

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：33919

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25850057

研究課題名(和文)糸状菌の新規PARGの探索とその生理学的機能の解明

研究課題名(英文) Identification and Characterization of the Novel Poly(ADP-ribose) glycohydrolase of Filamentous Fungi *Aspergillus nidulans*

研究代表者

志水 元亨 (Shimizu, Motoyuki)

名城大学・農学部・助教

研究者番号：20423535

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ポリ(ADP-リボース)代謝には、ポリ(ADP-リボース) (PAR) を合成する poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) および、分解する poly (ADP-ribose) glycohydrolase (PARG) の2種類の酵素が存在する。PARP は酵母を除くすべての真核生物に保存されている。しかし、酵母および糸状菌のゲノム中には、それらを除くすべての真核生物で高度に保存されている既知の *parg* と相同性を示す遺伝子はコードされていなかった。本研究から、世界で初めて糸状菌において PARG 活性を有する酵素 (fPARG) を発見した。

研究成果の概要(英文)：Poly(ADP-ribosylation) is a post-translational modification of protein in which the ADP-ribose moiety of NAD<sup>+</sup> is transferred to amino acids in proteins, altering their structure and function. This protein modification is catalyzed mainly by a nuclear poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in response to several stress, most notably DNA damage. PARP orthologs are found in mammals, plants, metazoans, protists and filamentous fungi, but not in yeast, while PARG homologs are identified in all eukaryotes, besides fungi.

Here, we searched for a *parg* ortholog in the genome sequence of a model fungus *A. nidulans*. First, we picked up seven genes as candidates of a fungal *parg* gene. Proteins coded by the genes were successfully expressed as soluble proteins using *Escherichia coli* expression system. Among them, only one protein was found to hydrolyze poly(ADP-ribose). This is the first report for identification of PARG in filamentous fungi.

研究分野：糸状菌分子生物学

キーワード：PARG *Aspergillus Fungi* poly(ADP-ribose) PARP

### 1. 研究開始当初の背景

真核微生物のポリ (ADP-リボース) 代謝についてはほとんど研究がなされていない。特に、酵母および糸状菌のゲノム中には、それら以外の真核生物に高度に保存された既知のポリ (ADP-リボース) グリコヒドロラーゼ (PARG) と相同性を示す遺伝子は存在しない。本研究では、カビの *parg* 遺伝子を特定することを目指した。

### 2. 研究の目的

ポリ (ADP-リボシル) 化反応は真核生物に特異的なタンパク質の可逆的翻訳後修飾であり、DNA 修復、転写調節、細胞死、中心体の分裂制御など核内における多くの機能に関与していると考えられている。ポリ (ADP-リボース) 代謝には、主にポリ (ADP-リボース) ポリメラーゼ (PARP) およびポリ (ADP-リボース) グリコヒドロラーゼ (PARG) の 2 種類の酵素が関与することが知られている (図 1)。

