

【研究区分：先端的研究】

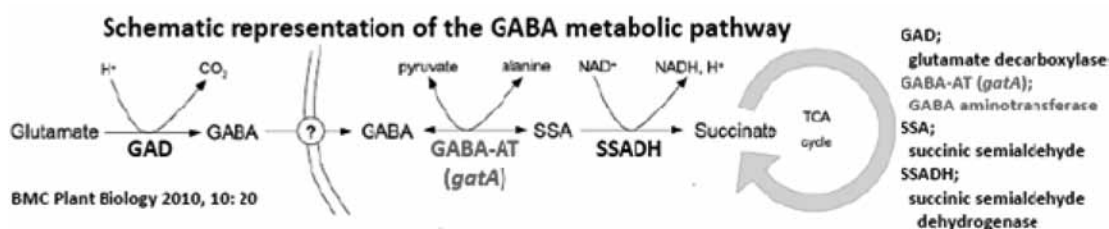
研究テーマ：黄麴菌の GABA 代謝とストレス応答の関連性	
研究代表者：生物資源科学部生命環境学科（環境科学コース） 助教 有馬寿英	連絡先：arima@pu-hiroshima.ac.jp
共同研究者：	
<p>【研究概要】</p> <p>黄麴菌 <i>Aspergillus oryzae</i> は醗酵・醸造産業などの製造業のみならず、「和食」という日本の文化にとっても欠かすことの出来ない微生物である。本実験では、そのゲノム解析対象菌株(RIB 40 株)や GABA aminotransferase をコードする <i>gatA</i> 遺伝子の破壊株(Δ<i>gatA</i> #F 株)とその相補株(<i>gatA</i> comp #A 株), それらの比較対象株を含む 6 菌株を用いて、その機能性が近年注目されている GABA の有する機能のその一端を明らかにするとともに、<i>gatA</i> 遺伝子のその発現が窒素源濃度に依存していることも示された。</p>	

【研究目的】

麴菌は伝統的な醗酵・醸造食品の製造や食文化に貢献するとともに、医薬品や酵素などの有用物質の生産にも利用されており、今後さらに産業界で広く活用されることが推察される。麴菌は、古来より大切に育み使ってきた日本の貴重な財産として、「国菌」に認定されている。近年、麴菌を含む子のう菌類のゲノム解析が進展し、黄麴菌 *Aspergillus oryzae* には 12,000 程度の遺伝子が存在することが判明したが、その 90%以上が機能推定遺伝子もしくは機能未知遺伝子であった。黄麴菌は、和食の根幹である清酒・醤油・味噌などの製造に欠かせない微生物である。黄麴菌が持つ有用な性質や機能の解明、そして黄麴菌と清酒醸造などでの複雑な関係を解析するため、その基礎的・基盤的な研究が望まれている。

4-aminobutanoic acid (gamma-aminobutanoic acid (GABA), γ -アミノ酪酸)は non-protein アミノ酸であり、バクテリアや酵母などの微生物、そして高等生物である植物や動物にまで普遍的に存在している。ヒトなどでは、中枢神経系における神経伝達物質として用いられている。子のう菌類の細胞内に存在する GABA は、グルタミン酸(L-glutamate)の脱炭酸反応(decarboxylation)に大部分が依存しており、胞子(有性・無性)形成やその発芽に関与していることが知られている。*Aspergillus nidulans* では、GABA の取り込みとその利用においては、pH-responsive regulator である PacC や nitrogen regulator である AreA, integrator である IntA や carbon catabolite repressor である CreA の制御下にあり、非常に複雑な機構によって制御されていることが示唆されている。さらに、植物病原菌においても、GABA とそれに関連する代謝が、植物への感染とその病原性に何らかの役割を果たしていることが示唆されているが、詳細なその機能と生理学的な役割などについては、不明な点が多数存在するのが現状である。

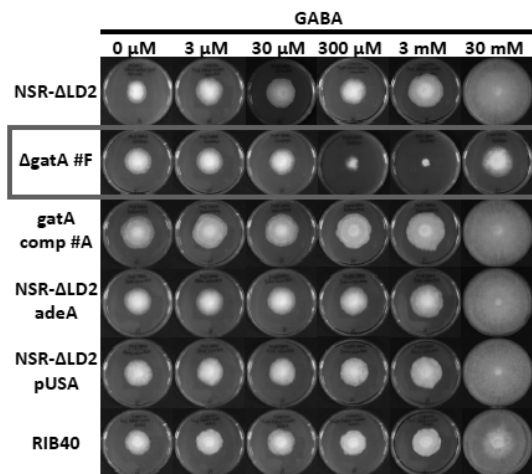
黄麴菌 *A. oryzae* RIB 40 株(=NBRC 100959 株, ゲノム解析対象菌株)のデータベースのスクリーニングの結果、機能推定遺伝子(A0090701000206)として GABA aminotransferase をコードする *gatA* 遺伝子が確認された。そこで、この遺伝子に関する分子レベルにおける解析とその機能を多面的に明確にするため、生理学を含めた幾つかの実験を実施した。



