

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23658282

研究課題名(和文)ピリジンヌクレオチド代謝調節による細胞機能の制御

研究課題名(英文)Pyridine nucleotides regulate gene expression and cellular metabolisms

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) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：Aspergillus nidulansのSirAが酵母のSir2pと相同性を示すNAD⁺依存型ヒストンデアセチラーゼ(sirtuin)であることを見出した。SirAはヒストンH4のアセチルリジン16を脱アセチル化することを示した。sirA遺伝子の遺伝子破壊株を用いた解析により、SirAがステリグマトシチンとペニシリンの生合成遺伝子であるafIRとipnAのプロモーター上のヒストンの脱アセチル化によって、これらの遺伝子発現を抑制していることを示した。一方、Nudix hydrolaseが、細胞内のNAD⁺濃度を低下させることによってこれと拮抗することも明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We found Aspergillus nidulans gene encoding a sirtuin isozyme (SirA) with an amino acid identity of 47% to yeast Sir2p. Recombinant SirA exhibited nicotinamide sensitive NAD(+)-dependent HDAC activity, and deacetylated lysine 16 residue of histone H4 (H4K16), indicating that SirA is a fungal sirtuin counterpart. Gene disruptant of sirA accumulated more acetylated H4K16 at the gene promoters of ipnA and afIR and their transcripts and produced more penicillin G and sterigmatocystin, indicating that SirA removes H4K16 acetylation and represses the expression of these secondary metabolite genes. The increased cellular NAD⁺ and the decreased secondary metabolite production induced by adding nicotinamide riboside accompanied decreased levels of H4K16 acetylation at the ipnA and afIR gene promoters, which was not evident in the sirA gene disruptant. These results indicate that cellular NAD⁺ modulates the HDAC reaction by SirA.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：Nudix hydrolase Sirtuin histone secondary metabolism

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、低酸素条件に曝されると、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。

我々は、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ことを試みてきた。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) 転写・翻訳のグローバルな抑制、(4) 細胞内小器官の機能調節(オートファジーの誘導)、(5)酸化還元ストレス応答系の亢進である。本研究では、(2)の研究の中から、近年、申請者が見出した「ピリジンヌクレオチド代謝調節による細胞機能の制御」の分子機構に焦点を当てた新たな研究を展開する。

2. 研究の目的

本研究では、カビ *A. nidulans* を研究モデルとして、真核生物の低酸素環境への応答・適応機構の全貌の解明の一助とすることを目指した。特に、研究代表者がこれまでに独自に見出した本菌の低酸素条件下で機能する Nudix hydrolase による細胞内 NADH/NAD⁺ 濃度の総量の制御について分子レベルで解明し、ピリジンヌクレオチド代謝調節による細胞機能の制御についての新概念を提案することを目指した。カビ *A. nidulans* を好気条件から低酸素条件に移すことによって、細胞内の主要なピリジンヌクレオチドである NAD⁺ と NADH の酸化還元比 (NADH/NAD⁺ 比) が大きくなるが、このとき、NAD⁺ と NADH の絶対量も減少する。本研究では、低酸素条件下における NAD⁺ と NADH の分解に関わる酵素を探索し、その役割について検討した。具体的には、近年、NAD⁺ と NADH の加水分解酵素として報告されている Nudix hydrolase (NUDT) の関わりについて検討した。

また、この研究の過程で、細胞内の NAD⁺ と NADH の減少に伴い遺伝子発現を制御する可能性があるタンパク質性の制御因子として、sirtuin タンパク質に着目した。sirtuin はヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) クラス

に分類される NAD⁺ 依存的 HDAC であり生物界に広く保存されている。sirtuin はヒストン H4 の脱アセチル化を促進することによって、ヘテロクロマチン構造の形成の促進と当該遺伝子のジーンサイレンシングを行う。また、sirtuin がヒストン以外のタンパク質を脱アセチル化する役割ももつことや他のタンパク質と複合体を形成して機能することも報告されている。一方、カビにおける sirtuin の役割はほとんど未解明であったことから、これらについての解析をあわせて行った。

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) 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 °C 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、ウエスタンブロットリング、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

ピリジンヌクレオチド分解酵素

A. nidulans のゲノム中に見出される 12 種の Nudix hydrolase (NUDT) 遺伝子 (図 1) の中から、AnNUDT1, 2, 3 を選抜しそれらの組換え蛋白質を調製し検討したところ、AnNUDT1, 3 が NADH を加水分解できた。AnNUDT1, 2, 3 遺伝子の遺伝子破壊株を作製し、これらと野生株を低酸素条件下で培養したところ、AnNUDT1 の遺伝子破壊株は、野生株の 36% の細胞内 NADH hydrolase 活性を示した。また、細胞内の NAD⁺ 量はすべての株で同程度であったのに対して、AnNUDT1 の遺伝子破壊により NADH が増加したことから、AnNUDT1 が低酸素条件下での NADH の分解に関わることが示された。

