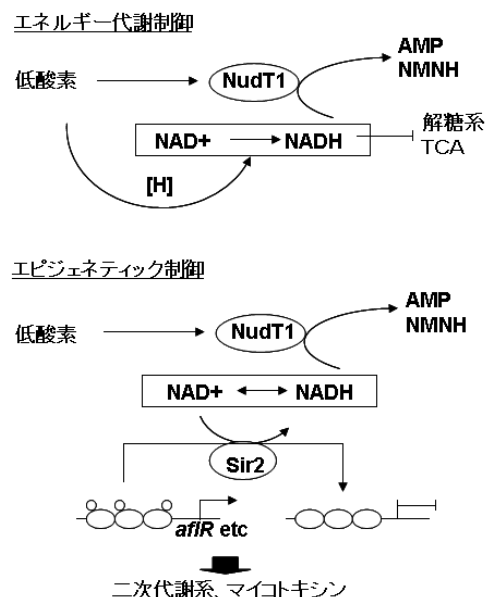


図 1 細胞内 NAD⁺/NADH の総量制御と低酸素代謝応答

(2) (1)で発見した *A. nidulans* の AnNUDT1 (論文中では NdxA と表記) は、低酸素環境下で培養した際に発現誘導されることがわかった。このとき、AnNUDT1 の遺伝子破壊株は野生型株よりも多くの NADH を細胞内に蓄積していた。これは *in vitro* での本酵素の活性と同様、細胞内でも NADH の加水分解に寄与することを示した。また、この遺伝子破壊株では、グルコースの消費とエタノールおよび乳酸の生成が低下していた。解糖系の律速段階の活性を検討したところ、AnNUDT1 の遺伝子破壊によって、グリセルアルデヒド 3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH) の反応速度が低下することが示された。NADH は本菌の GAPDH の阻害剤であることも明らかとなった(図 2)。以上のことから、低酸素環境下で、AnNUDT1 は細胞内の NADH 濃度を低下させることで GAPDH の活性を維持し、解糖系を機能さ

せる役目をもつことが明らかとなった(発表論文)(図1上パネル)

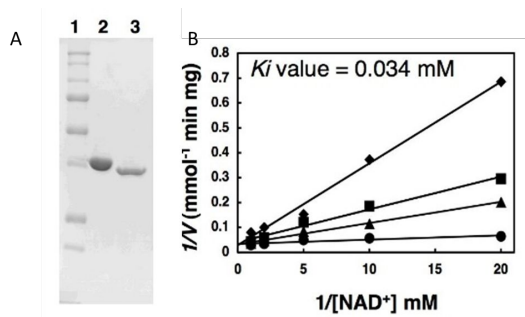


図2 組換え GAPDH(A, レーン 2)と NADH によるその活性阻害(B)

(3) 糸状菌 *A. nidulans* のチアミン生合成(図3)に必須な *thiA* の発現は、生物界に広く保存されているリボスイッチ機構を介してチアミンによって抑制される。発表論文では、通常のチアミン欠乏条件の培養条件下では、このリボスイッチが部分的に抑制されていることおよび各種の環境ストレスによってこの抑制が完全に解除されることを見出した。特に、低酸素ストレス下でのリボスイッチによる *thiA* の発現抑制の解除は、本菌のアルコール発酵や分岐鎖アミノ酸発酵といったチアミン補酵素に依存した代謝を亢進させることを明らかとした。

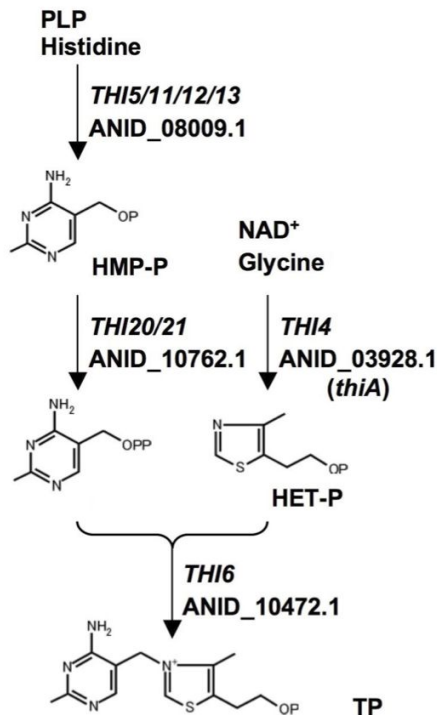


図3 *A. nidulans* のチアミン生合成

動物や植物にとっても、酸素の供給は、虚血・ガン化・炎症や根の機能に関係することから、動植物の酸化還元応答の研究の重要性は広く認識されている。本研究の進展によっ

て $NAD^+/NADH$ の新たな役割の真核生物における普遍性が解明されれば、真核生物の酸化還元応答の全体像が明らかとなると期待される。

本研究で取り扱った *A. nidulans* と同じアスペルギルス属に属する糸状菌には、清酒や醤油などの醸造、有機酸や有用酵素の発酵生産などに利用される産業上重要なものが多い。これらの過程において通気の制御は重要であることから、本研究成果はこれらの産業の効率化に貢献する。低酸素環境は、土壌、水圏、動植物の体内といった生物圏に広範に見られる。例えば、ヒトのアスペルギルス症の原因菌は、比較的低酸素環境であるヒトの体内で成育し病徴を発現する。*A. nidulans* の酸化還元応答が明らかとなれば、未だ不明な部分が多い動植物の病原菌の生理の理解につながり治療法の開発に役立つ。

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 3件)
全て査読有

Shimizu, M., Masuo, S., Ito, E., and Takaya, N.: Thiamine synthesis regulates the fermentation mechanisms in the fungus *Aspergillus nidulans*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **11**, 1-8 (2016).

Shimizu, M., and Takaya, N.: Nudix hydrolase controls nucleotides and glycolytic mechanisms in hypoxic *Aspergillus nidulans*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **77**, 1888-1893 (2013)

Shimizu, M., Masuo, S., Fujita, T., Doi, Y., Kamimura, Y., and Takaya, N.: Hydrolase controls cellular nicotinamide adenine dinucleotide, sirtuin and secondary metabolites. *Mol. Cell. Biol.* **32**, 3743-3755 (2012)

[学会発表](計 4件)

Ito, E., Sigemoto, R., Shimizu, M., and Takaya, N.: *Aspergillus nidulans* sirtuin A regulated secondary metabolite productions, European Conference of Fungal Genetics, Seville, Spain (2014.3)

高谷直樹: *Aspergillus nidulans* の低酸素応答と代謝調節のオミクス解析、生物工学会大会シンポジウム、広島国際会議場、広島県広島市(平成25年9月)

伊藤英里子, 志水元亨, 梶尾俊介, 高谷直樹: *Aspergillus nidulans* の sirtuin 様タンパク質 SirA の機能解析、糸状菌

分子生物学コンファレンス、ウイנקあ
いち、愛知県名古屋市(平成 24 年 11 月)
高谷直樹：糸状菌の酸化還元環境への応
答と適応の分子メカニズム、生物学大
会シンポジウム、神戸国際会議場、兵庫
県神戸市(平成 24 年 10 月)

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.microbes.agbi.tsukuba.ac.jp/
takaya/](http://www.microbes.agbi.tsukuba.ac.jp/takaya/)

6．研究組織

(1)研究代表者

高谷 直樹 (TAKAYA, Naoki)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：50282322