

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⁾ ◇新谷 尚弘¹⁾

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、それらの遺伝子の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、1) 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について作製した変異株（遺伝子破壊または条件的発現制御株）ライブラリーを利用して、生育ならびにタンパク質生産に及ぼす影響を調べる。2) マイクロアレイによる遺伝子発現プロファイルを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。3) 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。4) 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。

<2008年度当初の研究計画>

①有用酵素遺伝子発現に関与する転写因子の探索とその機能解析
1) 転写因子高発現株ライブラリーを利用して、プレートアッセイにより産業上有用な分解酵素群の生産に関与する新規転写因子を見出す。有用酵素生産に関わる転写因子の遺伝子機能を解明するとともに、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。2) 固体培養特異的な発現を示すプロテアーゼやグルコアミラーゼの生産に関与する転写因子の機能解析を行うとともに、培養環境応答との関連性を明らかにする。

②情報伝達系関連遺伝子の網羅的機能解析
1) 二成分情報伝達系構成遺伝子 (HK, HPt, RR) の破壊株を用いたアレイ解析により、細胞壁合成や菌糸成長などに関わる新たな情報伝達系を明らかにすると同時に、最終標的遺伝子の機能解析を行い、環境変化や外界刺激に対する応答-情報伝達-転写制御のパスウェイを明らかにする。2) HKの*in vitro*におけるリン酸基転移反応を明らかにすると同時に、細胞局在性と遺伝子機能の関連を解明する。3) 麹菌の全MAPK遺伝子破壊株のアレイ解析ならびに固相培養における有用酵素生産を解析し、タンパク質や有用酵素生産と情報伝達系の関連を明らかにする。

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
1) 分泌タンパク質をGFPタグで標識し、膜輸送過程における小胞輸送の動態を超微視的に可視化し、菌糸細胞内の膜輸送系の全貌を解明する。2) 構造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。3) 異種タンパク質分解に関わるプロテアーゼなどの因子を探索し、遺伝子破壊などにより異種タンパク質の高発現株の育種に利用する。

<2008年度の成果>

①1) 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的高発現株のライブラリー化を図った。数種類のコウジカビのゲノム情報を参考にして再アノテーションを行い新たに見出された転写因子もあわせて、約350種類のZn(2)-Cys(6)型、約70種類のC2H2型について、網羅的な高発現株作製を行っているが、形質転換体の得られない株も認められ、完成にはもう少し時間がかかりそうである。すでにGATA型 (6種類)、bZIP (8種類)、bHLH (10種類) についてはほぼ終了している。一

方、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、 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。*araR*破壊株を用いたDNAマイクロアレイ解析により、16種の糖質分解酵素ならびにアラビノース代謝に関与する4種の酵素遺伝子を制御下遺伝子として同定した。ソルビトール代謝を制御する転写因子、多様な多糖分解酵素遺伝子の発現や分化に関与する広域転写因子も同定した。マルトース資化MALクラスターに存在する転写因子*MalR*の破壊株は、マルトースだけでなくデンプンの資化にも大きな影響が見られた。*malR*破壊株ではマルトースによる誘導初期における α -アミラーゼ生産量が顕著に低下しており、クラスター中のマルトースパーミアゼ*MalP*によるマルトースの細胞内取込みがデンプン分解酵素生産に重要であることが示された。興味深いことに、アレイ解析により、*malR*または*malP*破壊株では通常は発現がほとんど見られないMALクラスターのホモログクラスターの遺伝子の発現が顕著に増加していた。2) 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の高発現により*glaB*発現が液体培養条件下でも誘導され、液体培養上清中に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、破壊株の固体培養におけるグルコアミラーゼ活性の減少は僅かでは他の転写因子の関与の可能性が示唆された。

