

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年5月31日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H02601

研究課題名(和文) 真菌における一酸化窒素の合成制御機構と生理機能の解明

研究課題名(英文) Synthetic regulatory mechanism and physiological function of nitric oxide in yeasts and fungi in

研究代表者

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

研究者番号：50275088

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 31,400,000円

研究成果の概要(和文)：真菌におけるNOの合成制御機構と生理機能を解明するとともに、NOが酵母の発酵力や病原真菌の表現型に及ぼす影響を解析した。その結果、NOS活性に必要なNADPHの生成に関わる酵素を同定した。また、Tah18の哺乳類オルソログNDOR1が酵母のNO合成に関与することを見出し、新規なNO合成機構が真核生物に保存されている可能性を示した。さらに、ビオチンスイッチ法を確立し、NOによりS-ニトロソ化されるタンパク質候補を多数同定した。一方、病原真菌ではCandida属の多剤耐性株やAspergillus fumigatusの臨床株の中にNO量やNO耐性の低い株が存在し、NOと病原性との関連が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

酵母のNO合成に関わるTah18タンパク質の哺乳類オルソログ(Ndor1)が酵母のNO合成に寄与することが判明し、酵母で見出したNOの合成制御機構が哺乳類にも保存されている可能性を見出した。また、酵母におけるNOの機能には、ヒトの心臓血管系でも報告されている細胞保護・細胞死の二面性があることが分かった。以上の結果から、酵母で見出したNOの合成制御機構、生理機能を解析することで、哺乳類のNO研究にインパクトを与えるとともに、産業酵母の育種や抗真菌剤の開発など基礎・応用の両面で波及効果が期待できる。

研究成果の概要(英文)：We found a candidate gene encoding an enzyme involved in NADPH synthesis, which is required for the NOS reaction. We also showed that an NADPH-dependent diflavin oxidoreductase 1 (NDOR1) and its interaction partner protein CIAPIN1, which are homologous to Tah18 and Dre2, respectively, are involved in the NOS activity in a manner similar to Tah18-Dre2, suggesting that the Tah18-dependent NO synthesis and its regulatory system are conserved in eukaryotic cells from yeasts to mammals. To identify S-nitrosylated proteins in yeast, we developed the biotin switch method combined with LC-MS. Using cell extract treated with a NO donor S-nitrosoglutathione, we identified many S-nitrosylated proteins. In research of pathogenic yeasts and fungi, we found that some of multidrug-resistant strains of Candida species and clinical strains of Aspergillus fumigatus had lower levels of NO or less sensitivity to NO than those of other strains, suggesting that NO is related to pathogenicity.

研究分野：応用微生物学

キーワード：一酸化窒素 酵母 酸化ストレス シグナル伝達 病原真菌

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

真核生物のモデルである酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において、一酸化窒素 (NO) はストレス応答に関与していると考えられ、NO 処理が細胞に高静水圧や銅に対する耐性を付与することが報告されている (*FEMS Yeast Res.*, **3**, 341, 2003)。また、過酸化水素で誘導されるアポトーシスに NO が関与する可能性もある (*J. Cell Sci.*, **120**, 3279, 2007)。これまでに、酵母細胞内で哺乳類様の NO 合成酵素 (NOS) 活性が検出され、NOS 抗体に反応するタンパク質の存在も報告されているが (*Biochem. Mol. Biol. Int.*, **45**, 1081, 1998)、酵母のゲノムには哺乳類 NOS のオルソログが存在しないため、NO の生成機構や生理機能については研究が進んでいない。

