

ゲノム情報から探るコウジカビの有用物質生産機構の分子基盤

●五味 勝也¹⁾ ◆阿部 敬悦¹⁾ ◆小林 哲夫²⁾ ◆北本 勝ひこ³⁾

1) 東北大学大学院農学研究科 2) 名古屋大学大学院生命農学研究科 3) 東京大学大学院農学生命科学研究科

＜研究の目的と進め方＞

コウジカビに属する産業菌である麹菌 (*Aspergillus oryzae*) とその近縁種 *Aspergillus nidulans* の全ゲノム情報をもとに、ポストゲノム科学的手法によって、カビの有用物質、特に有用タンパク質生産に関わる多様な遺伝子機能を解明し、それらの遺伝子的人為的コントロールによるタンパク質生産性の向上を図ることを目的とする。具体的には、カビでは培養条件（液体または固体培養の違い）によりタンパク質生産性に差が認められることから、コウジカビのゲノム情報より見出された環境応答に関わる情報伝達系および転写因子遺伝子の変異株（遺伝子破壊または条件的発現制御株）を造成し、それらの生育ならびにタンパク質生産に及ぼす影響を調べる。それと同時に、マイクロアレイによる遺伝子発現プロファイル解析することにより、コウジカビのタンパク質分泌生産に関わる遺伝子発現制御ネットワークを明らかにする。また、情報伝達系、転写因子ならびにタンパク質分泌に関与する遺伝子および遺伝子産物の機能を分子生物学・細胞生物学的手法により解明する。さらに、タンパク質分泌生産に関与することが明らかとなった遺伝子について、高発現または発現抑制（遺伝子破壊）することによって有用タンパク質高生産システムの構築を図る。

＜2007年度の研究の当初計画＞

① 転写因子遺伝子破壊及び条件の高発現株ライブラリーの作製とトランスクリプトーム解析：麹菌ゲノムデータから検索されたZn(2)-Cys(6)型転写因子を対象とする網羅的な条件の高発現株ライブラリー作製を完了する。高発現株ライブラリーをもとに、産業的に有用な酵素生産に関与する転写因子をプレートアッセイによりスクリーニングし、マイクロアレイ解析により転写因子が制御する遺伝子群の発現制御ネットワークを明らかにする。高頻度相同組換え株を宿主に用いて、有用分解酵素生産に関与する転写因子を対象として遺伝子破壊株を構築する。

② 情報伝達系関連遺伝子破壊株ライブラリーの作製とトランスクリプトーム解析：*A. nidulans*の二成分性情報伝達系のヒスチジンキナーゼ (HK) 15種及びResponse Regulator (RR) 4種について、全ての遺伝子破壊株の作製を完了し、破壊による表現型などへの影響を調べる。各HK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、それらの機能的相違を探る。また、15種類のHKから1種類のHPT、4種類のRRへのリン酸基の受け渡しを*in vitro*で詳細に検討し、リン酸リレーの全貌を明らかにする。

③ タンパク質分泌関連遺伝子群の機能解析とタンパク質生産への利用基盤の確立：タンパク質分泌・膜輸送に関わる遺伝子とGFPとの融合タンパク質を網羅的に作製して細胞内局在ならびに生きた細胞を用いてこれらの動態解析を行う。異常分泌タンパク質高発現株の過剰糖鎖付加現象を解析し、異種タンパク質分泌との関連を明らかにする。また、プロテアーゼ生産に関与する転写因子の制御ネットワークを解析するとともに、これ以外の異種タンパク質分解に関わる他の要因も探索する。

＜2007年度の成果＞

① 1) 麹菌の転写因子遺伝子のコード領域を α -アミラーゼ遺伝子 (*amyB*) プロモーターに連結したベクターを構築し、麹菌に1コピー導入して条件の高発現株を造成している。公表した当初のゲノム解析結果から推定された遺伝子のうち、約230種類のZn(2)-Cys(6)型については作製がほぼ完了した。GATA型 (6種類)、bZIP (8種類)、bHLH (10種類) についてもほぼ終了しているが、C2H2型 (約60種類) については6割程度の進捗状況である。一方、近年数種類のコウジカビのゲノム解析結果が公表されてきたことから、それらのデータも取り入れて再アノテーションを行うことにより、当初推定されたものに加えて、新たに120種類のZn(2)-Cys(6)型転写因子が見出された。C2H2型の残りとして新たに見いだされたZn(2)-Cys(6)型