②1) *A. nidulans*において、*alcA*プロモーター制御の*ypdA*条件的破壊株を作製した。本株が生育不良を示すことから、*ypdA*遺伝子は致死性であると考えられた。*YpdA*の致死性には下流のRRおよびHogA MAPK経路が関与していると推測される。HogA MAPK経路特異的遺伝子について解析したところ、*ypdA*遺伝子の発現低下時に*gfdB*や*catA*遺伝子が発現誘導されていた。このことより、*ypdA*遺伝子の発現低下時にHogA MAPK経路が活性化されていることが明らかになった。さらに、*ypdA*遺伝子発現低下による致死性とHogA MAPK経路の活性化の関係を明らかにするために、*ypdA*条件的破壊株にHogA MAPK経路のMAPKK PbsB欠損を導入した。本株では、*ypdA*発現低下時にHogAは活性化されなかったが、依然として生育阻害を示した。この結果から、*YpdA*はRRのSskAおよびSrrAに対してリン酸転移能があることから、SskA(\rightarrow HogA)ではなく、SrrAが*YpdA*欠損時の致死性に関与することが示唆された。2) 15種全てのHKとGFPとの融合遺伝子の発現解析の結果から、TcsB、PhkA、NikA、FphA、HK8-2、HK8-5が分化過程で重要な機能を持つことが示唆された。これらの破壊の無性生殖、有性生殖に与える影響を解析し、HK8-2遺伝子が酸素濃度低下に伴う有性生殖の誘導に関与することを明らかにし、HysA (Hypoxia sensor A) と命名した。精製HysAは還元剤の存在下で自己リン酸化するため嫌気センサーであると考えられる。また、HysA高発現株は、NikA破壊株と類似の農薬耐性を示すことから、下流のシグナル分子に対して正と負に働く二種のHKが存在し、これらの協調によるHPtのリン酸化レベルが、分化に影響を与えることが示唆された。3) 麹菌の5種類のMAPK遺伝子破壊株ではセルラーゼ及びキシラナーゼ生産については大きな影響は認められなかった。一方、麹菌にユニークな*mpkD*の破壊株は、分生子の生存性が他の破壊株に比べて著しく低下しており、本MAPKが麹菌において重要な役割を果たしていることが示唆された。

③1) 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Rab GTPaseの網羅的局

在解析を行った。すでに、麹菌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。さらに、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。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。また、これらのRab GTPaseは、隔壁周辺にも観察された。AoRab53は菌糸の長軸にそって双方向に動くドット状の構造体として観察され、FM4-64との共局在からearly endosomeに存在することが示唆された。AoRab7, 51, 52については、細胞質全体に拡散した蛍光が観察され、局在するオルガネラの特定には至らなかった。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。現在、優性不活性型のAoRab1やAoRab11を導入した形質転換株を取得し解析をしている。2) 黒麹菌の1,2- α -mannosidaseの1アミノ酸変異により構造異常型となった酵素タンパク質を高発現させて細胞応答を比較した。変異型酵素は通常の発現レベルでは分泌されずに細胞内で分解されており、ER-associated degradation (ERAD) に関与するユビキチンリガーゼHrdAの破壊により、分解が抑制されたことから、ERAD系で分解を受けているものと考えられた。一方、高発現させると過剰に糖鎖付加された酵素タンパク質が分泌された。そこで、N型糖鎖形成の初期に関与するmannosyltransferase *OCH1*のオーソログ*ochA*の破壊株を作製したが、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。また、麹菌のフルゲノムアレイを用いた解析により、変異型酵素の高発現では*bipA*や*pdiA*などのUPRに関連した遺伝子群の発現が上昇しており、HacAのスプライシングも引き起こされていた。さらに、小胞体-ゴルジ体輸送に関与するCOPII complex形成に関わる酵母*SEC31*や*ERV29*のホモログの発現も亢進していることが明らかとなった。3) マイクロアレイを用いてクラスター解析を行い、培養とともに発現が上昇するプロテアーゼ遺伝子群を選択したところ、すでに破壊株のヒトリゾチーム生産向上が認められている*pepA*, *tpaA*, *alpA*のほかに、中性プロテアーゼ遺伝子*nptB*が見出された。また*nptB*破壊によりリゾチーム生産量の向上が認められた。転写因子PrtRと液胞プロテアーゼPepEとの二重破壊株を用いて、小麦フスマを基質とした固体培養によって*Cryptococcus*のクチャーゼを生産したところ、野生株では分解による生産量の顕著な低下が認められたのに対して、二重破壊株では分解が抑制されて生産量が著しく向上した。一方、同様に固体培養でヒトリゾチームを生産させた場合には、分解が抑制されなかった。固体培養では各種プロテアーゼが高生産されているため、リゾチームのように分解されやすいタンパク質は、*prtR*破壊によってもわずかに残存するプロテアーゼ活性によって分解されるが、比較的安定なタンパク質では*prtR*破壊によるプロテアーゼ活性低下の効果が大きく認められたものと考えられる。

