

平成21年 6月 1日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19580088

研究課題名（和文） 麹菌 C C A A T 配列結合複合体による転写制御ネットワークの全体像

研究課題名（英文） An Overview image of the transcription network regulated by the CCAAT binding complex in *Aspergillus oryzae*

研究代表者

加藤 雅士（KATO MASASHI）

名古屋大学・大学院生命農学研究科・准教授

研究者番号：70242849

研究成果の概要：

本研究では麹菌 Hap 複合体により制御される遺伝子群を網羅的に同定し、それら遺伝子群の関連性を明らかにすることを目的とした。その結果、Hap 複合体はリボソームタンパク質遺伝子などの翻訳関連遺伝子を間接的に抑制することが明らかとなった。また、HapX と協調して鉄に関連した酵素（チトクローム c、アコニターゼなど）や鉄の取り込み系の抑制因子 SreA の遺伝子の発現を抑制することが明らかとなった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：微生物、ゲノム、マイクロアレイ、発現制御、糸状菌、転写因子、Hap 複合体、CCAAT-box

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のひとつである。CCAAT-box に結合する因子は酵母からヒトまでに存在し、それぞれ Hap 複合体および NF-Y（あるいは CBF）と呼ばれている。申請者らは麹菌 (*Aspergillus oryzae*) より CCAA 結合因子を生化学的手法で同定（Hap 複合体と命名）、本因子が様々な遺伝子の発現を上昇させる広域転写促進因子であることを明らかにしてきた。サブユニット HapB, HapC, HapE をコード

する遺伝子を単離し、分子生物学的解析を進めてきた。これらの因子を構成するサブユニットのアミノ酸配列には全真核生物を通じて相同性が見られたが、サブユニット構成および CCAAT 結合因子により制御される遺伝子（標的遺伝子）に違いが見られ、すべての真核生物において CCAAT 結合因子を統一的に理解するには至っていない。申請者らも含めたゲノム解析チームによって、麹菌ゲノムは解読が終了し (Machida *et al.* Nature 2005)、全ゲノム情報が利用できる。また、3,000 遺

伝子を搭載した DNA アレイも開発され実験に活用することができる。従って、麴菌 Hap 複合体のサブユニット遺伝子欠失株が取得できれば DNA アレイ解析により Hap 複合体の標的遺伝子の網羅的同定が可能である。しかし、糸状菌は酵母とは異なりランダムな遺伝子挿入が起こりやすく、ジーンターゲットングが難しいこと、さらに麴菌は多核であり、Hap 複合体のサブユニット遺伝子欠失株の生育および胞子着生が極めて悪いことが予想されるなど、再三の努力にも関わらず、単核である *A. nidulans* 以外は欠失株を取得できていない(*A. nidulans* ではまだ DNA アレイが実用段階になっていないため、麴菌を対象とした解析が必要である)。

ところが最近、DNA 結合ドメインに変異を導入した麴菌サブユニット (HapB-1M) をモデル糸状菌 *A. nidulans* において発現させると、正常な野生型 Hap 複合体の機能を阻害する、いわゆる優性阻害型 (Dominant negative) の表現型を示した。この変異遺伝子を麴菌内で発現させ、Hap 複合体の機能を抑えた株を作成し、これと野生株を DNA マイクロアレイにより解析することで標的遺伝子が検索できるのではないかとこの着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では麴菌 Hap 複合体により制御される遺伝子群を網羅的に同定し、それら遺伝子群の関連性を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 麴菌 Hap 複合体サブユニット変異遺伝子の優性阻害効果の解析

- ① ゲルモビリティシフトアッセイにより DNA 結合活性を調べた。
- ② GFP を融合した HapB-1M を用いて、蛍光顕微鏡により観察することにより、核への局在化能を調べた。
- ③ ³⁵S メチオニンラベルしたサブユニットを調製し、Hap 複合体の再構成実験をおこなうことにより、サブユニットアセンブリ能を調べた。

