

アスペルギルス属カビの生育環境特異的な遺伝子発現制御の分子機構

●五味 勝也 ◆阿部 敬悦

東北大学大学院農学研究科

〈研究の目的と進め方〉

アスペルギルス属カビの各種生育・培養条件、特に固相と液体環境下で特異的に発現する遺伝子群をゲノムおよびEST情報とDNAマイクロアレイを利用して検索し、発現に関与する転写・翻訳制御因子を解明するとともに、浸透圧などの生育環境を認識して応答制御を行うための情報伝達機構を解明する。

〈研究開始時の研究計画〉

① 麹菌ゲノム情報およびマイクロアレイ解析情報を利用した培養環境特異的な発現遺伝子の検索とプロモーター解析

麹菌のゲノム情報と各種培養条件下の菌体から得られたEST情報を利用して、固相および液体培養で特徴的な発現を示す遺伝子を探査する。また、種々の培養条件におけるマイクロアレイ解析を行い、培養環境に特異的な発現様式を示す遺伝子を検索同定する。これまで取得済の特異的な発現遺伝子と併せてプロモーター領域の配列をもとに、共通モチーフを検索する。

② 麹菌ゲノム情報を利用した形態形成・環境応答関連遺伝子の検索と機能解析

麹菌ゲノム解析データベースから形態形成および菌糸成長に関与する遺伝子ホモログならびに、環境応答センサーキナーゼや酵母HOG1経路の構成遺伝子ホモログを検索し、機能相補性等を調べることで機能解析を行う。

③ 形態形成・環境応答関連遺伝子の破壊・発現制御株における遺伝子発現プロファイル解析

分生子形成に関与する転写因子brlA遺伝子ならびに二成分性情報伝達系の浸透圧センサーキナーゼtcsB遺伝子の破壊・発現制御株について、固相環境下または浸透圧をはじめとするストレス条件下における遺伝子発現プロファイル解析を行い、形態分化や環境応答における情報伝達系の標的遺伝子候補を同定する。

〈研究期間の成果〉

① 麹菌のEST解析データをもとに重要なクローン約2,000個選択して作製したcDNAマイクロアレイを用いて、液体及び固体培養菌体における発現プロファイル解析を行った結果、液体培養および固体培養菌体における発現プロファイル解析を行った結果、EST解析で得られた発現頻度情報とほぼ一致することが確認された。また、グルコース液体培養で発現量が高い解糖系やTCA回路の遺伝子群は固体培養では発現が抑制されている一方で、多糖類分解酵素遺伝子群は発現が高くなっていった。固体培養では培地中の水分が少なく、栄養源も不溶性で分解速度が遅いため供給が律速されることから、カタボライト抑制が解除されることが示唆された(文献1)。

② 試作マイクロアレイを用いて各種培養条件下での遺伝子発現プロファイルを解析したところ、固体培養でのみ発現すると考えられていたbrlAやrolAなどの形態分

化に関わる遺伝子の発現が疎水性の高い物質を炭素源とする液体培養で認められた。それと同時にリパーゼの一種であるクチナーゼ遺伝子(cutL1)の発現も認められたことから、転写因子であるbrlAやその下流に存在するabaAの遺伝子破壊株を用いて発現解析を行った結果、cutL1はbrlAの支配下に制御されることが明らかになった。さらに、RolAは通常は固体培養下で形成される分生子細胞壁に存在するが、疎水性基質を含む液体培養で生産されることから、その機能について解析した結果、疎水性基質に吸着し立体構造を変えることにより、クチナーゼをリクルートして疎水性基質の分解を促進する役割を果たすことが明らかとなった。(文献2)

③ 固体培養ならびに発芽分生子で発現が高いチアミン抑制遺伝子(thiA、nmtA)のプロモーターおよび5'非翻訳領域の解析を行ったところ、5'非翻訳領域に存在するイントロンのスプライシングが発現制御に関与しており、そのイントロン内に細菌で報告されたりボスイッチ様構造が見出され、真核生物でリボ制御の存在を初めて示唆する結果を得た(文献3)。

④ 麹菌のゲノム解析を完了し全ゲノム情報を明らかにした(文献4)と同時に、類縁菌のAspergillus nidulansおよびAspergillus fumigatusのゲノム解析にも協力してAspergillus属カビの比較ゲノム学的解析を行った(文献5)。得られたゲノム情報をもとにリボスイッチ構造を持つ遺伝子を検索したところ、thiA、nmtAに加えてもう1種類の遺伝子(tpnA)を見出したが、チアミンの有無にかかわらず発現は認められなかった。プロモーター領域の不完全性が発現しない原因と考え、nmtAのプロモーターに置換して発現を調べたところ、チアミンによる制御を受けることを見出し、本遺伝子のリボスイッチも機能することを明らかにした。

