

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450108

研究課題名(和文)糸状菌分生子特異的hydrophilin遺伝子の光による発現制御機構の解明

研究課題名(英文)Transcriptional regulation machinery of conidia specific hydrophilin

研究代表者

鈴木 聡 (SUZUKI, Satoshi)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品研究部門 食品生物機能開発研究領域・上級研究員

研究者番号：90353979

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)：hydrophilin遺伝子上流の光応答因子結合配列に結合するタンパク質複合体を同定することを目的に以下の実験を行った。初めにEMSAによってDNA-タンパク質の相互作用のためのバッファー条件を決定し、次に核タンパク質と光応答因子結合配列のビオチン化プローブDNAを混合し、DNAアフィニティー沈殿法により結合タンパク質複合体を回収し質量分析により結合タンパク質候補を得た。ペプチド断片情報を元にプライマーを設計し、結合タンパク質候補の全長cDNAを取得し、無細胞発現系によるタンパク質の合成を行った。今後は、合成結合タンパク質候補と光応答因子結合DNA配列の相互作用を確認する。

研究成果の概要(英文)：In order to identify the transcription factor complex that binds to cis element of light regulation factor on 5' UTR of hydrophilin gene, following experiments were carried out. The nuclear extract of *Aspergillus nidulans* and biotinylated DNA probe of the cis element of light regulation factor of 5' UTR of hydrophilin gene were mixed and co-precipitated with streptavidin magnetic beads. Then the transcription factor complex were fragmented by tryptic digestion and subjected to MS analysis.

研究分野：応用微生物

キーワード：Aspergillus 光応答

1. 研究開始当初の背景

土壌糸状菌にとって、光は恒常的な土壌中から、乾燥、紫外線等に曝される苛酷な地表への環境変化を知らせるシグナルである。一方で地表は風や動物等により分生子を拡散させて生育域を広げるチャンスにも恵まれている。*Aspergillus nidulans* は、White-Collar 複合体(WCC)と呼ばれる青色光受容体に加えて赤色光受容体 Phytochrome を保持しており、それらが複合体を形成し(Purschwitz, 2008)青色及び赤色光を同時に受容する事により分生子形成を強力に誘導することが知られている。では、それら光受容体で光シグナルを検知した糸状菌はどのような信号伝達の結果、成熟した分生子を形成するのであろうか？糸状菌分生子においては、分生子が成熟乾燥する過程で高発現するタンパク質として *Neurospora crassa* の CON タンパク質群が知られている。なかでも CON-6 及び CON-10 は分生子の成熟に依存した発現のみならず、栄養菌系中でも青色光に应答して WCC に依存した一過性の発現誘導を受ける (Corrochano, 1995)。CON-6 及び CON-10 は共に hydrophilin と呼ばれる同じタンパク質のカテゴリーに属する (Garay-Arroyo, 2000)。hydrophilin は、原核から真核生物まで広く存在し、「構成アミノ酸中 6%以上がグリシンで、かつ、hydrophilicity index が 1 以上」という物理化学的性質のみで定義されるタンパク質である。*N. crassa* の CON タンパク質群は 80 年代の RNA ドットプロットから十数個見つけられたが、近年、*A. nidulans* のマイクロアレイ解析により、照射光によって 425 遺伝子が発現誘導され、それらの多くが新規の、分生子特異的または分生子形成期特異的遺伝子であることが報告されており (Ruger-Herreros, 2011)、さらに多くの hydrophilin の存在が示唆される。

研究代表者は 2010 年より新規に *A. nidulans* の光応答遺伝子の研究を開始し、Ruger-Herreros 等による 425 遺伝子中に con-6 及び con-10 のオルソログを見出し、それぞれ *conF*、*conJ* と名付けた。両遺伝子の二重破壊株では、分生子の初期発芽速度が有意に低下し、かつ、乾燥ストレスによって増加する分生子内グリセロール、エリスリトール量が野生株に比して増大した。一方それぞれの単独破壊株は上記表現形を示さなかった (Suzuki, 2013)。以上より、Con タンパク質は、機能重複して、乾燥ストレス、初期発芽において何らかの役割を果たしている事が初めて示唆された。

