

令和元年6月19日現在

機関番号：33919

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07679

研究課題名(和文) 糸状菌における鉄恒常性維持の主要制御因子HapXによる転写誘導・抑制の分子機構

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of transcriptional activation and repression by the major transcription factor of iron homeostasis in filamentous fungi

研究代表者

加藤 雅士 (KATO, Masashi)

名城大学・農学部・教授

研究者番号：70242849

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：HapXは申請者らが初めて見出した真菌類に特有の転写制御因子であり、広域転写因子 CCAAT-box結合因子と相互作用し、鉄を補欠分子族に含むような酵素や鉄取り込み系の遺伝子の転写を制御する。本研究では、モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* を用い、HapXとの相互作用するタンパク質のスクリーニング系を開発した。この系を用いて探索を行い、質量分析およびMASCOT解析により、2種類のタンパク質 Xip1 と Xip2 を同定することができ、それらの遺伝子も取得することにも成功した。現在、相互作用の詳細を解明するため、リコンビナントタンパク質および遺伝子欠失株の取得を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HapXは申請者らが初めて見出した菌類特有の転写因子であり、菌体内での鉄濃度の維持に重要な働きをしている。我々の発見を契機として、ヒトや動物および植物の病原性糸状菌(植物病原菌の大半が糸状菌である)の研究により、HapXがそれぞれの病原性に重要な働きをしていることが示されているので、HapXの機能を知ることが、それら病原性糸状菌の防除や治療法の開発に役立つ。今回の研究により、HapXと共同して働いている因子の候補が明らかとなり、HapXの働きの分子機構を明らかにする上で重要な手がかりを得たことになる。

研究成果の概要(英文)：HapX is a fungal specific transcription factor isolated by our group. HapX is interacting with the CCAAT-binding factor and represses the expression of the genes encoding iron-containing proteins such as aconitase, cytochrome c and catalase. Using *Aspergillus nidulans* as a model filamentous fungus we established a screening system for the interacting proteins with HapX. We identified two candidate proteins, Xip1 (HapX-interacting protein 1) and Xip2 (HapX-interacting protein 2) by MASS and MASCOT analyses. We have also isolated the genes, respectively and constructed plasmids for deletion of the genes and for the production of the recombinant proteins. We are currently examining in vitro interaction of HapX and Xips, and function of Xips.

研究分野：応用微生物学

キーワード：鉄のホメオスタシス 糸状菌 転写因子 HapX CCAAT Hap複合体 鉄硫黄クラスター 植物病原菌

1. 研究開始当初の背景

CCAAT-box は真核生物の典型的なプロモーターエレメントである。申請者らは *A. nidulans* および麹菌 *A. oryzae* より CCAAT 結合因子を生化学的手法で同定 (Hap 複合体と命名)、本因子が広域転写促進因子であることを明らかにしてきた。¹⁾ その研究の過程で申請者らは HapB/C/E 複合体と相互作用する因子 HapX を発見した。²⁾ 当初機能は不明であったが、その後の研究により以下のことが明らかにされていた (図 1)。³⁻⁷⁾

(1) HapX は鉄欠乏時に緊急的に鉄使用を押さえ、鉄の取り込みを亢進させる。³⁾

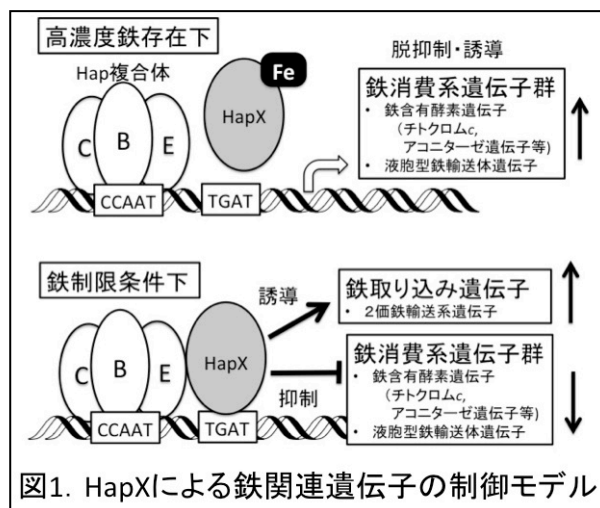
(2) 出芽酵母 *S. cerevisiae* には HapX のホモログが存在しない。³⁾