<国内外での成果の位置づけ>

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Rab GTPase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。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、デンプン分解酵素生産に及ぼす誘導基質の細胞内取込み系の重要性、取込み系の欠損による補完型ホモログクラスターの発現上昇など、学術的のみならず応用面、特に有用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が得られている。*Aspergillus*属の分化が光と酸素濃度により制御されていることが知られていたが、後者に対するセンサーが世界で初めて同定された。また、麹菌にユニークなMAPKが重要な役割を果たしており、麹菌では他の*Aspergillus*とは異なったMAPKの機能分担を有することも新たな知見である。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

安定な形質転換体の取得に時間を要したため、麹菌ゲノムデー

タの再アノテーションにより新たに見出されたZn(2)-Cys(6)型転写因子候補遺伝子の網羅的な高発現株ライブラリー作製が完了できなかった。次年度前半までにはライブラリーを完成させ、有用酵素遺伝子の発現に関する新規転写因子の探索のスピードアップを図りたい。

<今後の課題>

麹菌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、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詳細な機能解析を行う。麹菌の全MAPKの培養条件特異的な有用酵素生産に及ぼす影響を調べる。同時に麹菌にユニークなMAPK MpkDの生育やストレス応答などへの関与について詳細に解析する。HPtからRRへのリン酸基転移は*in vitro*で実証したが、HKからHPtは世界的にも全く示されていない。HKの自己リン酸化の実験系に問題があったが、HysAで成功したので他のHKについても自己リン酸化条件を検討していく予定である。また、様々な環境下におけるHPtのリン酸化レベルの検出も試み、破壊株を利用して環境シグナルとHKの対応を図っていききたい。レスポンスレギュレーター SrrA 支配下の遺伝子群、及び細胞壁成分の 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。

Rab GTPaseの網羅的局在解析がほぼ終了したので、今後GTP結合型変異体やGDP結合型変異体を用いて、EGFPでタグを付加した分泌酵素の微視的な可視化などの詳細な解析を進めたい。過剰糖鎖付加現象や膜輸送関連遺伝子群の異種タンパク質分泌との関連や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す。

<成果公開リスト>

- 0806270928 A. Suzuki, N. Azuma, K. Kanamaru, M. Kato, T. Kobayashi: GFP-tagged expression analysis revealed that some histidine kinases of *Aspergillus nidulans* show temporally and spatially different expression during the life cycle. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 72, 428-434 (2008)
- 0806271009 S. Kimura, J. Maruyama, M. Takeuchi, K. Kitamoto: Monitoring global gene expression of proteases and improvement of human lysozyme production in the *nptB* gene disruptant of *Aspergillus oryzae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 72, 499-505 (2008)
- 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.*, 45, 878-889 (2008)
- 0806270942 K. Sakamoto, T. Arima, K. Iwashita, O. Yamada, K. Gomi, O. Akita: *Aspergillus oryzae atfB* encodes a transcription factor required for stress tolerance in conidia. *Fungal Genet. Biol.*, 45, 922-932 (2008)
- 0901161025 D. Hagiwara, A. Kondo, T. Fujioka, K. Abe: Functional analysis of C₂H₂ zinc finger transcription factor CrzA involved in calcium signaling in *Aspergillus nidulans*. *Curr. Genet.*, 54, 325-338 (2008)
- 0901161036 J. Shoji, M. Arioka, K. Kitamoto: Dissecting cellular components of the secretory pathway in filamentous fungi: insights into their application for protein production. *Biotechnol. Lett.*, 30, 7-14 (2008)
- 0901161048 M. Tokuoaka, M. Tanaka, K. Ono, S. Takagi, T. Shintani, K. Gomi: Codon optimization increases steady-state mRNA levels in *Aspergillus oryzae* heterologous gene expression. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74, 6538-6546 (2008)
- 0901161114 J. Maruyama, K. Kitamoto: Multiple gene disruptions by marker recycling with highly efficient gene-targeting background (Δ *ligD*) in *Aspergillus oryzae*. *Biotechnol. Lett.*, 30, 1811-1817 (2008)
- 0901161128 O. Mizutani, K. Furukawa, S. Ichiyanagi, Y. Matsuda, M. Tokuoaka, T. Fujioka, Y. Yamagata, K. Gomi, K. Abe: Alternative processing of proprotein(s) in *Aspergilli* *kexB* gene disruptants under hyperosmotic conditions. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 73, in press (2009)