

糸状菌由来新規ステロールアミノ酸誘導体の生理機能の解明

久城 哲夫

明治大学農学部

研究の目的

真核生物は、細胞膜の構成成分としてステロール類を有しており、これらは生存に必須の化合物である。真菌類はエルゴステロールを有し、動物におけるコレステロールに機能的に相当し、膜の流動性や浸透圧調整、膜タンパク質の機能調整など様々な生理作用を有する。エルゴステロールは動植物には存在しないため、エルゴステロールの生合成を標的とした抗真菌剤が多数開発

されている。エルゴステロールの誘導体はこれまでにいくつか知られており、脂肪酸エステル化体やアセチル化体、グルコシド体などが見出されているが、これら誘導体の生理機能が明らかになった例は少ない。申請者は糸状菌において、エルゴステロールの 3 位水酸基にアミノ酸がエステル結合したステロールアミノ酸誘導体 (Erg-aa) を新規に発見した¹⁾。Erg-aa はこれまでにいずれの生物からも見出されていない新規化合物であった。Erg-aa の合成酵素は、アミノアシル tRNA 合成酵素に付随する機能未知ドメインとして発見された。糸状菌アスパルチル tRNA 合成酵素 (AspRS) に付随する DUF2156 ドメインは、1-ergosteryl-L-aspartate (Erg-Asp) を生合成し、この酵素を ErdS と命名した (図 1)¹⁾。さらに、DUF2156 ドメイン単独からなる酵素も見出し (ErgS)、1-ergosteryl glycine (Erg-Gly) を生合成していることが明らかとなった²⁾。ErdS は真菌の 70% 以上を占める Dikarya 亜界 (子囊菌門と担子菌門) に幅広く保存されていたことから、糸状菌において重要な生理機能を担っていることが考えられた。これまでに、麹菌 *Aspergillus oryzae* において *erdS* 破壊株と *ergS* 破壊株を野生株と比較したところ、無性孢子である分生子が 20~50% まで減少し、糸状菌の防御組織である菌核が培地表面を覆い尽くすほどに形成されることが観察された。コムギ赤カビ病菌 *Fusarium graminearum* の *erdS* 破壊株においても同様に分生子の減少が確認されたことから、Erg-aa は糸状菌の生殖や菌核形成に関与する可能性が示唆された。本研究では、Erg-aa と分生子・菌核形成などの生理現象との関連性や Erg-aa の作用する分子経路の解明を目的とした。

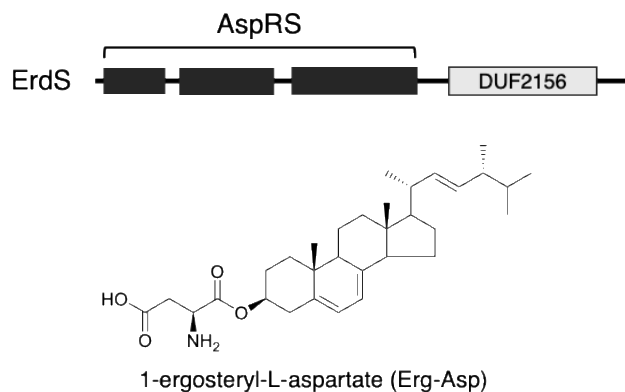


図 1 糸状菌より発見された Erg-Asp および Erg-Asp 合成酵素である ErdS のドメイン構造

方法

A. oryzae の野生株 (HiMe10 株)、*erdS* 破壊株および *ergS* 破壊株を最小寒天培地 (Czapek-Dox (CD) 培地) で 3~5 日間培養し、RT-qPCR によって分生子・菌核形成関連遺伝子の発現量を定量解析した。また、活性酸素種 (ROS) との関係調べるため、CD 培地に硫酸銅(II)を 1.6 μ M 添加した培地、さらに抗酸化物質であるグルタチオン (15 mM) や DMSO (5%)、タイロン (100 μ M)、ブチルヒドロキシアニソール (BHA) (100 μ M) をそれぞれ含む培地で 5 日間培養した。

さらに、Erg-Asp が病原性に関与しているのかを明らかにするべく、*F. graminearum* の野生株および *erdS* 破壊株を発芽 3 日目のコムギ子葉鞘の先端へ感染させ、7 日間培養後に病変部位の大きさを測定した。

また、Erg-Asp と有性生殖の関係性を調べるため、*A. nidulans* の *AnerdS* 破壊株の作製を行った。ゲノム上で、*AnerdS* の上流領域をキシロース誘導性プロモーター (PxylP) に置換することで、*AnerdS* の発現の抑制・誘導を制御可能な株 (PxylP-*AnerdS* 株) を作製した。ステリグマトシスチンの分析は、5 日間培養した菌体をクロロホルムで抽出後、HPLC (カラム: ODS-80T_M、溶媒: アセトニトリル/水=45/55、検出: UV254 nm) で行った。

