

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21380055

研究課題名（和文） 真菌の低酸素応答・適応・生存戦略の分子機構

研究課題名（英文） Mechanisms for eukaryotic response and adaptation to hypoxia

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

研究成果の概要（和文）：真菌（カビや酵母）には、病原菌、醸造・発酵、抗生物質や酵素などの有用物質生産に使われる重要な菌が多く、環境中ではしぶとく生き残るための工夫をし、我々の身の回りに多く生息する。酸素が少ない環境では、呼吸によるエネルギーの維持が困難となり生存の危機を迎えるが、このときの細胞内での代謝の変化のほとんどが未解明な点が多い。本研究で解明したこの代謝変化は、今後の真菌の生育の制御技術の開発に役立つ。

研究成果の概要（英文）：Oxygen depletion imposes a challenge on fungi since oxygen serves as a substrate for respiration and for other biological processes. Our investigation using omics and biochemical approaches revealed novel adaptation mechanisms to such environment of the *Aspergillus* fungi. These mechanisms are considered be important for the fungal adaptation into natural environment as well as into artificial fermenting conditions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,500,000	1,950,000	8,450,000
2010年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2011年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

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：真菌、嫌気呼吸、低酸素応答、エネルギー代謝、オミクス

1. 研究開始当初の背景

真核生物は、有機物の酸化によって遊離するエネルギーを利用して ATP を合成し、生育に必要なエネルギーを獲得している。酸化反応には酸化剤が必要であるが、真核生物では、最終的な酸化剤はピルビン酸あるいは酸素である。解糖 (glycolysis) などにより生じるピルビン酸は、この酸化反応に伴いエタノールや乳酸に還元され (アルコール・乳酸発

酵)、酸素はミトコンドリアの呼吸酵素の働きにより水へと還元される (酸素呼吸)。これが教科書の記述である。しかし、近年、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となってきた。即ち、1996年に、祥雲博士 (東京大学) の研究グループにより、カビ *Fusarium oxysporum* が硝酸呼吸 (脱

室) を行い嫌氣的にエネルギー(ATP)を獲得することが、真核生物としては初めて報告され、その後、申請者はこの詳細を解明するとともに、新規な発酵・呼吸系を見いだした。

これらにより、真核生物が酸素呼吸に依存せずに生育できること、真核生物の嫌氣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。さらに、最近では、プロテオーム解析の手法を導入するなどして研究を展開させ、カビ低酸素応答にかかわる興味深い現象の糸口を見出している。これらの成果は、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、これらの嫌氣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至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った。

2. 研究の目的

本研究は、申請者によるオリジナルの研究により明らかとなりつつある真菌が低酸素条件に応答・適応し生存する際に発現する酸素以外の代替電子受容体の利用メカニズム、核酸・糖代謝の改変による細胞内化合物の在庫整理、オルガネラ機能の調節、代謝のスローダウン、呼吸・発酵副産物に対する防御機構に関する個々の研究を分子生物学およびオミクスの手法を用いて推し進め、真菌の低酸素応答・適応・生存戦略の分子機構の全体像を解明することを目的とする。具体的には、酸素以外の代替電子受容体の利用メカニズムの未知な構成成分を同定する。また、これまでに、低酸素条件下で発現が上昇するNAD(P)H 分解酵素遺伝子として以下の2つを見出したので、これらの組換え酵素の発現と酵素学的解析、遺伝子破壊株の作製、細胞内核酸関連化合物の定量解析により、低酸素条件下での核酸代謝制御とNAD(P)Hの分解への寄与を明らかとする。また、低酸素条件下でのオートファジーの活性化、硝酸呼吸副産物への応答系としての解毒酵素P450・ヘム合成・メタロチオネインの機能、硫黄還元副産物とチオレドキシニン系などの役割を明らかとするを旨とする。

3. 研究の方法

(1) 使用した微生物とその培養方法：

Aspergillus nidulans A89、*A. nidulans* ABPUN (Fungal Genetic Stock center)、*A. oryzae* RIB40 (酒類総合研究所)、*F. oxysporum* JCM11502 (Japan Collection of Microorganism) を主な実験材料とした。窒

