

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月19日現在

機関番号：81409

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580096

研究課題名（和文） トランスポゾンによる麹菌の多様性を生み出すストレス応答機構の解明

研究課題名（英文） Stress response resulting in genetic diversity by transposable elements in *Aspergillus oryzae*

研究代表者

小笠原 博信（OGASAWARA HIRONOBU）

秋田県総合食品研究センター・醸造試験場・上席研究員

研究者番号：50390901

研究成果の概要（和文）：分生子中の全 mRNA シーケンシングにより作成したストレス cDNA ブラウザーによる探索から機能化が推定される新たなトランスポゾン様配列が見出された。これら遺伝子ではコード配列内の splicing や polyA 付加がストレスにより阻害され、活性型の mRNA が増加する共通現象を明らかにした。これにより、トランスポゾン遺伝子群の活性化と遺伝子構造の変化が麹菌の多様性を生み出すきっかけとなることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：In the survey using a stress-fluctuation cDNA browser afforded by high-throughput sequencing, several kinds of transposon-like elements were preferentially discovered in novel active transcriptional regions. Almost of the elements were inactivated by cryptic splicing which was inhibited by extreme stress. An intensity of mature polyadenylation to the mRNA of a novel DNA transposon *AoTan1* increased under stress conditions. It was suggested that mature and active mRNA molecules of transposon-like elements tended to be increased during the extreme stress, resulting in genetic diversity by transposable elements in *Aspergillus oryzae*.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：遺伝子発現、mRNA、トランスポゾン、麹菌、多様性、外来性遺伝子

1. 研究開始当初の背景

微生物は、他の生物が生息できない広範な環境への適応能力を進化の過程で獲得してきた。この環境適応メカニズムの根本には、ゲノムのダイナミックな変化が起きていることが多くの微生物で観察されている。多様性を生み出す原動力としてトランスポゾン等の外来性遺伝子の働きがあり、それに対す

る微生物の応答が、多彩なゲノム形成に重要な役割を果たしてきたと考えられている。

我が国の醸造・発酵産業に利用されている微生物も多様性を基に、様々な醸造現場に最適な株が先人の英知によって利用されてきている。特にカビ（糸状菌）の一種である麹菌（*Aspergillus oryzae*）は多様な発酵能力から1000年以上も昔から発酵食品に利用さ

れ、その間、外来性遺伝子を巧みに制御しながら優良株として進化、育種されてきたものと推測される。長年の醸造現場で育種されてきた麹菌においては、ゲノム情報からトランスポゾン配列が存在することは知られていたが、実際に転移するとは考えられていなかった。

先に担当者らは麹菌において強ストレス条件下 (CuSO₄ や高温処理など) のみで転移する DNA トランスポゾン (*Crawler*) が実用株に存在することを初めて見出した (Ogasawara, H., *et al. Fungal Gent. Biol.* **46**, 441-449 [2009])。さらに、*Crawler* 遺伝子は通常培養では不完全な poly(A) 付加やスプライシングにより抑制されているが、強ストレス下ではインタクトな mRNA が増加し、転移活性を発現することを明らかにした (小笠原・他、農化大会要旨、p190[2007]、Ogasawara, H., *et al. 24th Fungal Genetics Conference* p115[2007]、)。

すなわち、麹菌にはトランスポゾンの様な外来性遺伝子等に対するセンシング機構が存在し、通常の宿主遺伝子群とは異なるスプライシング・ファクターや poly(A) 付加因子により転写後制御がなされており、進化や有用形質発現において重要な役割を果たしてきたものと考えられる。

2. 研究の目的

麹菌などの真核生物において通常は cryptic splicing や ORF 内への poly(A) 付加などによって抑制されている外来性遺伝子が、強ストレスによって抑制解除され機能することで遺伝子の多様化を引き起こす機構を明らかにする。外来性遺伝子のモデルとして、担当者らが麹菌 (*A. oryzae*) で初めて転移活性を明らかにした DNA トランスポゾン *Crawler* をモデルにし、ストレス応答の中では新規となる外来性遺伝子の活性化機構の解明を目指した。そのために強ストレス条件下のみで活性化、転移するトランスポゾンを有する麹菌の分生子はストレス下で新たに機能化する遺伝子の mRNA を探索するための適切な系であると言える。