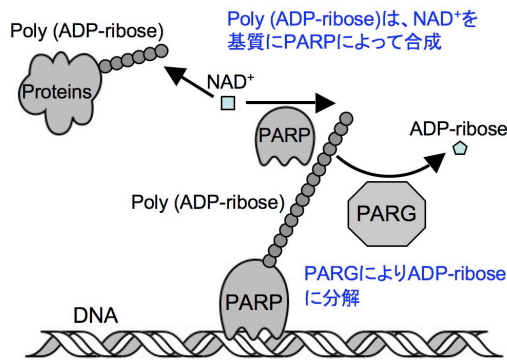


図 1. Poly (ADP-ribose) 化とその分解

PARP は酵母以外の真核生物で保存されており、*Aspergillus nidulans* のゲノム中にも 1 つ (AN3129.3) コードされている。ヒトの PARP-1 は分子量 116kDa の塩基性に富む DNA 結合性タンパク質で、2 つのジンクフィンガーモチーフを含む N 末端 DNA 結合ドメイン、自己修飾ドメイン、PARP 特異的モチーフを含む C 末端触媒ドメインの 3 つの機能ドメインからなる。従来、ポリ (ADP-リボシル) 化は主に核内において認められ、PARP-1 は  $NAD^+$  を基質として ADP-リボースをアクセプタータンパク質 (PARP, Histone etc.) に結合させる (図 1)。これらの反応は DNA に一本鎖切断が生じたとき高頻度に認められることから、DNA 損傷に対する生体内応答機構であると考えられている<sup>(1)</sup>。また、*A. nidulans* でもすでに *ΔparpA/+* mutant が DNA 鎖切断作用のあるブレオマイシンや 4-ニトロキノリン-1-オキシドに対して感受性になることも明らかになっている。

PARG はポリ (ADP-リボース) 分解の主要酵素であるが、その生理的意義は未だ十分に明らかにされていない。ヒトなど高等真核生物において、*parg* はゲノム中に 1 つのみコードされており、*parg* をノックダウンした場合、DNA 損傷が引き起こされる条件下 (アルキル化剤処理、酸化ストレス) に致死感受性が上昇する。また、ヒトではアルキル化剤処理により生成したポリ (ADP-リボース) は、ストレスを回避後速やかに PARG によって分解されることが知られており、*parg* をノックダウンさせるとハイパーポリ (ADP-リボシル) 化が引き起こされ細胞死を誘導する。これは、ハイパーポリ (ADP-リボシル) 化に伴って大量の  $NAD^+$  を使用するため、細胞内で  $NAD^+$  が枯渇し ATP の生成などがうまく行われずに細胞死を引き起こすと考えられている。

これらのことから、ポリ (ADP-リボース) 代謝を制御することは、種々のストレスに対応するだけでなく、細胞内の  $NAD^+$  や ATP のホメオスタシスを維持するうえでも重要である。しかし、酵母および糸状菌のゲノム中には、それら以外の真核生物に高度に保存された既知の *parg* と相同性を示す遺伝子は存在しない。本研究では、カビの *parg* 遺伝子を特定し、その生理的役割を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) ゲノム情報を利用した糸状菌の新規 PARG 候補の組換えタンパク質の調製および PARG 活性の測定

*A. nidulans* のゲノム情報を利用して、ヌクレオシドニリン酸類縁体加水分解酵素 (Nudixhydrolase; Ndx)、ヌクレオチドピロホスファターゼ (NPP)、hypothetical protein (HP) など PARG 活性を有す可能性のある合計 7 遺伝子を糸状菌の PARG 候補として選抜した。

それぞれの遺伝子について大腸菌または *A. nidulans* を宿主として組換え酵素を異種発現させ、精製を行った後、PARG Assay Kit (TREVIGEN) を用いて PARG 活性の有無を検討した。活性が認められた PARG 候補については、ポリ (ADP-リボース) を調製後、PARG による加水分解を LC-MS/MS にて解析し、反応生成物として ADP-リボースが検出されるか検討した。

(2) *fPARGΔ* 株の作製および野生株との表現型の比較

PARG 活性を有するタンパク質をコードする遺伝子の遺伝子破壊株 (fPARGΔ株) を作製し、ポリ(ADP-リボース)抗体を用いてウエスタンブロットティングを行うことで、ポリ(ADP-リボース)の分解が抑制されるか解析した。また、野生株と fPARGΔ株を用いて、*fparg* 遺伝子の破壊による生育やMMSなどのDNA損傷剤に対する影響を比較した。さらに、どのような条件で遺伝子発現が誘導されるかについても定量 PCR にて解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) ゲノム情報を利用した糸状菌の新規 PARG の探索

7つの *parg* 候補遺伝子の組換え酵素の調製を試みた。*A. nidulans* から7つの *parg* 候補遺伝子をクローニングし大腸菌にて異種発現を行い精製後、PARG Assay Kit を用いて PARG 活性を測定したところ、1種のみ PARG 活性を有していることが確認された (data not shown)。