結果

A. oryzae の野生株、*erdS* 破壊株および *ergS* 破壊株を最小寒天培地を用いて 5 日間培養し、RT-qPCR による分生子・菌核形成の関連遺伝子の発現量解析を行った。その結果、*erdS* 破壊株および *ergS* 破壊株における分生子形成の中心的な転写因子である *brlA*、*abaA*、*wetA* の発現量が野生株と比較して有意に減少していることが明らかとなった (図 2)³⁾。一方、菌核形成を正に制御する *sclR* や負に制御する転写因子である *ecdR* の発現量には有意な差が見られなかった。また、分生子と菌核形成のバランスを調整する velvet complex と呼ばれるタンパク質複合体を構成する *veA*、*velB*、*vosA* の発現量にも差が見られなかった。さらに、Erg-Asp と活性酸素種 (ROS) の関係を調べるため、抗酸化酵素の活性を高めることで菌核形成を抑制すると考えられている銅(II)イオンや、抗酸化物質を添加した培地で野生株、*erdS* および *ergS* 破壊株を生育させたところ、これら ROS の蓄積を阻害する条件下では菌核形成は見られなくなった。これにより、Erg-Asp または Erg-Gly の欠失は菌体内の ROS の蓄積を促進することで菌核形成を促進していることが

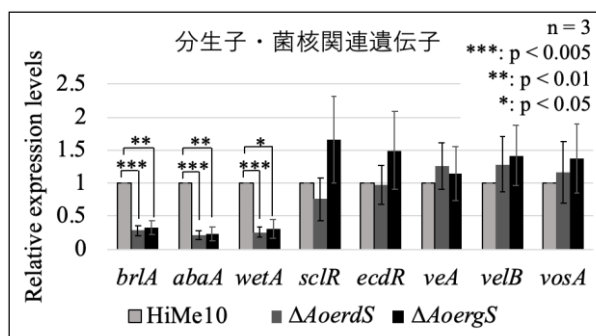


図 2 分生子・菌核関連遺伝子の発現量

示唆された。

次に、Erg-Asp が植物病原性糸状菌の病原性にどのような影響を与えるかを調べるため、野生株および *erdS* 破壊株をコムギ子葉鞘へ感染させたところ、*erdS* 破壊株では病変部位が有意に減少した。このことから、Erg-Asp は *F. graminearum* の病原性において亢進的に機能していることが考えられた。

また、Erg-Asp と有性生殖の関係性を調べるため、*A. nidulans* の *AnerdS* 破壊株の作製を行い、ゲノム上の *AnerdS* 遺伝子上流にキシロース誘導性の *PxylP* プロモーターを導入することに成功した (*PxylP-AnerdS* 株)。これにより、キシロース添加条件では *AnerdS* の発現誘導により Erg-Asp の過剰な蓄積が確認され、グルコース添加条件では *AnerdS* の発現抑制により Erg-Asp が生成されない (*AnerdS* 破壊株と同等) ことが確認された。これらの条件で *PxylP-AnerdS* 株を培養したところ、*AnerdS* の発現誘導・抑制に関わらず、野生株と比較して子嚢殻の増加が確認された。これにより、Erg-Asp の有性生殖への関与が示唆され、Erg-Asp の内生量が有性・無性生殖のバランスに影響を与えている可能性が考えられた。さらに、*A. nidulans* が生産する代表的な二次代謝産物であるステリグマトシスチン (ST) の蓄積量を調べたところ、*AnerdS* の発現抑制条件下では、ST が有意に増加することが分かった。このことから、Erg-Asp は二次代謝産物の生産にも影響を及ぼしていることが明らかとなった。

結論

本研究により、Erg-aa は分生子形成に関わる遺伝子の発現を変化させることで分生子形成を亢進させていることが明らかとなった。一方、velvet complex には影響を及ぼさないことが分かった。また、*A. nidulans* を用いた解析では子嚢殻形成に影響を与えることから、Erg-aa が有性生殖にも関与することが明らかとなった。さらに、菌核形成には ROS シグナルを介して関与している可能性が示唆された。糸状菌において ROS シグナルは無性・有性生殖、菌核形成、病原性や二次代謝に関与していることが知られていることから、Erg-aa は ROS シグナルと密接に関連していることが推察された。今後は、Erg-aa がどのようにして ROS シグナルに影響を与えているのかを解明していきたい。また、Erg-aa は病原性糸状菌の病原性にも影響を与えることが分かり、今後 Erg-aa を標的とした抗真菌剤の開発も期待される。

文献

- 1) Yakobov N. *et al.* (2020) RNA-dependent sterol aspartylation in fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **117**: 14948-14957.
- 2) Yakobov N. *et al.* (2022) RNA-dependent synthesis of ergosteryl-3 β -O-glycine in Ascomycota expands the diversity of sterol-amino acids. *J. Biol. Chem.* **298**: 101657.
- 3) Yokokawa D. *et al.* (2024) Sterol aminoacylation regulates conidiation and sclerotia formation in *Aspergillus oryzae*. *Fungal Biol.* **129**: 101609.