の転写因子の高発現株についても、高発現用ベクターの構築と麹菌への導入を順次進めており、2007年度内での完了を目指している。高発現株ライブラリーを利用して見出された有用分解酵素生産に関与する転写因子のうち、固体培養特異的な発現を示すグルコアミラーゼ遺伝子 (*glaB*) を制御すると考えられる転写因子は、高発現により*glaB*発現が液体培養条件下でも誘導され、液体培養上清中のグルコアミラーゼ活性が高くなっており、さらにウェスタン解析により、著量のグルコアミラーゼが生産されていることが確認されたが、 α -アミラーゼや他のグルコアミラーゼ (*glaA*) の発現には影響しなかった。転写因子破壊株の固体培養におけるグルコアミラーゼ活性も減少した。また、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子の発現に関与する転写因子の*araR*遺伝子の破壊株は、アラビノース資化能に欠損が見られ、資化に関わる遺伝子群のアラビノースによる誘導発現が顕著に低下していたことから、アラビナン代謝を正に制御する転写因子であると考えられた。

2) 高頻度で相同組換えが可能な宿主株として造成したDNAリガーゼIVホモログ遺伝子 (*ligD*) 破壊株は、通常の培養では親株と差は認められなかったが、高濃度のmethyl methanesulfonateに感受性を示すことが分かった。*ligD*破壊株を用いて得られた麹菌のMAP kinase遺伝子全5種類の破壊株のうち、麹菌にユニークな*mpkD*の破壊株は高浸透圧条件下での生育が*hogA*破壊株に比べても著しく低下しており、浸透圧応答における新たなMAP kinaseの関与が示唆された。

② 真菌の細胞壁構築はcell wall integrity経路によって制御されており、コウジカビにおいてもこの経路が存在し、本経路が糸状菌の形態形成に非常に重要な働きを担っていると考えられる。糸状菌-酵母間での細胞壁の構造や形態における差異が、経路下流のMAP kinase-転写因子-標的細胞壁関連遺伝子の関係に起因すると推定し、この三者の関係に注目した糸状菌の細胞壁構築の制御機構の解析を行った。*A. nidulans*のMAP kinase MpkA、Rlm1pオルソログRlmA、およびSBF (Swi4/6p) ホモログAnSwi4/6の遺伝子破壊株を造成し、 β -1,3-グルカン合成酵素阻害剤micafungin処理時の*mpkA*遺伝子の転写解析から、*A. nidulans*では出芽酵母と異なり、*mpkA*遺伝子の主要転写因子はRlmAでもSBFでもなく、MpkA下流の未知の転写因子が行っていることを明らかにした。また、*mpkA*、*rlmA*遺伝子破壊株における細胞壁関連遺伝子の転写解析により、*A. nidulans*では α -1,3-グルカン合成酵素遺伝子の転写制御はcell wall integrity経路を介してRlmAが行っていること、さらにcell wall integrity経路以外に細胞壁関連遺伝子の転写制御を行う未知のシグナル伝達経路が存在し、その経路は主に β -1,3-グルカンとキチンの合成関連遺伝子の転写制御を行っていることを明らかにした。さらに、麹菌より希少多糖である α -1,3-グルカンの大量分離法も確立した。

15種類のHisキナーゼ (HK) のうち、現在までに10種の遺伝子を破壊し、また、3種の高発現株を作製して、これら破壊株、高発現株の表現型を解析した。*nikA*の破壊は生育の著しい遅れを引き起こし、また、カビに特異的な薬剤に対して耐性となった。また、破壊株はキチンに特異的に結合するCalcofluor Whiteで染色されにくい。NikAは細胞壁合成に関与していると考えられた。*S. pombe* *phk1/2*、*phk3*のホモログである*phkA*、*phkB*の破壊株はわずかに過酸化水素耐性となり、*phkB*高発現株は感受性を示した。これらのHKは酸化ストレス応答に関与すると考えられる。赤色光応答に関与するとされる*fphA*や、配列からは機能が予測できない他のHKの破壊では、影響は見られなかった。唯一の例外が、名称未定のHKで、破壊により有性生殖の抑制が観察された。推定下流遺伝子群の発現解析の結果、本HKは嫌気応答に関与すると考えられた。一方、二成分制御系の最下流にあるResponse Regulator (RR) 4種についてはすべて破壊株を取得し、その表現型を観察した。結果は昨年度報告した通りである。

15種全てのHKについて、プロモーターとGFPとの融合遺伝子を構築し、*A. nidulans*に導入してGFP蛍光を顕微鏡観察した。TcsB、NikA、FphA、HK8-2、HK8-5は、無性生殖器官であるconidiophoreで強い発現が見られた。また、TcsB、PhkA、NikAは有性生殖器官であるcleistotheciaの内部で強い発現が見られた。これらのHKが分生子形成やcleistothecia形成などの分化過程で、重要な機能を持つことを示唆している。

