

糸状菌のユニークな代謝系を支える新規酵素の発見と多様な代謝を制御する細胞内レドックス恒常性維持機構の解明



名城大学農学部応用生物化学科 助教 志水元亨

はじめに

糸状菌は古くから我が国の発酵・醸造、酵素や抗生物質の生産にとって重要であり、産業上の重要性はますます高まっている。特に、糸状菌は酵素の宝庫といわれ、すでにアミラーゼをはじめ様々な酵素が産業利用されている。今後、さらに多岐にわたる分野で利用可能な糸状菌由来の新規酵素が発見される可能性を秘めている。また、発酵・醸造や酵素・物質生産など糸状菌を培養する過程では、糸状菌がしばしば高密度培養され酸素不足に陥り、低酸素状態（細胞内 NAD^+/NADH の比率が低下する環境）に曝される。一方、病原性糸状菌の感染時には、宿主が生成する活性酸素種により攻撃されることも知られている。従って、糸状菌の生育環境に応答したレドックス恒常性維持機構が理解できれば、実用上重要な糸状菌の生育制御技術の可能性が見出され多方面の応用技術開発に役立つ。

本研究では、ポストゲノム解析技術を基盤として、糸状菌のユニークな代謝系を支える新規酵素を多数発見し、さらに糸状菌の多様な代謝を制御する細胞内レドックス恒常性維持機構について解明した。以下にその概要を紹介する。

1. 新規GH 134 ファミリーに属する β -マンナーゼ Man134A の発見

β -マンナン(グルコマンナンおよびガラクトマンナン)は針葉樹、グアガムやコーヒー豆などの様々な植物に含まれる多糖で自然界に多く存在するバイオマスの1つであることから、様々な産業分野での利用が期待されている。筆者は、 β -マンナンを唯一の炭素源として、麹菌と近縁の糸状菌である *Aspergillus nidulans* を生育させた際に、Glycoside Hydrolase 5 (GH5) ファミリーに属するよく知られた産業利用されているマンナン分解酵素(β -マンナーゼ:40-50 kDa, アミノ酸配列から既知の β -マンナーゼはGH5, GH26およびGH113に分類されている)と同様に細胞外に多量に分泌される低分子量(18 kDa)の機能未知タンパク質(HP)を同定した(図1A)。このタンパク質は、既知の β -マンナーゼを含む機能が分かっているいずれのタンパク質とも全く相同性を有しておらず、推定される機能ドメインすら含んでいなかった。筆者らは、精製したHPを用いた解析から、このタンパク質が新規の β -マンナーゼ(Man134A)であることを生化学的に明らかにし、新しいGH134 ファミリーを創設した。 β -マンナンを基質にした場合、Man134Aは反応産物としてマンノピオース(M_2)、マンノトリオース(M_3)、マンノテトラオース(M_4)を生成し、 M_3 が主要な反応産物であった。また、鎖長2(M_2)~鎖長6(M_6)のマンノオリゴ糖を基質にした場合、*A. nidulans*のGH5に属するMan5Cと比べて、 M_6 に対するMan134Aの k_{cat}/K_m 値は20倍高かった。さらに、 $\Delta man134A$ 株を作製し、 β -マンナンを唯一の炭素源とした培地で生育させたところ、野生株(WT)と比較して生育が抑制されたことから、Man134Aは β -マンナン

の資化に関与していることが明らかになった(図1B)。

以上、既知の β -マンナーゼと比べてMan134Aは、ユニークな酵素学的性質を持つことおよび β -マンナンの資化に重要であることが明らかになった。

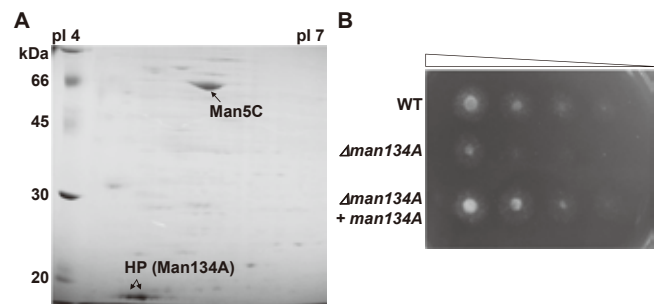


図1 新規 β -マンナーゼ Man134A の発見とその役割。(A) 細胞外タンパク質の二次元電気泳動図、(B) グルコマンナンのみを炭素源にした培地におけるWTと $\Delta man134A$ 株の生育。

2. 糸状菌の多様な代謝系を制御する新規細胞内レドックス恒常性維持機構の発見

レドックス恒常性の破綻はエネルギー活動の停止を引き起こす。そのため、細胞内レドックスは厳密に制御されている。糸状菌において、発酵をはじめとする多様な代謝を行う上で、レドックス制御は極めて重要である。糸状菌の二次代謝、アミノ酸生成、アルコール発酵など有用物質の生合成に関与する酵素、遺伝子について数多くの研究が行われてきたが、それらの代謝経路には、 NAD(P)(H) などの補酵素を必要とする酸化還元反応が多数存在することが分かっている。筆者らは、糸状菌が多様な生物機能を支える代謝系を活性化させる際に、それらの代謝反応に必要な NAD(P)(H) 産生系(NAD(P)(H) の産生を伴う反応系)を同時に制御することによって、ユニークな代謝系の効率を高めていることを明らかにした(図2)。

