

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05766

研究課題名(和文) 遺伝子発現制御機構におけるシスエレメント機能の論理解析

研究課題名(英文) Logical analysis of cis-element function in a gene expression regulatory mechanism

研究代表者

児島 孝明 (Kojima, Takaaki)

名古屋大学・生命農学研究科・講師

研究者番号：40509080

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：産業微生物 *Aspergillus oryzae* における転写因子による発現制御機構を包括的に理解する基盤技術構築を目的とし、*A. oryzae*由来の様々な転写因子の発現制御機構の解析を実施した。その結果、KojR、CreAおよびAraRの結合コンセンサス配列の特定に成功した。また、AoXlnRの転写制御機構において、結合部位のみならず、その周辺のDNA配列環境がその下流に位置する遺伝子の細胞内の発現制御に関与している可能性を、機械学習の手法を用いて論理的に示すことに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の遂行研究において、解析する転写因子の数は、当初目標とした数に達することができなかったものの、機能の全く異なる様々な転写因子を用いた場合においても、それらの結合配列の選択的濃縮に成功した点は、gSELEX-Seqの汎用性を補強するものであり、今後の *A. oryzae* の転写制御機構の大規模解析の技術確立という観点からも大変意義深い。さらに、今回明らかにした結合部位周辺のDNA環境と発現変動を論理的に対応付けることができるという現象が他の転写因子や他の種でも観察される可能性は高く、様々な転写因子を介した転写制御機構の解明への波及効果が期待される。

研究成果の概要(英文)：With the aim of establishing a basic technology to comprehensively understand the regulatory mechanism of expression by transcription factors in the industrial microorganism *Aspergillus oryzae*, the regulatory mechanisms of various transcription factors from *A. oryzae* were analyzed. As a result, the binding consensus sequences of KojR, CreA, and AraR were successfully identified. In addition, the machine learning approach logically demonstrated that not only the binding site but also the surrounding DNA sequence environment may be involved in the transcriptional regulatory mechanism of AoXlnR in regulating the expression of genes located downstream of the binding site.

研究分野：応用微生物学

キーワード： *Aspergillus oryzae* 転写因子 バイオインフォマティクス 合成生物学 トランスクリプトーム 高速DNAシーケンシング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

トランスクリプトーム解析は細胞内の転写量の網羅的な把握を目的とする解析の総称であり、転写因子が結合する *cis*-エレメントは、このトランスクリプトーム解析における一つの指標としてかねてから着目されてきた。しかしながら、実際の細胞内では、*cis*-エレメントと同じ配列を保持しているにも関わらず、標的転写因子によって発現制御を受けないプロモーターも数多く存在するため、転写因子による発現制御機構は当初想定されていたよりも遥かに複雑かつ精緻であることが示唆されていた。

一方、我が国が世界に誇る産業微生物、*Aspergillus oryzae* は、高い分泌活性、培養の容易さ、安全性などの観点から食品、醸造分野以外での応用が現在も模索されている。その一方で、非モデル生物である *A. oryzae* における転写因子による発現制御機構の詳細は未知であり、産業目的を満たす任意の機能を付与するためには、まずこの機構の包括的な理解が必要不可欠であった。

これらの状況に対し、申請者らは、転写因子の制御遺伝子を網羅的に解析・同定する手法を独自に構築し、この手法が *A. oryzae* 由来の転写因子の機能解析に応用可能であることを示していた。

2. 研究の目的

微生物をセルファクトリーとして目的有用物質を効率よく生産するためには、関連遺伝子群の発現量バランスを合理的に最適化することが非常に重要となる。転写因子結合部位の解析システムと数理解析技術を融合させることにより、産業微生物 *A. oryzae* における転写因子による発現制御機構を包括的に理解する基盤技術構築を目的とした。

3. 研究の方法

1) *A. oryzae* 転写因子の結合部位の網羅的同定

A. oryzae ゲノムライブラリーを用いた gSELEX により、*A. oryzae* における炭素源代謝に関連する種々の転写因子 (AlcR、AraR、CreA、ManR) のゲノム上の結合部位の選択的濃縮を試みた。無細胞タンパク質合成系によって MBP 融合型の各転写因子 (DNA 結合ドメイン) を調製し、これらの反応産物を gSELEX に用いた。なお、有機酸のコウジ酸の代謝に関連する転写因子 KojR の場合、大腸菌細胞中で発現した組み換えタンパク質を用いた。回収された DNA プールを高速 DNA シーケンサーに供し、得られた配列データを基にバイオインフォマティクス解析を実施し、各転写因子の結合領域の網羅的同定を行った。