⑤ 麹菌のゲノム情報とEST情報を対応させることにより、解糖系の重要な酵素であるエノラーゼ(enoA)及びグリセルアルデヒド3リン酸脱水素酵素(gpdA)の遺伝子が培養条件特異的に異なる転写開始点を用いているという可能性を見出した。両者ともに固体培養では翻訳開始コドンよりもそれぞれ520、160 bpほど上流から転写され、5'非翻訳領域(5'UTR)内のイントロンがスプライシングされる。一方、グルコースを炭素源とする液体培地では、両者ともに5'UTRのイントロン内から転写が開始されることが示唆された。各種炭素源を含む、または炭素源飢餓の培地で液体培養した細胞について、異なる転写開始点から転写されたenoAのmRNA量を定量PCRによって解析した。その結果、炭素源飢餓および酢酸やエタノールのような糖新生を伴う炭素源の培養では、翻訳開始点の上流-530 bp付近から主として転写が開始され、グルコースやフルクトースのような解糖系で代謝される糖類を炭素源とする培養では、-50 bp付近から転写されることが明らかとなった。

⑥ 生育環境の浸透圧応答に関わると予想される

*Aspergillus nidulans*より単離したヒスチジンキナーゼ遺伝子 (*tcsB*) は酵母のHOG1経路の*sln1*変異を相補し、カビで初めての膜貫通型の浸透圧センサーであったが、遺伝子破壊によって顕著な表現型の変化は認められなかった。*A. nidulans*は、高浸透圧応答に関わる酵母のHOG1経路構成遺伝子を持つにもかかわらず、酵母とは全く異なり、ヒスチジンキナーゼ遺伝子 (*tcsB*) 及びMAPK遺伝子 (*hogA*) の欠損株は目だった表現型を示さなかった。そこで、*hogA*の上流にあるMAPKK (*pbsB*) 及びMAPKKK (*sskB*) の活性化型変異体を作製したところ、高浸透圧下で菌糸伸長阻害を受けた。一方、ゲノム情報から*Aspergillus*カビではヒスチジンキナーゼが15種類存在することを明らかにした。情報伝達系については、*A. nidulans*を用いてHOG経路を構成する二成分性及びMAPKカスケード遺伝子群の機能を調べている。HOG経路の上流浸透圧センサーを構成する二成分性情報伝達系*tcsB-ypdA-sskA*のそれぞれの遺伝子を単離し、酵母の当該遺伝子変異の相補性を調べ、ヒスチジン(His)キナーゼ-リン酸基伸介因子-レスポンスレギュレーターとして機能することを確認した。しかし、*tcsB*破壊株は表現型を示さなかった。*ypdA*はその単独破壊株を取得できず、必須遺伝子と考えられた。*sskA*破壊株とセンサー経路下流のMAPKKK (*SskB*)、MAPKK (*PbsB*) 遺伝子破壊株はMAPK (*HogA*) 破壊株と同程度の高浸透圧感受性を示し、いずれの破壊株でも*HogA*のリン酸化が認められなかった。以上の結果と、*PbsB*が酵母のもう一つの浸透圧センサー*Sho1p*のホモログである*ShoA*とは相互作用を示さなかったことから、*A. nidulans*のHOG経路は酵母のそれとは異なり*SskA*→*SskB*→*PbsB*→*HogA*という単独直線路であることが明らかとなった。また、これらの遺伝子破壊株が顕著な高浸透圧感受性を示さなかったことから、カビには他に未知の高浸透圧応答システムが存在する可能性が示唆された(文献6))。

〈国内外での成果の位置づけ〉

- ①2,000個という限られた遺伝子であるが、麹菌のcDNAマイクロアレイにより固体培養における遺伝子の特徴的な発現プロファイルを解析できたことから、マイクロアレイを使用して対象酵素のみならずエネルギー代謝遺伝子群の転写状態をモニタリングすることにより、産業現場での培養プロセスの最適化が可能であることが示された。ゲノム解析完了により、全遺伝子を搭載したマイクロアレイの開発が可能となり、産業界からのアレイ解析に対する要望が大きく、アレイの供給と解析を行うバイオベンチャーが設立されることにつながった。
- ②これまで、疎水性基質の分解に関わる酵素の探索とその機能については多くの報告があったが、今回見出された*RoIA*が疎水性基質へ分解酵素をリクルートすることにより分解を促進する機能を有することは初めての発見であり、微生物による疎水性基質の分解機序に新たな知見をもたらした。
- ③ゲノム情報とEST情報を対応させることにより、細菌で見出されていたリボスイッチ構造が真核生物である麹菌にも存在していることが初めて発見された。麹菌のリボスイッチは、細菌などの原核生物のものとは異なり、5'-非翻訳領域のイントロン内に存在しているが、麹菌のようなカビと同じ真核微生物で、モデル生物として汎用されている酵母にはこのようリボスイッチの存在は見出されていない。遺伝子内にイントロンを