2-1. 新規Nudix hydrolase (NdxA) による細胞内レドックス調節に依存したサーチュイン(SirA)による二次代謝物の生産制御

細胞内における NAD^+ と NADH の総量は、*de novo*での生合成とサルベージ経路でコントロールされていると考えられているが、 NAD(H) の分解による調節機構についてはほとんど分かっていない。筆者らは、*A. nidulans*において、真核生物に広く保存されており、トランスクリプトーム解析から定常期に発現が誘導されていた NAD(H) を加水分解する新規Nudix hydrolaseであるNdxAを見出し、その生理的役割について明らかにした。 $\Delta ndxA$ 株では、定常期に NAD^+ を蓄積していたことから、NdxAは NAD^+/NADH のホメオスタシスに関わっていることが示唆された(図2)。また、

$\Delta ndxA$ 株では、二次代謝物 (SM) であるステリグマトシスチンやペニシリンGの生成量およびそれらの生合成に関わる遺伝子の発現量が減少した。さらに、 NAD^+ 依存的にヒストンH4の16番目のリシン残基の脱アセチル化を行うことで遺伝子の発現を抑制する、糸状菌の新規サーチュインであるSirAを発見した。 $\Delta sirA$ 株では、SMの生成量が増加した。 $\Delta ndxA$ 株ではSMの生成量が減少したが、 $\Delta sirA \Delta ndxA$ 株では増加したことから、NdxAによるSM生合成の制御は、SirAを介することが示された (図2)。本研究から、真核生物に広く保存されておりNAD (H) を加水分解するNdxAは、定常期における NAD^+/NADH のバランスを調節することで、 NAD^+ を用いてヒストンの脱アセチル化を制御するSirAの働きをコントロールする新規エピジェネティック制御因子であることが明らかになった (図2)。

2-2. 低酸素条件下で活性化する分岐鎖アミノ酸発酵による NAD(P)^+ 再生機構

プロテオーム解析から、低酸素条件下において*A. nidulans*は分岐鎖アミノ酸およびグルタミン酸の生合成を活性化させていることを見出した。そこで、培地中の代謝物を分析したところ、低酸素条件下において、エタノール、乳酸および分岐鎖アミノ酸 (BCAA)、グルタミン酸を含む種々のアミノ酸が蓄積していた。さらに、生化学および分子生物学的に検討した結果、分岐鎖アミノ酸の生合成はグルタミン酸をアミノ供与体として用いるため、分岐鎖アミノ酸の生合成とグルタミン酸の供給が協調して機能し、2つの反応 (経路) を効率よく行なうことで、低酸素条件下にて蓄積した NAD(P)H を NAD(P)^+ へと再酸化 (分岐鎖アミノ酸発酵) し、生成した NAD(P)^+ を解糖や発酵に利用していることを明らかにした (図2)。これは、糸状菌の低酸素条件への適応戦略として生理学的に重要な発見となった。

2-3. 酸化ストレス耐性化に関与する新規酵素の発見

糸状菌の酸化ストレス応答は、農学だけでなく医学分野でも関心が高い。筆者らは、ポストゲノム解析を利用して、糸状菌のみに見いだされる酸化ストレスの耐性化に関わる新規グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) を発見した (図2)。さらに、新

規なペプチドであるNO-inducible nitrosothionein (iNT) とチオレドキシシン (Trx) レダクターゼが協調して一酸化窒素 (NO) を無毒化することを明らかにした (図2)。iNT様ペプチドは生物界に広く分布することから、iNTによるNO耐性化は普遍的なものであると考えている。

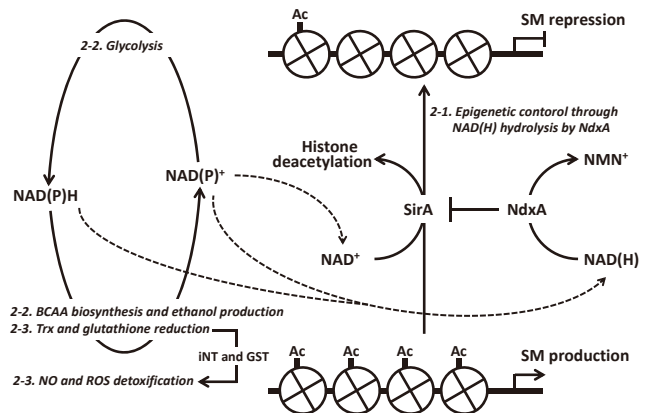


図2 糸状菌の多様な代謝系を制御する新規細胞内レドックス恒常性維持機構。

謝辞 本研究は、名城大学農学部応用生物化学科応用微生物学研究室ならびに筑波大学生命環境科学研究科負荷適応微生物学研究室において行われたものです。ポストドク時代に最先端の糸状菌研究を行う機会を与えていただき、終始ご指導ご鞭撻を賜りました筑波大学教授・高谷直樹先生に深甚なる感謝の意を表します。また、研究遂行において多大なるご助言とご支援を賜りました名城大学教授・加藤雅士先生、名古屋大学教授・小林哲夫先生に心より感謝申し上げます。大学院時代にポストゲノムおよび酵素研究の基礎を厳しくご指導くださった九州大学教授・割石博之先生に深く感謝申し上げます。本研究の成果は、研究室の卒業生・在学生および共同研究者すべての皆様のご協力、ご支援によるものであり、ここに深く感謝申し上げます。最後に、本奨励賞にご推薦くださいました日本農芸化学会中部支部長・堀尾文彦先生ならびにご支援くださいました諸先生方に厚く御礼申し上げます。