2) AoXlnR を介したプロモーター機能の論理解析

以前の科研費助成研究 (16K18297) によって遂行、報告した AoXlnR の転写制御情報 (Oka, H. et al. BMC Genomics 2019) を基に、結合モチーフ付近の配列から DNA 構造情報を抽出し、それらを用いて機械学習による転写因子-DNA 結合メカニズム予測モデルの構築を実施した。さらに、構築した予測モデルを用い、野生株の持つプロモーターと同等の発現が期待される DNA 構造を有する新たなプロモーターを設計し、レポーター遺伝子とともに麹菌に導入し、その発現量を解析した。

4. 研究成果

A. oryzae における転写因子による発現制御機構の解明と、*A. oryzae* による標的有用物質の高効率生産を目的として、以下のアプローチを実施した。

1) *A. oryzae* 転写因子の結合部位の網羅的同定

各転写因子のゲノム上の結合部位の網羅的同定に先立ち、gSELEX-Seqのさらなる効率化のため、無細胞タンパク質合成系を用いた転写因子の発現システムの構築を行った。具体的には、各転写因子をコードする遺伝子をT7プロモーター、T7ターミネーターを保持するMBP融合タンパク質発現用コンストラクトに連結し、これを鋳型として用いることで生細胞を介さずに目的転写

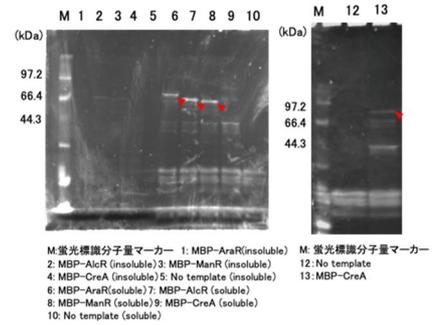
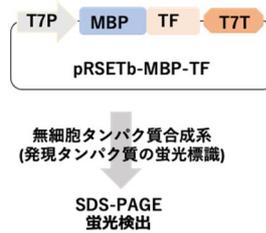


図1. 無細胞タンパク質合成系を用いた *A. oryzae* 転写因子の発現

因子の迅速かつ簡便な調製が可能となる。この手法によって調製された発現タンパク質を蛍光標識し、SDS-PAGE に供したところ、今回無細胞タンパク質合成系による発現を試みた AlcR、AraR、CreA、ManR すべてにおいて、可溶性画分への発現を確認した (図 1)。

この手法によって調製した転写因子を用いて gSELEX を実施したところ、AlcR、AraR、CreA、ManR いずれの転写因子において、結合 DNA の選択的濃縮を確認した。取得した DNA プールを、高速 DNA シーケンサーに供したところ、CreA および AraR において良好な結果が得られたため、以下に詳細を示す。

・CreA の転写制御機構の解析

カーボンカタボライト抑制に關与する CreA を用いた gSELEX から、既知の *A. nidulans* CreA のモチーフ

(C/G)(C/T)GG(A/G)G (Cubero, B. et al. EMBO J. 1994) と類似するモチーフが検出された (図 2)。さらに、検出されたピーク位置と *A. oryzae* 全遺伝子のプロモーター領域を照合したところ、約 40 種類の遺伝子の上流領域に結合部位が存在することが確認された。これらの遺伝子には、C 源代謝に関する遺伝子のほか、トランスポーター関連遺伝子が多数含まれており、これらは CreA によって発現制御される遺伝子の候補と考えられた。現在、CreA 欠損株を用いた RNA-Seq 実施の準備を進めている。RNA-Seq による CreA の発現依存的な発現変動遺伝子の同定を行った上で、これらの研究成果をまとめた論文を投稿する予定である。なお、この成果に関して、1 件の国内学会発表を行った。

