

令和元年6月14日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H02487

研究課題名(和文) しつこく生えるカビの環境耐性と適応の分子機構

研究課題名(英文) Fungal mechanisms for tolerance and adaptation to environmental stresses

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) 18,700,000円

研究成果の概要(和文)：子囊菌 *Aspergillus nidulans* をカビの生物モデルとして、様々なストレス下でも増殖可能な環境ストレス耐性とユニークな二次代謝の機構の分子機構を解明することを目指した。特に、一酸化窒素に対する耐性化に関わる遺伝子の単離とそれらによるストレス耐性機構の解明と、ヒストンのアセチル化修飾を介した二次代謝機構の制御の解明を課題として設定し、これらに関わる遺伝子を発見した。得られた知見は、カビの環境耐性と適応の解明の礎となり、カビの生育抑制技術の開発に貢献する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

解明された *A. nidulans* の一酸化窒素耐性機構の知見は、動植物の病原菌の一酸化窒素耐性の理解につながり、治療法や植物病害の防除法の開発に役立つと期待できる。*A. nidulans* の類縁菌には、産業上重要なものが多く、本研究成果はこれらのカビの生育の制御に役立つ。動植物のNO応答の重要性は広く認識されている。本研究によって解明された新たな一酸化窒素耐性機構は、真核生物に普遍的な生命活動の新たな原理の提案につながる意義を持つ。

研究成果の概要(英文)：Some filamentous fungi persist under the severe environment. This study investigated fungal mechanisms that tolerate the model fungus *Aspergillus nidulans* to environmental stress. We identified novel genes required for normal growth tolerance to one of the stressors, nitric oxide. These genes included *napA*, *rbgA*, *rcoD* and *snaD*. They also included *proC*, *argB*, and *cpcA*, which are related to the fungal amino acid biosynthesis, suggesting that relationship between fungal NO-tolerance and amino acids metabolisms. Secondary metabolite production is a fungal mechanism and often induced by environmental stresses through activity of sirtuins. This study also characterized functions of the sirtuin isozymes SirE, SirC, and SirD of this fungus on the secondary metabolite production. Inhibitors of histone deacetylase activity of the sirtuin (SirA) were identified in a library of fungal culture extracts.

研究分野：微生物学

キーワード：糸状菌 一酸化窒素 サーチュイン 二次代謝

1. 研究開始当初の背景

カビには、麹菌をはじめとする醸造・発酵に不可欠なものや抗生物質などの有用化合物の生産菌などが含まれる。これらの農医薬学上において有用なものがある。この反面、カビはどこにでもしつこく生える厄介者という側面をもつ。例えば、カビは、穀物のカビ毒による汚染や腐敗、アスペルギルス症や水虫などの内在・表在性真菌症の原因ともなり、ボトル飲料やパウチ食品のカビによる汚染は飲食料産業に多大な経済損失をもたらす。これらの原因となるカビが「しつこく生える」メカニズムを解明することができれば、カビの生育を制御・抑制する技術の開発につながり、応用微生物学および他の学問領域と産業への貢献は多大である。

研究代表者は、カビが「しつこく生える」ための共通メカニズムを以下の2点に整理して研究を進めた。その一つは、過酷な環境下であっても「しつこく増殖する」ためのストレス耐性機構である(図1)。実際、一般的な細菌や酵母と比較して、カビの各種の環境ストレスに対する耐性は高い。もう一つのメカニズムとしては、細胞の栄養増殖とは明確に区別される「しつこく生き残る」ための二次代謝機構が挙げられる。これによって、カビは、環境に常在する他の微生物を駆逐する二次代謝産物(抗生物質)を生産し、さらには栄養細胞を環境ストレスに強く拡散性が高い孢子へと分化させることで生存することが可能である。

2. 研究の目的

本研究では、糸状菌のストレス耐性機構と二次代謝機構によって成り立つカビの環境耐性・適応能を分子レベルで解明することを最終的な目標とする。このために、(1)一酸化窒素(NO)などの活性窒素種に対する本菌の耐性化に関わる遺伝子の単離とそれらによるストレス耐性機構の解明と、(2)最近、研究代表者が見出し未だ解明されていない糸状菌の核ヒストンのアセチル化修飾とそれを制御する低分子化合物とを介した二次代謝機構の制御の解明を目的として研究を進めた。