研究代表者は、実験室酵母 *S. cerevisiae*  $\Sigma$ 1278b 株において高温処理 (25°C→39°C) のような活性酸素種 (ROS) レベルが上昇する酸化ストレスに伴い、*N*-アセチルトランスフェラーゼ Mpr1 を介したアルギニン (Arg) 合成が亢進されること、増加した Arg から NO が合成されることを見出した (*FEMS Yeast Res.*, **10**, 687, 2010; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **430**, 137, 2013)。また、NOS 活性依存的に生成する NO が細胞の高温ストレス耐性に寄与することも判明した (*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **430**, 137, 2013)。*S. cerevisiae* の機能未知遺伝子を発現させた大腸菌の解析から、Tah18 が Arg からの NO 合成 (NOS 活性) に関与し、酵母の高温耐性に寄与することを見出した (*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **430**, 137, 2013)。Tah18 は Dre2 と複合体を形成し、NADPH からの電子を Dre2 に渡すことで細胞質の鉄硫黄タンパク質合成に関わるジフラビン還元酵素であるが (*Nat. Chem. Biol.*, **6**, 758, 2010)、NO 合成への関与は初めての知見である。さらに、高温ストレス下で合成される NO が銅代謝関連転写因子 Mac1 を活性化し (ニトロソ化など)、銅の取込み系の亢進を介して銅依存型スーパーオキシドジスムターゼ Sod1 活性を上昇させることで、高温に伴い生成する ROS を除去し、酵母のストレス耐性に寄与することを明らかにした (*PLoS One*, **9**, e113788, 2014)。また、実用パン酵母にも同様の機構が存在し、NO 合成系の強化により製パン過程の酸化ストレス (乾燥、冷凍) に対する耐性と発酵力の向上に成功した (*Microb. Cell Fact.*, **11**:40 doi:10.1186/1475-2859-11-40, 2012)。

続いて研究代表者らは、Dre2 が Tah18 依存的な NOS 活性を阻害すること、酸化ストレス (高温、過酸化水素) に応答し、Tah18-Dre2 複合体が解離することから、Dre2 による新規な NO 合成制御機構を提唱した (*Nitric Oxide*, **57**, 85, 2016)。また、Tah18、Dre2 の過剰発現株や発現抑制株、NOS 阻害剤を用いた実験から、高濃度の過酸化水素存在下で Tah18 依存的な NO 合成がアポトーシス様細胞死を誘導することが示唆された。さらに、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* において、NO を解毒する酵素の同定や酸化ストレス応答における機能解析を行い、NO を介したシグナル伝達系の存在を示唆する結果を得た (*Nitric Oxide*, **52**, 29, 2016)。

一方、病原真菌はヒトに感染する際、種々のストレス (温度、酸素濃度、栄養など) に応答して耐性を獲得し、病原性を示すことから、NO が真菌のストレス耐性や病原性に関与する可能性がある。そこで、主要な病原真菌 (*Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida glabrata*) の NO 合成関連遺伝子に着目し、機能解析を行った。その結果、*C. glabrata* の Tah18 発現抑制株は野生型株より毒性が低下すること、*C. neoformans* の Mpr1 遺伝子破壊株は野生型株より熱ショック感受性を示すこと、*A. fumigatus* や *C. neoformans* では過酸化水素処理・Arg 添加により NO が検出されるなど NO と病原性との関連を示唆する知見が蓄積されてきた。

### 2. 研究の目的

本研究では、酵母に見出した NO の合成制御機構と生理機能について以下の4点に取り組む。

(1) NO の合成制御機構の解析: Tah18 が関与する NOS 様活性に着目し、Tah18 依存的な NOS 活性発現機構の解析 (オキシゲナーゼ様タンパク質の同定)、Dre2 による NOS 活性制御機構の解析、哺乳類の Tah18 オルソログおよび Dre2 オルソログの機能解析などを行う。

(2) NO の生理機能の解析: シグナル分子としての NO に着目し、NO の標的タンパク質 (S-ニトロソ化・ニトロ化) の同定、およびその分子機能や表現型の解析を行う。また、NO による細胞死誘導機構を解析し、NO が示す二面性 (細胞保護、細胞死) の生理的意義を理解する。

(3) 産業酵母における NO の合成制御機構と生理機能の解析: 上記で解析する NO 関連遺伝子について、産業酵母 (パン、バイオエタノールなど) の当該遺伝子を人為的に改変 (過剰発現、発現制御、破壊) した菌株を作製し、NO が産業酵母の生理特性に及ぼす影響を評価する。

(4) 病原真菌における NO の合成制御機構と生理機能の解析: 上記で解析する NO 関連遺伝子について、病原真菌 (*A. fumigatus*, *C. neoformans*, *C. glabrata*) のオルソログ遺伝子の分子機能を解析するとともに、NO が増殖、感染、病原性に及ぼす影響を検証する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 菌株、プラスミドおよび培地