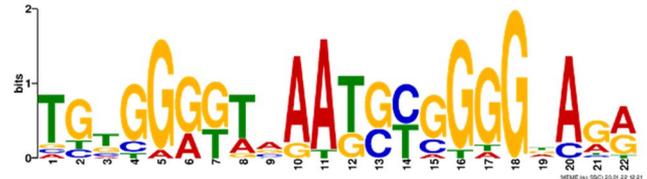


図2. CreAを用いたgSELEX-Seqによって取得されたDNA配列より検出されたコンセンサス配列

・AraR の転写制御機構の解析

アラピノース代謝に關与する AraR を用いた gSELEX から、先行報告のモチーフ CGG(A/G/T)TAA(A/T) (Ishikawa, K., et al. Curr Genet 2018) と類似する明瞭なモチーフが検出された (図 3)。さらに、検出されたピーク位置と *A. oryzae* 全遺伝子のプロモーター領域を照合したところ、C 源代謝に關する遺伝子を多数含む 200 種類以上の遺伝子の

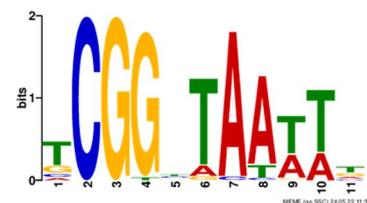


図3. AraRを用いたgSELEX-Seqによって取得されたDNA配列より検出されたコンセンサス配列

部位が存在することが確認された。先行研究 (Ishikawa, K., et al. Curr Genet 2018) から、AoXlnR と AraR の標的遺伝子の類似性が報告されていたため、以前 gSELEX-Seq によって取得した AoXlnR 結合部位を保持する遺伝子リスト (Oka et al. BMC Genomics 2019) と照合したところ、半数以上の 126 遺伝子はその積集合に含まれた (図 4)。この結果は AraR と AoXlnR の機能の類似性をさらに裏付けるものであった。今後、AraR 欠損株を作出ののち、RNA-Seq による AraR の発現依存的な発現変動遺伝子の同定を行った上で、これらの研究成果をまとめた論文を投稿する予定である。

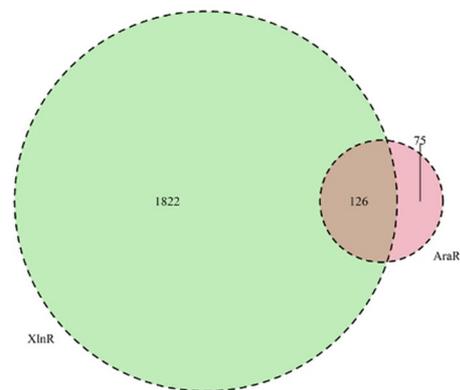


図4. gSELEX-Seqによって取得したAraRとAoXlnRの制御候補遺伝子の比較

さらに、有用有機酸コウジ酸代謝に関連する転写因子 KojR のゲノム上の結合部位の網羅的同定のため、大腸菌中で発現、調製を行った KojR を用いた gSELEX-Seq を実施した。条件を変更した上で 2 回実施し、1 回目の実施では、Zn₂Cys₆ 型転写因子の典型的な結合配列 CGG トリプレットを含む明瞭なコンセンサス配列が観察されなかったものの、結合部位をプロモーター中に保持する 160 種類以上の遺伝子を特定した。2 回目の実施では、取得した DNA 配列の解析を行ったところ、Zn₂Cys₆ 型転写因子の典型的な結合配列 CGG トリプレットを含むコンセンサス配列が検出されたものの (図 5)、6 種の遺伝子上流領域にのみ顕著なピークが検出された。1 回目および 2 回目の試行、いずれの場合においても、KojR によって発現制御を受けることが既知の *kojA*、*kojT*、*kpeA*、*nrtA* の上流中に KojR 結合部位は検出されなかった。この要因として、gSELEX における結合反応が適切ではなかった可能性に加え、これらの遺伝子が KojR の直接的な制御を受けない、二次的な発現制御の可能性も考えられる。

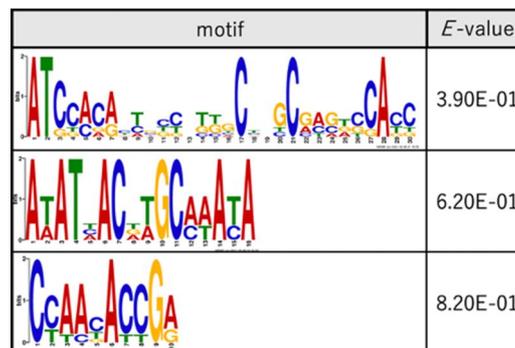


図5. KojRを用いたgSELEX-Seqによって取得されたDNA配列より検出されたコンセンサス配列

今回の試行では先行研究によって報告された上記の遺伝子は含まれていなかったものの、今回新たに同定した上流に KojR 結合部位を保持する遺伝子は、KojR の制御下にある可能性が高いと考えられる。