素源を10 mM 硝酸ナトリウムとした液体最少培地にそれぞれの株の分生子を添加し、37°Cで6~48時間振とう培養した。

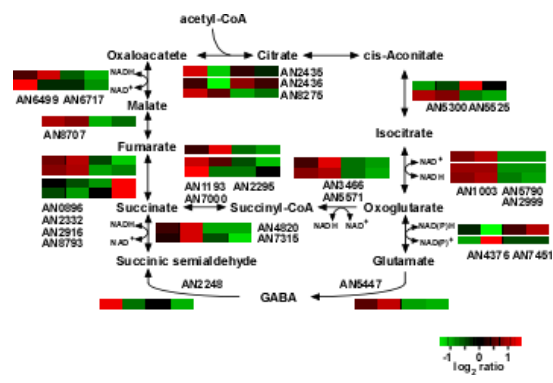
(2) *A. nidulans* の形質転換方法：最少培地40 mLに *A. nidulans* の胞子けん濁液を添加し、37°C、250 rpmで6時間振とう培養した。顕微鏡で発芽を確認し、集菌して細胞壁溶解酵素液に入れ、30°C、250 rpmで30分振とうした。その後、振とう回数を180 rpmに落として2時間振とうした。顕微鏡でプロトプラスト化を確認し、集菌した後、プロトプラスト緩衝液Aで二回洗浄後、B液にけん濁した。各マイクロチューブにDNA溶液、50 μlのポリエチレングリコール液、プロトプラスト溶液を添加してピペッティングで静かに攪拌した。これを氷上に20分間静置した。さらに、これにA液を1 mL添加し、20分間室温で静置した。これを15 mLファルコンチューブに分注した上層寒天培地にプロトプラスト溶液を添加し、下層寒天培地(1 Mスクロースを含む)に分注した。37度で2~3日間培養し形質転換体を得た。

(3) タンパク質の取り扱い方法：カラムクロマトグラフィーを用いたタンパク質の精製、電気泳動、ウェスタンブロッティング、組換えタンパク質の調製、MALDI-TOF質量分析計を用いたペプチドマッピング、エドマン分解法によるアミノ末端のアミノ酸配列の決定、NADHまたはNADPHの脱水素酵素活性の測定には、一般的な手法を利用した。詳細は、公表論文を参照されたい。

4. 研究成果

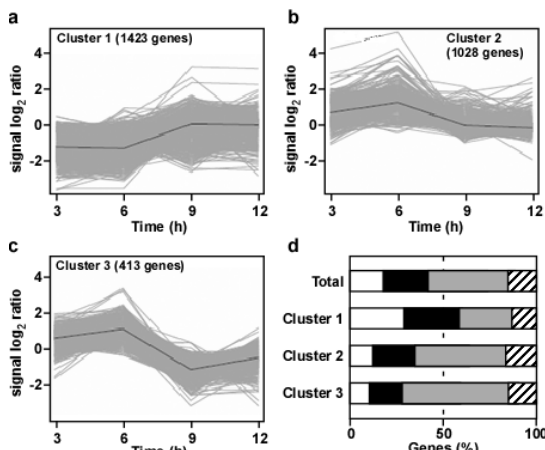
(1) 研究の主な成果

① *A. nidulans* の低酸素条件下における遺伝子発現応答をDNAマイクロアレイを用いて網羅的に解析した(1)。*A. nidulans* は低酸素条件下で、解糖系、TCA サイクルおよびTCA サイクルのバイパス経路であるgamma-aminobutyrate (GABA) シヤントを構成する遺伝子の発現を上昇させた(下図)。



本菌は、低酸素条件下では、エタノール発酵および乳酸発酵によって NADH を再酸化し、GABA シャントにより NADH の過剰な蓄積を回避していると考えられる。また、低酸素条件下では、主要な電子受容体である酸素が不足によって細胞内の NAD⁺:NADH の比が上昇する。この条件下では、NAD⁺依存型のヒストンデアセチラーゼである Sirtuin の活性が低下することによって、通常は発現抑制されている二次代謝系（ステリグマトシスチンやペニシリン）の生合成が脱抑制されることも明らかとなった。一方で、低酸素条件下では、RNA polymerase II (Pol II) や Pol II 依存型の転写の開始に関わる遺伝子の発現が低下するとともに、細胞内の全 mRNA 含量が低下したことから、*A. nidulans* は低酸素に応答して Pol II に依存した転写を抑制していることが示された。

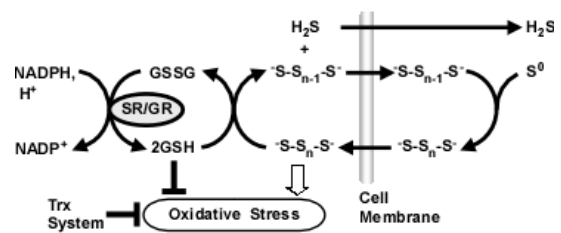
②同様の手法を用いて、*A. oryzae* の低酸素環境への遺伝子発現応答を解析した。その結果、*A. nidulans* と同様、極めて多く（全遺伝子の 50%）の遺伝子の発現が低酸素条件下に応答し変化することが示された（下図：解析された遺伝子の発現様式によるクラスタリング解析）。