本研究では、酵母 *S. cerevisiae* の S288C 系統株 (BY4741 株) および  $\Sigma$ 1278b 系統株 (L5685 株) を用いた。また、非必須遺伝子の破壊株コレクションである Yeast MATa Collection (Dharmacon 社) を適宜用いた。Tah18 の過剰発現株 (TAH18-OE) および His タグ融合型 Tah18 の過剰発現株 (6His-TAH18-OE) は、L5685 株に pAG414GPD-TAH18 もしくは pAG414GPD-6HisTAH18 を導入後、ゲノム上の *TAH18* 遺伝子を破壊して、それぞれ構築した。*TAH18* 遺伝子を *NDOR1* 遺伝子に、*DRE2* 遺伝子を *CIAPIN1* 遺伝子にそれぞれ置換した株 (NC) は、L5685 株に pRS414-CIAPIN1、pRS415-NDOR1 を導入後、ゲノム上の *TAH18* 遺伝子および

*DRE2* 遺伝子を破壊して、それぞれ構築した。タンパク質相互作用の解析に用いた CIAPIN1 過剰発現株、NDOR1 過剰発現株および CIAPIN1/NDOR1 共過剰発現株は、L5685 株に pAG414GPD-3HA-CIAPIN1 または pAG416GPD-EGFP-NDOR1、もしくはその両方を導入して、それぞれ構築した。各菌株が有する栄養要求性の相補には、pRS416 および pRS414 を用いた。pAG414GPD-TAH18、pAG414GPD-6HisTAH18、pAG414GPD-3HA-CIAPIN1 および pAG416GPD-EGFP-NDOR1 は、Tah18、N 末端に 6His タグを融合した Tah18、N 末端に 3HA タグを融合した CIAPIN1 および N 末端に EGFP タグを融合した NDOR1 をそれぞれ恒常的に発現するプラスミドであり、Gateway technology (Invitrogen 社) の BP/LR 反応を用いて構築した。pRS414-CIAPIN1 は *DRE2* 遺伝子のプロモーター、ターミネーターとともに CIAPIN1 遺伝子を、pRS415-NDOR1 は *TAH18* 遺伝子のプロモーター、ターミネーターとともに NDOR1 遺伝子をそれぞれクローニングして構築した。酵母の培養には、栄養培地の YPD (2%グルコース、1%酵母エキス、2%ポリペプトン)、最少培地の SD (2%グルコース、0.5%硫酸アンモニウム、0.16% Yeast Nitrogen Base without Amino Acids and Ammonium Sulfate) などを用いた。

#### (2) フローサイトメトリー (FCM) による細胞内 NO の定量

酵母の培養液 (OD<sub>600</sub>=1.0) を NO 特異的な蛍光プローブ Diaminofluorescein-FM diacetate (DAF-FM DA) で 15 μM, 30 分間処理し、2 mM 過酸化水素処理後、経時的に BD Accuri C6 Flow Cytometer (Becton Dickinson Bioscience 社) に供し、平均蛍光強度を測定した。

#### (3) Tah18 と相互作用するタンパク質の同定と解析

SD 培地で対数増殖期まで培養した酵母を 2 mM 過酸化水素で 30 分間処理した後、集菌・洗浄し、細胞抽出液を Buffer A : TNETG buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 2.5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 10% (v/v) glycerol, 0.5% (v/v) Triton X-100) で平衡化した Ni Sepharose 6 Fast Flow (GEヘルスケア社) と混合した。50 mM imidazole を含む Buffer A で洗浄した後、結合タンパク質を Buffer B (10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 2.5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 10% (v/v) glycerol, 0.5% (v/v) Triton X-100, 500 mM imidazole) で溶出した。溶出液を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) に供し、ゲルからペプチドを回収した後、液体クロマトグラフィー-質量分析 (LC-MS) に供してタンパク質の同定を行った。また、SD 培地で対数増殖期まで培養した酵母から抽出したタンパク質溶液を TNETG buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 2.5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 10% (v/v) glycerol, 0.5% (v/v) Triton X-100) で平衡化した 10 ml の anti-GFP magnetic beads (Medical & Biological Laboratories 社) と混合し、15 分間室温でインキュベートした。TNETG buffer で 3 回洗浄した後、SDS-PAGE sample buffer (50 mM Tris-HCl (pH 6.8), 10% (w/v) glycerol, 2% (w/v) sodium dodecyl sulfate, 0.1% bromophenol blue, 5% 2-mercaptoethanol) で溶出し、SDS-PAGE およびウェスタンブロットに供した。