また、KojR 発現依存的に発現変動する遺伝子の網羅的同定のため、*A. oryzae* 野生株 (RIB40) およびその *kojR* 欠損株を用いた RNA-Seq を実施したものの、発現変動が顕著な遺伝子を同定することはできなかった。今後、*A. oryzae* の培養条件および RNA 調製条件を再検討の上、再度 RNA-Seq を実施する予定である。

上記のように、KojR の直接的な標的遺伝子を網羅的に同定するという当初の目的には到達できていないものの、KojR の結合コンセンサス配列の特定と KojR の制御化にある候補遺伝子を新たに同定したことは、コウジ酸合成制御機構の解明の観点から意義深いと考える。KojR 欠損株を用いた RNA-Seq による発現変動遺伝子の同定を行った上で、これらの研究成果をまとめた論文を投稿する予定である。なお、この成果に関して、1 件の国内学会発表を行った。

以上に示したように、種々の転写因子を用いた場合においても、標的とする結合配列の選択的

濃縮に成功したという上記の結果は、gSELEX-Seq の汎用性を補強するものであり、今後の *A. oryzae* の転写制御機構の大規模解析の技術確立という観点から大変意義深いものである。

2) AoXlnR を介したプロモーター機能の論理解析

キシラン、セルロースやペントース等の代謝に関する転写因子 AoXlnR を介した転写制御機構の包括的な理解のため、AoXlnR の転写制御情報を基に、結合モチーフ付近の配列から DNA 構造情報を抽出し、機械学習による AoXlnR を介した発現変動の予測モデルの構築を試みた。Support vector machine (SVM) を用いた種々の発現変動の予測モデルを構築し、評価したところ、モデルの正確性を示す指標

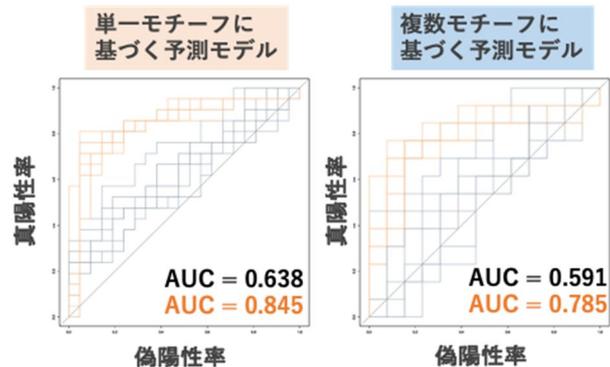


図6. DNA構造パラメータを基にしたAoXlnRによる発現変動予測モデルの構築

Area under the Curve (AUC)が0.8程度の比較的高い値を示した。このことから、結合部位周辺の構造パラメータから下流の遺伝子が発現変動の有無を高精度に予測できることが明らかとなった。

本結果は、プロモーター中の AoXlnR 結合部位のみならず、周辺の DNA 配列環境がその下流に位置する遺伝子の細胞内の発現制御に関与している可能性を、発現変動予測モデルを用いて明らかにしたものであり、AoXlnR を介した転写制御機構の解明への重要なマイルストーンとなりうる。結合部位周辺の DNA 環境と発現変動を論理的に対応付けることができるという現象が他の転写因子や他の種でも観察される可能性は高いと考えられる。今後、様々な転写因子をターゲットとしてこの現象の普遍性を検証していく。