PARG 活性を有していた HPA については、大腸菌にて発現させた場合、His-タグを付与するとインクルージョンボディとなったため、精製せずに活性測定を行った。そこで、*A. nidulans* にて C-末端に FLAG-His-タグを付けて発現後、精製したところ可溶性の組換えタンパク質として得ることができた。既知の PARG は活性発現に  $Mg^{2+}$  が必要であることが知られており、精製した HPA を用いて PARG 活性を測定したところ、同様であった (図2)。このことから、HPA は真核生物に広く保存されている一般的な PARG とアミノ酸配列上は全く相同性を有していないが、それらと同様にポリ (ADP-リボース) を ADP-リボースに分解する活性を持つこ

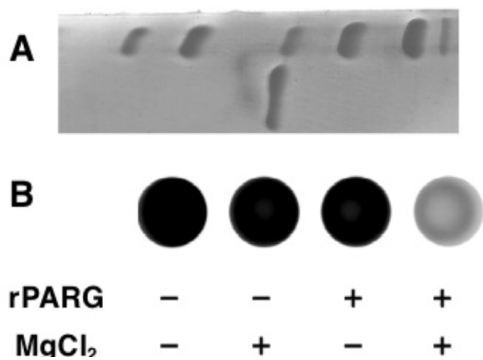


図3 カビ由来の組換え PARG によるポリ(ADP-リボース)の分解  
(A)糸状菌由来組換え PARG の SDS-PAGE  
(B)PARG 活性の測定。

とが示された。これまで糸状菌における PARG の報告はなく、今回見出したものが初めてとなる。そこで fungal PARG (fPARG) と名付け以下の研究を行った。

次に、fPARG によるポリ (ADP-リボース) の分解産物の同定を試みた。精製した fPARG とポリ (ADP-リボース) を反応させた後、LC-MS/MS にて分解産物を追跡したが、現在、ADP-リボースを検出できていない (data not shown)。今後、検出感度やサンプル調製を工夫する必要がある。

##### (2) fPARGΔ株の作製および野生株との表現型の比較

定量 PCR を用いて *fparg* 遺伝子の遺伝子発現を解析したところ、*parg* と同様に DNA 損傷剤応答的に発現が誘導された (data not shown)。そこで、*fparg* 遺伝子破壊株 (*Δfparg* 株) を作製した。DNA 損傷剤に対する感受性を調べたところ、野生株と比べて感受性が高くなっていた (図3)。このことから、高等真核生物の既知の PARG と同じように、fPARG も DNA の損傷において機能することが示唆された。また、野生株と

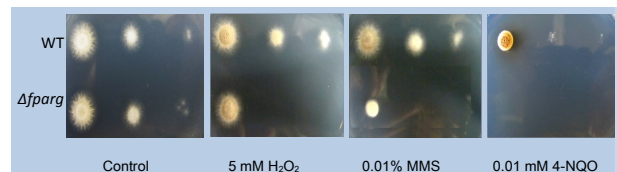


図3 各種 DNA 損傷剤の生育に対する影響  
MMG 寒天培地にはそれぞれ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、MMS、4-NQO が含まれている。  
写真は、37°C で 48 時間培養後のコロニーの様子を示している。

比較して、作製した *Δfparg* 株において、ポリ(ADP-リボース)の分解能が低下しているか抗ポリ(ADP-リボース)抗体を用いて検討した。その結果、野生株ではストレス (DNA の損傷) 回避後速やかにポリ(ADP-リボース)が分解されるのに対して *Δfparg* 株ではほとんど分解されていなかった。これらのことから、糸状菌において fPARG が、広く真核生物に保存されている既知の PARG と同様の機能を有していると考えられた。

マウスなどでは、*parg* 遺伝子に変異を加えると DNA 損傷剤に対して感受性になるだけでなく、発生段階や減数分裂に影響を与えることが報告されている。今後は、無性胞子や有性胞子の形成に変化がないか検討することで、fPARG のストレス応答以外の役割を明らかにしたい。

