

## 糸状菌の低酸素応答・適応機構の解明

高谷 直樹（筑波大学大学院生命環境科学研究科）

ntakaya@sakura.cc.tsukuba.ac.jp

糸状菌（カビ）は醸造・発酵産業や酵素・抗生物質の供給源として利用される。また、カビには植物病原菌や穀類などの汚染を引き起こすものも数多く知られており、その農学上の重要性は高い。本研究は、カビが低酸素条件下で行う新たな呼吸・発酵系を発見・解析し、カビが多様な嫌氣的エネルギー獲得機構を使い分けることによって低酸素下で生き残ることを示したものであり、カビ関連産業の基盤技術として役立つと期待される。

### はじめに

カビは、我が国の発酵・醸造産業に古くから利用されているとともに、酵素製剤・抗生物質などの供給源としても利用される。さらに、植物病原菌や日和見感染菌にも多くのカビが知られることから、カビは農学の研究対象として最も重要な微生物の一つであるといえる。こうした背景から、カビに関連した研究は数多いが、それらの多くは上のような研究分野に限られたものが多いように感じる。特に、生命が生きていく上で必須な一次代謝（エネルギー代謝）に関わるものは、一部のカビで呼吸や有機酸発酵などが研究されているものの、数が少ない。これはどうしてだろうか？一般的な教科書には、「（カビを含む）真核生物はミトコンドリアなどのオルガネラをもつ」、「ミトコンドリアは酸素呼吸の場であり真核生物はそれにより大きなエネルギーを得る」とある。うっかりすると、これらを「ミトコンドリアで酸素呼吸するのが真核生物の特徴である」と解釈してしまいそうになる。ヒトも酸素呼吸せずに生活することはできない。このため、多くの人が真核生物は酸素呼吸に依存して生育する絶対好気性生物だと思い込んできたのかもしれない。しかし、これは間違いである。近年、ミトコンドリアをもたない真核生物や酸素呼吸以外の呼吸を行い生き延びてきた真核生物が報告されてきたからである。本発表では、硝酸呼吸やアンモニア発酵といったカビが低酸素状態に曝されたときに発現する嫌氣的エネルギー生産機構についての筆者らによる研究成果を紹介する。これらの代謝系も酸素に依存しないエネルギー代謝であり、真核生物が低酸素条件にどのように応答し、どのようなエネルギー生産系を利用して適応するかを考える上で重要である。

### カビの脱窒・硝酸呼吸

そもそも本研究は、1991年に祥雲博士ら（東京大学）によって、カビ *Fusarium oxysporum* があたかも通性嫌気性脱窒細菌のように、低酸素条件下で硝酸塩を還元し亜酸化窒素を生成（脱窒反応）することが報告され、後に、その反応が細菌のそれと同様に嫌氣的なエネルギー獲得機構（硝酸呼吸）としての生理的意義をもつことが見出されたことに端を発する<sup>1)</sup>。ほとんどの真核生物は酸素呼吸に依存して生育するのに対して、その報告によれば、カビがミトコンドリアで酸素呼吸以外の嫌気呼吸（硝酸呼吸）をするというのである。私は、その後、この興味深い現象の詳細な解析に取り組む機会を頂き、カビのミトコンドリアの呼吸系に関するいくつかの考察を得ることができた。

*F. oxysporum* の硝酸呼吸系は脱窒細菌のそれと類似しており、硝酸を順次還元し亜酸化窒素を生成する（図1）。これらの反応を触媒する酵素のうち、硝酸還元酵素（Nar）と亜硝酸還元酵素はミトコンドリアの呼吸鎖電子伝達系と共役した嫌気呼吸を担うことが生化学的解析によって示されている（図1）<sup>1,2)</sup>。亜酸化窒素を生成する一酸化窒素（NO）還元酵素（Nor）には2種のアイソザイムがあることが知られていたが、

本酵素のN末端とβ-galactosidaseの融合蛋白質をカビに導入し解析した結果、これらが同一の遺伝子から翻訳され、翻訳開始点の違いによりそれぞれミトコンドリアあるいは細胞質に局在化することを明らかとした<sup>3)</sup>。また、Nor遺伝子の遺伝子破壊株を作製し、Norが脱窒に必須であることを示した<sup>4)</sup>。Nor遺伝子の発現は低酸素条件下で硝酸塩の存在下に誘導されるが、これに関わるNor遺伝子プロモーター上のシス領域をレポーター解析により同定した。即ち、Nor遺伝子の転写は、カビでよく知られる硝酸による転写の正の制御因子 NirA および *Saccharomyces cerevisiae* で知られる酸素による負の制御因子 Rox1 の結合コンセンサス配列を通して転写レベルで制御されることを明らかとした<sup>5)</sup>。 *F. oxysporum* は、転写・翻訳制御を巧みに利用して硝酸呼吸しているのである。