2. 研究の目的

光刺激は多くの生物にとって普遍的な環境シグナルであり、糸状菌においては無性胞子(分生子)の形成に影響を与える要因の一つである。分生子中には、光により高発現する機能未解明のタンパク質が数多く含まれる。研究代表者は、*Aspergillus nidulans* の ConF、

ConJ をはじめとするこれらの光誘導分生子タンパク質のいくつか、植物種子の成熟乾燥過程で高発現するタンパク質に類縁の hydrophilin に分類され、かつ、栄養菌系ではそれらをコードする遺伝子が短時間の照射光に依りて一過的に発現上昇する事を見出したが、その光による発現制御メカニズムは不明である。そこで、多様な hydrophilin の遺伝子プロモーター領域の構造を解明し、転写因子を同定することで、これら遺伝子の発現制御機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1.) これまでの研究で明らかとなった光応答因子結合配列に結合する光応答因子を DNA アフィニティー沈殿法にてタンパク質複合体ごと同定する。すなわち、光応答因子結合配列 DNA の両端をビオチン修飾し、照射光培養、暗培養の菌体から抽出した核タンパク質と適切なバッファー中で DNA-タンパク質複合体を形成させ、ストレプトアビジン磁気ビーズを用いて、ビオチン修飾 DNA 断片をタンパク質との複合体を形成させたまま沈殿回収する。これを SDS-PAGE にてサイズごとに分離し、当該バンドを切り出した後、ゲル内トリプシン消化を行う。それを、研究協力者に送り、ペプチド MS フィンガープリンティングによりタンパク質を同定する。

(2.) (1.)により同定されたタンパク質すべての遺伝子の cDNA をクローニングし、リコンビナントタンパク質を作成する。EMSA により各タンパク質と DNA の相互作用を確認する。FRET あるいは BiFC により in vivo でタンパク質間相互作用及び細胞内局在を確認する。

(3.)各タンパク質破壊株及び過剰発現株における hydrophilin 遺伝子の発現を解析する。

(4.)発現抑制因子結合領域の解析も上記同様に行う。

4. 研究成果

(1.) con 遺伝子上流の光応答因子結合配列に結合するタンパク質複合体を同定することを目的に以下の実験を行った。

これまでの研究で明らかになった光応答因子結合配列の配列情報を元に外注にて 5' 側 3'側のオリゴ DNA を合成し、アニーリングさせた後、市販ライゲーションキットにて tail-to-head ライゲーションにより保存配列のコンカテマーを作成した。アガロースゲル電気泳動によるサイズ確認と切り出し精製により 10 回程度繰り返し配列を取得した。取得した約 10 回繰り返しコンカテマーを市販 PCR 産物クローニングキットによりベクターにクローニングし、シーケンスを外注して繰り返し回数が 10 であることを確認した。クローニングサイト近傍のベクター配列上の配列情報を用いて外注にて 5'-ビオチン化プライマーを上下方向 2 本作成した。ビオチン化プライマーを用いた PCR によりベクター

にクローニングされたコンカテマーを鋳型にしてピオチン化コンカテマーを大量増幅した。市販 PCR 産物精製カラムにて精製後、O.D.計測により濃度を調整した。*A. nidulans* の光照射培養及び暗培養の菌体から核タンパク質を抽出した。DNA-タンパク質の結合に適したバッファー条件を詰めるため、予備実験として EMSA を試みたが DNA-タンパク質の結合を検出できなかった。そのため、当初予定の後の計画に変更を生じた。まず第一に EMSA による DNA-タンパク質相互作用の確認を行うための、条件の検討を行った。クルードの核抽出液を用いた実験では夾雑タンパク質へのプローブの非特異吸着により、全くシフトバンドを検出できなかった。そこで、核抽出液をヘパリンカラムで精製し、ヘパリンカラム吸着画分を EMSA に用いた。また、DNA-タンパク質結合バッファーの検討を行った。その結果、EMSA による DNA-タンパク質相互作用の検出に成功した。