(3) 鉄欠乏時に HapB/C/E 複合体と HapX は相互作用し働く。³⁾

(4) HapX は転写の抑制・誘導の両方に働く 2 面性因子である。⁴⁾

(5) HapX は HapB/C/E との協調的 DNA 結合により、鉄関連遺伝子を認識する。⁵⁾

(6) HapX は病原性糸状菌 *A. fumigatus* やクリプトコッカスの感染に不可欠であり、臨床医学上重要な因子である。^{6, 7)}



当初、HapX による鉄関連遺伝子の制御の詳細が明らかになりつつある一方、HapX の転写誘導機構および抑制機構については、まだ不明な点が多かった。HapB/C/E 複合体との相互作用は明らかになっているが、鉄の感知の機構や転写制御機構を明らかにするにあたり、HapX と相互作用する因子 (例えば、ヒストンアセチラーゼやヒストンデアセチラーゼおよび基本転写因子との相互作用を媒介するアダプター因子など) の解析はまだ手つかずの状態であった。

糸状菌では我々のグループと A. A. Brakhage ら (独、Hans-Kunoell Institute) および H. Haas ら (オーストリア、Innsbruck Medical University) のグループが共同して解析を進めており、他に追従するグループはない状況であった。同様の研究が *S. pombe* やクリプトコッカスの研究グループでも進められていたが、既に *in vitro*, *in vivo* 両面で広範な解析を進めている我々のグループの方が、アドバンテージを持っていたが、この分野は今後急速に進展する可能性があったため、予断を許さない状況ではあった。申請者は当初より、リコンビナント HapB, HapC, HapE および HapX サブユニットからの HapB/C/E/X 複合体の再構成に成功しており、鉄関連遺伝子のプロモーターへの結合実験に成功していた。HapX は単独では DNA に結合できないが、bZip ドメインを有しており、鉄欠乏時に HapX と HapB/C/E 複合体との親和性が上昇すると、鉄関連遺伝子のプロモーターに存在する CCAAT-box とその下流の TGAT 配列に協調的に結合し、転写を抑制する (図 1 参照)。この時、TGAT 配列のない CCAAT-box のみのプロモーターには HapX は結合しないので、厳密に鉄関連遺伝子と他の HapB/C/E 依存の遺伝子とを区別することができることを明らかにした⁵⁾。

<引用文献>

- ① **Kato M. (単著)** An Overview of the CCAAT-binding factor in filamentous fungi: assembly, nuclear translocation and transcriptional enhancement. (Review) *Biosci. Biotech. Biochem.* 69, 663-672 (2005).
- ② Tanaka A., **Kato M. (責任著者)**, Nagase T., Kobayashi T., and Tsukagoshi N. Isolation of genes encoding novel transcription factors which interact with the Hap complex from *Aspergillus* species.

Biochim. Biophys. Acta, 1576, 176-182 (2002).

- ③ Hortschansky P., Eisendle M., Al-Abdallah Q., Schmidt A.D., Bergmann S., Thön M., Kniemeyer O., Abt B., Seeber B., Werner E.R., Kato M. (日本側責任者), Brakhage A.A., Haas H. Interaction of HapX with the CCAAT-binding complex—a novel mechanism of gene regulation by iron. *EMBO J.* 26(13):3157-3168 (2007).
- ④ Gsaller F., Hortschansky P., Beattie SR, Klammer V, Tuppatsch K, Lechner BE, Rietzschel N, Werner ER, Vogan AA, Chung D, Mühlhoff U, Kato M (日本側責任者), Cramer RA, Brakhage AA, Haas H. The Janus transcription factor HapX controls fungal adaptation to both iron starvation and iron excess. *EMBO J.* 33(19):2261-2276 (2014).
- ⑤ Hortschansky P, Ando E, Tuppatsch K, Arikawa H, Kobayashi T, Kato M (日本側責任者), Haas H, Brakhage AA. Deciphering the Combinatorial DNA-binding Code of the CCAAT-binding Complex and the Iron-regulatory Basic Region Leucine Zipper (bZIP) Transcription Factor HapX. *J. Biol. Chem.* 290, 6058-6070 (2015).
- ⑥ Schrettl M., Bschmann N., Varga J., Heinekamp T., Jacobsen I. D., Jöchl C., Moussa T. A., Wang S., Gsaller F., Blatzer M., Werner E. R., Niermann W.C., Brakhage A. A. and Haas H. HapX-mediated adaptation to iron starvation is crucial for virulence of *Aspergillus fumigates*. *PLoS Pathog.* 6(9): e1001124 (2010).
- ⑦ Jung W. H., Saikia S., Hu G., Wang J., Fung C. K., D'Souza C., White R., Kronstad J. W. HapX positively and negatively regulates the transcriptional response to iron deprivation in *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Pathog.* 6(11): e1001209 (2010).