#### (4) SNO 化タンパク質の探索と同定

対数増殖期まで SD 培地で培養した酵母から抽出したタンパク質溶液を NO ドナー (2 mM S-ニトロソグルタチオン (GSNO)) で 3 時間処理したものに、1.8% SDS, 0.15% *N*-methylmaleimide を加えて 50°C で 20 分間インキュベートした (ブロッキング処理)。アセトン沈殿で得たタンパク質を HENS buffer (100 mM HEPES, 1 mM EDTA, 0.1 mM Neocuproine, 2% SDS (pH 8.0)) に懸濁し、0.082 mM CuCl<sub>2</sub>, 0.41 mg/ml Biotin-HPDP, 47.9 mM アスコルビン酸を加えて、3 時間処理した。再度アセトン沈殿を行い、タンパク質を 1/10 HENS buffer (10 mM HEPES, 0.1 mM EDTA, 0.01 mM Neocuproine, 2% SDS (pH 8.0)) 250 μl に溶解し、Neutralization buffer (25 mM HEPES, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% TritonX-100 (pH 7.5)) 750 μl を加えてビオチン化サンプルとした。続いて、1/10 HENS buffer と Neutralization buffer の混合溶液 (1:5) で平衡化した Neutravidin-agarose beads 50 μl と混合し、4°C で 18 時間インキュベートした。600 mM NaCl を含む Neutralization buffer でビーズを洗浄後、DTT を含む 1/10 HEN buffer (10 mM HEPES, 0.1 mM EDTA, 0.01 mM Neocuproine (pH 8.0)) により、結合したビオチン化タンパク質を溶出し、SDS-PAGE に供した後、ゲルからペプチドを回収し、LC-MS に供してタンパク質を同定した。

#### (5) *A. fumigatus* における NO シグナルの検出

*A. fumigatus* の胞子を Czapek-Dox (CD) 培地に  $2 \times 10^6$  個/ml となるように植菌し、37°C で 24 時間振とう培養を行った。その後、DAF-FM DA (終濃度 15 mM) を添加し、20 分後に 48°C の恒温槽に移動、または過酸化水素 (終濃度 0.3%) を添加、1 時間後に水洗し、Axio observer 蛍光顕微鏡システム (Zeiss 社) で画像を取得した。RNA-sequencing 解析については、CD 培地で 37°C、24 時間振とう培養後、SNAP (終濃度 100 mg/ml) を添加し、1 時間後に菌体を回収して RNA 抽出を行った。その後、Miseq システム (Illumina 社) により RNA-sequencing を行い、CLC Genomics Workbench (CLC 社) にてデータ解析を行った。二次代謝遺伝子クラスターの発現解析については、Brilliant Ultra-Fast SYBR Green QPCR Master Mix (Roche 社) を用い、リアルタイム PCR (CFX Connect, BioRad 社) により行った。また、臨床から分離した *A. fumigatus* 株については、千葉大学真菌医学研究センターに分与していただき、各株の NO 感受性を検討した。

## 4. 研究成果

(1) NO の合成制御機構：ヘム依存的酸化酵素が NO 産生に及ぼす影響

哺乳類 NOS において、基質であるアルギニンはオキシゲナーゼドメインのヘムを含んだ活性中心において酸化され、NO が合成される (*Eur. Heart J.*, **33**, 829, 2012)。研究代表者らはこれまでに、酵母の NOS 様活性に関わる分子としてフラボタンパク質 Tah18 を同定したが (*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **430**, 137, 2013; *Nitric Oxide*, **57**, 85, 2016)、Tah18 はレダクターゼ様タンパク質であり、オキシゲナーゼドメインと相同なアミノ酸配列を有していない(図 1)。そこで、ヘム依存的な酸化酵素が NO 産生に及ぼす影響を解析した。まず、ヘム結合および酸化酵素であると報告されている酵素、または推測される酵素をコードする遺伝子をリストアップし、