(2) *hapB-1M* 導入による麴菌 Hap 複合体機能抑制株の取得。

- ① 野生株へ *hapB-1M* を導入した。
- ② アレイ解析に適した株の取得。

(3) 麴菌マイクロアレイを用いた Hap 複合体の標的遺伝子群の網羅的同定とクローニング。

- ① マイクロアレイを用いて Hap 複合体依存の遺伝子の探索を行った。
- ② Hap 複合体依存の発現をする遺伝子 (標的遺伝子) の取得。

(4) 取得された遺伝子の転写が Hap 複合体依存であることをノーザンブロット法により再確認した。

(5) 取得された遺伝子のプロモーター領域に Hap 複合体が結合することを確認した。

(6) 取得された遺伝子のプロモーター領域に存在する CCAAT 配列が転写制御に関係があることを確認した。

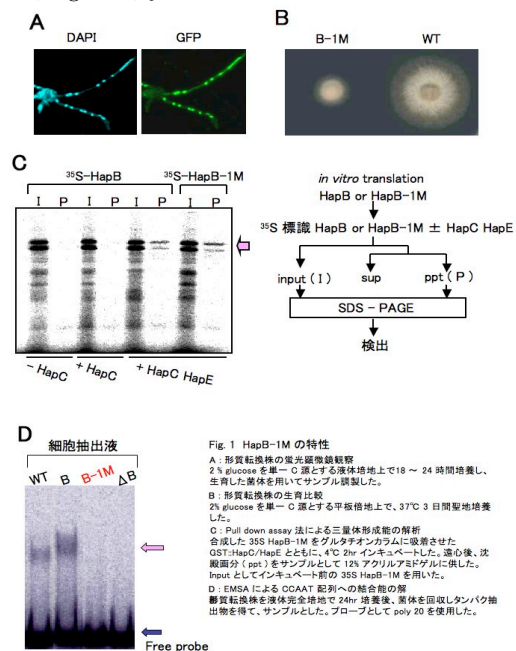
4. 研究成果

(1) 麴菌 Hap 複合体サブユニット変異遺伝子の優性阻害効果の解析

① GFP を融合した HapB-1M を用いて、蛍光顕微鏡により観察することにより、核への局在化能を調べた。その結果、核局在能は正常であることが分かった (Fig. 1A)。しかしながら、*hap* サブユニット遺伝子欠失株にみられる表現型 (遅い生育と分生子着生の不良) は相補せず、機能欠失型の変異であることが明らかとなった (Fig. 1B)。

② ³⁵S メチオニンラベルしたサブユニットを調製し、Hap 複合体の再構成実験をおこなうことにより、サブユニットアセンブリ能を調べたところ、野生型の HapB サブユニットと同様に、HapC/HapE とアセンブリしてヘテロ 3 量体を形成しうることが分かった (Fig. 1C)。

③ ゲルモビリティシフトアッセイにより DNA 結合活性を調べたところ、HapB-1M 株は DNA 結合能を有さないことが明らかとなった (Fig. 1D)。



(2) *hapB-1M* 導入による麴菌 Hap 複合体機能抑制株の取得。

① 麴菌 (野生株) へ *hapB-1M* を導入し、形質転換株 (GBM 1、GBM 2) を得た (Fig. 2A)。野生株に比べ、若干の生育不良と分生子着生能の低下 (Fig. 2A, B) が見られた。

② Hap 複合体に依存して発現することが既に明らかになっているセルラーゼ EG-A の活性を調べたところ、欠失株ほどではないにしても、EG-A の明らかな活性低下がみられ Hap 複合体の機能抑制が起こることが確認確認された(Fig. 2C). このうち一株をアレイ解析に供した。