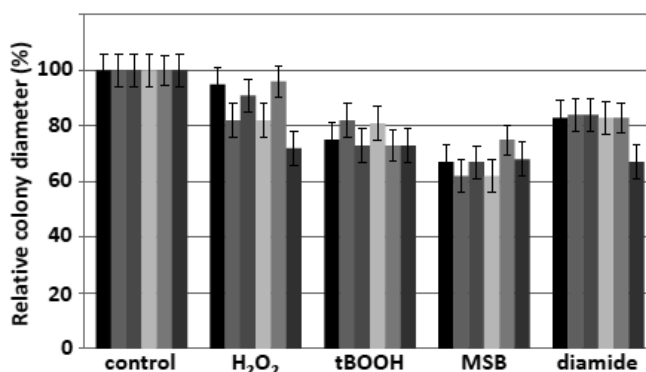
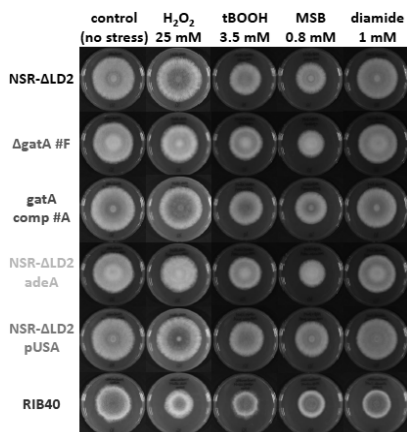
【研究区分：先端的研究】

【研究内容・成果】

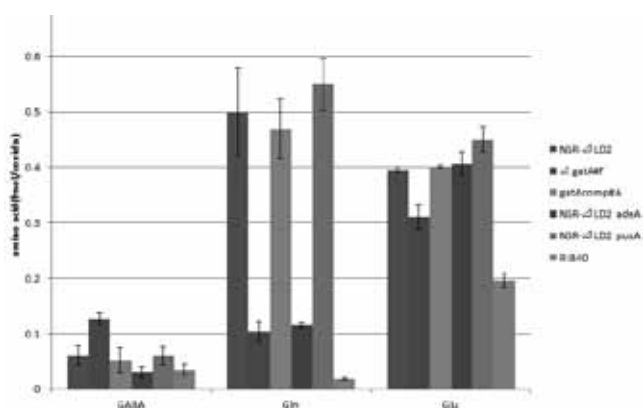
黄麴菌ゲノム解析対象菌株である RIB 40 株を含めた 6 菌株(recipient 株(NSR- Δ LD2 株), *gatA* 遺伝子破壊株(Δ *gatA* #F 株)とその相補株(*gatA* comp #A 株), 及びそれぞれの比較対象株(NSR- Δ LD2 *adeA* 株と NSR- Δ LD2 pUSA 株)について, 窒素源である GABA のその濃度に対する応答を CD 寒天培地での菌糸生育により比較した結果, 0~3mM では Δ *gatA* #F 株の菌糸生育が減少傾向を示していたが, 30mM ではその菌糸生育が増加傾向に転じていた(右図参照)。この結果は, GABA に関連する代謝が変化している, もしくは nitrogen regulator である AreA 及び integrator である IntA による転写レベルでのその制御が示唆される。



各々の菌株に由来する分生子について, 各種ストレスに対する応答を N + *ade* 寒天培地での発芽により比較した結果, H₂O₂を用いた酸化ストレスの場合のみ, Δ *gatA* #F 株とその他 5 菌株の間で有意な差が示された。この結果は, Δ *gatA* #F 株の分生子内で GABA が代謝されず蓄積した影響と考えられる。さらに, H₂O₂などの酸化ストレス発生源を含む N + *ade* 寒天培地での菌糸生育を比較した結果, 特に有意な差が確認されなかった(下図参照)ため, GABA の持つその機能は, 分生子と菌糸生育では異なることが示唆された。



全ての使用菌株の分生子からエタノール抽出液を作製し, GABA などの定量のためにアミノ酸分析装置に供した結果, *gatA* 遺伝子破壊株である Δ *gatA* #F 株の分生子では, 他の使用菌株の分生子と比較した場合, その GABA 含有量が 2 倍程度であることが判明した(右図参照)。この分生子での GABA の蓄積は, 上述の H₂O₂を用いた酸化ストレスに対して, 何らかの機能を果たしているものと推察される。



窒素源としての GABA のその濃度を段階的に変化させた培養において, *gatA* 遺伝子の発現解析を行った結果, 70mM 及び 100mM GABA を用いた場合, その遺伝子発現が確認された。この結果によって, *gatA* 遺伝子のその発現が, GABA のその濃度に依存していることが示唆された。