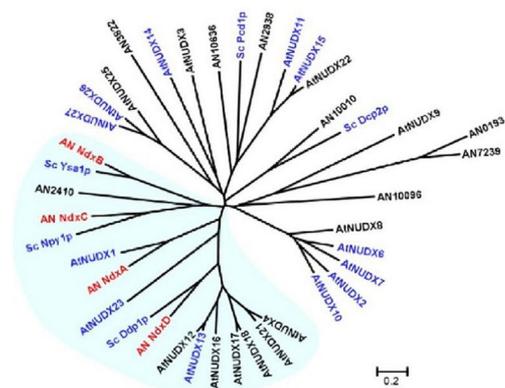


図 1 *A. nidulans* の NUDT の分子系統樹

NAD⁺依存型ヒストン脱アセチル化酵素酵母の Sir2p やヒトの SIRT1 とアミノ酸配列が類似した *A. nidulans* のタンパク質を探索し分子系統樹を作製したところ、AN10449 (SirA) が Sir2p と同一のクラスターを形成した。SirA の組換えタンパク質が sirtuin 活性を有していたことおよび *sirA* 遺伝子破壊株 (Δ SirA) の無細胞抽出液のアセチルリジンレベルが野生株 (WT) のそれよりも高かったことから SirA が *A. nidulans* の sirtuin として機能することが示された。また Δ SirA ではペニシリンやステリグマトシチンといった二次代謝産物の生合成とそれらの生合成遺伝子の発現が上昇した。細胞内 NAD⁺ が過剰な条件下では二次代謝産物の生合成が減少したことから、SirA は NAD⁺ 濃度依存的に二次代謝産物の生合成を抑制していると考えられた。と得られた発見を考察し、本菌のピリジンヌクレオチドとヒストンアセチル化を介した遺伝子発現の制御に関する以下のモデルが提唱できた (図 2)。

(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

Nudix hydrolase については、酸化傷害を受けたヌクレオチドの除去や ADP-ribose を分解することにより細胞のストレス応答機

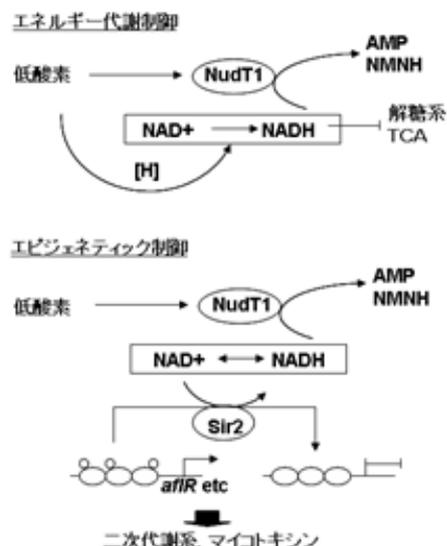


図 2 *A. nidulans* の新たな二次代謝系の発現制御のモデル

構の発現を調節する役割が議論されている。しかし、Nudix hydrolase による細胞内のピリジンヌクレオチドの総量の調節は知られていなかった。本研究では、「ピリジンヌクレオチドの分解による細胞機能の制御」という Nudix hydrolase の新たな機能を提案することができた。この発見は、通常的环境応答では NAD と NADP の酸化型と還元型の割合のみが制御され、ピリジンヌクレオチドの総量は変わらないという従来の常識を覆す驚くべき成果を導くと期待される。

ピリジンヌクレオチド (NAD と NADP) は、細胞内では酸化型 (NAD⁺, NADP⁺) および還元型 (NADH, NADPH) 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、細胞内の酸化還元状態に合わせてそれらの酵素活性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クス制御に関わることが注目されている。本研究で得られた *A. nidulans* が低酸素環境に応答して速やかに細胞内のピリジンヌクレオチド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の発見は、市場菌の低酸素条件への適応戦略を知る上で基礎的に重要なものである。

(3) 今後の展望

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、特に本菌の遺伝子発現制御をヒストンのアセチル化修飾の制御の観点から解析し、本菌の二次代謝系遺伝子の発現が培養に伴いピリジンヌクレオチドの代謝を通して

制御されることを明らかとした。得られた研究成果は、培養に影響する複雑なファクター（通気、培養時間、栄養）の適切な制御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。

糸状菌の二次代謝産物には、有用な生物活性物質が多く知られており、実用化されているものも多い。一方、多くの糸状菌が、通常の実験室条件下では発現していない潜在的な二次代謝系を多く持つことが明らかとなっている。これらを人為的に発現させることができれば、多様な二次代謝産物の取得が可能であり様々な分野で貢献する。一方、本研究では、*A. nidulans* の SirA が二次代謝系の発現制御に重要であることを示した。これにより、SirA の阻害剤は、様々な糸状菌に利用可能な二次代謝系の発現誘引物質として利用できると期待される。実際、本研究の成果を受け、これら阻害剤の探索研究をスタートさせることができ、既に目的化合物が得られつつあることから、本研究成果は、有用な生物活性物質の生産の新技术の開発にも発展すると期待される。

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2件)

Shimizu, M., and Takaya, N.: Nudix hydrolase controls nucleotides and glycolytic mechanisms in hypoxic *Aspergillus nidulans*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **77**, 1888-1893 (2013)、査読あり doi: 10.1271/bbb.130334z10.1271/bbb.130334

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) 査読あり doi: 10.1128/MCB.00032-12

〔学会発表〕(計5件)

S. Zhou, Narukami, T., and Takaya, N.: Metallothionein, a novel factor to suppress nitrosative stress, 2013 International Symposium on New Frontiers in Microbiology and Biotechnology (平成25年3月11日、中国・無錫)

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(平成24年11月12日、名古屋)

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、生物工学会シンポジウム(平成24年10月25日)、神戸

高谷直樹: レドックスライフィノベーションシンポジウム「微生物研究から見えてきた NAD を解した新たな代謝制御」(平成24年3月8日)、東京

高谷直樹: NAD を介した代謝調節～菌類(カビ)の場合、微生物研究会(平成23年11月12日)、千葉

〔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