

## 研究ノート

***Aspergillus oryzae* 菌体内グルタチオンに対する環境ストレスの影響**服部 領太, 鈴木 聡, 楠本 憲一<sup>§</sup>

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所

**The effect of environmental stresses on intracellular glutathione levels of *Aspergillus oryzae***Ryota Hattori, Satoshi Suzuki, Ken-Ichi Kusumoto<sup>§</sup>

Applied Microbiology Division, National Food Research Institute, NARO

**Abstract**

Glutathione ( $\gamma$ -glutamyl-cysteinylglycine) is a major thiol compound that plays various roles *in vivo*. This study focused on intracellular glutathione levels and on the influence of the environmental stresses on the levels under filter culture condition in *Aspergillus oryzae*. The profile of the levels showed a peak on the second day after inoculation. Under oxidative stress, the levels did not change. The levels increased under heavy metal stress and decreased under nitrogen source deficient condition.

**緒言**

*Aspergillus oryzae* は日本醸造学会により我が国の国菌と認定された有用糸状菌であり、古来より味噌、醤油などの伝統的発酵食品の製造に麹菌として利用されている。それは、*A. oryzae* が持つ、糖質やタンパク質等を加水分解する酵素群の生産能が高いことに由来する。醸造業界では作業効率向上のため、現状の麹菌株よりもさらに短時間で培養が終了する増殖力の高い菌株や、分生子形成が現状よりも盛んな菌株が望まれており、これらの要望に応えるための方策の一つとして

環境ストレスに対する耐性の高い菌株、生育の速い菌株の育種が喫緊に必要とされている。

グルタチオン ( $\gamma$ -L-グルタミル-L-システイニルグリシン) はチオール基を有するトリペプチドで、あらゆる生物の細胞に普遍的に存在する物質である。その生体内での生理的役割は酸化ストレス、重金属ストレス等の様々なストレス耐性に関与しており、菌体の成長に影響を及ぼす<sup>1)</sup>。グルタチオンの代謝経路としては $\gamma$ -グルタミルサイクルが提唱されており、 $\gamma$ -グルタミルシステイン合成酵素とグルタチオン合成酵素を介して合成される<sup>1)</sup>。

また、グルタチオンは医療やサプリメントなどに利

<sup>§</sup> 連絡先 (Corresponding author), kusumoto@affrc.go.jp

用されるため、菌培養によるグルタチオン合成経路を利用する効率的な大量生産を目的とした研究が行われている<sup>2)</sup>。さらに、酵母などでグルタチオン高生産株の育種が行われ、特許が取得されている。しかし、糸状菌に関して報告は、主に *Penicillium chrysogenum* における細胞内グルタチオンについて報告があるものの<sup>3-5)</sup>、グルタチオンの生産に関する知見は未だ不十分である。醸造用微生物である *A. oryzae* におけるグルタチオン生産の知見が得られると我が国独自の麹菌によるグルタチオン生産や麹菌を用いた醸造食品の新たな価値の付与が期待される。そこで、本研究では *A. oryzae* を用いて培養を行い、菌体内グルタチオン含有量の経時変化、およびストレス環境下における蓄積量の変化を調べた。

### 実験材料および方法

供試菌株として *Aspergillus oryzae* RIB40株を使用した。ツァベック・ドックス寒天培地 (1% (w/v) D-glucose, 0.6% (w/v) NaNO<sub>3</sub>, 0.15% (w/v) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.03% (w/v) KCl, 0.2% (v/v) 1 M MgSO<sub>4</sub> solution, 0.01% (v/v) trace element solution (0.88% (w/v) ZnSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O, 0.1% (w/v) FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.04% (w/v) CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O, 0.001% (w/v) Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> · 10H<sub>2</sub>O), 2% (w/v) agar), にメンブレンフィルター (A020A090C: ADVANTEC) を乗せたプレート培地を作製し、接種する分生子数が  $2 \times 10^5$  となるように調製して30℃でフィルター培養を