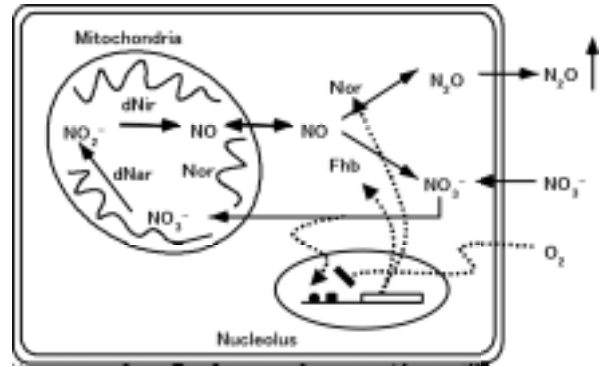


図1 明らかとなったカビ脱窒系

Nar、硝酸塩還元酵素；Nir、亜硝酸塩還元酵素；Nor、NO還元酵素；N<sub>2</sub>O<sub>r</sub>、亜酸化窒素還元酵素；NOD、flavo-hemoglobin (NO ジオキシゲナーゼ)。点線は遺伝子発現調節を示す。

通常の脱窒細菌の Nor とは異なり、カビの Nor は可溶性のシトクロム P450<sub>nor</sub> であり呼吸鎖とはリンクせず NADH により還元される<sup>6,7)</sup>ことから、直接 ATP 生産に寄与しているとは考えにくい。また、Nor 遺伝子破壊株は亜酸化窒素を生産せずに NO を蓄積する以外には目立った表現型を示さなかったことから、Nor の生理的な役割については非常に興味深かった。一方、*F. oxysporum* が硝酸呼吸に際して、Nor とともにある種のヘム蛋白質を大量に誘導合成することを見出しこれを単離したところ、flavo-hemoglobin (fhb) であることが判明した<sup>8)</sup>。fhb および Nor 遺伝子の変異株を作製し詳細に解析したところ、両者を欠損した変異株は硝酸呼吸条件下で NO を蓄積し、ミトコンドリアの形態異常、呼吸活性の低下、NO による鉄硫黄クラスターの破壊が起きていた。NO は広範な生物で様々な生理作用を示す調節因子として注目されているが、同時に、活性窒素ラジカル的一种であり細胞にとっては非常に危険な分子である。fhb と Nor の主な役割は硝酸呼吸に伴って生じる NO の解毒であると考えている(図1)。通常の好気性生物は酸素呼吸の副産物として生じる活性酸素種の消去系を持つが、カビの硝酸呼吸(脱窒)においても副産物として生じる活性ラジカル種を消去する系を持つという共通性は、呼吸系の進化を考える上でも興味深い。

近年、fhb は広範囲の微生物に分布し NO ジオキシゲナーゼとして NO の解毒に寄与することが報告され、本研究の知見と一致する。これに対して、カビを含むゲノム解析の結果を参照すると Nor はカビのみに見出される。おそらく、カビは進化の過程で Nor を獲得することによって、硝酸呼吸条件に適応したと考えている。

### カビのアンモニア発酵

これらの研究の過程で、*F. oxysporum* が硝酸呼吸条件よりももっと極端な嫌気条件に曝された場合は硝酸呼吸せず硝酸をアンモニアに変換し生育することを見出した<sup>9)</sup>。この反応は、細胞質での NADH の酸化と ATP 生成とを伴うことから、発酵(アンモニア発酵)としての生理的意義をもつことを明らかとした。さらに、*Aspergillus nidulans* をモデルとして各種変異株を解析し、アンモニア発酵に必要な遺伝子の多くを同定した(図2)<sup>10)</sup>。その結果、アンモニア発酵における硝酸のアンモニアへの還元反応は、硝酸の同化に必須である硝酸還元酵素(NiaD)と亜硝酸還元酵素(NiiA)の働きによって触媒されることが明らかとなった。これは、カビが硝酸の同化と異化(アンモニア発酵)のメカニズムを共有していることを意味

する。これとは別に、カビ *Cylindrocarpum tonkinense* が、嫌気条件下で同化型硝酸還元酵素と類似の反応によって硝酸を異化的に還元することも見出した。さらに、カビが強い硝酸同化能を持つことは古くから有名な話である。カビとは硝酸に対して非常に貪欲な生き物である。

