

報 文

麹菌 *Aspergillus oryzae* のスーパーオキシドジスムターゼの解析松葉泉水²⁾, 近田裕梨¹⁾, 木村真²⁾, 小林哲夫²⁾, 金丸京子¹⁾¹⁾中部大学応用生物学部, ²⁾名古屋大学大学院生命農学研究科

要 旨

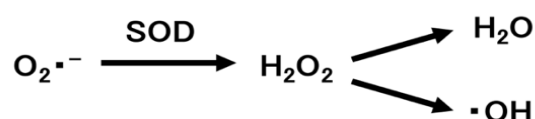
麹菌 *Aspergillus oryzae* の生育の過程では, 活性酸素種 (ROS) の一種であるスーパーオキシドアニオン ($O_2^{\cdot-}$) が発生し, 酸化ストレスの中心的な原因物質になっている. 過剰に発生した ROS は DNA やタンパク質, 脂質の酸化を引き起こすため, ROS を無毒化するスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) の役割は重要である. 本研究では, 麹菌の 2 つの SOD (SodA, SodB) に着目した. *sodA*, *sodB* 遺伝子破壊株を作製し, 生育やストレス条件に対する感受性を解析した. その結果, SodA と SodB は細胞内で発生した ROS の消去に固有の働きを持つことが示唆された.

1. はじめに

麹菌 (*Aspergillus oryzae*) は α -アミラーゼやプロテアーゼなどのさまざまな有用酵素を分泌するため, 古来より味噌, 醤油, 酒など発酵食品の生産に利用され, 平成 18 年には日本醸造協会によって国菌に認定された. 現在では, 食品だけでなく医薬や繊維工業など産業全般にわたって有用である. 2005 年には全ゲノム配列が明らかにされ (Machida *et al.*, 2005), 麹菌の安全性を生かした新たな産業の創生が期待されている.

麹菌が利用される発酵生産の環境は, 高濃度のエタノール, 高温, 低温, 高浸透圧, 偏栄養, 酸化ストレスの発生など, 麹菌の生育にとってストレスな環境であることが多い. これらの環境ストレスは麹菌の生育を低下させ, 発酵生産に影響するため, 近年確立された分子生物学的手法によって麹菌にストレス耐性を付与するなどによって, 麹菌の利用効率を向上させることが必要である. そのためにも, 麹菌の基本的なストレス応答システムを詳細に解明することが重要である.

麹菌は生育に酸素を必要とするため, 環境ストレスのなかでも, 生育の過程で発生する酸化ストレスは不可避なストレスである. ミトコンドリアでの ATP 生産をはじめ, さまざまな酵素反応で発生した電子が空気中の酸素と反応すると, 活性酸素種 (ROS) の一種であるスーパーオキシドアニオン ($O_2^{\cdot-}$) が発生し, 酸化ストレスの中心的な

図 1 SOD による $O_2^{\cdot-}$ の変換反応

原因物質になる. 一方, 菌糸先端で発生する ROS は糸状菌の菌糸伸長の方向性を決定する重要なシグナルでもあることが明らかになっている (Scott and Eaton, 2008a,b).

過剰に発生した ROS は DNA やタンパク質, 脂質の酸化を引き起こすため, 生物は ROS を無毒化するシステムを有している (Moradas-Ferreira and Costa, 2000, Hopkins, 2016). スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) は発生した $O_2^{\cdot-}$ を無毒化する最初の酵素として重要である (図 1). 麹菌のゲノム上には, 推定上の SOD が 4 種類存在し, 細胞内の異なる場所に局在して $O_2^{\cdot-}$ の変換に機能すると考えられる (表 1).