3. 研究の方法

NOは、強い細胞傷害活性をもつ活性ラジカルであり、自然免疫系による病原性糸状菌(カビ)の感染防御の機能を持つことが知られるが、カビのNO応答については不明な点が多い。本研究では、NOに対する生育の耐性化を促す遺伝子を同定するために、表現型に基づく遺伝学的な戦略とオミクスによる戦略を併用した。オミクス解析からは見出すことができない新規遺伝子が得られることも期待されるので、あわせて研究対象とした。また、研究対象としては、カビの生物モデルである *Aspergillus nidulans* を用いた。得られた遺伝子の分子生物学および生化学的解析を行い、*A. nidulans* のNO耐性機構の解明を試みた。この知見を総合して、カビがNOストレス環境下で増殖耐性を持つメカニズムを考察した。

研究代表者は、真核生物に広く保存されたサーチュイン(NAD⁺依存型ヒストン脱アセチル化酵素; SirA)をカビから初めて見出し、これが *A. nidulans* の二次代謝産物(ペニシリン等)の生合成をエピジェネティック抑制することを見出した。そこで、本菌が有するSirA以外の5つのサーチュインアイソザイムについても同様の解析を行うことによって、サーチュインの二次代謝系発現における機能分担を解明することを試みた。また、SirA阻害天然物を世界で初めて発見した。そこで、同じ生理作用をもつ化合物をさらに発見し、各種の分子生物学、生化学的手法を組み合わせて、この化合物による二次代謝生産制御の分子機構を解明する。以上で得られた知見をあわせ、しつこく生育するカビの環境耐性と適応の分子機構を考察する。

4. 研究成果

(1) *A. nidulans* の生育のNO耐性に関わる遺伝子を探索し、NOジオキシゲナーゼ、新規なニトロソ化ペプチドであるニトロソチオネイン、酸化ストレス耐性に関わる転写因子NapAなどのNOの解毒に関わる因子を見出すことができた。このうち、プロリンの生合成に関わるProCおよびアミノ酸生合成の一般制御が本菌の生育のNO耐性に関与するメカニズムの解明を目指した。本菌は、低濃度のNO存在下ではプロリンや他の多くのアミノ酸の細胞内濃度が上昇し、高濃度のNO存在下では低下していた。さらに、培地へのプロリン添加によってプロリン生合成能欠損株(*proA*-)のNO感受性が回復したことから、細胞内アミノ酸量が *A. nidulans* のNO耐性にかかわることが考えられた。一方、本研究で見出したNO耐性遺伝子 *rbgB* の *Saccharomyces cerevisiae* におけるオルソログは、アミノ酸生合成の一般制御に関わると予想されている。*A. nidulans* の *rbgB* とアミノ酸生合成関連遺伝子 *argB*、*prnB* の転写はNOにより活性化されており、アミノ酸一般制御に関わる転写因子 *cpcA* の欠損株ではこのNOによる転写活性化が観察されなかった。また *cpcA* の欠損はNO感受性と過酸化水素感受性を引き起こした。以上の結果から、転写因子 *cpcA* を介してNOに応答し、アミノ酸代謝系を亢進す