この代謝系の鍵酵素の一つは基質レベルのリン酸化により ATP を作る acetate kinase (ACK) である (図 2)。 *A. nidulans* は、生物界に広く分布する acetyl CoA synthetase (ACS) の逆反応によりこの反応を触媒することを明らかとした。さらに、ACK と ACS の反応の方向性はリシン残基のアセチル化によって酵素レベルで制御されることがわかった。即ち、嫌気的なアンモニア発酵条件下では ACS はアセチル化され通常とは反対方向の ACK 活性を触媒する酵素となるのである。これは、翻訳後修飾により可逆酵素の反応の方向性が制御される例として興味深い。

カビの硝酸同化系酵素遺伝子の発現はアンモニアなどの利用されやすい窒素源によって転写レベルで抑制される (アンモニウム抑制)。これに対して、アンモニア発酵はアンモニアによって抑制されない。 *A. nidulans* の *NiaD* 遺伝子 (*niaD*) プロモーターのレポーター解析から、嫌気条件下では *niaD* の発現がアンモニウム抑制をうけないことを見出した<sup>11)</sup>。この詳細な機構は現在解析中であるが、この機構は、自らが生成するアンモニアによってアンモニア発酵系の酵素の発現が抑制されないために重要である。

興味深いことに、 *F. oxysporum* の硝酸呼吸は微量な通気条件下で誘導されるのに対して、アンモニア発酵はもっと強い嫌気条件下で発現する。また、嫌気条件下でグルコースが存在するとアルコール発酵を行いアンモニア発酵しない。アルコール発酵の産物であるエタノールはアンモニア発酵のよい電子供与体となることから、アンモニア発酵はアルコール発酵を引き継ぐ二次発酵としての意味を持つといえる。カビは環境中の酸素濃度や利用できる増殖基質に応答して様々な嫌気代謝を使い分け生き残るたくましい生物である。

## おわりに

以上、カビは硝酸呼吸を初めとする多様な嫌気的エネルギー代謝系を利用して、低酸素という過酷な環境に適応し生き残ることが明らかとなった。時には、カビはどこにでもしつこく生えてくる厄介者であるが、そのたくましさの一つの理由はこの多様なエネルギー代謝なのかもしれない。また、本研究により得られた知見は、呼吸系の進化、窒素の同化と異化の関係などの新たな問題を提起する興味深いものだと考えている。一方、これまでに広範なカビが嫌気的な硝酸の還元能をもつことを見出している。これは、地球規模での窒素サイクルを考える際に細菌だけでなくカビを考慮することを促すものとして興味深いものかもしれない。

産業上重要なカビはその機能を発揮する際に、常に低酸素ストレスに曝されている。例えば、有用物質・酵素生産のためにカビを高密度培養する際にカビが通気不足に陥ることは生産の効率化にとって大きな問題であるし、我が国の醸造産業の伝統である麹づくりの際の通気作業 (手入れ) は未だに経験に頼らざるを得ない。また、カビは動植物の体内といった低酸素環境にも生息し病徴を引き起こしている。したがっ

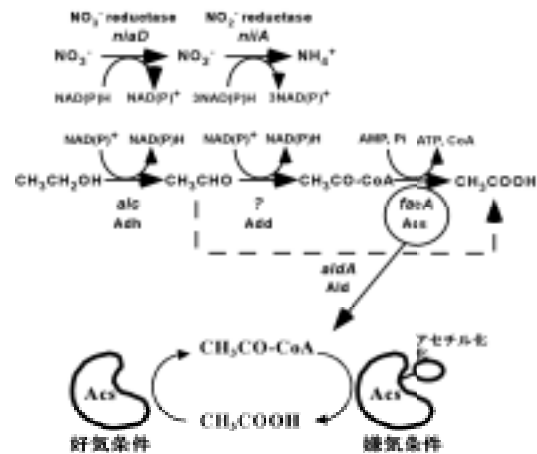
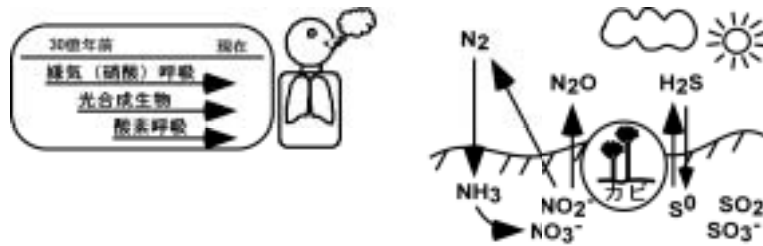


