

真菌における一酸化窒素の統合的理解と育種・創薬への応用
Integrated understanding of nitric oxide in yeasts and
fungi and its application to microbial breeding and
drug development

課題番号：19H05639

高木 博史 (TAKAGI Hiroshi)

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・教授



研究の概要（4行以内）

真菌（酵母・糸状菌）に共通すると思われる一酸化窒素（NO）の分子機能について、我々が見出した酵母におけるNOの合成制御機構、標的タンパク質・シグナル伝達系、機能二面性を中心に統合的理解を目指す。また、NOが酵母の発酵特性に及ぼす影響、糸状菌におけるNOと増殖、感染、生理活性物質生産との関連を解析し、産業酵母の育種や抗真菌剤の開発に資する。

研究分野：微生物機能、微生物代謝生理

キーワード：一酸化窒素、酵母、糸状菌、合成制御機構、生理機能

1. 研究開始当初の背景

一酸化窒素（NO）はシグナル分子として様々な生命現象に関与し、哺乳類ではアルギニンからNO合成酵素（NOS）により生成する。一方、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* では、ゲノム上にNOSのオルソログが存在せず、NOの研究は進んでいない。我々は、酵母においてNOがTah18タンパク質依存的なNOS様活性により合成され、銅代謝関連転写因子Mac1の活性化を介して高温ストレス耐性に寄与することを見出した。また、Dre2タンパク質がTah18依存的なNO合成を阻害すること、酸化ストレスにตอบสนองしてTah18-Dre2複合体が解離することを示し、新規なNO合成制御機構を提唱した。さらに、NOの機能二面性（細胞保護、細胞死）も明らかにした。

2. 研究の目的

真菌（酵母・糸状菌）に共通すると考えられるNOの分子機能について、酵母における合成制御機構と生理機能、標的タンパク質・シグナル伝達系、機能二面性を中心に統合的理解を目指す。また、NOが酵母の発酵特性に及ぼす影響、糸状菌におけるNOと増殖、感染、生理活性物質生産との関連を検証し、産業酵母の育種や抗真菌剤の開発に資する。

3. 研究の方法

1) 酵母におけるNOの分子機能解明と発酵生産への応用：NOの合成制御機構については、Tah18依存的なNOS様活性の責任分子である酸化酵素の同定、Dre2によるNO合成の

制御機構、哺乳類のTah18、Dre2オルソログ（Ndor1、Ciapin1）の機能を解析する。NOの生理機能については、翻訳後修飾に着目し、標的タンパク質（S-ニトロソ化・ニトロ化）およびNO応答性のシグナル伝達系の同定と解析を行い、表現型との関連を明らかにする。また、NOによる細胞死誘導機構を解析し、NOの機能二面性の分子機構と生理的意義を理解する。さらに、NO関連遺伝子の発現改変株を用い、NOが発酵特性に及ぼす影響を解析し、発酵生産性が向上した株を作製する。

2) 糸状菌におけるNOの分子機能解明と創薬標的分子の探索：モデル糸状菌および病原糸状菌におけるNOの分子機能、特にNO関連遺伝子のオルソログ、二次代謝制御や耐性機構に着目し、NOが増殖、感染、生理活性物質生産などに及ぼす影響を明らかにするとともに、抗真菌薬の標的遺伝子を同定する。本研究の概要と意義を図1に示す。

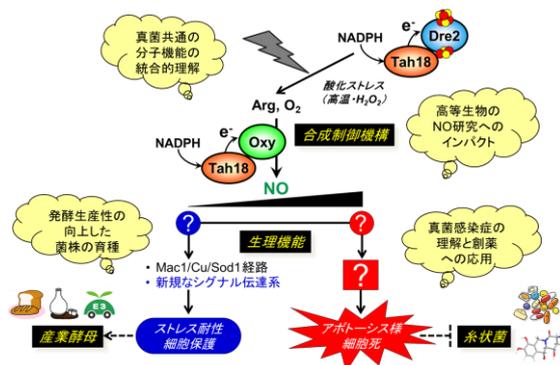
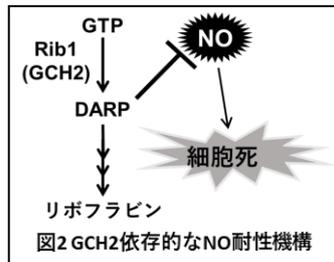


