

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：32682

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05406

研究課題名（和文）糸状菌由来新規アミノアシル化ステロール誘導体の生理機能の解明

研究課題名（英文）Functional analysis of novel aminoacyl-sterol derivatives in fungi

研究代表者

久城 哲夫（Kushiro, Tetsuo）

明治大学・農学部・専任教授

研究者番号：80373299

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：糸状菌より見出された新規エルゴステロールアミノ酸誘導体（Erg-aa）の生理機能を探るべく、黄麹菌およびコムギ赤カビ病菌におけるErg-aaの欠損変異体を作製したところ、分生子量の減少と菌核形成の増加がみられた。これら欠損変異体では分生子形成に関わる遺伝子の発現低下がみられたことから、Erg-aaは分生子形成関連遺伝子の発現を制御していることが示唆された。さらに、コムギ赤カビ病菌ではErg-aa欠損変異体のコムギへの感染能が低下していることが分かり、植物病原菌の病原性にも影響を与えることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糸状菌より新規に見出されたエルゴステロールアミノ酸誘導体（Erg-aa）は、糸状菌の分生子形成や菌核形成に関与することが明らかとなり、糸状菌の生殖過程に影響を及ぼすことが判明した。さらに、植物病原菌の病原性にも関与することが明らかとなり、これまでに見出されていないErg-aaを介した糸状菌の新たな生理機構の解明につながる成果であった。また、Erg-aaを標的とした新規抗真菌剤の開発にも発展する成果であり、植物病原菌の防除にも貢献できることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Physiological roles of novel ergosterol amino acid derivatives (Erg-aa) in fungi were investigated using Erg-aa knockout mutant of *Aspergillus oryzae* and *Fusarium graminearum*. Both Erg-aa knockout mutants showed reduced spore formation and increased sclerotia formation compared with wild type strain. Besides, knockout mutants showed reduced expression of genes involved in spore formation indicating that Erg-aa plays a role in controlling these gene expression. Furthermore, Erg-aa knockout mutant of *F. graminearum* showed reduced infection phenotype against wheat indicating that Erg-aa also affects pathogenicity of this plant pathogen.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：ステロールアミノ酸誘導体 エルゴステロール アミノアシルtRNA合成酵素 黄麹菌 コムギ赤カビ病  
菌 分生子形成 菌核形成

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

アミノアシル tRNA 合成酵素 (aaRS) は、tRNA に正しいアミノ酸を結合させ、遺伝暗号のコードンとアミノ酸の対応関係を成立させるタンパク質の翻訳過程において中心的な役割を担っている。糸状菌において、アスパルチル tRNA 合成酵素 (AspRS) の C 末側に付加した機能未知のドメイン (DUF2156) が見出され、DUF2156 は Asp-tRNA からアスパラギン酸を真菌のステロールであるエルゴステロールに転移し、エルゴステリルアスパラギン酸 (Erg-Asp) を合成することが明らかとなった (図 1)<sup>1)</sup>。本酵素を ErdS と呼ぶ。ステロールにアミノ酸が結合したこのようなステロール誘導体は、すべての生物種においてこれまで全く発見されておらず、新規な脂質成分であった。さらに、ゲノム上で本酵素 (ErdS) 遺伝子の隣に存在した加水分解酵素 (ErdH) が、Erg-Asp を特異的にエルゴステロールとアスパラギン酸に加水分解することが見出された<sup>1)</sup>。これは、Erg-Asp の内生量がホメオスタティックに制御されていることを示唆している。ErdS と ErdH は、酵母を除く子囊菌門と担子菌門 (Dikarya、いわゆる高等真菌) に広く保存されており、Erg-Asp が真菌類において重要な生理機能を担っていることが考えられた。また、ErdS 破壊株の表現系を観察したところ、細胞内にオートファゴソームと思われる顆粒の増加が観察された。分子形成はオートファジーによる分解物を栄養源として進行することから、Erg-Asp のオートファジーへの関与が推察され、その作用はオートファジー抑制的であると考えられた。例えば Erg-Asp が細胞内のアミノ酸センサーとして機能し、Asp レベルが下がることで Erg-Asp が減少し、アミノ酸の飢餓を認知しオートファジーを亢進させている可能性が考えられる。また、Erg-Asp の内生量を LC-MS 解析により見積もったところ、エルゴステロールの約 7% 程度存在していることが明らかとなった。このことは、Erg-Asp のようにステロールがアミノアシル化されることで膜表面の電荷や親水性が変化し、菌に薬剤耐性を付与することなどが考えられる。また、Erg-Asp がシグナル分子として働く可能性も考えられた。