次に、上記により明らかになった光応答因子結合 DNA 配列と核タンパク質との結合バッファー条件を用いて、光応答因子結合 DNA 配列に結合するタンパク質の回収を試みた。ヘパリンカラム精製した核タンパク質とピオチン化プローブ DNA を混合し、ストレプトアビジンビーズを用いた DNA アフィニティー沈殿法により結合タンパク質複合体を回収した。結合タンパク質複合体を SDS-PAGE にてサイズごとに分離し市販 MS コンパチブル銀染色キットにより検出した。バンド毎あるいはまとまったバンド毎にゲルごとタンパク質を切り出し、市販 MS 前処理用ゲル内トリプシン消化キットによりトリプシン消化を行った。ゲルサンプルを国際郵便にて研究協力者へ送付、ペプチド MS フィンガープリンティングによりタンパク質複合体の同定を行った。その結果、2 種類の機能未知新規タンパク質を見出した。

(2.) 光応答因子結合 DNA 配列と相互作用する 2 種類の機能未知新規タンパク質の cDNA を取得した。2 種類の機能未知新規タンパク質と光応答因子結合 DNA 配列の結合を確認するため、無細胞タンパク質発現系にて 2 種類の機能未知新規タンパク質のポリペプチドを発現させ、EMSA に供した。その実験のため、まず、それぞれの遺伝子の cDNA を取得した。当初光応答因子は明培養条件時に DNA 配列に結合すると考えられたため、明培養条件の RNA を抽出、そこからペプチド MS フィンガープリンティングにより明らかとなった遺伝子のゲノム情報より設計した ORF の 5' 側及び 3' 側プライマーを用いた逆転写 PCR により、全長 cDNA を取得しようとした。2 種類の機能未知新規タンパク質遺伝子のうち、片方は容易に全長 cDNA を取得できた。一方、もう片方の機能未知新規タンパク質遺伝子の cDNA は取得できなかった。*A. nidulans* ゲノム情報において、当該遺伝子の遺伝子番号及び ORF 情報及び

アノテーションが当初公開のデータから中途で変更されていたため、転写開始点に相違があるかもしれないと考え、5'RACE 及び 3'RACE により、全長 cDNA の末端配列を決定することとした。ペプチド MS フィンガープリンティングにて同定されたペプチド断片上に位置するプライマーを設計し、そこから 5' 方向及び 3' 方向へ PCR による増幅を試みたが、増幅断片を得る事が出来なかった。そこで、暗培養条件菌体から抽出した RNA を鋳型とした逆転写 PCR により 5' 及び 3' の RACE を試みたところ、両 RACE 断片を取得できた。この断片をベクタークローニングし、シーケンスを確認したところ、公開されているゲノム情報データベースにおける転写開始点以降の 5' UTR 上の 1 塩基が間違っており、機械予測による ORF のフレームシフトが起こっていることが分かった。新たに判明した正しいシーケンスを元にプライマーを設計し、当該遺伝子の全長 cDNA を取得した。