そこで本研究では、①強ストレスによって変動する mRNA の発現パターンを対照区と比較できる cDNA ブラウザー (ストレス cDNA ブラウザー) を既知のトランスポゾン配列を記載し構築する。②シーケンス株 RIB40 における活性型 *Crawler* のストレスによる発現パターン変動について明らかにし、ストレス cDNA ブラウザーの有効性を確認する。③ *Crawler* と同様のパターンで制御を受けている遺伝子領域を抽出し、外来性 (トランスポゾン) 遺伝子に対する共通の制御機構を解明する。④強ストレス下で機能が阻害されると推定される mRNA 修飾遺伝子の発

現変動と *Crawler* や新規トランスポゾン遺伝子の発現との連動性について解析する。

以上により、麹菌 (真核生物) における外来性 (トランスポゾン様) 遺伝子に対する共通の制御および活性化様式的一端を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ストレス cDNA ブラウザーの構築

Cu ストレス処理後および対照区の分生子より total RNA を抽出し、全 cDNA シーケンシングを行った。得られた配列情報を DOGAN のデータベースにマッピングし、アノテーションデータも加えたストレス応答 cDNA ブラウザーを構築した。既知のトランスポゾン配列もアノテーションデータとして新たに追加した。

(2) RIB40 株への *Crawler* 導入と強ストレス条件下での mRNA 分子種変動解析

サテライト型ベクター pPTR II に *Crawler* の TSD 配列を含む全領域を連結し、RIB40 株に導入した。強ストレス (20mM Cu²⁺ および 50°C) 条件下で 6hr 処理した分生子の全 RNA を抽出、調製し、RT-PCR により発現の有無と cryptic splicing の変化を調べた。

(3) *Crawler* 様ストレス変動領域の検索と新規機能遺伝子の抽出

アノテーションがなされていない領域を中心に、*Crawler* mRNA と同様にストレス応答により、強いスプライシング阻害が認められる DNA 配列を抽出し、BLAST 検索による解析を行った。

(4) 新規機能遺伝子のストレス変動様式の解析

未アノテーション領域より見出された幾つかの推定機能遺伝子の mRNA 分子種変動について検討するため、Cu²⁺ 処理および高温処理を行った分生子より全 RNA を抽出、調整した。ストレス cDNA ブラウザーから推定された splicing 領域につて増幅可能なプライマーを設計し、RT-PCR や 3'-RACE および転写産物の cDNA 配列決定により、splicing の変化と poly(A) 付加位置の変動について解析を行った。

(5) mRNA 修飾遺伝子群との連動性比較

mRNA 修飾遺伝子群の強ストレス下における mRNA の不活性化とトランスポゾン様遺伝子の mRNA 活性化との連動性について、ストレス cDNA ブラウザー上で比較し、RT-PCR による確認を行った。

4. 研究成果

(1) ストレス cDNA ブラウザーの構築

DOGAN のアノテーションデータ上に Cu ストレスによる mRNA 変動が比較できるようにストレス cDNA ブラウザーを構築した。

(図 1-A : 概要)

また、すでに報告されているが DOGAN のアノテーションに未登録のレトロ型トランスポゾン *AoLTR1*(2 copies)、*AoLTR2*(7 copies)、*Aoret1*(2 copies)、*Aoret2*(8 copies)、*Aoret3*(1 copy) および DNA トランスポゾン *Aot1*(3 copies) もアノテーションラインに新たに追加した。

ブラウザ上での波形比較によって推定検出された Cu ストレスによる splicing 阻害について、RT-PCR によって確認を行った。(図 1-B : *histonH3H4* の例)

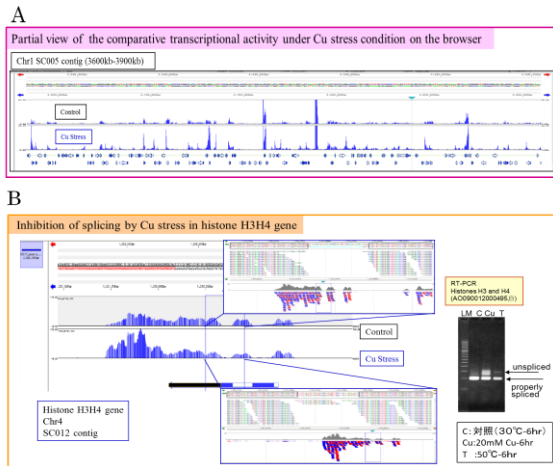


図 1 ストレス cDNA ブラウザーの部分概要 (A) と splicing 阻害の確認 (B)