表 1 *A. oryzae* のゲノム上に存在する *sod* 遺伝子の種類と機能

遺伝子	コファクター	局在(推定)	オルソログ (<i>S. cerevisiae</i>)
<i>sodA</i>	Cu/Zn	サイトソル ミトコンドリア膜間腔 核	SOD1
<i>sodB</i>	Mn	ミトコンドリアマトリクス	SOD2
AO090038000258	Cu/Zn	菌糸基底部分	-
AO090005001580	不明	ミトコンドリアリボソーム 小サブユニット	RSM26

本研究では、麴菌のSODの機能的な重要性を解析することにした。まず、native gelのNBT(nitro blue tetrazolium)染色によって、SOD活性を示すタンパク質の網羅的な検出を試みた。生物に広く保存されている2種のSOD、Cu/Zn-SOD(SodA)とMn-SOD(SodB)に着目し、それぞれの欠損による麴菌の生育への影響を解析した。

2. 材料と方法

2-1. 使用菌株および培養方法

sodA, *sodB* 各遺伝子の破壊株($\Delta sodA$, $\Delta sodB$)は、*A. oryzae* の RIB40 $\Delta ku70 \Delta pyrG$ 株を親株にして、*sodA*, *sodB* 遺伝子領域に *pyrG* 遺伝子を導入して作製した。破壊株の作製に用いたプライマーは次のとおりである。

・ $\Delta sodA$ 株の作製に使用したプライマー

sodAleft5 (*Sac* II) : 5'-GCGCGCCCGCGGGAGCAGCACCTTGTGAAGCAAC-3'

sodAleft3 (*Spe* I) : 5'-GCGCGCACTAGTCAATGCCAATGACACCTG-3'

sodAright5 (*Sph* I) : 5'-GCGCGCGCATGCCAATCTAGGATGTGAAGTGCC-3'

sodAright3 (*Eco* RV) : 5'-GCGCGCGATATCTCTCTAGAAAATCTTCCCG-3'

・ $\Delta sodB$ 株の作製に使用したプライマー

sodBup1 (*Eco* RV) : 5'-GATATCCATCGACCAACGACTTCAAG-3'

sodBup2 (*Pst* I) : 5'-CTGCAGGGATAAGAGAGGCAGCCATAG-3'

sodBdown3 (*Spe* I) : 5'-ACTAGTGAGAAGCGCTTCTCGTAAGC-3'

sodBdown4 (*Xba* I) : 5'-TCTAGACGTAGCCTTCTGTGTGCG-3'

sodA 遺伝子の上流 1 kb 領域を *sodAleft5* (*Sac* II) と *sodAleft3* (*Spe* I)を用いて PCR で増幅した。*sodA* の下流 1 kb 領域を *sodAright5* (*Sph* I)と *sodAright3* (*Eco* RV)を用いて PCR により増幅した。それぞれ *Sac* II-*Spe* I, *Sph* I-*Eco* RV で処理したあと、*A. nidulans* 由来の *pyrG* 遺伝子を含む DNA 断片 2.4 kb(*Spe* I と *Sph* I で処理)と連結させて、pBluescript II KS(+)ベクター(アジレント・テクノロジー)の *Eco* RV-*Sac* II に挿入し pBS-pyrG-*sodA* プラスミドを作製した。*sodB* 遺伝子の上流 1 kb 領域を *sodBup1* (*Eco* RV)と *sodBup2* (*Pst* I)を用いて PCR で増幅した。*sodB* の下流 1 kb 領域を *sodBdown3* (*Spe* I)と *sodBdown4* (*Xba* I)を用いて PCR により増幅した。それぞれ *Eco* RV-*Pst* I, *Spe* I-*Xba* I で処理したあと、*A. nidulans* 由来の *pyrG* 遺伝子を含む DNA 断片 2.4 kb(*Pst* I と *Spe* I で処理)と連結させて、pBluescript II KS(+)ベクターの *Eco* RV-*Xba* I に挿入した(pBS-pyrG-

sodB)。pBS-pyrG-*sodA*, pBS-pyrG-*sodB* をそれぞれ RIB40 $\Delta ku70 \Delta pyrG$ 株に導入した。形質転換株から染色体を抽出し、サザンハイブリダイゼーションにより目的の破壊株であることを確認した。