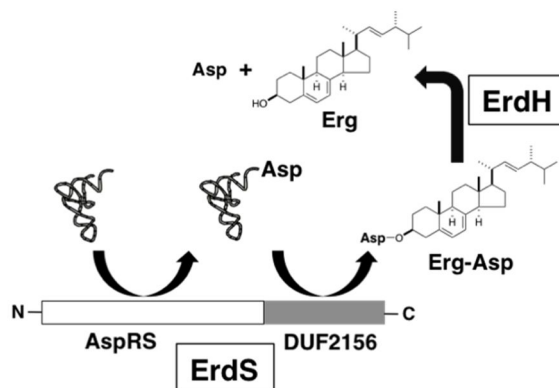


図 1 ErdS による Erg-Asp の生成

### 2. 研究の目的

本研究では、新たに見出されたエルゴステロールアミノ酸誘導体が糸状菌においてどのような生理機能を有しているのかを、黄麹菌 *Aspergillus oryzae* とコムギ赤カビ病菌 *Fusarium graminearum* を用いて明らかにすることを目的とした。まず、各々の糸状菌において *erdS* 遺伝子を破壊した ErdS 欠損株を作製し、野生株と表現系を比べることで生理作用やどの分子経路に働いているのかに関する知見を得ようと試みた。さらに、Erg-Asp と相互作用するタンパク質の探索も試みた。また、*F. graminearum* においては Erg-Asp がコムギへの病原性に関与しているのかどうかを調べた。一方、ErdS に含まれる DUF2156 が AspRS に付随せず単独で存在する遺伝子 *ergS* も見出され、ErgS の機能解析も試みた。

### 3. 研究の方法

Erg-Asp の生理機能を明らかにするために、Erg-Asp の欠損体である *erdS* 破壊株の作製を行った。*A. oryzae* および *F. graminearum* において、*erdS* 遺伝子上流と下流領域約 1000 bp に各々マーカーである *pyrG* またはハイグロマイシン耐性遺伝子 (*Hph*) をつなげたコンストラクトを作製した。これらを用いて *A. oryzae* HiMe10 株ならびに *F. graminearum* H3 株をプロトプラスト PEG 法を用いた二重相同組換えにより形質転換し、栄養要求性またはハイグロマイシン薬剤選抜で *erdS* 破壊株を取得した。目的の遺伝子破壊は PCR により確認を行った。*A. oryzae* HiMe10 株の *ergS* 破壊株も同様に作製した。

CD 寒天培地上に、EtOH のみに溶解させた Erg-Asp 合成物を 0.001 mM、0.01 mM、0.1 mM の濃度で塗布し、*A. oryzae* HiMe10 株または *A. nidulans* A4 株を植菌し形態を観察した。

Erg-Asp アフィニティーカラムの合成には市販の CarboxyLink™ Coupling Resin (Thermo Fisher Scientific) および Pierce™ NHS-Activated Agarose (Thermo Fisher Scientific) を用いた。前者は Erg-Asp のカルボン酸とアミド結合を、後者は Erg-Gly のアミノ基とアミド結合を形成させるべく合

成を行った。

*F. graminearum* の感染実験にはコムギ品種 *Chinese spring* を用いた。発芽後 3 日目のコムギ子葉鞘の先端 1-2 mm を切断し、切断面に分生子懸濁液 ( $1.0 \times 10^6$  conidia/mL) を植菌し、25°C で 7 日間培養し、病変部位を観察した。

#### 4. 研究成果

##### (1) Erg-Asp のオートファジーへの関与について

Erg-Asp がオートファジーに関与しているかどうかを調べるために、*A. oryzae* の野生株 RIB40 株を Czapek-Dox (CD) 培地および窒素欠乏培地 (CD-N) で培養し、得られた菌体から総脂質を抽出し、HPLC により Erg-Asp の定量を行った。その結果、CD-N 培地では Erg-Asp がほぼ完全に消失することが確認された。次にオートファジー関連遺伝子である *atg1* と *atg8* の発現量を RT-qPCR により測定し、野生株である HiMe10 株と *erdS* 欠損株で比較を行った。その結果、どちらにも発現量の差はみられなかった。さらに、オートファジーのマーカーとなる Atg8 タンパク質に GFP を融合した *eGFP-atg8* を HiMe10 株および *erdS* 破壊株に導入し発現させ、CD 培地で培養した後、菌体を蛍光顕微鏡にて観察した。その結果、HiMe10 株と *erdS* 破壊株においてオートファゴソームの量に大きな差は見られなかった。また、それぞれの株を CD-N 培地で培養したところ、両株ともにオートファゴソーム量の増加が確認されたものの、両株間にオートファゴソーム量の差はみられなかった。以上の結果より、Erg-Asp はオートファジーには関与していないことが示唆された。