(2)RIB40 株への *Crawler* 導入と強ストレス条件下での mRNA 分子種変動解析

シーケンス株 RIB40 株において、*Crawler* 遺伝子は RIP 様変異によって高度に不活性化され、ゲノム上でのマッピングが未だなされていない。形質転換株では活性型を保有する株と同様に cryptic splicing された mRNA が検出され、強ストレスによりインタクトな転写産物が多くなることが認められた。(図 2) これにより、RIB40 株においてもトランスポゾン等の外来性遺伝子に対し同様の制御がなされていることが推察された。

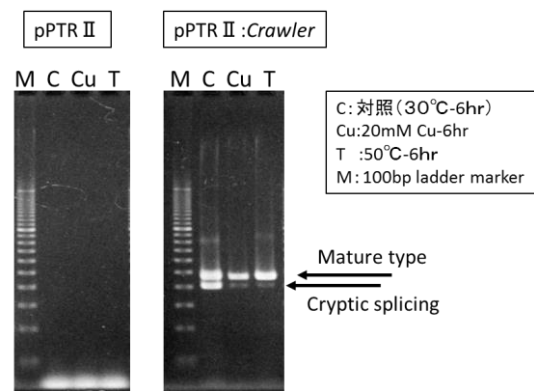


図 2 *Crawler* 形質転換 RIB40 株における転写産物の強ストレスによる変動

(3) *Crawler* 様ストレス変動領域の検索と新

規機能遺伝子の抽出

①未アノテーション領域に注目して Splicing や poly(A)付加によって *Crawler* と同様に発現波形が変動する領域をピックアップし BLASTX 検索を行い、機能化する遺伝子をスクリーニングした。その結果、幾つか機能が推定された領域の中でトランスポゾン・エレメント様遺伝子が多くピックアップされた。その中から推定機能領域を full-length で有する領域の例を示す。(図 3) それらの中には、*A. flavus* の LTR 型レトロトランスポゾンの *gag* 様タンパク質、同じく DNA トランスポゾンの *Taf1* 様トランスポゾン、*C.elegans* の *Tc5* 様トランスポゾン、および、*A. niger* の *Tan1* 様トランスポゾンなどの相同領域が見出された。

これらについて、Cu および高温ストレス時の splicing 阻害および mature 型の mRNA の増加について、内部プライマーを用いた RT-PCR により検討した。*gag* 様、*Tc5* 様、および *Taf1* 様トランスポゾン、さらにアノテーションが成されている *impala* 様トランスポゾンでは 100bp 前後の splicing がされていることが判明した。Cu および高温ストレスによってその阻害が認められ、*Crawler* と同様に mature 型の mRNA 分子種の増加が認められた。一方、*Tan1* 様トランスポゾンについて、RT-PCR からは明かな splicing は認められなかった。(図 4)