これらの遺伝子と上述の *A. nidulans* の低酸素応答遺伝子の推定アミノ酸配列を比較し、2 種間での双方向ベストヒット (BBH)、片方向ベストヒット (EH)、ヒットなし (NSG) に分類した。BBH と EH のクラスタリング解析の結果、両菌種ともに、低酸素条件下においてアルコール発酵および TCA サイクルの GABA シャントを構成する酵素遺伝子の発現を誘導しており、これらの菌が低酸素に応答して共通の代謝制御を行うことが示された。一方、*A. oryzae* では、*A. nidulans* とは異なり、低酸素条件下でグリオキシル酸回路が活性化されることが明らかとなった。また、*A. oryzae* の低酸素応答遺伝子の NSG には二次代謝および一酸化窒素代謝に関わるものが多く含まれていた。以上の結果から、両菌種は、

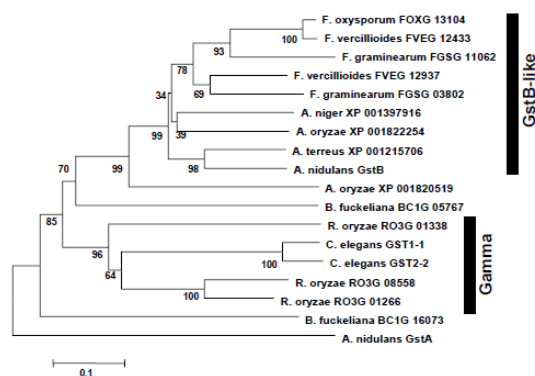
低酸素環境に応答して、種間で保存された代謝変換に加えて、種特異的な遺伝子発現応答を行うことが示された。

③ *F. oxysporum* JCM11502 株 (FOWT) を用いて、無細胞抽出液から S⁰還元酵素 (SR) を電気泳動的に単一となるまで精製したところ、SR の酵素活性の発現には NADPH に加えて GSH または GSSG が要求されることが示された。SR の推定アミノ酸配列は、他の生物の GR のそれと高い相同性を示した。また、精製した SR は GR 活性を有していた。GSH は非酵素的に S⁰ を還元して H₂S を生成することから、FOWT はグルタチオンと GR から構成されるグルタチオン系によって S⁰ を還元していることが明らかとなった。GR 遺伝子の遺伝子破壊株 (FODGR) を作製し、S⁰ を添加した培地を用いて、FOWT および FODGR を低酸素条件下で培養した。S⁰ を添加しない場合、WT と DGR の培養後の生菌数の違いはなかった。一方、S⁰ を添加した培地を用いた場合、両株とも生菌数が経時的に低下し、FOWT に比べ FODGR の方が生菌数が低下した。このとき、FODGR による H₂S の生成量は FOWT に比べ顕著に低下した。また、Na₂S を培地に添加した場合には、FOWT と FODGR の生存率の違いは見られなかった。以上の結果から、SR は、S⁰ を H₂S へと還元することによって本菌の生存率を上昇させる働きを持つことが明らかとなった。SR による S⁰ の還元反応は、細胞内の還元当量を除去する異化的な働きを持つことと S⁰ によるストレスから細胞を防御する機能を持つことが考えられた。S⁰ の還元および S⁰ 存在下での生存へのグルタチオン系の関与の発見は新規であり、本研究成果によって、生物のグルタチオン代謝の新たな機能の一つが明らかとなった（下図）。



④ *A. nidulans* を用いて、GR に着目した糸状菌のグルタチオン系の解析を行った。組換え GR を大腸菌を用いて発現させ、その酵素化学的性質を調べたところ、他の生物由来のそれと同様に、FAD を含有し、NADPH 依存的に GSSG を還元した。*A. nidulans* の GR 遺伝子破壊株 (DGR1) は野生株 (WT) に比べ、生育が著しく低下した。また、DGR1 は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、呼吸活性が低下した。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。WT と DGR1 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、DGR1 では、チオレドキシシン還元酵素、パーオキシレドキシシン、カタラーゼ、シトクロム c パーオキシダーゼなどの抗酸化系酵素の存在量が増加した。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、DGR1 の細胞内における発現量が上昇するタンパク質として新規なグルタチオン-S-転移酵素 (GST) を見出し、GstB と命名した。この組み換えタンパク質を調製することによって酵素化学的性質を明らかとした (下図)。



(2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

Aspergillus 属は古くから清酒や醤油などの発酵・醸造産業に使用されてきた糸状菌であるとともに、クエン酸などのさまざまな有用物質や酵素の工業生産にも利用されている。一方、*Aspergillus* 属は、菌類のモデル生物として重要な *A. nidulans* を含む。本研究では、特に培養の通気条件に注目し、*A. nidulans* と麹菌 *A. oryzae* の遺伝子発現が低酸素条件下でどのように変化するかをトランスクリプトームの手法を用いて網羅的に解析した。得られた研究成果は、培養の通気条件が重要とされる食品・工業生産の効率化に役立つと期待される。