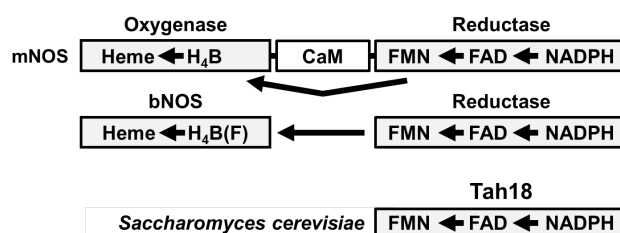


図1 哺乳類NOS、細菌NOS、酵母Tah18の構造

Yeast MATa Collection の当該遺伝子破壊株を YPD 培地で OD<sub>600</sub>=1.0 まで培養し、過酸化水素処理下での NO 産生を評価した。その結果、野生型株においては過酸化水素処理時間に伴って蛍光強度が上昇したが、ある遺伝子 (X) の破壊株では蛍光強度がほとんど上昇しなかった。続いて、その遺伝子産物の阻害剤を酵母の培養液に加え、NO 産生に及ぼす影響を解析したところ、阻害剤未処理条件下では過酸化水素処理時間に伴って蛍光強度が上昇したが、阻害剤処理条件下では、蛍光強度の上昇は完全に阻害された。以上のことから、ある種のヘム依存的酸化酵素が、NOS 活性が発現する際にオキシゲナーゼ様の機能を果たしている可能性が考えられた。

(2) NO の合成制御機構：Tah18 と相互作用するタンパク質の同定と NO 産生に及ぼす影響

Tah18 の過剰発現株 (TAH18-OE) および His タグ融合型 Tah18 の過剰発現株 (6His-TAH18-OE) を、それぞれ過酸化水素処理し、過酸化水素処理条件下で特異的に Tah18 と相互作用するタンパク質を網羅的に同定した。次に、同定したタンパク質をコードする遺伝子の破壊株を Yeast MATa Collection より選出し、過酸化水素処理条件下での NO 産生について評価した。その結果、ある遺伝子 (Y) の破壊株においては、過酸化水素に応答した NO 産生がほぼ完全に阻害された。その遺伝子産物は NADPH の代謝に関連する酵素であり、ある種の NADPH 代謝関連酵素が NOS 活性の発現に重要である可能性が考えられた。

(3) NO の合成制御機構：Tah18-Dre2 複合体による NO 合成制御機構の生物間保存性

研究代表者らはこれまでに、Tah18 依存的な NO 合成が、Tah18 と Dre2 の相互作用によって負に制御されることを報告している (*Nitric Oxide*, **57**, 85, 2016)。哺乳類は主に NOS により NO を合成しているが、Tah18 のオルソログとして NADPH 依存性ジフラビンオキシドレダクターゼ 1 (NDOR1) を、Dre2 のオルソログとしてサイトカイン誘導性アポトーシスインヒビター 1 (CIAPIN1) をそれぞれ有している (*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **110**, 7136, 2013)。そこで、NDOR1 および CIAPIN1 を酵母で発現させて、その機能を解析することで、Tah18-Dre2 複合体による NO 合成制御機構が、酵母以外の生物においても存在しているかどうかを検証した。

まず、TAH18 遺伝子を NDOR1 遺伝子に、DRE2 遺伝子を CIAPIN1 遺伝子にそれぞれ置換した株 (NC) を作製し、過酸化水素処理条件下での NO 産生を評価した。その結果、NC 株は野生型株と同様に、過酸化水素処理時間に伴って NO を産生した (Fig. 2A)。次に、この条件下での NDOR1 および CIAPIN1 の挙動を解析するため、免疫共沈降法を用いて両者の相互作用について評価した。その結果、過酸化水素処理に伴い、NDOR1 による免疫沈降画分中、および細胞抽出液中の CIAPIN1 タンパク質量が低下した (Fig. 2B)。これらのことから、NDOR1 と CIAPIN1 は過酸化水素処理に伴って解離し、また CIAPIN1 は同時に分解されることが明らかになった。この結果は、NDOR1-CIAPIN1 が Tah18-Dre2 と同様の機構で、既知の NOS とは異なる NO 合成に寄与することを示唆している。また、Tah18-Dre2 複合体に依存的な NO 合成とその制御機構が、哺乳類を含む高等生物にも保存されている可能性が示された。