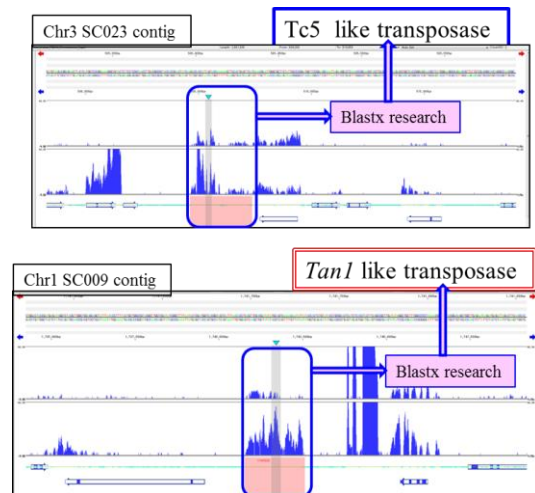


図 3 波形変動パターンによる機能遺伝子領域の検索

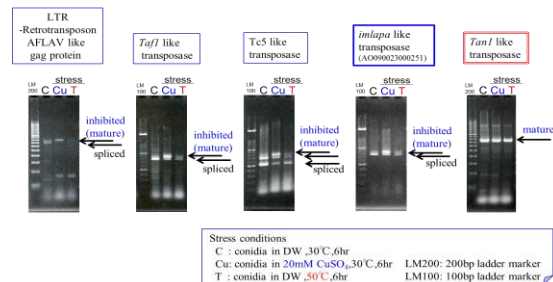


図 4 トランスポゾン様遺伝子の強ストレスによる転写産物の変動

そこで、3'-RACE 解析を行ったところ、コード領域内の 3 箇所 poly(A)付加サイトがあること明らかとなった。一方で mature 型の poly(A)付加は Cu や高温ストレスにより増加する傾向が認められた。(後述図 5-A 参照) さらに、*Tan1* 様 DNA 配列の遺伝子構造解析によって完全型の TIR や DDE モチーフを含む transposase を有するインタクトな DNA トランスポゾンであり、ゲノム内に 11 コピー存在することから、*AoTan1* と命名して、別途、転移解析を進めている。(data not shown)

②今回見出されたトランスポゾン・エレメントが転移機能と転移活性化条件検討のためストレス応答時の活性型 mRNA の変動について検討した。*Crawler* においては、Cu ストレス開始後 2-4 時間目から、また、高温ストレス 1 時間目から、実際の転移が認められる 6 時間目まで活性型 mRNA の増加が認められた。ストレス解除後は制御を回復するが、Cu ストレス区では 4 時間目以降、対照区ほどは回復しなかった。(図 5-A)

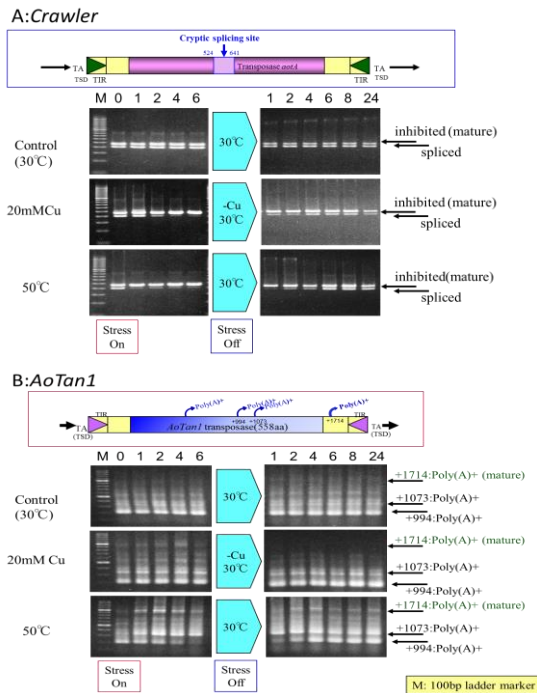


図 5 ストレス条件下および解除後の転写産物の変動 (A: *Crawler*, B: *AoTan1*)

他のトランスポゾン様配列についても、ほぼ同様の変動経過が観察された。一方、cryptic splicing 制御が認められなかった *AoTan1* における poly(A) 付加変動の様子を図 5-B に示した。RACE 産物のシーケンシングにより決定された 2 箇所コード領域内の付加サイトと mature 型の poly(A)付加に注目してみると、Cu ストレスにより 4 時間目付近で mature 型 mRNA が多くなる様子が認められ、6 時間以降ストレス解除にもか

かわらず、長い mRNA および mature 型の mRNA が認められなくなった。一方、高温ストレスでは 1 時間目以降に mature 型の poly(A)付加にシフトする様子が認められ、*Crawler* と同様の結果を示した。

(5)mRNA 修飾遺伝子群との連動性比較

ストレス cDNA ブラウザー上での発現比較と RT-PCR による確認から、強ストレス条件下における既知遺伝子群のスプライシング阻害について検討した。その結果、*gpdA* など代謝に関わる遺伝子群ではストレスにより発現量の低下はあるものの正常なスプライシングを受けていることが認められた。一方、*actin* などの細胞構造に関わる遺伝子ではスプライシングが阻害された mRNA が検出される傾向にあった。さらに、mRNA 修飾に関連する遺伝子群においても、Cu および高温ストレスによって多くの遺伝子で高頻度スプライシング阻害が起きていることが明らかとなった。(表)