A. oryzae の培養には、1 L あたりグルコース 30 g, NaNO₃ 3.0 g, K₂HPO₄ 1.0 g, KCl 0.5 g, Trace element solution 1.5 ml, MgSO₄·7H₂O 0.5 g を用いた。Trace elements solution は、1 L あたり Na₂B₄O₇·10H₂O 40 mg, CuSO₄·5H₂O 0.4 g, FeSO₄·7H₂O 1.6 g, MnSO₄·4H₂O 0.8 g, Na₂MoO₄·2H₂O 0.8 g, ZnSO₄·7H₂O 8.0 g を含む。寒天培地には、Agar(富士フイルム和光純薬製)を終濃度 1.5 %となるよう添加した。

酸化ストレス条件下での生育は、メナジオン(2-methyl-1,4naphthoquinone)(富士フイルム和光純薬製)を終濃度 3 μ M になるように添加した培地で観察した。炭素源として、グルコースの代わりにエタノール(99.5)(富士フイルム和光純薬製)を終濃度 1%(v/v)または酢酸ナトリウムを終濃度 100 mM となるように添加した培地を用いた。

発芽した分生子を観察するには、55×17 mm の丸形シャーレに液体最少培地 7 ml 加え、カバーガラスを沈めてから分生子を植菌し、30 °Cで 12 時間培養した。

2-2. NBT による ROS の検出

カバーガラス上で発芽した分生子や伸長した菌糸に NBT 溶液(0.1 % NBT(Nitro Blue Tetrazolium(富士フイルム和光純薬製)), 100 mM リン酸ナトリウム, pH 7.0)を 150 μ l 滴下し、遮光条件下で 4 時間静置した。ROS が発生すると NBT が還元され、不溶性の青色沈殿ブルーホルマザンが生じて染色される。落射蛍光顕微鏡 OLYMPUS BX51(倍率:接眼×10, 対物×40 倍)下で分生子や菌糸の染色状況を観察した。

2-3. 菌体からのタンパク質抽出および細胞分画

Li らの方法を参考にして細胞分画を行った(Li *et al.*, 2014)。培養菌体を冷却した滅菌水で洗浄後、菌体 1 g に対して、6 ml の抽出バッファー(10mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.2 mM EDTA, 15 % スクロース)を添加し、ポッター型ホモゲナイザーを用いてホモゲナイズした。ホモゲナイズ後の細胞破砕液を 4°C, 5,000×g, 5 分間遠心分離し、上

清をさらに 4 °C, 15,000×g, 30 分間遠心分離した. 沈殿を 3 ml の wash バッファー (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.2 mM EDTA, 15 % スクロース) で懸濁し, 4°C, 15,000×g, 20 分間遠心分離した. ホモゲナイズ後の細胞破碎液を全タンパク質画分, 1 回目の遠心分離の沈殿を核画分 (細胞膜や未破碎細胞なども含む), 2 回目の遠心分離の上清をサイトゾル画分, 3 回目の遠心分離の沈殿を粗ミトコンドリア画分として以降の実験に用いた. 核, ミトコンドリア画分は TBS バッファー (25 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl) で懸濁した.

2-4. ザイモグラフィーによる SOD 活性の検出

細胞分画後の各画分について Native-PAGE を行った. Native-PAGE ゲルの NBT 染色は Beauchamp らの方法を参考にして行った (Beauchamp and Fridovich, 1971). Native-PAGE を行ったゲルを NBT 溶液 (0.01% リボフラビン, 0.025% Nitro blue Tetrazolium (NBT)) 中で遮光して 15 分間静置したのち, 0.1 % N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED) に浸し, 光をあてながら 15 分間静置した. TEMED によって還元された還元型リボフラビンは光酸化によってスーパーオキシドアニオンを発生させる. NBT が発生したスーパーオキシドアニオンによって還元されると, 青色ホルマゼンを形成するためゲルが青く染色されるが, SOD 活性を有するタンパク質はゲル上でスーパーオキシドアニオンを消去するため, 青く染色されないことを利用して SOD 活性を確認した.