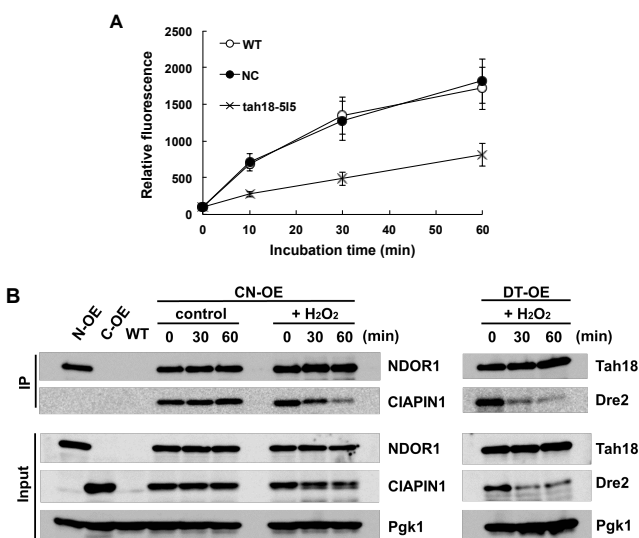


図2 酵母のNO合成におけるNDOR1とCIAPIN1の影響

(4) NOの生理的役割：NOによりS-ニトロソ化されるタンパク質の探索と同定

NOが生理機能を発現する作用機序としては、sGC/cGMP経路によるものやタンパク質のSNO化によるものがある。酵母ゲノム上にはsGCのオルソログが保存されていないことから、酵母においてはタンパク質のSNO化が特に重要であると考えられる。そこで、ビオチンスイッチ法 (*Free Radic. Biol. Med.*, **46**, 119, 2009) を用いたSNO化タンパク質のスクリーニング系を確立することを試みた。酵母抽出液を2 mM GSNOで3時間処理したものをビオチンスイッチ法に供し、抗ビオチン抗体によるウェスタンブロットを行った。その結果、GSNOの濃度依存的にビオチン化されたタンパク質が検出された (Fig. 3A)。さらに、Neutravidin-agarose beadsを用いたプルダウンアッセイにより回収したタンパク質をLC-MS解析に供し、SNO化タンパク質を同定したところ、複数のタンパク質が同定された (Fig. 3B)。同定されたタンパク質には、TCA回路や解糖系の酵素が多く含まれていたことから、SNO化修飾により炭素代謝の中央経路が制御を受ける可能性が考えられた。

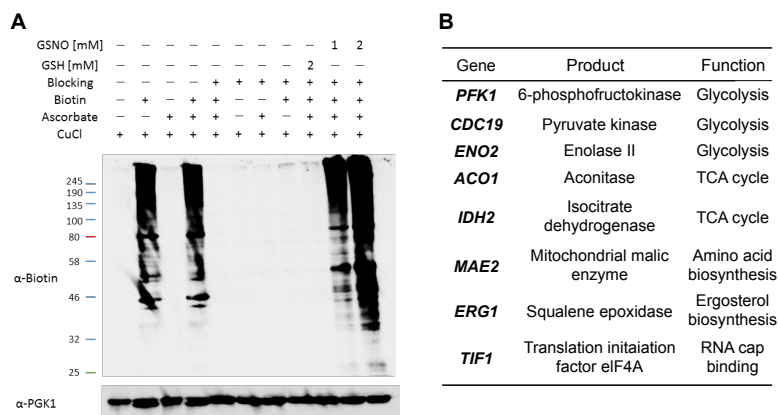


図3 酵母におけるS-ニトロソ化タンパク質の同定

(5) NOの生理的役割：正負二面性（細胞保護・細胞死）

*S. cerevisiae* では、過酸化水素処理に応答したTah18依存的な細胞死誘導が報告されている (*PLoS One*, **4**, e4376, 2009)。そこで、Tah18の発現抑制株およびTah18-Dre2融合株を高濃度(2 mM)の過酸化水素で処理したところ、いずれも野生型株と比較して顕著に細胞死の割合が低下した (*Nitric Oxide*, **57**, 85, 2016)。この結果は、高濃度の過酸化水素処理に伴いTah18依存的に合成されるNOが細胞死を誘導することを示しており、NOは細胞保護だけでなく、細胞毒性にも関与することが明らかになった (*Appl. Microbiol. Biotech.*, **100**, 9483, 2016)。これまでの研究から、酵母におけるNOの機能には哺乳類と同様に (*Physiol. Rev.*, **87**, 315, 2007)、正負二面性がある点は注目すべきである。高温に対する細胞保護 (*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **430**, 137, 2013; *PLoS One*, **9**, e113788, 2014; *FEMS Yeast Res.*, **15**, fov051, 2015) と過酸化水素処理時の細胞死誘導 (*J. Cell Sci.*, **120**, 3279, 2007; *Nitric Oxide*, **57**, 85, 2016) は一見すると矛盾しており、NOはTah18依存的に合成されるが、相反する機能(細胞保護, 細胞死)を有している。