コウジカビではHPt因子はYpdAの一種しか存在しないが、HKからHPtそしてRRへのリン酸基転移をin vitroで初めて検証することに成功した。15種のHK、HPt因子(YpdA)、2種のRR(SrrA、SskA)を大腸菌で発現・精製した。大腸菌のHKであるArcBを自己リン酸化させて用いることで、ArcBからYpdA、YpdAからSrrA、SskAへのリン酸基転移、ならびにYpdAからHKのFphAへの逆方向のリン酸基転移を確認した。

③オルガネラの構造や機能維持・タンパク質の分泌・エンドサイトーシスに必要とされる小胞輸送過程で、輸送小胞と特定のオルガネラ間の特異的認識・融合を担うSNAREタンパク質とRab GTPaseの網羅的局在解析を行った。これまでに、*A. oryzae*ゲノム情報を利用してSNAREタンパク質をコードすると予想される全21個の遺伝子とEGFPの融合タンパク質を発現し、SANREの局在の全体像を糸状菌で初めて明らかにすることに成功している。これに続いて、*A. oryzae*ゲノム情報を利用してRab GTPaseをコードすると予想される10個の遺伝子をクローニングし、そのN末にEGFPを融合したタンパク質として発現させた株を作製し蛍光顕微鏡により観察した。Rab GTPaseは輸送小胞が芽生する際に輸送小胞表面に集められ、目的のオルガネラへ間違いなく輸送されるためのタグのような働きをしている。その結果、EGFPとAoRab1、AoRab2、AoRab6の融合タンパク質は、Golgi体と思われる菌糸先端領域に多く見られるドット状構造体に局在が観察された。またAoRab4、AoRab11、AoSec4の融合タンパク質は、菌糸先端において点状または半月状に局在したことから、これらは菌糸先端の分泌に重要な働きをもつSpitzenkörperに存在していることが示唆された。現在、残りのRab GTPaseについても観察を続けている。これらの観察結果は糸状菌で初めてであり、小胞体、ゴルジ体、Spitzenkörperなどを含むオルガネラの空間的分布や相互関係を理解するために極めて重要な成果である。

*A. saitoi*由来の α -1,2-mannosidase (msd)の1アミノ酸置換による立体構造変異体を麹菌で過剰発現させると、小胞体におけるunfolded protein response (UPR)が引き起こされるとともに、興味深いことに変異型msdが過剰に糖鎖付加されたタンパク質として分泌されることが明らかとなった。分泌性の異常タンパク質は小胞体タンパク質分解機構(ERAD)で分解されることから、ubiquitin-protein ligaseである酵母*HRD1*のオーソログ*hrdA*を破壊したところ、変異型msdの菌体内への蓄積が観察された。このことは変異型msdがERADで分解をうけることを示している。一方、過剰に糖鎖付加の分泌タンパク質の品質管理機構への意義を明らかにするため、N型糖鎖形成の初期に関与するmannosyltransferaseである酵母*OCHI*のオーソログ*ochA*の破壊株を作製した。しかし、*ochA*破壊株では糖鎖付加量が若干減少したものの分泌量には違いは認められなかった。麹菌のゲノムには*OCHI*のホモログがもう1種類存在し、この遺伝子*ochB*の破壊株を作製して糖鎖付加及び分泌への影響を検討している。

タンパク質分解酵素群の転写制御に関与すると考えられる転写因子PrtRの破壊株では、異種タンパク質(ヒトリゾチーム)の分泌生産量の向上が認められ、プロテアーゼによる分解が抑制された。また、液胞に局在すると考えられるプロテアーゼPepEとの二重破壊株を作製したところ、リゾチーム生産量の増加が認められ、液胞局在型のプロテアーゼによる異種タンパク質分解の可能性が示唆された。さらに、PepEとPrtRの支配下にあると考えられるペプチダーゼのTppAの二重破壊株でもリゾチーム生産量が向上した。

<国内外での成果の位置づけ>

海外では産業菌である*A. niger*をはじめ他のコウジカビのゲノム解析も進行中であり、遺伝子機能解析が急速に進むと考えられる中で、本研究で極めて高い頻度の相同組換え用宿主株が開発できたことにより、高い優位性をもって網羅的な遺伝子破壊株作製が可能になった。転写因子と情報伝達系の遺伝子の網羅的条件制御変異株の作製と機能解析、ならびにSNAREタンパク質の網羅的な局在解析は、本研究が初めてのものである。また、固体培養特異的な遺伝子発現を制御する転写因子の発見は、糸状菌による酵素タンパク質の工業