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 5 件)

- (1) Doi, Y., Shimizu, M., Fujita, T., Nakamura, A., Takizawa, N., Takaya, N. *Achromobacter denitrificans* YD35 pyruvate dehydrogenase controls NADH production to tolerate extremely high nitrite levels. *Appl. Environ. Microbiol.* 2014, 80, 1910-1918. 査読あり
- (2) Zhou, S., Narukami, T., Masuo, S., Shimizu, M., Fujita, T., Doi, Y., Kamimura, Y., Takaya, N. NO-inducible nitrosothionein mediates NO removal in tandem with thioredoxin. *Nature Chemical Biology* 2013, 9, 657-663. 査読あり
- (3) Shimizu M.\*, Takaya N. Nudix hydrolase controls nucleotides and glycolytic mechanisms in hypoxic *Aspergillus nidulans*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2013, 77, 1888-1893.\*corresponding author 査読あり
- (4) Shimasaki Y, Tsuyama M, Tasmin R, Qiu X, Shimizu M. et al. Thiobencarb Herbicide Reduces Growth, Photosynthetic Activity, and Amount of Rieske Iron-Sulfur Protein in the Diatom *Thalassiosira pseudonana*. *J Biochem Mol Toxicol.* 2013, 27, 437-444. 査読あり
- (5) Qiu X, Shimasaki Y, Tsuyama M, Yamada T, Kuwahara R, Kawaguchi M, Honda M, Gunjikake H, Tasmin R, Shimizu M. Sato Y, Kato-Unoki Y, Nakashima T, Matsubara T, Yamasaki Y, Ichinose H, Wariishi H, Honjo T, Oshima Y. Growth-Phase Dependent Variation in Photosynthetic Activity and Cellular Protein Expression Profile in the Harmful Raphidophyte *Chattonella antiqua*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 2013, 77, 46-52. 査読あり

[学会発表] (計 5 件)

- (1) 志水元亨. 2014年度発酵と代謝研究奨励賞. 細胞内レドックス変化に応答した糸状菌代謝のエピジェネティック制御機構. 一般財団法人バイオインダストリー協会
- (2) 宮地雄大, 山田麻衣子, 平野 濤, 山本竜也, 高谷直樹, 志水元亨, 加藤雅士. 糸状菌 *Aspergillus nidulans* の新規 poly (ADP-ribose) glycohydrolase の機能解析とその役割. 2014, 第66回日本生物工学会、札幌
- (3) 平野 濤、須藤美穂、枡尾俊介、高谷直樹、志水元亨、加藤雅士. (2013) 糸状菌の Poly(ADP-ribose) glycohydrolase の探索及びその働き. 2013, 第 13 回糸状菌コンファレンス、つくば
- (4) Hirano M., Sudo, M., Doi, Y., Masuo, S., Takaya, N., Shimizu, M., Kato, M. Identification and characterization of the novel poly(ADP-ribose) glycohydrolase of the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. 2013, XI Fungal Biology Conference Karlsruhe (KIT, Germany).
- (5) Kaneko Y., Tanaka H., Shimizu, M., Kobayashi, T., Kato, M. A model chimeric transcription factor: construction and characterization of an AmyR::XlnR hybrid transcription factor. 2013, XI Fungal Biology Conference Karlsruhe (KIT, Germany).

[図書] (計 1 件)

- (1) 志水元亨、小林哲夫、加藤雅士. 「発酵・醸造食品の最前線」 (北本勝ひこ監修) 第 18 章 ゲノム情報を活用した麹菌の新たな分子育種の可能性、シーエムシー出版、2015

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: ロイシン酸生産活性を有するタンパク質及びその利用

発明者: 志水元亨、加藤雅士

権利者：名城大学  
種類：  
番号：特願 2014-076212  
出願年月日：2014/04/02  
国内外の別： 国内

○取得状況（計 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

志水元亨 (Motoyuki, Shimizu)  
名城大学・農学部・助教  
研究者番号：20423535

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：