行った。培養区の設定は非ストレス区 (対照区)、ストレス条件としてカドミウム (Cd) 添加培地 (10 mM CdCl<sub>2</sub>)、窒素 (N) 源欠乏培地 (上記より0.6% NaNO<sub>3</sub> を除く)、10 mM 過酸化水素 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 含有培地を設定した。過酸化水素含有培地はツァベック・ドックス培地をオートクレーブ滅菌後に、フィルター滅菌を行ったH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を上記の濃度になるように添加した。各区2日目まで対照区と同様にツァベック・ドックス培地で生育させた後、フィルターごと菌体を各ストレス条件培地に移し換えて培養を継続した。培養後、菌体コロニーを経時的に回収し、液体窒素で凍結破碎、5% (w/v) 5-スルホサリチル酸を10μl/mg cell weight になるよう添加・攪拌後、15,000g, 4℃で10分間遠心し、得られた上清をサンプル溶液とした。グルタチオンの定量は、HT Glutathione Assay Kit (TREVIGEN) を用いて測定を行ない、標準試料より得られた検量線を使用して算出した。

### 実験結果および考察

#### 1. *A. oryzae* 菌体内グルタチオン量の経時変化

本研究では *A. oryzae* の培養法としてフィルター培養を採用した。最少培地であるツァベック・ドックス培地を用いてフィルター培養を行った *A. oryzae* 菌体内のグルタチオン含有量は、2-3日目でピークを迎え、その後減少した (図1)。

*Aspergillus nidulans* では発芽時にカタラーゼをコー

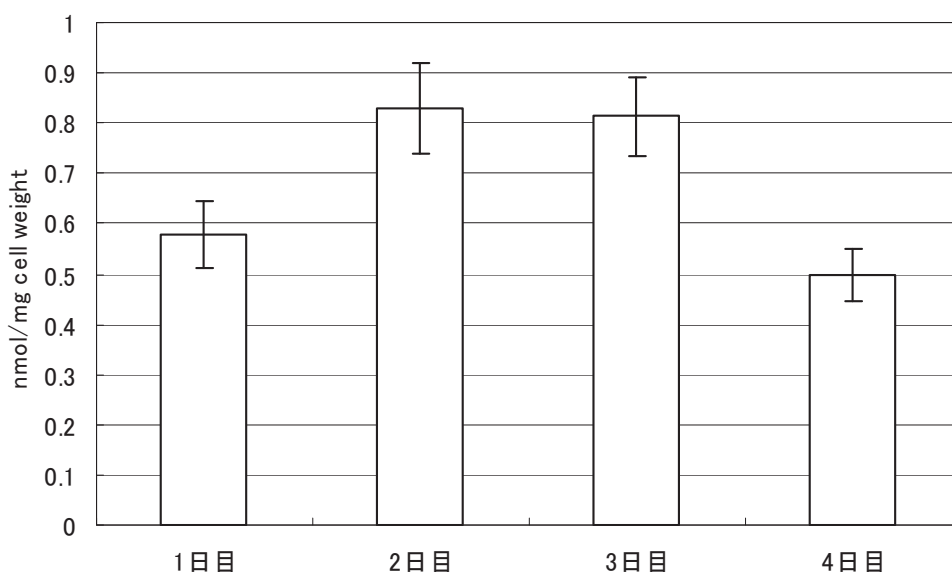


図1. *A. oryzae* RIB40菌体内グルタチオン含有量の経時変化

ドしている遺伝子 *catA* の翻訳が増大することからも、呼吸によって発生する活性酸素種等による酸化ストレスに対する耐性機構は重要であると考えられている<sup>6)</sup>。坂本らの報告によれば *A. oryzae* において、転写制御因子遺伝子である *aftA* 破壊株では孢子発芽率の減少がみられた。破壊株において分生子中アミノ酸含量を測定したところ、主要な貯蔵アミノ酸であるグルタミン酸の含量が大きく低下していた<sup>7)</sup>。また、*catA* と共にグルタチオン合成酵素である *GSH1* のホモログの発現も減少していた。これによりグルタチオン合成も酸化ストレス耐性機構に関与していることが推察された<sup>8)</sup>。また、佐野らによればフィルター培養は通常の寒天培地よりも水分活性が低く、*A. oryzae* は乾燥ストレスの影響を受けるとしている<sup>9)</sup>。本試験では培養開始から2日目にかけてグルタチオン含有量の増加が確認された。各種ストレスに対応するため発芽・増殖の段階で速やかにグルタチオンを合成、蓄積したと考えられる。