##### (2) *erdS* 破壊株の表現系観察

*A. oryzae* の *erdS* 破壊株と HiMe10 株を PD 培地および CD 培地でプレート培養し、形態を観察した。その結果、CD プレート培養した菌体において、*erdS* 破壊株では分生子の量が著しく減少し、HiMe10 株の 4 割程度であった。さらに、*erdS* 破壊株においては菌核の形成が多数見られ、菌核から培地へのメラニン色素の沈着も確認された。*F. graminearum* においても、*erdS* 破壊株と野生株である H3 株をカルボキシメチルセルロース (CMC) 液体培地で分生子形成を誘導して培養を行ったところ、*erdS* 破壊株において分生子量が野生株の 4 割程度まで減少していた (図 2)。以上の結果より、Erg-Asp は分生子形成ならびに菌核形成に大きく関与していることが明らかとなった。このことから、Erg-Asp は糸状菌の生殖に関与していることが強く示唆された。糸状菌の菌核形成には velvet complex と呼ばれるタンパク質複合体が制御に関わっていることが知られているため、*erdS* 破壊株において velvet complex に含まれるタンパク質の遺伝子発現解析を行った。その結果、暗所で 5 日間培養した菌体において velvet complex の遺伝子の発現に野生株との差はなかったものの、分生子形成に関わる *brlA*、*abaA*、*wetA* の 3 遺伝子が *erdS* 破壊株において優位に発現低下していることが観測された。

さらに、*erdS* 破壊株を種々のストレス条件下で培養したところ、*A. oryzae* の *erdS* 破壊株において高浸透圧ストレスへの耐性が上昇している傾向がみられた。一方、塩ストレスや酸化ストレス、細胞壁の健全性については野生株と差は見られなかった。

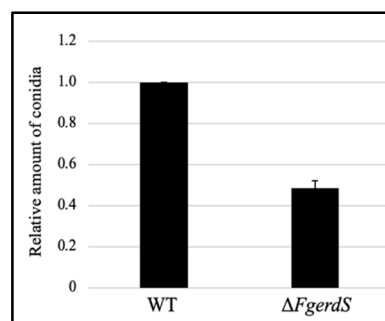


図 2 *F. graminearum* における分生子量

##### (3) ErgS の機能解析

ErdS とは別に、AspRS には付随していない DUF2156 単独のタンパク質をコードする遺伝子 *ergS* を見出した。*ergS* も *erdS* 程ではないが Dikarya に幅広く保存されている。ErgS の機能解析を行うため、*A. oryzae* の *ergS* 遺伝子をクローニングし酵母での発現を行った。脂質抽出物を LC/MS で解析したところ、エルゴステロールにグリシンがエステル結合したエルゴステリルグリシン (Erg-Gly) を生成していることが明らかとなった<sup>2)</sup>。生成物の同定は、化学合成した Erg-Gly と比較することで行った。

##### (4) *ergS* 破壊株の表現系観察

*A. oryzae* の *ergS* 破壊株と HiMe10 株を PD 培地および CD 培地でプレート培養し、形態を観察した。その結果、*erdS* 破壊株と同様に CD プレート培養した菌体において、*ergS* 破壊株では分生子の量が著しく減少し、HiMe10 株の 2 割程度であった。さらに、*ergS* 破壊株において *erdS* 破壊株と同様に菌核の形成が多数見られ、菌核から培地へのメラニン色素の沈着も確認された。以上により、*A. oryzae* においては Erg-Gly は Erg-Asp とほぼ同様の生理活性を持つことが示唆された。

##### (5) Erg-Asp の菌体外からの投与による表現系観察

Erg-Asp を 0.1 mM 添加した培地において、*A. oryzae* の分生子量が 40% 増加することが明らかとなった。一方、*A. nidulans* では 0.1 mM の Erg-Asp の添加により逆に分生子量が減少することが観察された。また、*A. oryzae* に対して Erg-Gly を添加したところ、分生子および菌核形成の抑

制傾向が見られ、気中菌糸が過剰に形成された表現型が確認された。

(6) アフィニティークロマトグラフィーによる Erg-Asp 相互作用タンパク質の探索

Erg-Asp および Erg-Gly のアミノ酸部分をセファロースビーズと結合させたアフィニティークロマトグラフィー用の担体の合成を試みた。得られたビーズを用いて *A. oryzae* より抽出したタンパク質画分を供試したが、特異的な相互作用タンパク質は見出せなかった。さらに、ステロールの側鎖部分をセファロースビーズに結合させた担体の合成も試みたが、合成がうまくいかなかった。

(7) *F. graminearum* のコムギ感染能への影響

*F. graminearum* の *erdS* 破壊株をコムギの子葉鞘へ感染させ、病変部位の大きさを比較したところ、野生株と比べて *erdS* 破壊株では病変部位が有意に小さくなっていることが明らかとなった(図3)。これにより、Erg-Asp は植物病原菌の病原性に影響を及ぼすことが明らかとなった。