本研究結果により、これまで未解明な点が多かった糸状菌のグルタチオン系の抗酸化系としての機能が解明されたとともに、 S^0 の還元といった新たなグルタチオン系の生物界での役割が提唱された。また、本研究によって、低酸素条件下での S^0 還元反応に GR-グルタチオン系が関与することが初めて明らかとされ、GR-グルタチオン系が低酸素条件下での S^0 への還元当量の消費と、 S^0 ストレスの回避という新しい生理機能を有することが示された点は新規の発見である。また、糸状菌のグルタチオン系が酸化ストレス耐性に関与し、他の抗酸化系を相互作用することを明らかにした。

本研究では、糸状菌特異的に分布する新規 GST を見出した。この GST は *Aspergillus* 属と *Fusarium* 属といった限られた生物種にのみ分布する新規なファミリーに属する GST である点は極めて興味深い。以上の結果から、*A. nidulans* のグルタチオン系は他の生物のそれと同様に抗酸化機能を有することと、GR 遺伝子の欠損により新規の GST を含む他の抗酸化系タンパク質の発現が上昇することが明らかとなった。

(3) 今後の展望

本研究により、*Aspergillus* 属が低酸素条件に応答して遺伝子の発現をグローバルに制御することによって細胞内代謝を調節していることが示された。さらに、*A. oryzae* と *A. nidulans* の遺伝子発現の低酸素応答には、両菌種に共通したもののほかに、*A. oryzae* に特有のものが存在することが明らかとなった。一方、これとは反対に、十分な通気の下でのみ発現誘導される麴酸の生産に関わる遺伝子も *A. oryzae* 固有のゲノム領域に存在した。これらのことは、*A. oryzae* がゲノム構造を変化させることによって通気条件に適応してきたことを推察させるものであり、近縁種同士の分子進化を考察する上で重要な知見を与える。一方、培養に際する通気条件は、多くの有用物質の工業生産のために重要である。本研究で得られた知見は、*Aspergillus* 属を用いた発酵・醸造産業の効率化に向けた応用研究に大きく貢献すると期待される。

また、本研究は、これまで不明だった糸状菌のグルタチオン系の S^0 還元および酸化ストレス応答に対する生理機能の詳細を明らかにし、新たな知見を数多く含むものであり、糸状菌の新たな代謝研究の礎を築いた点で高く評価できる。

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 6 件)
全て査読有り

- ① Sato, I., Shimatani, K., Fujita, K., Abe, T., Shimizu, M., Fujii, T., Hoshino, T., and Takaya, N.: Glutathione reductase/ glutathione is responsible for cytotoxic elemental sulfur tolerance via polysulfide shuttle in fungi, *J. Biol. Chem.* **286**, 20283-20291 (2011)
- ② Shimizu, M., Fujii, T., Masuo, S., and Takaya, N.: Mechanism of *de novo* branched-chain amino acid synthesis as an alternative electron sink in hypoxic *Aspergillus nidulans* cells. *Appl. Environ.*

Microbiol. **76**, 1507-1515 (2010)

- ③ Masuo, S., Terabayashi, Y., Shimizu, M., Fujii, T., Kitazume, T., and Takaya, N.: Global gene expression analysis of *Aspergillus nidulans* reveals metabolic shift and transcription suppression under hypoxia. *Mol. Genet. Genomics.* **284**, 415- 424 (2010)
- ④ Zhou, Z., Takaya, N., and Shoun, H: Multi-energy metabolic mechanisms of the fungus *Fusarium oxysporum* under lower oxygen environments. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **74**, 2431-2437 (2010)
- ⑤ Sato, I., Shimizu, M., Hoshino, T., and Takaya, N.: The glutathione system of *Aspergillus nidulans* involves a fungus-specific glutathione *S*-transferase. *J. Biol. Chem.* **284**, 8042-8053 (2009)
- ⑥ Shimizu, M., Fujii, T., Masuo, S., Fujita, K., and Takaya, N.: Proteomic analysis of *Aspergillus nidulans* cultured under hypoxic conditions. *Proteomics* **9**, 7-19 (2009)

[学会発表] (計 3 件)

- ① 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 5 日)、東京
- ② 榊尾俊介、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 5 日)、東京
- ③ Sato, I., Shimiatani, K., Shimizu, M., Takaya, N.: Roles of *Aspergillus nidulans* proteins in thioredoxin reductase superfamily, “Microbial Interactions Leading to Novel Biological Functions” (Nov. 20, 2009), Tsukuba

[その他]

ホームページ等

<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