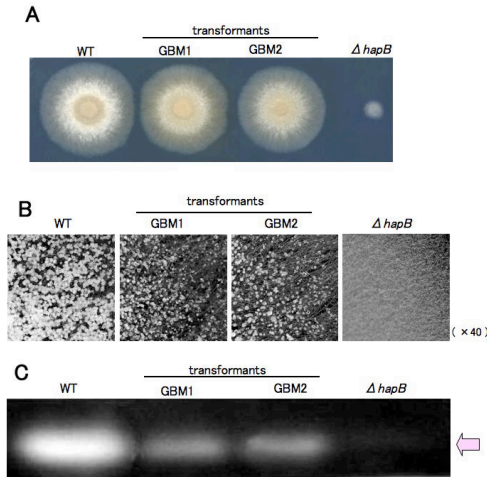


Fig 2 GFP::hapB-1M を用いた Hap 複合体依存遺伝子の人為的抑制
 A: 形質転換株の表型型
 1% starb⁺ を単一 C 菌として含む平板培地上で 37°C 2日間培養した。
 B: 形質転換株の胞子形成能の顕微鏡観察
 A の菌株を実体顕微鏡を使い倍率 40 倍で観察した。
 C: 形質転換株の EG-A 活性染色
 形質転換株を、合成培地で 24hr 培養後、3mM cellobiose で誘導をかけた 14hr 本培養後の培養上清をサンプルとした。サンプルのアライ量は菌株の乾重量で補正した。

(3) 麴菌マイクロアレイを用いた Hap 複合体の標的遺伝子群の網羅的同定とクローニング。
 ① マイクロアレイを用いて Hap 複合体依存で発現する遺伝子の探索を行った (Fig. 3)。

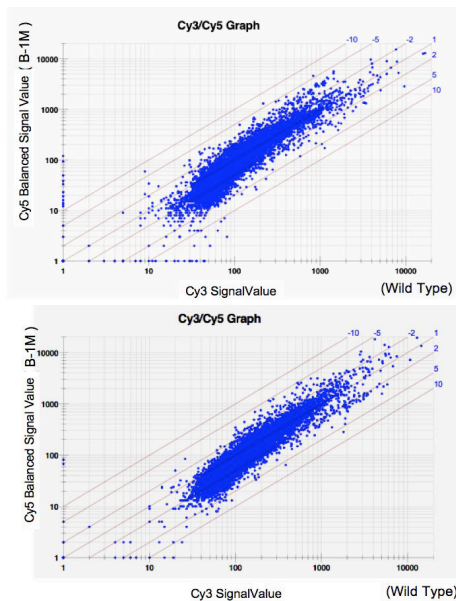


Figure 3 Cy5, Cy3 でそれぞれのRNAを標識した時の Scatter Plott

② Hap 複合体依存の発現をする遺伝子 (標的遺伝子) の取得。誘導される遺伝子に

ついては特に共通性も見られず、特徴的な遺伝子は見つからなかった。また、機能未知の遺伝子が大半を占めていた。一方、抑制される遺伝子に関しては、リボソーマルタンパク質遺伝子や翻訳開始因子遺伝子など翻訳に関わる遺伝子群が抑制されていることが分かった (図 4 はリボソーマルタンパク質遺伝子について解析したもの)。以後の解析のために代表的なリボソーマルタンパク質遺伝子を取得した。