本培養では2-3日目に分生子形成が確認され、以降4日目まで分生子の増加が視認された。*A. oryzae* は固体培養を行う際、分生子から発芽して菌糸を伸ばし

ていく。菌糸は栄養を取り込むための基底菌糸と空中に伸びる気中菌糸があり、分生子は気中菌糸の先端部に形成される。時間の経過と共にコロニー中の分生子が形成されることによって、総菌体中の分生子の割合は増加したと考えられる。分生子の形成が見られ始める2-3日目以降にコロニー菌体全重量あたりのグルタチオン含量が低下していった。グルタチオンはアミノ酸貯蔵の役割を担っており、栄養状態によって分解を受け資化される<sup>1)</sup>。菌体内グルタチオンは分生子形成に使用されて減少したと考えられる。

## 2. ストレス環境下における菌体内グルタチオン量の変化

2日目までツァベック・ドックス寒天培地で培養を行った菌体を、ストレス区として設定した  $H_2O_2$  添加培地、Cd 添加培地、N 源欠乏培地にフィルターごと移し換え、培養を継続した。各区において菌体の生育に大きな差は見られなかった。移動1日後（3日目）、2日後（4日目）のグルタチオン量を測定した（図2）。 $H_2O_2$  添加区では日数を経ても2日目の対照区とグルタチオン量に変動による差が見られなかつ

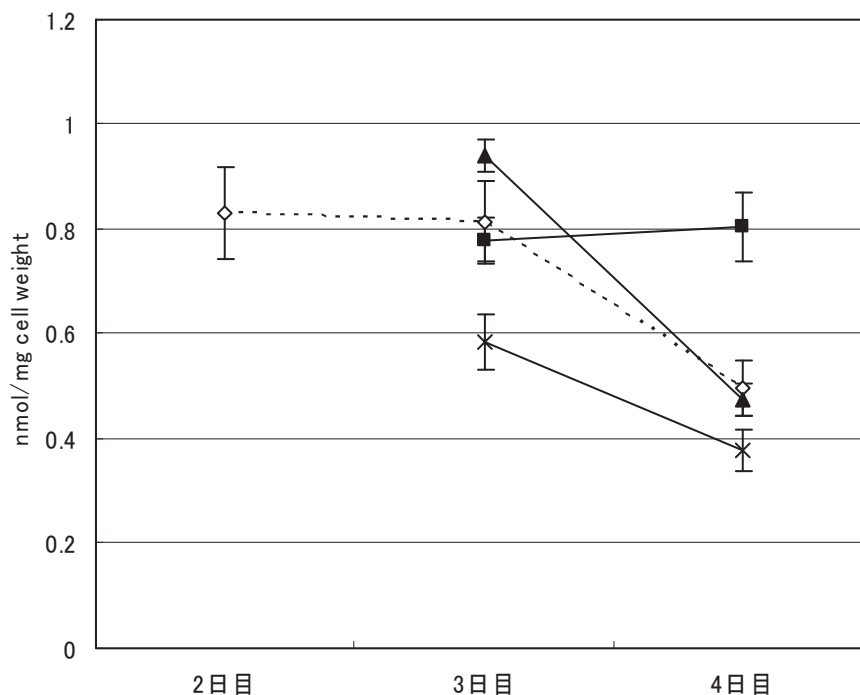


図2. ストレス環境下における *A. oryzae* RIB40 菌体内グルタチオン含有量の変動

(◇: 対照区, ■:  $H_2O_2$  添加区, ▲: Cd 添加区, ×: N 源欠乏区)