図 2 *A. nidulans* のアンモニア発酵に関する遺伝子と ACS の活性制御

て、従来から知られる好気的な代謝に加えて、カビの低酸素条件下でのエネルギー獲得機構を理解することによって、これまで解決困難であった上述の農学上の課題を解決するための基盤技術とならないだろうか。

・呼吸系の進化

・地球の物質循環



## 謝辞

本研究に会うチャンスを与えて頂き、終始ご指導ご激励を賜りました東京大学大学院農学生命科学研究科教授・祥雲弘文先生に心より感謝致します。共同研究させていただいた千葉大学真菌医学研究センター助教授・山口正視先生に厚くお礼申し上げます。本研究は、筑波大学応用生物化学系応用酵素学研究室・同大学院生命環境科学研究科生命共存科学専攻負荷適応分子生物学研究室で行われたものであります。本研究に取り組んでくれた学生・大学院生の皆様には心より感謝いたします。また、ご指導いただいた関連学会・研究会の諸先生方、本賞にご推薦下さいました筑波大学生物資源学類長・金井幸雄先生に厚くお礼申し上げます。

## 引用文献

1. 高谷直樹, 祥雲弘文 (2005) 低酸素環境下でのカビの呼吸と発酵、バイオサイエンスとインダストリー、**63**, 233-236
2. Takaya, N., Kuwazaki, S., Adachi, Y., Suzuki, S., Kikuchi, T., Nakamura, H., Shiro, Y., and Shoun, H. (2003) Hybrid respiration in the denitrifying mitochondria of *Fusarium oxysporum*. *J. Biochem. (Tokyo)* **133**, 461-465
3. Takaya, N., Suzuki, S., Kuwazaki, S., Shoun, H., Maruo, F., Yamaguchi, M., and Takeo, K. (1999) Cytochrome P450nor, a novel class of mitochondrial cytochrome P450 involved in nitrate respiration in the fungus *Fusarium oxysporum*. *Arch. Biochem. Biophys.* **372**, 340-346
4. Takaya, N., and Shoun, H. (2000) Nitric oxide reduction, the last step of the fungal denitrification by *Fusarium oxysporum*, is obligatorily mediated by cytochrome P450nor. *Mol. Gen. Genet.* **263**, 342-348
5. Takaya, N., Uchimura, H., Lai, Y., Shoun, H. (2002) Transcriptional control of nitric oxide reductase gene (*CYP55*) in the fungal denitrifier *Fusarium oxysporum*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **66**, 1039-1045
6. Kudo, T., Takaya, N., Park, S.-Y., Shiro, Y., and Shoun, H. (2001) A positively charged cluster formed in the heme-distal pocket of cytochrome P450nor is essential for the interaction with NADH. *J. Biol. Chem.* **276**, 5020-5026
7. Zhang, L., Kudo, T., Takaya, N., and Shoun, H. (2002) The B'-helix determines specificity of cytochrome P450nor with the electron donors NADH and NADPH. *J. Biol. Chem.* **277**, 33842-33847
8. Takaya, N., Suzuki, S., Matsuo, M., and Shoun, H. (1997) Purification and characterization of a flavohemoglobin from the denitrifying fungus *Fusarium oxysporum*. *FEBS Letters*, **414**, 545-548
9. Zhou, Z., Takaya, N., Nakamura, A., Yamaguchi, M., Takeo, K., and Shoun, H. (2002) Ammonia fermentation, a novel anoxic metabolism of nitrate by fungi. *J. Biol. Chem.* **277**, 1892-1896
10. Takasaki, K., Shoun, H., Yamaguchi, M., Takeo, K., Nakamura, A., Hoshino, T., and Takaya, N. (2004) Fungal ammonia fermentation-A novel metabolic mechanism that couples the dissimilatory and assimilatory pathways of both nitrate and ethanol. *J. Biol. Chem.* **279**, 12414-12420
11. Takasaki, K., Shoun, H., Nakamura, A., Hoshino, T., and Takaya, N. (2004) Unusual transcription regulation of the *niaD* gene under anaerobic conditions supporting fungal ammonia fermentation *Biosci. Biotech. Biochem.* **68**, 978-980

## Fungal Adaptation to Anaerobic Environment

Naoki Takaya (Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba)  
ntakaya@sakura.cc.tsukuba.ac.jp