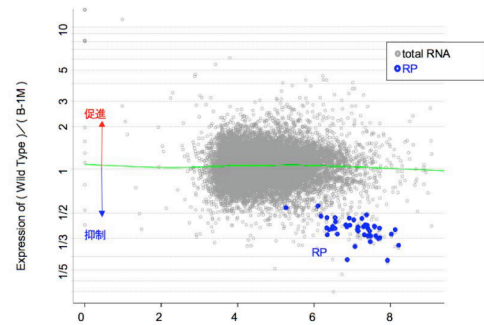


Figure 4 リボソーマルタンパク質群の変動

(4) 上記の研究で Hap 複合体によって抑制されていることが明らかになったリボソーマルタンパク質遺伝子について、これらの遺伝子の転写が Hap 複合体依存であることをノーザン解析により確認した。
 (5) いくつかの Hap 複合体依存の遺伝子のプロモーター領域に Hap 複合体が結合することをゲルシフト法、フットプリント法により解析した。特に HapB/C/E と相互作用する転写抑制因子 HapX との関係において DNA 結合特性を調べた。一方、リボソーマルタンパク質遺伝子に関してはプロモーターの全てに CCAAT 配列が存在するわけではないことから、間接的な抑制機構が推定された。そのため、DNA 結合解析は行わなかった。
 (6) 取得された遺伝子のプロモーター領域に存在する CCAAT 配列が転写制御に関係があることを確認した。Hap 複合体依存で転写制御される遺伝子群の代表的な遺伝子、特に HapX によって抑制される遺伝子に関して、プロモーター領域内に存在する CCAAT 配列および推定 HapX 結合配列を破壊し、lacZ をレポーターとしてプロモーター活性を調べた。

以上の結果、Hap 複合体はリボソーマルタンパク質遺伝子などの翻訳関連遺伝子を間接的に抑制することが明らかとなった。また、HapX と協調して鉄に関連した酵素 (チトクローム c、アコニターゼなど) や鉄の取り込み系の抑制因子 SreA の遺伝子の発現を抑制することが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

- ① Furukawa T, Shida Y, Kitagami N, Mori K, Kato M, Kobayashi T, Okada H, Ogasawara W, Morikawa Y. Identification of specific binding sites for XYR1, a transcriptional activator of cellulolytic and xylanolytic genes in *Trichoderma reesei*. Fungal Genet Biol. 2009. [印刷中]. 査読有.
- ② Makita T, Katsuyama Y, Tani S, Suzuki H, Kato N, Todd RB, Hynes MJ, Tsukagoshi N, Kato M, Kobayashi T. Inducer-dependent nuclear localization of a Zn(II)(2)Cys(6) transcriptional activator, AmyR, in *Aspergillus nidulans*. Biosci Biotechnol Biochem. 2009 ;73(2):391-399. 査読有.
- ③ Furukawa T, Shida Y, Kitagami N, Ota Y, Adachi M, Nakagawa S, Shimada R, Kato M, Kobayashi T, Okada H, Ogasawara W, Morikawa Y. Identification of the *cis*-acting elements involved in regulation of xylanase III gene expression in *Trichoderma reesei* PC-3-7. Fungal Genet Biol. 2008 ;45(7):1094-1102. 査読有.
- ④ Shida Y, Furukawa T, Ogasawara W, Kato M, Kobayashi T, Okada H, Morikawa Y. Functional analysis of the *egl3* upstream region in filamentous fungus *Trichoderma reesei*. Appl Microbiol Biotechnol. 2008 ;78(3):515-524. 査読有.
- ⑤ Suzuki A, Kanamaru K, Azuma N, Kato M, Kobayashi T. 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. 2008 ;72(2):428-434. 査読有.
- ⑥ Endo Y, Yokoyama M, Morimoto M, Shirai K, Chikamatsu G, Kato N, Tsukagoshi N, Kato M, Kobayashi T. Novel promoter sequence required for inductive expression of the *Aspergillus nidulans* endoglucanase gene *eglA*. Biosci Biotechnol Biochem. 2008 ;72(2):312-320. 査読有.
- ⑦ Azuma N, Kanamaru K, Matsushika A, Yamashino T, Mizuno T, Kato M, Kobayashi T. *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. 2007 ;71(10):2493-2502. 査読有.