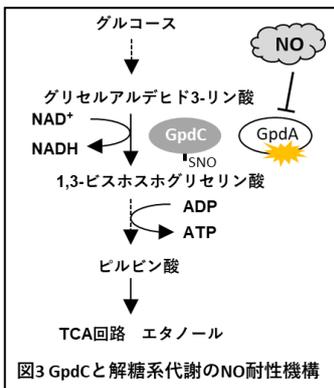
図1 本研究の概要と意義

4. これまでの成果

1) 酵母における NO の分子機能解明と発酵生産への応用: 酵母の NOS 様活性に重要な酸化酵素の候補として、モノオキシゲナーゼ活性を有するタンパク質の中から、ラノステロール-14 α -デメチラーゼ Erg11 を見出した。また、細胞内 NO 濃度を正確に測定する系および NO 合成の基質を同定する系を開発した。さらに、プロテオーム解析により NO 依存的に翻訳後修飾（ニトロ化、グルタチオン化、アミノ化）を受けるタンパク質として解糖系酵素（ピルビン酸脱炭酸酵素 Pdc1、グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 Tdh3、フルクトース-1,6-ニリン酸アルドラーゼ Fba1）を同定し、ニトロ化による活性制御が確認できたことから、NO および NO 標的タンパク質の生理機能の理解に繋がる知見が得られた。また、ニトロ化修飾消去（脱ニトロ化）酵素の候補として、*YDL124W* 遺伝子がコードする推定還元酵素を見出した。一方、酵母の新規な NO 耐性機構として、①リボフラビン合成の初発酵素 GTP cyclohydrolase II (GCH2) 依存的、②NADPH 非依存的、③ γ -アミノ酪酸 (GABA) 依存的な機構をそれぞれ見出し、特に GCH2 の反応生成物 (DARP) が NO を消去することを明らかにした (図2)。さらに、NO 分解酵素 (フラボヘモグロビン) の転写制御因子 Fzf1 は、NO 依存的にタンパク質レベルで活性化されることを示した。



2) 糸状菌における NO の分子機能解明と創薬標的分子の探索: 病原糸状菌 *Aspergillus fumigatus* において、植物や微生物が産生する天然抗菌物質（ファルネソール、チモール、ピオシアニンなど）の処理により細胞内に NO が産生されることを見出した。また、麹菌 *A. oryzae* の転写因子をコードする遺伝子の破壊株ライブラリーから NO 処理で生育が低下する株を探索し、病原性機構に重要な転写因子 (SrbA、AtrR)、亜鉛ホメオスタシスやプロリン代謝への関与が予想される転写因子が NO 応答に重要であることが判明した。さらに、モデル糸状菌 *A. nidulans* のト



ランスクリプトーム解析により、アミノ酸合成系関連遺伝子や推定シトクロム P450 遺伝子が NO 耐性に関与することが示唆された。また、推定 GAPDH である GpdC が NO 耐性に寄与する可能性を初めて見出した (図3)。

5. 今後の計画

1) 酵母における NO の分子機能解明と発酵生産への応用: 酸化酵素候補の Erg11 が関与する NO 合成活性を解析するとともに、NO 合成制御機構の生物間保存性を検証する。また、NO 依存的に翻訳後修飾（ニトロ化、グルタチオン化、アミノ化）を受ける解糖系酵素 (Pdc1、Tdh3、Fba1) の機能解析を行い、NO の生理機能を明らかにする。さらに、脱ニトロ化酵素の同定、NO による Mac1 の活性化機構の解明などを行う。新規 NO 耐性機構については、GABA 依存的および NADPH 非依存的な機構を解明するとともに、薬剤標的分子として有望な GCH2 の特異的阻害剤を探索する。また、NO 代謝関連遺伝子および NO 標的タンパク質遺伝子の発現株を作製し、NO が発酵特性に及ぼす影響を解析する。

2) 糸状菌における NO の分子機能解明と創薬標的分子の探索: 天然抗菌物質に応答した NO の産生機構と病原性との関連を解析する。また、転写因子 (SrbA、AtrR) が関与する新規な NO 応答機構を解析し、薬剤標的分子としての可能性を検証する。さらに、アミノ酸合成系制御因子 CpcA、シトクロム P450、GpdC の NO 耐性への関連を明らかにする。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

- ・ Yoshikawa Y, Nasuno R, Takagi H. A reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-independent mechanism enhances oxidative and nitrosative stress tolerance in yeast cells lacking glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. *Yeast*, in press, DOI: 10.1002/yea.3558.
- ・ Nasuno R, Yoshikawa Y, Takagi H. The analytical method to identify the nitrogen source for nitric oxide synthesis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **85**, 211-214, 2021.
- ・ Anam K, Nasuno R, Takagi H. A novel mechanism for nitrosative stress tolerance dependent on GTP cyclohydrolase II activity involved in riboflavin synthesis of yeast. *Sci. Rep.*, **10**, 6015, 2020.
- ・ Nasuno R, Shino S, Yoshikawa Y, Yoshioka N, Sato Y, Kamiya K, Takagi H. Detection system of the intracellular nitric oxide in yeast by HPLC with a fluorescence detector. *Anal. Biochem.*, **598**, 113707, 2020. ほかに査読有2報、査読無2報
- ・ 高木博史. 2020年度 日本農芸化学会賞
- ・ 高木博史. 2020年度 飯島藤十郎食品科学賞

7. ホームページ等

<https://bsw3.naist.jp/takagi/takagi-j.html>