生産にも大きく寄与する重要な成果である。二成分性情報伝達系については遺伝学的な解析が主に行われているが、本研究でHK→HPt因子(YpdA)→RRへのリン酸基転移を生化学的に証明したことは、世界的にも注目される成果であり、論文も高く評価された。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

麹菌ゲノム解析データの再アノテーションにより新たに多くのZn(2)-Cys(6)型転写因子候補遺伝子が見出されたことから、それらもあわせて網羅的高発現株作製に時間がかかり、有用分解酵素生産に関わる新規転写因子の探索が十分に行えなかった。しかし、今年度中にライブラリーが完成できる見込みなので、今後探索のスピードアップが可能である。

<今後の課題>

*A. oryzae*の転写因子遺伝子の条件的高発現株ライブラリーを活用して、まだ未発見の有用遺伝子発現に関わる転写因子を見出すとともに、重要な酵素生産に関与する転写因子の機能解析を詳細に行いたい。*ligD*破壊株を宿主として一般的に使用するには支障はないが、*Cre-loxP*などを利用して目的の遺伝子破壊後に*ligD*を正常型に戻すことが容易な宿主株の造成も試みる。

残りの5種類のHK破壊株の取得解析に加え、各HK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、それらの機能的相違を探る。また、15種類のHKから1種類のHPt、4種類のRRへのリン酸基転移過程を詳細に検討し、リン酸レールの全貌を明らかにする。細胞壁成分の β -1,3-グルカン及びキチンの生合成制御に関与するMAP kinase経路を解明する。

観察が終わっていない4つのRab GTPaseの局在解析ができれば、小胞輸送の総合的理解に大きく貢献すると思われる。また、今後Rab GTPaseのGTP結合型変異体やGDP結合型変異体を作製することにより、各小胞輸送ステップの詳細な理解を進めたい。さらに、過剰糖鎖付加現象と異種タンパク質分泌との関連や異種タンパク質分解に関わる因子を明らかにし、異種タンパク質の高分泌生産株の育種への利用を目指したい。

<成果公表リスト>

<論文>

- 1) 0705081703 T. Kobayashi, K. Abe, K. Asai, K. Gomi, P. R. Juvvadi, M. Kato, K. Kitamoto, M. Takeuchi, M. Machida: Genomics of *Aspergillus oryzae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 71, 646-670 (2007)
- 2) 0801291755 T. Akao, M. Sano, O. Yamada, T. Akeno, K. Fujii, K. Goto, S. Ohashi-Kunihiro, K. Takase, M. Yasukawa-Watanabe, K. Yamaguchi, Y. Kurihara, J. Maruyama, P. R. Juvvadi, A. Tanaka, Y. Hata, Y. Koyama, S. Yamaguchi, N. Kitamoto, K. Gomi, K. Abe, M. Takeuchi, T. Kobayashi, H. Horiuchi, K. Kitamoto, Y. Kashiwagi, M. Machida, O. Akita: Analysis of expressed sequence tags from the fungus *Aspergillus oryzae* cultured under different conditions. *DNA Res.*, 14, 47-57 (2007)
- 3) 0801291816 T. Fujioka, O. Mizutani, K. Furukawa, T. Nakajima, K. Abe: MpkA-dependent and -independent cell wall integrity signaling in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot. Cell*, 6, 1497-1510 (2007)
- 4) 0801291621 N. Azuma, K. Kanamaru, A. Matsushika, T. Yamashino, T. Mizuno, M. Kato, T. Kobayashi: In vitro analysis of His-Asp phosphorelays in *Aspergillus nidulans*: The first direct biochemical evidence for the existence of His-Asp phosphotransfer systems in filamentous fungi. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 71, 2493-2502 (2007)
- 5) 0801291827 M. Kuratsu, A. Taura, J. Shoji, S. Kikuchi, M. Arioka, K. Kitamoto: Systematic analysis of SNARE localization in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genet. Biol.*, 44, 1310-1323 (2007)
- 6) 0801291835 F.J. Jin, T. Watanabe, P. R. Juvvadi, J. Maruyama, M. Arioka, K. Kitamoto: Double disruption of the proteinase genes, *tpaA* and *pepE*, increases the production level of human lysozyme by *Aspergillus oryzae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 76, 1059-1068 (2007)
- 7) 0801291851 O. Mizutani, Y. Kudo, A. Saito, T. Matsuura, H. Inoue, K. Abe, K. Gomi: A defect of LigD (human Lig4 homolog) for nonhomologous end joining significantly improves efficiency of gene targeting in *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genet. Biol.*, in press (2008), doi: 10.1016/j.fgb.2007.12.010

<特許>

- 1) 0801291729 阿部敬悦, 水谷治, 五味勝也, 長谷川史彦: 特願2006-225295, 新規グルカンおよびその製法