あまり持たない酵母には存在せず、カビのイントロン内に存在することの進化的な意義や、スプライシングを介した遺伝子発現制御という原核生物とは異なった新規の発現制御機構の解明に大きく貢献することが期待できる。

- ④解糖系の酵素遺伝子の発現制御は、主として解糖、すなわちグルコースやフルクトースなどの糖類の代謝という観点から解析がされてきており、糖新生を伴って資化されるような炭素源(酢酸やエタノールなど)での発現制御についてはあまり重点が置かれて解析がなされておらず、炭素源によって異なる転写開始点を利用されるという現象も全く知られていない。解糖系という生物の基幹代謝経路の重要な酵素遺伝子の転写が、炭素源の違いにより500 bpも離れた位置から開始されるということはこれまで報告されておらず、全く新規な発見であり、新たな解糖系酵素遺伝子の炭素源代謝における応答機構を提示することができると期待される。
- ⑤*A. nidulans*のヒスチジン・キナーゼを介する二成分性情報伝達経路*TscB-YpdA-SskA*の*TscB*が、酵母のホモログ*Sln1p*と同じような機能を示すにもかかわらず、 Δ *tcsB*は目だった表現型を示さず、*TscB*とは異なる*YpdA*にリン酸基を転移するセンサーキナーゼの存在が示唆された。さらに、カビの高浸透圧応答が形態形成や生育とリンクしていることが示唆されたことから、このような情報伝達経路を標的とした抗カビ剤スクリーニング系の開発基盤の確立につながっている。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

予算的な問題もあり、麹菌の*A. oryzae*のフルゲノムアレイの作製が遅れたことにより、全遺伝子についての培養特異的発現プロファイル解析が不十分となり、固体培養特異的な発現に関わる転写因子の候補遺伝子までは見出せなかった。また、米国のコンソーシアム事業から供給される予定であった*A. nidulans*のDNAマイクロアレイの出荷が大幅に遅れて期間内に入手できなかったため、シグナル伝達系の遺伝子破壊株についてのアレイ解析を行うまでにはいたらなかった。

〈今後の課題〉

遅れていた*A. oryzae*および*A. nidulans*のDNAマイクロアレイの利用が可能になったことから、各種培養条件下ならびに遺伝子破壊株や強制発現株を用いたアレイ解析を行い、固体培養特異的な発現を示す有用遺伝子(グルコアミラーゼなど)とシグナル伝達系の遺伝子の発現制御ネットワークの解明を進める。また、シグナル伝達系については、ゲノム情報から見出された15種類のHisキナーゼ破壊株の取得解析に加え、各Hisキナーゼの生育段階特異的、部位特異的な発現プロファイル及び局在部位を明らかにし、それらの機能的相連を探る。以上の研究は、特定領域研究の「応用ゲノム」で引き続き進展させることとしている。リボスイッチおよび解糖系の遺伝子発現制御についても新規の現象を見出したことから、その機能や遺伝子発現制御機構を解明することが重要である。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

- 1) H. Maeda, M. Sano, Y. Maruyama, T. Tanno, T. Akao, Y. Totsuka, M. Endo, R. Sakurada, Y. Yamagata, M. Machida, O. Akita, F. Hasegawa, K. Abe, K. Gomi, T. Nakajima, Y. Iguchi: Transcriptional analysis of genes

- for energy catabolism and hydrolytic enzymes in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae* using cDNA microarrays and expressed sequence tags, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 65, 74-83 (2004)
- 2) T. Takahashi, H. Maeda, S. Yoneda, S. Ohtaki, Y. Yamagata, F. Hasegawa, K. Gomi, T. Nakajima, K. Abe: The fungal hydrophobin RolA recruits polyesterase and laterally moves on hydrophobic surfaces, *Mol. Microbiol.*, 57, 1780-1796 (2005)
- 3) T. Kubodera, M. Watanabe, K. Yoshiuchi, N. Yamashita, A. Nishimura, S. Nakai, K. Gomi, H. Hanamoto: Thiamine-regulated gene expression of *Aspergillus oryzae* thiA requires splicing of the intron containing a riboswitch-like domain in the 5'-UTR., *FEBS Lett.*, 555, 516-520 (2003)
- 4) M. Machida et al (64名), K. Gomi (12th), K. Abe (11th): Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature*, 438, 1157-1161 (2005)
- 5) W. Nierman et al (97名, K. Gomi (29th), K. Abe (8th)): Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature*, 438, 1151-1156 (2005)
- 6) K. Furukawa, Y. Hoshi, T. Maeda, T. Nakajima, K. Abe: *Aspergillus nidulans* HOG pathway is activated only by two-component signalling pathway in response to osmotic stress. *Mol. Microbiol.*, 56, 1246-1261 (2005)