表 ストレス条件下における既知遺伝子群のスプライシング阻害

○ : 正常スプライシング × : スプライシング阻害

Category	Gene Name	AO090 No.	KOG	Splicing
Metabolism	Alcohol dehydrogenase, class V	AO09000900634	O	○
	<i>pdx4</i> pyruvate decarboxylase	AO090003000661	EH	○
	<i>gpdA</i> Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	AO090003001322	G	○
	Cytochrome b5	AO090003000270	C	×
	<i>eno4</i> Enolase (2-phosphoglycerate dehydratase)	AO090003000055	G	○
	Esterase/lipase	AO090003001071	I	○
	Aspartate aminotransferase/Glutamic oxaloacetic	AO090003001171	E	○
	<i>pk4</i> Pyruvate kinase	AO090005001556	G	×
	Phosphoglycerate dehydrogenase	AO090005000571	EH	○
	Fructose-6-phosphate 2-kinase	AO090701000027	G	×
	<i>pgkA</i> 3-phosphoglycerate kinase	AO090038000395	G	×
	Glutamine synthetase	AO090009000269	E	○
Cellular structure	Actin and related proteins	AO090701000065	Z	×
	Histones H3 and H4	AO090012000495	B	×
	<i>hnsA</i> Nitrogen regulatory protein	AO090009000502	K	×
	<i>rolA</i> hydroxibin putative	AO090020000588	?	○
	Hsp27-ERE-TATA-binding protein/Scaffold	AO090005000269	K	×
	60S ribosomal protein L7	AO090011000338	J	×
	Thioredoxin	AO090026000708	O	×
	40S ribosomal protein S16	AO090011000590	J	×
	<i>dhcA</i> Dyneins, heavy chain	AO090120000298	Z	×
	Histone H4	AO090012000496	B	×
mRNA Splicing	Splicing factor U2AF, large subunit (RRM)	AO090005000259	A	×
	Splicing factor SPF30	AO090001000628	A	×
	U2-associated snRNP A' protein	AO090026000751	A	×
	Small nuclear ribonucleoprotein (snRNP) Sm core	AO090120000397	A	×
	mRNA cleavage and polyadenylation factor II	AO090103000017	K	×
	Component of the U4/U6.U5 snRNP/mitosis protein	AO090005000738	A	×
	U5 snRNP-associated RNA splicing factor	AO090005000976	A	×
	Alternative splicing factor SRp55/B52/SRp75 (RRM)	AO090003000544	A	○
	Splicing factor (branch point binding protein)	AO090003000633	A	×
	Splicing factor 3a, subunit 2	AO090003001026	A	×
	U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein Prp4	AO090023000320	A	×
	Small nuclear ribonucleoprotein (snRNP)	AO090103000445	A	×
	Splicing factor RNPS1, SR protein superfamily	AO090012000924	A	×
	U2 snRNP splicing factor, small subunit	AO090120000034	A	×
	mRNA splicing factor	AO090120000312	A	×
Spliceosomal protein snRNP-U1A/U2B	AO090120000314	A	-	
RNA splicing factor - Slu7p	AO090020000320	A	○	
Spliceosomal protein FBP11/Splicing factor PRP40	AO090038000398	A	-	
U3 small nuclear ribonucleoprotein (snRNP)	AO090011000672	A	×	
Nonsense-mediated mRNA decay 2 protein	AO090005000406	A	×	

また、ストレスカスケードに関与する *HogA* と相同性の高い DNA 配列とエピジェネテクスへの関与が推定される HDAC (ヒストンデアセチラーゼ) 様の遺伝子が未アノテーション領域より新たに見出された。これら遺伝子群のスプライシング変動は確認されなかったが、ストレスによる発現上昇が認められた。

以上より、スプライシング因子および poly(A) 付加因子に関わる遺伝子群の強ストレスによる機能阻害により *Crawler* 等のトラン

スポゾン様遺伝子群の転移活性化が促進されるものと推定された。

本研究により、新規の知見として、未アンテーション領域から機能化が推定される新規トランスポゾン様配列等が見出された。これら遺伝子ではコード配列内の *splicing* や *polyA* 付加がストレスにより阻害され、活性型の mRNA が増加するという共通現象を明らかにした。既知の mRNA 修飾遺伝子群との連動解析から、トランスポゾン様遺伝子群の活性化と遺伝子構造の変化が麹菌の多様性を生み出すきっかけとなることが示唆された。