取得した 2 種類の機能未知新規タンパク質全長 cDNA を元に、無細胞タンパク質発現系でのタンパク質発現を試みた。TNT® T7 Quick for PCR DNA キットを用いてタンパク質を発現させるため、取得した cDNA を鋳型にして、T7 プロモーター配列を開始コドン ATG の上流に付加するための PCR を行った。メーカーの指示に従い T7 プロモーター配列及びスパーサー配列、KOZAK 配列を翻訳開始点上流に配した PCR 断片を取得し、これをキットによるタンパク質合成反応に供した。タンパク質発現の確認は FluoroTect™ GreenLys in vitro Translation Labeling System を用いた。TNT® T7 Quick for PCR DNA キットにそれぞれの PCR 断片を供した反応液を SDS-PAGE により分離、スキャナー型画像解析装置により、FluoroTect™ GreenLys in vitro Translation Labeling System の蛍光を検出した。以上より 2 種類の機能未知新規タンパク質全長 cDNA を元に、無細胞タンパク質発現系でのタンパク質発現に成功した。次に、この無細胞発現タンパク質と、光応答因子結合配列の相互作用を確認するため、EMSA を行った。外注にて合成した光応答因子結合配列をベクタークローニングし、ベクター上の配列にアニーリングする FITC 標識プライマーを用いて PCR 増幅により、FITC 標識光応答因子結合配列のプローブを合成した。当該プローブと上記無細胞発現タンパク質を混合し、EMSA に供したところ、DNA を入れない無細胞タンパク質発現系の対照実験区には存在しないバンドが検出されたため、当該機能未知新規タンパク質 2 種は共に光応答因子結合配列に結合することができる事が示唆された。

以上のように本研究では hydrophilin 遺伝子上流制御配列に存在する光応答因子結合配列に結合することが強く示唆される、2 種類の新規タンパク質を発見し、その遺伝子をク

ローニングすることができた。この成果により hydrophilin 遺伝子の発現制御機構の解明に重要な知見を得ることができた。

これまでの研究から糸状菌 hydrophilin 類は機能重複していると想像されるが、共通の転写因子の人為的制御によって複数の hydrophilin の発現を同時に抑えれば、分生子の耐久性が低下すると期待される。植物病害による農業被害の 80%以上は糸状菌によるものであり、また、ヒトの深在性真菌症は重篤例が多い。将来的には病原糸状菌の拡散伝播を防ぐための光による分生子抑制技術、例えば、室内照明の特定波長光の制御により空气中分生子飛散量を低減する事が可能かもしれない。あるいは反対に分生子形成を誘導する波長光の利用により、伝統醸造産業にスターターとして用いられる分生子の耐久性向上や、効率的な生産技術に貢献する基盤的知見が得られると期待される。

引用文献

Purschwitz, J., Mueller, S., Kastner, C., Schoser, M., Haas, H., Espeso, E., Atoui, A., Calvo, A., Fischer, R., 2008. Functional and physical interaction of blue- and red-light sensors in *Aspergillus nidulans*. *Current Biology*. **18**, 255-259.

Corrochano, L. M., Lauter, F. R., Ebbole, D. J., Yanofsky, C., 1995. Light and developmental regulation of the gene con-10 of *Neurospora crassa*. *Dev Biol*. **167**, 190-200.

Garay-Arroyo, A., Colmenero-Flores, J. M., Garcarrubio, A., Covarrubias, A. A., 2000. Highly hydrophilic proteins in prokaryotes and eukaryotes are common during conditions of water deficit. *J Biol Chem*. **275**, 5668-5674.

Ruger-Herreros, C., Rodriguez-Romero, J., Fernandez-Barranco, R., Olmedo, M., Fischer, R., Corrochano, L., Canovas, D., 2011. Regulation of Conidiation by Light in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*. **188**, 809-NIL_897.

Suzuki, S., Bayram, Ö., Bayram, O., and Braus, G. 2013. *conF* and *conJ* contribute to conidia germination and stress response in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol.* **56**: 42-53.

5 . 主な発表論文等 なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 聡 (SUZUKI, Satoshi)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合
研究機構・食品研究部門 食品生物機能開
発研究領域・上級研究員
研究者番号：90353979

(2)連携研究者

楠本 憲一 (KUSUMOTO, Ken-Ichi)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合
研究機構・食品研究部門 食品生物機能開
発研究領域・食品醸造微生物ユニット長
研究者番号：80353978