2. 研究の目的

HapX は申請者らが初めて見出した真菌類に特異的な転写制御因子であり、広域転写因子 CCAAT-box 結合因子 (HapB/C/E 複合体) と相互作用し、鉄を補欠分子族に含むような酵素や鉄取り込み系の遺伝子 (以後、鉄関連遺伝子と称する) の転写を、鉄の存在量に応答して制御する。本研究では、モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* を用い、(1) HapX との相互作用するタンパク質 (転写調節に関する因子) を探索し、同定する。(2) HapX と相互作用タンパク質との相互作用の詳細を解明する。

以上の知見を総合し、真菌における鉄関連遺伝子の転写促進および抑制機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) HapX との相互作用因子の候補の選抜

申請者らは既に準備段階として、*hapX* 欠失株に TAP タグ (Tandem Affinity Purification Tag) を融合した HapX を発現する系を構築した。温和な条件で HapX を精製し、相互作用因子を取得することができる。また、鉄濃度を変えて培養し、試料を取得することで、相互作用するタンパク質の組成の変化も検討の対象とする。

(2) TOF-MS を用いた HapX と相互作用する因子の同定

(1) で得られた画分の電気泳動ゲルの主要なタンパク質バンドを切り出し、TOF-MS 等の質量分析器 (本学に現有する共通機器) で解析する。*A. nidulans* のゲノム配列は明らかになっているので、MASCOT 解析によりタンパク質を同定する。

(3) HapX と相互作用タンパク質候補との相互作用の検証

(2) の実験で得られたタンパク質の情報から遺伝子を取得する。得られた遺伝子 (cDNA) をもとに、

リコンビナントタンパク質を作製し、HapX とのプルダウンアッセイや HapB/C/E 複合体と組み合わせた DNA 結合実験 (EMSA) により、*in vitro* の実験系により相互作用の検証を行う。また、候補タンパク質の遺伝子の欠失株の取得をおこない、*in vivo* における候補タンパク質の役割を調べるための基盤を整備する。

4. 研究成果

(1) HapX との相互作用因子の候補の選抜

誘導プロモータ (*alcA* promoter) を用いて TAP タグ (Tandem Affinity Purification Tag) を融合した HapX を *hapX* 欠失株内で過剰発現する系を構築したが、誘導に伴い生育が悪くなり、解析が困難であることが判明したため、*hapX* のネイティブプロモータを利用した系を構築した。本コンストラクトでは、鉄欠乏条件下で HapX 依存のプロモータが正常に抑制されたため、この組換え HapX は正常に機能していることが分かり、相互作用因子のスクリーニングに取りかかった。TAP タグを用いた 2 段階アフィニティー精製を行った結果、HapX と相互作用することが予想される複数のタンパク質が検出された。

(2) 相互作用因子候補タンパク質の同定

(1) で得られた画分の電気泳動ゲルから候補タンパク質のバンドを切り出し、質量分析器および MASCOT 解析によりタンパク質を同定したところ、HapX と相互作用することが明らかとなっている HapB, HapC, HapE が含まれていることが明らかとなり、実験系が正常に機能していることが示された。同条件の実験により、さらに 2 種類のタンパク質が Xip1 (HapX Interacting Protein 1) と Xip2 (HapX Interacting Protein 2) を同定することができた。Xip1 は、ヒストン修飾酵素の一種であることが示唆され、転写調節に関与することが予測された。転写因子である HapB/C/E 複合体が行う転写調節に関わる可能性が推測されるため、解析を行う 1 つ目の候補とした。また、Xip2 はそのホモログが出芽酵母において多岐にわたる生命現象に関与することが既に報告されており、広域転写促進因子として様々な機能に関与する HapB/C/E 複合体との関与が考えられるため、解析する 2 つ目の候補とした。