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 2 件)

① 小笠原 博信 : 麹菌トランスポゾン *Crawler* の構造および転移特性と醸造産業への応用、秋田県総合食品研究センター報告、14 巻(2012)、48-58、査読無

② 小笠原 博信 : 麹菌におけるトランスポゾン (*Crawler*) 活性の発見と醸造産業への応用展望、日本醸造協会誌、105 巻 (2010)、334-342、査読無

[学会発表] (計 11 件)

① Hironobu Ogasawara, Saori Takahashi, and Katsuya Gomi, Post-transcriptional suppression against potential transposable elements by cryptic splicing and premature polyadenylation in *Aspergillus oryzae*, 9th International Aspergillus Meeting & 11th European Conference on Fungal Genetics, 2012.3.29, Marburg Univ. (Germany)

② 小笠原 博信、渡辺 隆幸、佐藤 勉、今野 宏、五味 勝也 : 内在性トランスポゾンによる麹菌変異株の味噌醸造適性、平成 23 年度日本醸造学会大会、2011 年 10 月 4 日、北とぴあ (東京都北区)

③ 小笠原 博信、高橋 砂織、五味 勝也 : 麹菌 (*Aspergillus oryzae*) 分生子におけるストレス応答によるトランスポゾン遺伝子転写産物の動的変動、日本生物工学会 2011 年度大会、2011 年 9 月 28 日、東京農工大 (東京都)

④ 小笠原 博信、高橋 砂織、五味 勝也 : mRNA 変動解析による麹菌 (*Aspergillus oryzae*) のストレス応答遺伝子の探索、日

本農芸化学会 2011 年大会、2011 年 3 月 26 日、京都女子大学 (京都市)

⑤ Hironobu Ogasawara, Saori Takahashi, and Katsuya Gomi, Exploratory survey for potential transposable elements in *Aspergillus oryzae* by a stress-fluctuation cDNA browser, 8th International Aspergillus Meeting & 26th Fungal Genetics Conference, 2011.3.17, Asilomar Conference Grand(CA,USA)

⑥ 小笠原 博信、高橋 砂織、五味 勝也 : ストレス応答 mRNA 変動解析による麹菌 (*Aspergillus oryzae*) の機能的外来性遺伝子探索、糸状菌分子生物学コンファレンス、2010 年 11 月 18 日、広島大学 (東広島市)

⑦ 小笠原 博信 : 麹菌の DNA トランスポゾン *Crawler* の転移特性と実用株育種に向けて、糸状菌遺伝子研究会 (依頼講演)、2010 年 6 月 4 日、北とぴあ (東京都北区)

⑧ 小笠原 博信、佐藤 勉、今野 宏、秦 洋二、高橋 砂織、五味 勝也 : 麹菌 (*Aspergillus oryzae*) DNA トランスポゾン *Crawler* の転移活性を利用した新規育種法の検討、秋田応用生命科学研究会、2010 年 5 月 28 日、秋田県総合食品研究センター (秋田市)

[図書] (計 3 件)

① 小笠原 博信 (分担執筆) : 日本醸造協会 (清酒酵母・麹研究会) : 清酒酵母・麹の研究 ~ 2000 年代の研究 ~ (麹菌のトランスポゾンの特徴と実用株育種への応用)、(2013 予定)、205 (編集集中)

② 小笠原 博信 (分担執筆) : 日本醸造協会 : 「改訂版 分子麹菌学」(麹菌におけるトランスポゾン活性の発見と醸造産業への応用展望)、(2012)、269 (114-122)

③ 小笠原 博信 (分担執筆) : シーエムシー出版 : 発酵・醸造食品の最新技術と機能性 II (麹菌トランスポゾン (*Crawler*) 活性の発見と実用株育種への応用)、(2011)、278 (60-69)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

「秋田県総合食品研究センター」
<http://www.arif.pref.akita.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

小笠原 博信 (OGASAWARA HIRONOBU)
秋田県総合食品研究センター・醸造試験
場・上席研究員
研究者番号：50390901

(2)研究分担者

高橋 砂織 (TAKAHASHI SAORI)
秋田県総合食品研究センター・食品加工研
究所・所長
研究者番号：10142184