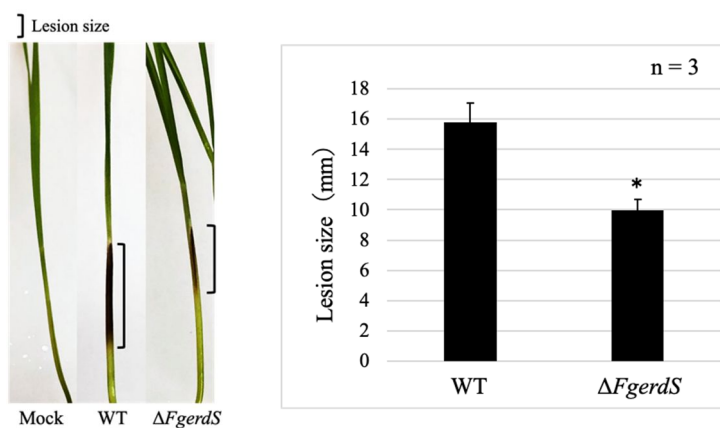


図3 *F. graminearum* のコムギへの感染能試験

<引用文献>

N. Yakobov, F. Fischer, N. Mahmoudi, Y. Saga, C. D. Grube, H. Roy, B. Senger, G. Grob, S. Tatematsu, D. Yokokawa, I. Mouyna, J.-P. Latge, H. Nakajima, T. Kushiro, H. D. Becker, RNA-dependent sterol aspartylation in fungi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 2020, 14948-14957.

N. Yakobov, N. Mahmoudi, G. Grob, D. Yokokawa, Y. Saga, T. Kushiro, D. Worrell, H. Roy, H. Schaller, B. Senger, L. Huck, G. R. Gascon, H. D. Becker, F. Fischer, RNA-dependent synthesis of ergosteryl-3 $\beta$ -O-glycine in Ascomycota expands the diversity of steryl-amino acids, *J. Biol. Chem.*, **298**, 2022, 101657.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yokokawa Daisuke, Tatematsu Shunsuke, Takagi Ryoka, Saga Yusuke, Roy Hervy, Fischer Frederic, Becker Hubert D., Kushiro Tetsuo	4. 巻 169
2. 論文標題 Synthesis of aminoacylated ergosterols: A new lipid component of fungi	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Steroids	6. 最初と最後の頁 108823-
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.steroids.2021.108823	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Yakobov Nathaniel, Mahmoudi Nassira, Grob Guillaume, Yokokawa Daisuke, Saga Yusuke, Kushiro Tetsuo, Worrell Danielle, Roy Hervy, Schaller Hubert, Senger Bruno, Huck Laurence, Riera Gascon Gisela, Becker Hubert D., Fischer Frederic	4. 巻 298
2. 論文標題 RNA-dependent synthesis of ergosteryl-3 -O-glycine in Ascomycota expands the diversity of steryl-amino acids	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 101657-
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2022.101657	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 金子雅弘、横川大祐、佐賀裕亮、Frederic Fischer、Hubert D. Becker、久城哲夫
2. 発表標題 コムギ赤カビ病菌における新規ステロールアミノ酸誘導体の生理機能解析
3. 学会等名 第21回糸状菌分子生物学コンファレンス
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 横川大祐、立松俊祐、佐賀裕亮、Frederic Fischer、Hubert D. Becker、久城哲夫
2. 発表標題 糸状菌由来新規ステロールアミノ酸誘導体の生理機能解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 今井誠、横川大祐、立松俊祐、佐賀祐亮、Frederic Fischer、Hubert D. Becker、久城哲夫
2. 発表標題 糸状菌由来新規ステロールアミノ酸誘導体の機能解析および相互作用タンパク質の探索
3. 学会等名 第22回糸状菌分子生物学コンファレンス
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 横川大祐、佐賀祐亮、Frederic Fischer、Hubert D. Becker、久城哲夫
2. 発表標題 糸状菌由来新規エルゴステロールアミノ酸誘導体の生理機能解析
3. 学会等名 第22回糸状菌分子生物学コンファレンス
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 関澤大地、金子雅弘、横川大祐、Frederic Fischer、Hubert D. Becker、久城哲夫
2. 発表標題 コムギ赤カビ病菌における新規ステロール誘導体加水分解酵素の機能解析
3. 学会等名 第22回糸状菌分子生物学コンファレンス
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 横川大祐、今井誠、立松俊祐、佐賀祐亮、Frederic Fischer、Hubert D. Becker、中島春紫、久城哲夫
2. 発表標題 糸状菌由来新規ステロールアミノ酸誘導体の発見および生理機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2024年度大会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------