3. 結果と考察

3-1. *A. oryzae* における SOD タンパク質の検出

A. oryzae において機能する SOD タンパク質を検出するために, 野生株 (WT) を液体培養後, 菌体から全タンパク質を抽出し, 細胞分画を行った. 分画したサンプルを native gel にアプライし, NBT で染色することで SOD 活性を有するタンパク質を検出した (図 2). その結果, サイトゾル画分 (C) において, 2 本の SOD タンパク質が検出された. 生物は主に Cu や Zn をコファクターにして機能する SOD (Cu/Zn-SOD) と Mn をコファクターにする SOD (Mn-SOD) を有している. *A. oryzae* では, それ

ぞれ *sodA*, *sodB* 遺伝子にコードされるタンパク質に該当する. 図 2 の SOD 活性を示すタンパク質のバンドが SodA もしくは SodB であるかを確定するために, 各遺伝子の破壊株を作製し, 野生株と同様に細胞分画を行い, native gel の NBT 染色を行った. 破壊によって消失する SOD タンパク質のバンドから, 移動度の小さいタンパク質が SodA, 移動度の大きいタンパク質が SodB であることが明らかになった. 表 1 に示すように, Cu/Zn-SOD である SodA は予想通りサイトゾル画分において高い活性を示した. 一方, SodB はミトコンドリア画分ではなく, サイトゾル画分で検出された. SodB のアミノ酸配列上には推定上のミトコンドリア局在シグナルが確認できるが, 本研究で行った細胞分画の方法では SodB をミトコンドリア画分に検出することができなかった. SodB が細胞内の局在性については今後検討する必要がある.

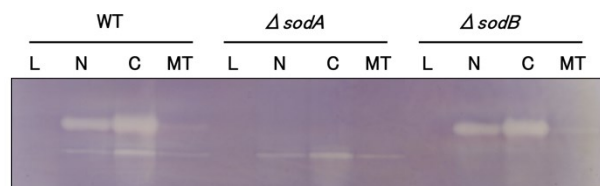


図 2 *A. oryzae* の SOD タンパク質の検出

液体培養後の野生株 (WT), *sodA* 破壊株 ($\Delta sodA$), *sodB* 破壊株 ($\Delta sodB$) から全タンパク質を抽出し, 核 (N), サイトゾル (C), ミトコンドリア (MT) に分画した. 各画分 50μg を 10% の native gel に泳動後, NBT 染色によって SOD 活性を示すタンパク質のバンドを検出した. L には液体培養後の上清 24μl を泳動に用いた.

3-2. *sodA*, *sodB* 破壊による細胞内 ROS の発生レベル

sodA, *sodB* の破壊によって菌体内でどの程度 ROS が発生するかを明らかにするために, 各株の発芽後の分生子を NBT 染色し観察した. 糸状菌では, 菌糸先端で発生する ROS は菌糸の伸長方向の決定に重要であり, 野生株の菌糸先端では ROS の発生が検出される (図 3 WT). *sodA* 破壊株でも野生株と同レベルの ROS が菌糸先端において確認された. 図 2 において SodA の活性レベルは高く, *sodA* の破壊により細胞内の ROS が上昇することを予想したが, SodA 以外の ROS を消去するさまざまなシステムが機能したため ROS の発生が上昇しなかったと考える. 一方, *sodB* 破壊株では, 膨張した分生

子や伸長した菌糸全体に ROS の発生が確認された。SodB が機能する細胞内部位(おそらくミトコンドリア)では, SodB が ROS の消去に中心的に機能することが示唆された。