(3) HapX との相互作用の検証

2 種類の候補タンパク質をコードする遺伝子を取得することに成功した。まず、*in vitro* での相互作用の検証のため、上記の 2 種類の因子に関して、大腸菌を用いた組換えタンパク質の調製を試みた。大腸菌を用いた異種タンパク質生産用のベクターを作製を終え、タンパク質の発現実験を行ったところ、極めて発現量が少ないことが明らかとなった。可溶性画分にも不溶性画分にも、組換えタンパク質が確認することはできず、検出限界以下であった。この理由として、タンパク質コード領域内のレアコドンの存在が一つの要因であると考えられた。今後も引き続き、発現の宿主を酵母に変えるなど、発現条件等の検討を行い、相互作用の検証を行っていく。すでに作成してあるリコンビナント HapX を用いてのプルダウンアッセイや EMSA の系に添加することによる相互作用検出系を試みる。また、2 つの候補タンパク質に関して、それらをコードする遺伝子の破壊カセットベクターを構築した、破壊株の取得を進めている。これらの遺伝子破壊株の取得により、*in vivo* での解析が格段に進むと思われる。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 7 件)

- (1) 辻上誠也、山下美春、村田俊輔、志水元亨、加藤雅士 (2018) 糸状菌の鉄恒常性維持に関与する転写因子 HapX の C-末端ドメインの機能解析. 日本生物工学会 2018 年度大会 9月6日 大阪

- (2) 加藤雅士 (2018) ゲノム情報を用いた新たな麹菌分子育種の可能性:第三の吟醸香成分ロイシン酸エチルの生成に関与する新規酵素 MOA reductase の研究を中心として 第 84 回酵母研究会(招待講演) 2018 年 3 月 6 日 京都
- (3) 村田俊輔、辻上誠也、山下美春、小森誠也、志水元亨、加藤雅士 (2017) 真菌特有の転写因子 HapX の鉄硫黄クラスター結合モチーフの解析 第 17 回糸状菌分子生物学コンファレンス 2017 年 11 月 17 日 佐賀 (佐賀市立東与賀文化ホール)
- (4) 辻上誠也、村田俊輔、小森誠也、志水元亨、加藤雅士 (2017) 糸状菌特有の転写因子 HapX の cysteine-rich 領域の機能解析 第 69 回日本生物工学会大会 2017 年 9 月 13 日 東京 (早稲田大学)
- (5) 村田俊輔、小森誠也、志水元亨、加藤雅士 (2016) 糸状菌特有の転写因子 HapX の cysteine-rich 領域の機能解析 第16回糸状菌分子生物学コンファレンス 11月17, 18日 京都
- (6) 村田俊輔、小森誠也、志水元亨、加藤雅士 (2016) 糸状菌の鉄恒常性維持を担う転写因子 HapX のシステインリッチ領域の機能解析 日本生物工学会 2016年度大会 9月30日 富山
- (7) 村田俊輔、小森誠也、志水元亨、加藤雅士 (2016) 糸状菌の鉄恒常性維持に関与する転写因子 HapX の C-末端領域ドメインの機能解析 日本農芸化学会 中部支部 第 177 回例会 9月24日 名古屋

〔図書〕(計 1 件)

- (1) 山根恒夫、中野秀雄、加藤雅士、岩崎雄吾、河原崎泰昌、志水元亨 (2016. 9. 1) 「新版 生物反応工学」(分担執筆) 産業図書.

〔紀要等〕(計 2 件)

- (1) Masaya TSUJIKAMI, Shunsuke MURATA, Miharu YAMASHITA, Motoyuki SHIMIZU and Masashi KATO, Analysis of proteins interacting with the HapB/C/E/X complex, the master regulator of iron homeostasis in filamentous fungi. Bulletin of Research Institute of Meijo University (ISSN 1344-8099). 23, 133-135 (2017)
- (2) Shunsuke MURATA, Hayato NAKAMURA, Motoyuki SHIMIZU and Masashi KATO, Interaction of HapX, the master regulator of iron homeostasis with the CCAAT-binding complex in filamentous fungi. Bulletin of Research Institute of Meijo University (ISSN 1344-8099). 21, 77-80 (2016).

〔その他〕

ホームページ等

名城大学 農学部 応用生物化学 科 応用微生物学研究室

<http://www-agr.meijo-u.ac.jp/labs/nn008/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名： 志水 元亨

ローマ字氏名：SHIMIZU, Motoyuki

所属研究機関名：名城大学

部局名：農学部

職名：准教授

研究者番号 (8 桁)：20423535

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。