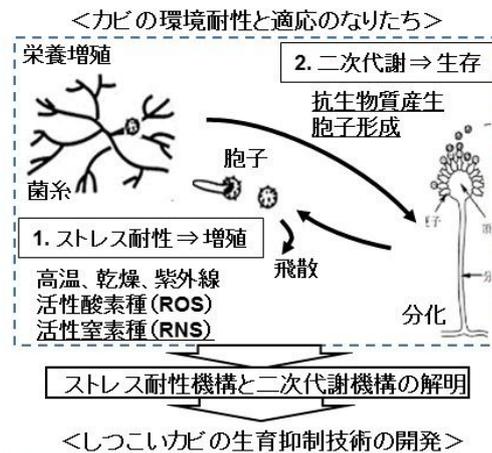


図1 本研究の背景と目的

るという *A. nidulans* の新たな NO 耐性機構が明らかになった。

(2) 既に取得していた *A. nidulans* の NO 感受性変異株の変異の特定に成功した。具体的には、長期間を要する *A. nidulans* の交配と子孫の解析、次世代シーケンサーによる目的変異の特定については、国内外で例は少なく新たな貴重な実験系として重要なものとなった。具体的には、交配によって変異株（親株）の変異遺伝子候補を 7 つに絞り込むことが可能であり、これらの遺伝子破壊等の検証実験を通して、2 つの NO 耐性化遺伝子（*rcoA* および *snaD*）を発見することができた。(1)の成果によって、NO への耐性化にアミノ酸生合成が寄与することが示されたが、両遺伝子のうち *snaD* 遺伝子破壊株の生育の NO 感受性が培地にアミノ酸を添加することで回復したことは、*snaD* が NO による細胞内アミノ酸レベルの低下になんらかの機能を持つことを示唆するものであった。また、NO の添加による本菌の転写変化を網羅的に解析した。関連する酸化ストレス応答などに既存の研究例と比較し、NO は極めて広範な遺伝子発現を変化させることが明らかになった。

(3) sirtuin がかわる代謝制御についての研究を進めた。sirtuin は多様な遺伝子の発現をエピジェネティックに抑制し、多様な代謝を制御することを既に明らかにしていた。また、*A. nidulans* が 5 つの sirtuin を有することを見出し、このうちの SirA が NAD⁺依存的にヒストン H4 の 16 番目のアセチルリジン残基を脱アセチル化することによってステリグマトシスチンおよびペニシリン G の生合成遺伝子の発現を抑制することを見出してきた。そこで、本研究では、*A. nidulans* の sirtuin E (SirE) が定常期に発現し、核に局在することを明らかとした。また、*sirE* 遺伝子破壊株 (Δ SirE 株) では対数増殖期と定常期にヒストン H3 の 56 番目のリジン残基の、定常期にヒストン H3 の 9 および 18 番目のリジン残基のアセチル化レベルが上昇した。さらに、 Δ SirE 株ではキチナーゼ等の自己溶菌関連酵素の遺伝子発現や活性が低下し、自己溶菌が阻害されるとともに、分生子形成やステリグマトシスチンの生合成といった培養後期に起こる代謝が転写レベルで抑制されることを見出した。一方、 Δ SirE 株では野生株に比べ、一次代謝系（炭素・窒素代謝および細胞壁の合成）に関与する遺伝子の発現が上昇していた。このうち、 β -1,3-glucan synthase *agsB* 遺伝子のプロモーター領域、解糖系遺伝子 *pfkA* および AN5210 のプロモーター領域のヒストンは、SirE によって脱アセチル化され、その遺伝子発現が抑制されていたことから、SirE の直接の制御下にあると考えられた。以上の結果は、生育期に応答して、ヒストンをアセチル化レベルを制御することによって細胞代謝を制御する新たな転写因子であると考えられた。

本菌の他の sirtuin タンパク質をコードする *sirC* および *sirD* に対応する組換えタンパク質を作製し、これらがヒストン H4 の Lys 16 とヒストン H3 の Lys 9 および Lys 18 のアセチル化修飾を脱アセチル化する sirtuin 活性を有することが示された。*sirC* および *sirD* の遺伝子破壊株では、ヒストン H3 の Lys 9 , Lys 18 および Lys 56 のアセチル化レベルが野生株のそれらよりも増加していたことから、SirC と SirD がこれらの 3 つのアセチルリジン残基を脱アセチル化する機能を持つことが明らかとなった。また、これらの遺伝子破壊株では、オースチノール (AUS)、デヒドロ AUS および ST の生産量が野生株よりも多かった。以上の結果から、SirC および SirD がヒストンの脱アセチル化を介して AUS、デヒドロ AUS、ST の生合成を抑制していることが明らかとなった。