2日目に対照区からフィルターごとストレス区の培地へ移行させた。3日目、4日目はそれぞれ、移行後1日目および2日目に相当する。

た。Cd添加区では3日目で対照区の $115.6 \pm 3.7\%$ と、やや上昇した後4日目で対照区と同等になった。N源欠乏区では3日目、4日目共に同日の対照区と比較して $71.6 \pm 6.5\%$ 、 $75.6 \pm 8.0\%$ と低い値となった。

グルタチオンはグルタチオンペルオキシダーゼやグルタチオン-S-転移酵素を介して活性酸素種や薬物と反応し酸化型となる。酸化型グルタチオンはグルタチオン還元酵素によって還元型へと戻ることによりリサイクルされる。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>によって引き起こされる酸化ストレスがグルタチオン総量に変化をもたらすことは報告がほとんど無い。ただし、*Saccharomyces cerevisiae*では、好気培養下においてGSH1の転写には影響が無くシスタチオンβ合成酵素活性上昇による細胞内システイン量の上昇に伴いグルタチオンが増加した<sup>10)</sup>。または、培地内にグルタミン酸、グルタミン、リシン添加時にGSH1発現が上昇した<sup>11)</sup>、といったような、限定的な報告例がある。グルタチオンが関与する酸化ストレス耐性機構はグルタチオン還元酵素を介した酸化還元サイクルが主要であると考えられる。*A. nidulans*でもグルタチオン機構が酸化ストレス耐性を担っていることが明らかにされた<sup>12)</sup>。本試験で3日目の対照区とH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>添加区でグルタチオン含有量に差が無かったことは、*A. oryzae*においても、グルタチオンによる酸化ストレス耐性はグルタチオン還元酵素によるところが大きいと推察される。ただし4日目のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>添加区におけるグルタチオン含有量が対照区と比較して高いまま推移していた理由は定かではなく、今後明らかにする必要がある。

*S. cerevisiae*ではCdイオンによってグルタチオン合成系が誘導されることが知られている<sup>13)</sup>。重金属を抱合したグルタチオンはATP結合カセットトランスポーターであるYcf1を介して液胞に輸送される<sup>14)</sup>。また、液胞ではグルタチオンやグルタチオン複合体はγ-グルタミン酸転移酵素、アミノペプチダーゼであるLap4といったグルタチオン分解経路の酵素によりアミノ酸へ分解され再利用されると考えられている<sup>15,16)</sup>。*A. nidulans*では、N源代謝調節因子であるURE2と相同性を持つものがグルタチオン-S-転移酵素として機能しており、重金属の排出に関する機構は*S. cerevisiae*と同様であると考えられている<sup>17)</sup>。本研究の結果から、*A. oryzae*でも上記の排出機構が備わっており、Cdによるグルタチオン合成の誘導がストレス負荷直後のグルタチオン含有量の増加につながったと考えられる。一方、4日目で対照区と同レベルになった理由は明らかではない。今後グルタチオン分解経路

の酵素遺伝子の発現変化を調べることでその理由を解明したい。

*S. cerevisiae*ではN源飢餓状態で、グルタチオン分解に代謝がシフトする。*S. cerevisiae*菌体をN源欠乏培地に移して培養を継続した場合、分解酵素であるγ-グルタミン酸転移酵素の活性が上昇し、4時間後には細胞内グルタチオン量が減少した<sup>18)</sup>。一方、*P. chrysogenum*ではN源の違いやN源欠乏は細胞内グルタチオン量に影響を及ぼさなかったという報告がある<sup>4,5)</sup>。しかし、*A. nidulans*では炭素源欠乏培地による培養でγ-グルタミン酸転移酵素の活性が上昇とグルタチオン量の減少が確認されている<sup>19)</sup>。そのため、Pocsiらは、*P. chrysogenum*においてもグルタチオンをN源として利用している可能性に言及している<sup>3)</sup>。本試験ではN源欠乏区で対照区と比較して3-4日目を通じて細胞内グルタチオン量の減少が確認された。従って、*A. oryzae*でも*S. cerevisiae*と同様にグルタチオンをN源として利用していることが考えられる。以上の結果より、*A. oryzae*における細胞内グルタチオン量は環境ストレスの影響を受けることが示唆された。