- ⑧ Hagiwara D, Asano Y, Marui J, Furukawa K, Kanamaru K, Kato M, Abe K, Kobayashi T, Yamashino T, Mizuno T. The SskA and SrrA response regulators are implicated in oxidative stress responses of hyphae and asexual spores in the phosphorelay signaling network of *Aspergillus nidulans*. Biosci Biotechnol Biochem. 2007 ;71(4):1003-14. 査読有.
 - ⑨ Kobayashi T, Abe K, Asai K, Gomi K, Juvvadi PR, Kato M, Kitamoto K, Takeuchi M, Machida M. Genomics of *Aspergillus oryzae*. Biosci Biotechnol Biochem. 2007 ;71(3):646-670. 査読有.
 - ⑩ Hagiwara D, Matsubayashi Y, Marui J, Furukawa K, Yamashino T, Kanamaru K, Kato M, Abe K, Kobayashi T, Mizuno T. Characterization of the NikA histidine kinase implicated in the phosphorelay signal transduction of *Aspergillus nidulans*, with special reference to fungicide responses. Biosci Biotechnol Biochem. 2007 ; 71(3):844-847. 査読有.
 - ⑪ Hortschansky P, Eisendle M, Al-Abdallah Q, Schmidt AD, Bergmann S, Thön M, Kniemeyer O, Abt B, Seeber B, Werner ER, Kato M, Brakhage AA, Haas H. Interaction of HapX with the CCAAT-binding complex--a novel mechanism of gene regulation by iron. EMBO J. 2007 ; 26(13):3157-3168. 査読有.
- [学会発表] (計 8 件)
- ① 伊奈 慎太郎、高橋 明珠、小林 哲夫、加藤 雅士：糸状菌 CCAAT 結合因子の存在量は栄養状態に応答する、日本農芸化学会 2009 年度大会 2009/03/29、福岡
 - ② 安藤 栄里子、杉山 純也、小林 哲夫、加藤 雅士：糸状菌転写因子 HapX による転写抑制機構、日本農芸化学会 2009 年度大会 2009/03/29、福岡
 - ③ Ando E, Sugiyama J, Hortschansky P, Brakhage AA, Haas H, Kobayashi T, and Kato M. Interaction of HapX-HapB/C/E complex with the cytochrome *c* promoter. 25th Fungal Genetics Conference at Asilomar. 2009.3.19, California, USA

④ Kato, M. Analysis on the transcriptional regulation network by the CCAAT-binding complex as a key factor in *Aspergillus* spp. 2008 JSPS and KOSEF Joint Seminar. The Japan-Korea Joint Basic Scientific Cooperation Program. Pioneering Research on Fungal Molecular Biology. 2008.11.19, Kanazawa, Japan

⑤ Takahashi A, Sugiyama J, Sano M, Kobayashi T, and Kato M. Expression of ribosomal protein genes is depressed by the CCAAT-binding complex in *Aspergillus* species. 9th European Conference on Fungal Genetics, 2008.4.7, Edingurgh, Scotland

⑥ Hortschansky P, Eisendle M, Al-Abdallah Q, Schmidt AD, Bergmann S, Thön M, Kniemeyer O, Abt B, Seeber B, Werner ER, Kato M. Brakhage AA, Haas H. Novel mechanisms of redox and iron regulation of fungal transcription factors. 9th European Conference on Fungal Genetics. 2008.4.7, Edingurgh, Scotland

⑦ 高橋 明珠、佐野 元昭、小林 哲夫、加藤 雅士：糸状菌 CCAAT-box 結合因子による転写制御ネットワーク：リボソーマルタンパク質の転写抑制機構、日本農芸化学会 2008 年度大会 2008/03/27、名古屋

⑧ 高橋 明珠、杉山 純也、佐野 元昭、小林 哲夫、加藤 雅士：麴菌 CCAAT-box 結合因子によるリボソーマルタンパク質遺伝子の発現抑制、日本農芸化学会 2007 年度大会 2007/03/25、東京

[図書] (計 1 件)

① Kobayashi T and Kato M. Transcriptional Regulation in *Aspergillus*. In "Aspergillus: Molecular Biology and Genomics". eds by Machida M and Gomi K., Caister Academic Press, Portland, USA. pp. 85-114. (2009)

[その他]

ホームページ

http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~iden/japanese/index_j.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 雅士 (KATO MASASHI)

名古屋大学・

大学院生命農学研究科・准教授

研究者番号：70242849