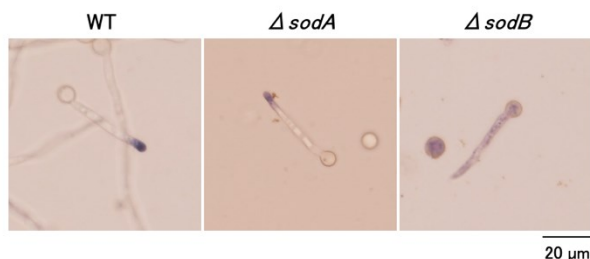


図 3 発芽時の ROS 発生レベルの観察

グルコースを含む最小培地に各株の分生子を植菌し 30℃で 6 時間培養した。カバーガラス上で発芽した分生子を NBT で染色し、顕微鏡下で観察した。

3-3. *sodA*, *sodB* 破壊による *A. oryzae* の生育への影響

SodA, SodB の機能が *A. oryzae* の生育に影響するかについて明らかにするために、野生株と破壊株の液体培養後の菌体重量、寒天培地上での分生子数を比較した(図 4, 5)。どちらも, *sodA* の破壊株において低下が確認された。図 3 の発芽後の菌糸には ROS の上昇が認められなかったものの、発芽後の長時間の培養において *A. oryzae* が正常に生育するためには SodA が不可欠であることが示唆された。

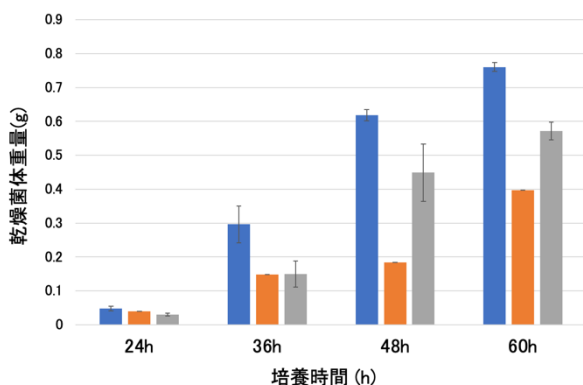


図 4 *sodA*, *sodB* 破壊による生育への影響

グルコースを含む最小培地で培養し菌体重量を測定した。野生株(青), $\Delta sodA$ 株(オレンジ), $\Delta sodB$ 株(グレー)の結果を棒グラフで示した。

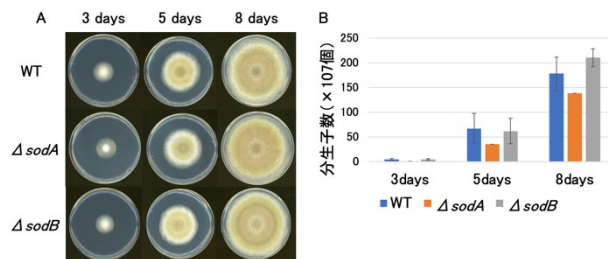


図 5 *sodA*, *sodB* 破壊による生育への影響

A. グルコースを含む最小寒天培地で 30℃で 3,5,8 日間培養した。

B. 各寒天培地から分生子を回収し顕微鏡下で分生子数をカウントした。野生株(青), $\Delta sodA$ 株(オレンジ), $\Delta sodB$ 株(グレー)の結果を棒グラフで示した。

3-4. *sodA*, *sodB* 破壊株のストレス感受性についての検討

図 6 では、培地にメナジオンを添加して酸化ストレスを与え、野生株と破壊株で生育への影響を比較した。*sodA*, *sodB* のどちらの破壊株も強い感受性を示した。外界の酸化ストレスにどちらも重要であることは明らかである。炭素源として非発酵性のエタノールや酢酸ナトリウムを用いると, *sodB* 破壊株の生育に遅延が確認された。図 2 ではミトコンドリアでの SodB の活性を確認することができなかったが、やはりミトコンドリアでの ROS 消去に重要で、破壊によってミトコンドリア機能が低下したために、ミトコンドリアが関与するエタノールや酢酸ナトリウムの代