この成果に関して、これまでに 11 件の学会発表を行ったほか、本アプローチを解説した日本語総説を 1 件報告した(児島ら、化学と生物 2021 年)。さらに、上記成果を研究論文としてまとめ、プレプリントとして掲載された(Oka et al. bioRxiv 2022)。一方で、今回構築したモデルの妥当性の検証のため、予測モデルから提案されたプロモーター領域の細胞内の転写活性を解析するレポーターアッセイを実施したものの、*A. oryzae* 変異株間の成長速度の不均一性により、安定した結果を未だ取得できていない。このアプローチに関して、さらなる条件検討の上でレポーターアッセイを試み、これによって得られる細胞内発現解析の結果を加えた上で査読付きのジャーナルに投稿する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Oka, H., Kojima, T., Kato, R., Ihara, K., and Nakano, H.	4. 巻 0
2. 論文標題 Construction of transcript regulation mechanism prediction models based on binding motif environment of transcription factor AoXlnR in <i>Aspergillus oryzae</i> .	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2021.07.28.454268	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 兒島 孝明、岡 大椰、中野 秀雄	4. 巻 58
2. 論文標題 データマイニングによる転写因子の結合配列環境と発現応答の関連性の解析.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 化学と生物	6. 最初と最後の頁 267-268
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1271/kagakutoseibutsu.58.267	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 兒島 孝明
2. 発表標題 パイオインフォマティクスを駆使した転写制御機構のゲノムワイド解析.
3. 学会等名 名古屋大学 GTRリトリート2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡 大椰、兒島 孝明、井原 邦夫、小林 哲夫、中野 秀雄
2. 発表標題 機械学習を用いた配列環境情報に基づく転写因子制御遺伝子予測モデルの構築.
3. 学会等名 日本農芸化学会 中部支部第187回支部例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡 大椰, 兒島 孝明, 井原 邦夫, 小林 哲夫, 中野 秀雄
2. 発表標題 DNA構造パラメーターを用いた麹菌由来転写因子AoXInR制御メカニズムの網羅的解析.
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡 大椰, 兒島 孝明, 井原 邦夫, 小林 哲夫, 中野 秀雄
2. 発表標題 糸状菌由来転写因子AoXInRにおける結合配列と発現制御の関連性の網羅的解析.
3. 学会等名 生物工学若手研究者の集い(若手会)夏のセミナー2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡 大椰, 兒島 孝明, 井原 邦夫, 小林 哲夫, 中野 秀雄
2. 発表標題 データ・マイニングを駆使した糸状菌由来転写因子の結合配列環境と発現応答の関連性の解析.
3. 学会等名 第71回日本生物工学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡 大椰, 兒島 孝明, 井原 邦夫, 小林 哲夫, 中野 秀雄
2. 発表標題 DNA構造情報による麹菌由来転写因子の結合メカニズムの解析.
3. 学会等名 日本農芸化学会2020 年度福岡大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiroya OKA, Takaaki KOJIMA, Kunio IHARA, Tetsuo KOBAYASHI, Hideo NAKANO.
2. 発表標題 Integrative mining for comprehensive analysis of the gene expression system regulated by a transcription factor, AoXInR in <i>Aspergillus oryzae</i> .
3. 学会等名 2020 Sakura-Bio online Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiroya OKA, Takaaki KOJIMA, Kunio IHARA, Tetsuo KOBAYASHI, Hideo NAKANO
2. 発表標題 Prediction of binding motif function based on DNA shape features extracted from transcription factor AoXInR-binding sites.
3. 学会等名 2021 Sakura-Bio Meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡大椰, 兒島 孝明, 加藤竜司, 井原邦夫, 中野秀雄
2. 発表標題 結合領域周辺におけるDNA 構造パラメーターに基づく麹菌由来転写因子AoXInRの転写結合メカニズム予測モデルの構築.
3. 学会等名 第73回日本生物工学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水谷友香, 岡大椰, 兒島孝明, 中野秀雄
2. 発表標題 麹菌におけるコウジ酸代謝関連転写因子 KojR の制御遺伝子の網羅的解析.
3. 学会等名 第73回日本生物工学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡大椰, 兒島孝明, 加藤竜司, 井原邦夫, 中野秀雄
2. 発表標題 麹菌由来の転写因子AoXInRによる発現制御と結合部位近傍におけるDNA構造との関連性の解明.
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小笠原菜々子, 水谷友香, 岡大椰, 兒島孝明, 中野秀雄
2. 発表標題 麹菌におけるC源代謝に関連する転写因子の制御機構の網羅的解析.
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 八木本 亜実, 岡 大椰, 兒島 孝明, 中野秀雄
2. 発表標題 無細胞タンパク質合成系を用いた転写制御機構の網羅的解析システムの効率化.
3. 学会等名 生物工学若手研究者の集い 夏のオンラインセミナー2021
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	井原 邦夫 (Ihara Kunio) (90223297)	名古屋大学・遺伝子実験施設・准教授 (13901)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	中野 秀雄 (Nakano Hideo) (00237348)	名古屋大学・生命農学研究科・教授 (13901)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関