醸造の際に麹菌は、蒸煮された米や大豆等の表面で40時間前後生育し、空気に直接晒されて酸化ストレスを受けている。他にも、種麹として用いられる分生子の発芽率に関しても酸化ストレス耐性が大きく影響することが示唆されている<sup>8)</sup>。ストレス耐性や分生子の発芽率が高く、さらに増殖率の高い菌株であれば培養が短時間で済み、効率的な物質生産が可能とることからコストの低減につながる。そのために産業界では、このような菌株の育種・利用が喫緊に求められている。また、グルタチオン自身にも、味覚におけるフレーバー（こく味）を増強する機能があるとの報告もある<sup>20)</sup>。しかし、現段階において日本では食品添加物として認可されていない。食品に利用可能な麹菌のグルタチオン高生産株の取得は、醸造食品の高付加価値化につながることを期待される。今後、グルタチオン強化麹菌株の育種にむけた基盤的知見を積み重ねることにより、醸造産業へのフィードバックを行いたい。

## 要 約

グルタチオンは生体内に存在するトリペプチドであり、様々なストレス耐性に関与していることが知られている。本研究では醸造用麹菌である*Aspergillus oryzae* RIB40のフィルター培養条件下における細胞内グルタチオン含有量の経時的変化を測定した。分生



子接種後2-3日で細胞内グルタチオン量が最大となり、4日目には低下した。また、最少培地での培養を2日間行った後、環境ストレスとして設定した、酸化ストレス区 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>添加培地)、重金属ストレス区 (Cd添加培地)、飢餓ストレス区 (N源欠乏培地)での培養を継続して行った。グルタチオン含有量の変動を調べたところ、対照区と比較して酸化ストレス区では変化は見られなかったが、重金属ストレス区では一時的な上昇が見られた。また、飢餓ストレス区ではグルタチオン含有量は総じて減少していた。このことから、*A. oryzae*において細胞内グルタチオン量は環境ストレスの影響を受けることが示唆された。