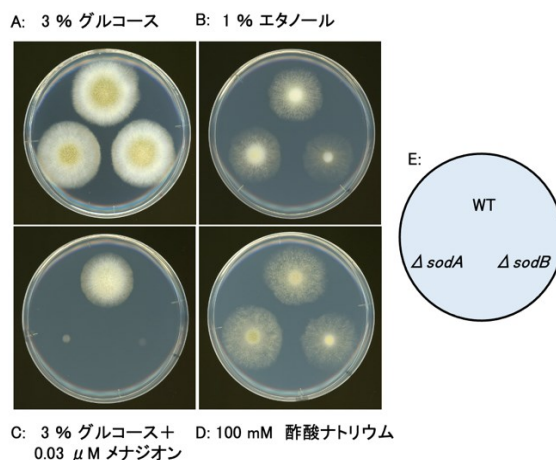


図 6 *sodA*, *sodB* 破壊による生育への影響

グルコース(A), 1%エタノール(B), グルコースと 0.03 μ M メナジオン(C), 100mM 酢酸ナトリウム(D)を含む最小寒天培地で 30℃で 3 日間培養した。E に各培地の菌株の配置を示した。

謝が低下した結果、生育に影響したと考える。

4. おわりに

本研究の結果から、SodA と SodB が *A. oryzae* の正常な生育にそれぞれ特有の機能を有することが明らかになった。特に、さまざまなストレスや栄養条件下での生育に重要であることから、細胞内で発生する ROS のコントロールの重要性が伺える。

近年、*S. cerevisiae* では、*sodA* 遺伝子のオルソログである *SOD1* 遺伝子がタンパク質の安定化に機能する (Claudia Montllor-Albalatea *et al.*, 2019), *SOD1* が核に移行して DNA に結合する (Chi Kwan Tsang *et al.*, 2014) が報告され、これまで知られていない新たな SOD の機能が明らかになりつつある。SodA も同様に SOD 以外の働きを持つ可能性があり、今後 SodB とともにさらなる解析をする必要があると考える。

引用文献

Beauchamp, C., Fridovich, I. (1971) Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 44, 276-287.

Chi Kwan Tsang *et al.* (2014) Superoxide dismutase 1 acts as a nuclear transcription factor to regulate oxidative stress resistance. *Nature Communications* 5 Article number: 3446

Claudia Montllor-Albalatea *et al.* (2019) Extra-mitochondrial Cu/Zn superoxide dismutase (Sod1) is dispensable for protection against oxidative stress but mediates peroxide signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Redox Biology* 21, 101064

Li, L., Hu, X., Xia, Y., Xiao, G., Zheng, P., Wang, C. (2014) Linkage of Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunctions to Spontaneous Culture Degeneration in *Aspergillus nidulans*, *Mol Cell Proteomics* 13, 449-461.

Machida, M. *et al.* (2005) Genome sequencing and analysis

of *Aspergillus oryzae*. *Nature* 438, 1157-1161.

Moradas-Ferreira, P., Costa, V. (2000) Adaptive response of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to reactive oxygen species: Defences, damage and death. *Redox Rep.* 5. 277-285.

Hopkins, R. Z. (2016) Superoxide in Biology and Medicine: An overview. *Reactive Oxygen Species* 1, 99-109.

Scott, B., Eaton, C. J. (2008a) Roles of reactive oxygen species in fungal cellular differentiations. *Curr. Opin. Microbiol.* 11, 488-493.

Scott, B., Eaton, C. J. (2008b) Regulation of apical dominance in *Aspergillus nidulans* hyphae by reaction oxygen species. *Genetics* 17, 1919-1932.

Title: Analysis of Superoxide dismutase in *Aspergillus oryzae*

Authors: Izumi Matsuba²⁾, Yuri Chikada¹⁾, Makoto Kimura²⁾, Tetsuo Kobayashi²⁾, Kyoko Kanamaru¹⁾

Addresses: ¹⁾ College of Bioscience and Biotechnology, Chubu University.

²⁾ Department of Biological Mechanisms and Functions, Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University

Keywords: *Aspergillus oryzae*, Superoxide dismutase