(6) 病原真菌におけるNOの合成機構と生理的役割

酵母 *S. cerevisiae* (S288C株) に加え、*Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. auris* 株についてNO寛容性やNO産生量の解析を行った。その結果、過酸化水素処理に伴うNO産生は、*S. cerevisiae* では誘導が、*C. albicans* では抑制が、*C. krusei* および *C. tropicalis* では促進がそれぞれ見られたことから、*Candida* 属酵母ではNOの多様な産生誘導経路の存在が示唆された。また、NOに高い感受性を示す *Candida* 属酵母も存在していた。

*Aspergillus fumigatus* においては、ストレスがNO産生を誘導するか検討した。その結果、高温または過酸化水素処理によって、DAF-FM DA由来の蛍光シグナルが検出され、菌糸内でNOが発生することが示された (Fig. 4)。糸状菌のNO産生機構は不明であるため、*S. cerevisiae* のTah18のオルソログの関与について検討した。Tah18のアミノ酸配列をもとに、AfTah18 (Afu5g07290) をオルソログ候補として見出し、遺伝子の破壊株を試みたが、AfTah18の遺伝子破壊株は得られなかった。また、NOに対する *A. fumigatus* の応答を解析するため、NOドナーの *S*-nitroso-*N*-acetylpenicillamine (SNAP) を添加1時間後に菌体からRNAを抽出し、RNA-sequencing解析を行った。その結果、*has* および *fsq* の二次代謝遺伝子クラスターの発現が誘導されることが明らかになった。また、臨床から分離した *A. fumigatus* 株 (16株) に、NOドナーを処理したところ、超感受性を示す1株を見出した (*Med. Mycol. J.*, **59**, E63, 2018)。

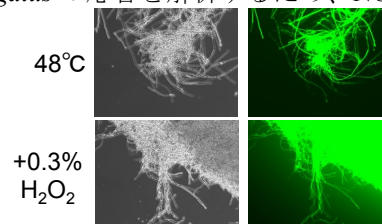


図4 ストレス条件下の *A. fumigatus* におけるNO産生

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計8件)

1. 那須野 亮, 吉川雄樹, 高木博史: 酵母における一酸化窒素シグナルを介したストレス応答機構. *生化学*, **90**, 701-705, 2018. 査読無

2. Rika Indri Astuti, Ryo Nasuno, Hiroshi Takagi: Nitric oxide signaling in yeast. *Advances in Microbial Physiology*, **72**, 29-63, 2018. DOI: 10.1016/bs.ampbs.2018.01.003. 査読有
3. Daisuke Hagiwara, Hiroki Takahashi, Hiroshi Takagi, Akira Watanabe, Katsuhiko Kamei: Heterogeneity in pathogenicity-related properties and stress tolerance in *Aspergillus fumigatus* clinical isolates. *Medical Mycology Journal*, **59**, E63-E70, 2018. DOI:10.3314/mmj.18-00007. 査読有
4. 那須野 亮, 吉川雄樹, 高木博史: 酵母に見出した一酸化窒素 (NO) の合成制御機構と生理機能. *化学と生物*, **55**, 617-623, 2017. 査読無
5. 高木博史: 酵母における一酸化窒素の分子機能と応用. *バイオサイエンスとインダストリー*, **75**, 214-218, 2017. 査読無
6. Rika Indri Astuti, Ryo Nasuno, Hiroshi Takagi: Nitric oxide signaling in yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **100**, 9483-9497, 2016. DOI:10.1007/s00253-016-7827-7. 査読有
7. Yuki Yoshikawa, Ryo Nasuno, Nobuhiro Kawahara, Akira Nishimura, Daisuke Watanabe, Hiroshi Takagi: Regulatory mechanism of the flavoprotein Tah18-dependent nitric oxide synthesis and cell death in yeast. *Nitric Oxide*, **57**, 85-91, 2016. DOI: 10.1016/j.niox.2016.04.003. 査読有
8. Rika Indri Astuti, Daisuke Watanabe, Hiroshi Takagi: Nitric oxide signaling and its role in oxidative stress response in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nitric Oxide*, **52**, 29-40, 2016. DOI:10.1016/j.niox.2015.11.001. 査読有

〔学会発表〕 (計 46 件)