### 引用文献

- 1) Pocsí, I., Prade, R.A. and Penninckx, M.J., Glutathione, Altruistic Metabolite in Fungi, *Adv. Microb. Physiol.*, **49**, 1-76 (2004).
- 2) Wang, M., Sun, J., Xue, F., Shang, F., Wang, Z. and Tan, T., The Effect of intracellular Amino Acids on Production by High-cell-density Cultivation of *Saccharomyces cerevisiae*, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **168**, 198-205 (2012).
- 3) Pocsí, I., Molnár, Z.S., Pusztahelyi, T., Varecza, Z. and Emri, T., YEAST-LIKE CELL FORMATION AND GLUTATHIONE METABOLISM IN AUTOLYSING CULTURES OF *PENICILLIUM CHRYSOGENUM*, *Acta Biol. Hung.*, **58**, 431-440 (2007).
- 4) Emri, T., Pocsí, I. and Szentirmai, A., Phenoxylacetic acid induces glutathione-dependent detoxification and depletes the glutathione pool in *Penicillin chrysogenum*, *J. Basic Microbiol.*, **37**, 181-186 (1997).
- 5) Emri, T., Sami, L., Szentirmai A. and Pocsí, I., Coordination of the nitrate and nitrite assimilation, the glutathione and free radical metabolisms, and the pentose phosphate pathway in *Penicillium chrysogenum*, *J. Basic Microbiol.*, **39**, 109-115 (1999).
- 6) Oh, Y.T., Ahn, C.S., Kim, J.G., Ro, H.S., Lee, C.W. and Kim, J.W., Proteomic analysis of early phase of conidia germination in *Aspergillus nidulans*, *Fungal Genet. Biol.*, **47**, 246-253 (2010).
- 7) 坂本和俊, 麹菌胞子の耐久性にかかわる遺伝子の発現制御機構について, 醸協, **105**, 762-769 (2010).
- 8) Sakamoto, K., Iwasita, K., Yamada, O., Kobayashi, K., Mizuno, A., Akita, O., Mikami, S., Shimoi, H. and Gomi, K., *Aspergillus oryzae atfA* controls conidial germination and stress tolerance, *Fungal genet. Biol.*, **46**, 887-897 (2009).
- 9) 佐野元昭, 小林亜希子, 町田雅之, 大箸信一 麹菌フィルター培養条件下での解析, 第5回糸状菌コンファレンス要旨集, p. 40, 東京 (2005).
- 10) Ohmori, S., Nawata, Y., Kiyono, K., Murata, H., Tsuboi, S., Ikeda, M., Akagi, R., Morohashi, K-I. and Ono, B-I., *Saccharomyces cerevisiae* cultured under aerobic and anaerobic conditions: air-level oxygen stress and protection against stress, *Biochim. Biophys. Acta*, **1472**, 587-594 (1999).
- 11) Stephen, D.W.S. and Jamison, D.J., Aminoacid-dependent regulation of the *Saccharomyces cerevisiae GSH1* gene by hydrogen peroxide, *Mol. Microbiol.*, **23**, 203-210 (1997).
- 12) Sato, I., Shimizu, M., Hoshino, T. and Takaya, N., The Glutathione System of *Aspergillus nidulans* Involves a Fungus-specific Glutathione S-Transferase, *J. Biol. Chem.*, **284**, 8042-8053 (2009).
- 13) Dormer, U.H., Westwater, J., McLaren, N.F., Kent, N.A., Mellor, J. and Jamieson, D.J., Cadmium-inducible expression of the yeast *GSH1* gene requires a functional sulfur-amino acid regulatory network, *J. Biol. Chem.*, **275**, 32611-32616 (2000).
- 14) Li, Z.S., Lu, Y.P., Zhen, R.G., Szczypka, M., Thiele D.J. and Rea P.A., A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalyzed transport of bis(glutathionato)cadmium, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 42-47 (1997).
- 15) Adamis, P.D., Panek, A.D. and Eleutherio, E.C., Vacuolar compartmentation of the cadmium-glutathione complex protects *Saccharomyces cerevisiae* from mutagenesis. *Toxicol. Lett.*, **173**, 1-7 (2007).
- 16) Adamis, P.D., Mannarino, S.C., Riger, C.J., Duarte, G., Cruz, A., Pereira M.D. and Eleutherio, E.C., Lap4, a vacuolar aminopeptidase I, is involved in cadmium-glutathione metabolism. *Biometals*. **22**, 243-249 (2009).
- 17) Fraser, J.A., Davis, M.A. and Hynes, M.J., A Gene from *Aspergillus nidulans* with Similarity to *URE2* of *Saccharomyces cerevisiae* Encodes a Glutathione S-Transferase Which Contributes to Heavy Metal and

- Xenobiotic Resistance, *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 2802–2808 (2002).
- 18) Mehdi, K. and Penninckx, M.J. An important role for glutathione and  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase in the supply of growth requirements during nitrogen starvation of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Microbiology*. **143**, 1885-1889 (1997).
- 19) Emri, T., Molnar, Z., Pusztahelyi, T. and Pocs, I., Physiological and Morphological Changes in Autolyzing *Aspergillus nidulans* Cultures. *Folia Microbiol.*, **49**, 277-284 (2004).
- 20) Ueda, Y., Yonemitsu, M., Tsubuku, T., Sakaguchi, M. and Miyajima, R., Flavor Characteristics of Glutathione in Raw and Cooked Foodstuffs, *Biosc. Biotechnol. Biochem.*, **61**. 1977-1980 (1997).