(4) SirA が、strigmatocystin および penicillin G の生合成遺伝子の二次代謝系遺伝子の発現を抑制することから、SirA 活性の阻害化合物を取得し糸状菌の培養へ添加することによって、様々な糸状菌が有する二次代謝産物生合成遺伝子の発現を促進できることを着想した。そこで、*A. nidulans* の SirA 活性の阻害剤を探索した。糸状菌 189 種を各種の培地で 7~14 日間培養して得られた糸状菌抽出物をスクリーニング源とした。蛍光法によるヒストンの脱アセチル化活性を指標として、SirA 阻害活性を有する 30 種の糸状菌抽出物を得た。これらを K16 アセチル化ヒストン H4 ペプチドを基質とした酵素反応系に添加したところ、酵素反応産物である nicotinamide の生成量が減少した抽出物が 16 種得られた。これらを培地に添加して培養を行ったところ、*A. terreus*、*Ustilago maydis*、*Fusarium oxysporum* をなどの糸状菌の二次代謝産物の生産を増加させた抽出物が 4 種得られた。これらは、糸状菌の二次代謝産物の生産を引き起こす薬剤として利用可能であると期待される。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

Shigemoto, R., Matsumoto, T., Masuo, S., and Takaya, N.: 5-Methylmellein is a novel inhibitor of fungal sirtuin and modulates fungal secondary metabolite production. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **64**, 240-247 (2018) 査読有

10.2323/jgam.2018.01.001

Shigemoto, R., Oinuma, K.-I., Masuo S., and Takaya, N.: Novel antioxidant isolated from *Warcupiella spinulosa* JCM 2358, 7-hydroxycordylactam. *Heterocycles*, **96**, 1075-1079 (2018) 査読有

10.3978/COM-18-13895

Itoh, E., Odakura, R., Oinuma, K.-I., Shimizu, M., Masuo, S., and Takaya, N.: Sirtuin E is a fungal global transcriptional regulator that determines the transition from the primary growth to the stationary phase. *J. Biol. Chem.* **292**, 11043-11054 (2017) 査読有
10.1074/jbc.M116.753772

Itoh, E., Shigemoto, R., Oinuma, K.-I., Shimizu, M., Masuo, S., and Takaya, N.: Sirtuin A regulates secondary metabolite production by *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **63**, 228-235 (2017) 査読有
10.2323/jgam.2016.11.002

〔学会発表〕(計 8件)

小田倉里佳、伊藤恵理子、竹下典男、榎尾俊介、高谷直樹：*Aspergillus nidulans* の Sirtuin アイソザイムの機能解析、糸状菌分子生物学コンファレンス、長岡、2018年11月

Eriko Ito, Motoyuki Shimizu, Shunsuke Masuo, and Naoki Takaya: Fungal sirtuin E, a novel sirtuin isozyme regulates global transcription between exponential growth and stationary phases、日本農芸化学会大会、京都、2017年3月

伊藤英里子、小田倉里佳、老沼 研一、志水元亨、榎尾俊介、高谷直樹：Sirtuin E は糸状菌の遺伝子発現の対数期から定常期への移行を制御する、微生物研究会、藤沢、2016年11月

塚越まどか、高谷直樹 糸状菌 *Aspergillus nidulans* の一酸化窒素耐性に関わる遺伝子群、微生物研究会、藤沢、2016年11月

伊藤恵理子、高谷直樹：糸状菌の新規 sirtuin アイソザイムの定常期から死滅期における機能、日本農芸化学会大会、札幌、2016年3月

高谷直樹：糸状菌 *Aspergillus nidulans* の一酸化窒素耐性機構の解明、日本生化学会、神戸、2015年12月

塚越まどか、榎尾俊介、周勝敏、高谷直樹：糸状菌 *Aspergillus nidulans* のアミノ酸代謝を介した一酸化窒素耐性機構、日本生化学会大会、神戸、2015年12月

茂本亮輔、伊藤恵理子、張本修平、榎尾俊介、高谷直樹：Sirtuin 活性の制御による糸状菌の休眠二次代謝系遺伝子の活性化、糸状菌分子生物学コンファレンス、東京、2015年11月

〔図書〕(計 1件)

榎尾俊介、高谷直樹：アグリバイオアグリバイオ(北隆館) 2018年12月臨時増刊号、pp50-54、2018年

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：榎尾俊介

ローマ字氏名：MASUO, Shunsuke

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。