1. 高木博史: 酵母に見出した「両刃の剣」一酸化窒素の合成機構と生理機能. 日本農芸化学会 2019 年度大会シンポジウム「微生物・植物における一酸化窒素研究の新展開：生成機構と生理機能への理解から応用まで」, 2019.
2. 吉川雄樹, 那須野 亮, 高木博史: 酵母における一酸化窒素合成に必要な NADPH の解析. 日本農芸化学会 2019 年度大会, 2019.
3. 示野誠也, 吉岡奈津子, 吉川雄樹, 那須野 亮, 高木博史: 酵母 *Saccharomyces cerevisiae* における S-ニトロソ化修飾を介した一酸化窒素の生理的役割. 日本農芸化学会 2019 年度大会, 2019.
4. 萩原大祐, 二宮章洋, 浦山俊一, 高木博史: RNA-sequencing による糸状菌の一酸化窒素応答の解析. 第 18 回糸状菌分子生物学コンファレンス, 2018.
5. Supapit Eknikom, Ryo Nasuno, Hiroshi Takagi: Identification and functional analysis of nitrated proteins in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. The 34<sup>th</sup> International Specialized Symposium on Yeasts (ISSY34), 2018.
6. 高木博史: 酵母に見出したアミノ酸の新しい代謝調節機構と生理的役割. 第 91 回日本生化学会大会シンポジウム「生命活動をつかさどる酵素・代謝機能の解明」, 2018.
7. Yuki Yoshikawa, Ryo Nasuno, Hiroshi Takagi: Regulatory mechanism of the flavoprotein Tah18-dependent nitric oxide synthesis and cell death in yeast. The 13<sup>th</sup> International Meeting on Yeast Apoptosis, 2018.
8. Hiroshi Takagi: Novel stress tolerant mechanisms of yeast and their application to biotechnology. The 6<sup>th</sup> International Conference on Biochemistry and Molecular Biology (BMB 2018), 2018.
9. 高木博史: 酵母に見出した「両刃の剣」一酸化窒素の合成機構と生理的役割. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) ワークショップ「多様な微生物に見出したユニークな細胞・酵素機能とその応用」, 2017.
10. Hiroshi Takagi: Nitric oxide in yeast: a double-edged sword "cell protection vs. cell death". The 12<sup>th</sup> International Meeting on Yeast Apoptosis, 2017.
11. Hiroshi Takagi: Synthetic Mechanism and Physiological Role of Nitric Oxide in Yeast. Gordon Research Conference "Nitric Oxide", 2017.
12. Hiroshi Takagi: Novel stress-tolerant mechanisms of yeast mediated by proline-arginine metabolism and their applications to industrial yeasts. The 3rd International Seminar on Science, 2016.
13. Hiroshi Takagi: Synthetic mechanism and physiological role of nitric oxide in yeast. The 9<sup>th</sup> International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide. 2016.
14. Ryo Nasuno, Miho Aitoku, Yuki Manago, Akira Nishimura, Yu Sasano, Hiroshi Takagi: Nitric oxide-mediated antioxidative mechanism in yeast: the transcription factor Macl-dependent activation of the superoxide dismutase Sod1. The 9<sup>th</sup> International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide. 2016.
15. Yuki Yoshikawa, Ryo Nasuno, Hiroshi Takagi: Regulatory mechanism of the flavoprotein Tah18-dependent nitric oxide synthesis and cell death in yeast. The 9<sup>th</sup> International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide. 2016.

※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。

様式 C-19 (別紙) 基盤研究 (A) 課題番号: 16H02601 高木 博史

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 渡辺 大輔

ローマ字氏名: WATANABE, Daisuke

所属研究機関名: 奈良先端科学技術大学院大学

部局名: 先端科学技術研究科

職名: 助教

研究者番号: 30527148

研究分担者名: 那須野 亮

ローマ字氏名: NASUNO, Ryo

所属研究機関名: 奈良先端科学技術大学院大学

部局名: 先端科学技術研究科

職名: 助教

研究者番号: 90708116

研究分担者名: 川本 進

ローマ字氏名: KAWAMOTO, Susumu

所属研究機関名: 千葉大学

部局名: 真菌医学研究センター

職名: 客員教授

研究者番号: 80125921

研究分担者名: 知花 博治

ローマ字氏名: CHIBANA, Hiroji

所属研究機関名: 千葉大学

部局名: 真菌医学研究センター

職名: 准教授

研究者番号: 30333488

研究分担者名: 萩原 大祐

ローマ字氏名: HAGIWARA, Daisuke

所属研究機関名: 筑波大学

部局名: 生命環境系

職名: 准教授

研究者番号: 20612203