

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：33302

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03799

研究課題名(和文)糸状菌二次代謝系の誘導因子コンビネーションの解明と誘導予測の研究

研究課題名(英文) Analysis of combination of inducing factors for fungal secondary metabolism genes and prediction of inducing conditions

研究代表者

町田 雅之 (Machida, Masayuki)

金沢工業大学・工学研究科・教授

研究者番号：30358006

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：麹菌を用いて、ゲノム上に多数存在するが発現させることが難しい二次代謝遺伝子について、簡便に発現を解析するためのレポーターを構築した。EGFPは菌系の自家蛍光や場所による蛍光強度の違いなどにより定量的な解析が困難と判明したため、分泌型のルシフェラーゼを改変することで、簡便で定量的再現性の高いレポーターを構築した。このレポーターを用いて、情報科学的に予測された二次代謝系遺伝子を含めて、固体培養、浸透圧ストレス、培養時間等による制御を明らかにした。また、浸透圧ストレス応答に主要な役割を果たすHogA系遺伝子の破壊株を作製し、主要な二次代謝系遺伝子の発現誘導に関する有益な情報が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

二次代謝系遺伝子は、抗生物質や免疫抑制剤を初めとして、社会に有益な様々な生理活性物質の生合成に関わる。ゲノム解析によって、糸状菌ゲノムより多数の二次代謝系遺伝子が発見されたが、その多くは発現させることが困難で、解析の大きな障害になっている。本研究で開発した分泌型ルシフェラーゼを用いたレポーターにより、二次代謝系遺伝子を制御する重要な要素が見いだされた。各要素はこれまでも解明されていたが、組合せによって誘導を増強できること、約80%の遺伝子に友好であること、従来よりも簡便な培養で実現できることなどが明らかとなった。これにより、二次代謝系遺伝子をより有効に利用するための基盤が築かれた。

研究成果の概要(英文)：Secondary metabolism genes often have diverse expression conditions and are generally difficult to be expressed. Thus, we have constructed reporters to measure transcription strength of genes in *Aspergillus oryzae* using EGFP and secretory luciferase, and have found only the latter worked in terms of quantitative measurement. By using the reporter above, we analyzed transcription induction of various secondary metabolism genes including those predicted by bioinformatics based on transcriptome analyses. It was found that most of the genes were induced by solid-state cultivation, high osmotic pressure and long cultivation time. So, we have constructed deletants of some member genes in the HogA signaling cascade. Together with the reporter we have developed, important information in terms of induction of secondary metabolism genes especially by osmotic stress was obtained.

研究分野：ゲノム科学

キーワード：二次代謝 転写制御 ルシフェラーゼ 麹菌 シグナル伝達

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

糸状菌は二次代謝物を生産する微生物として知られている。ゲノム解析以前は、二次代謝生成系の数は種あたり 10 個程度以下しか知られていなかったが、ゲノム解析によりその 10 倍程度の二次代謝生成系遺伝子の存在が明らかとなった (Machida, M. et al., 2005)。しかし、その約 9 割の遺伝子は発現条件も未知であり、生産物質を含めて、機能解析にはほとんど手がつけられていない。

提案者らがゲノム解析を行った麹菌も多数の二次代謝系遺伝子を有することが明らかとなったが、その発現は一般的に強く抑制され、二次代謝物をほとんど生産しない (Tamano, K., et al., 2008)。一方、麹菌と塩基配列レベルでほぼ 100% の類似性があると言われる *Aspergillus flavus* は、二次代謝物の生産が旺盛であり、この近縁種間の際だった違いの理由の解明は長年の命題となっている。

二次代謝系の発現条件は多様で、一般的な実験の培養条件と異なるため、発現条件すら見いだせない場合も多い。しかし、これらの遺伝子も塩基配列上で高い選択圧がかかっていることから、特定の条件で重要な役割を担っていると考えられる (Umamura, M. et al., 2012)。そこで、二次代謝系遺伝子の誘導に関わる多様な外的要因とコンビネーションを解明する。また、上記 2 種糸状菌の比較、染色体上の位置、各シグナル伝達系との関係の情報を加えることにより、多数の SMB 遺伝子クラスターを効率的に発現誘導するための方法論を開発する。これにより、全体の約 9 割とも見積もられる糸状菌の機能未知な二次代謝系遺伝子の効率的な発現誘導と機能解明への貢献が期待される。

### 2. 研究の目的

本研究では、既知の遺伝子だけではなく、transcriptome やゲノム情報を用いて見いだされた、新規な二次代謝生成系 (SMB) 遺伝子クラスターも用いる。得られた SMB 遺伝子クラスターについて、多数の transcriptome からの誘導条件等を加味して、SMB 遺伝子クラスターを選択する。このクラスター内で、絶対発現量が比較的高い遺伝子のプロモーターの下流に GFP などのレポーター遺伝子を接続する (図 2)。得られたレポーター株について、温度、培養時間、C 源、植物固形物、ストレス等の様々な培養条件、およびそれらのコンビネーションも解析することにより、SMB 遺伝子クラスターの環境応答に関してデータを取得する。また、これらとは別に作製する主要なシグナル伝達系遺伝子の破壊 (あるいは条件破壊)・強発現株による transcriptome 解析の結果を合わせて解析することにより、複雑で多様な SMB 遺伝子クラスターの制御機構の解明を目指す。

### 3. 研究の方法

(1) 本研究では、多数の SMB 遺伝子クラスターについて、様々な条件での転写発現強度を迅速かつ正確に測定するためのレポーターの構築が重要である。そこで、GFP を用いたレポーター系を構築した。一方、麹菌では GFP の蛍光波長域での自家蛍光 (背景蛍光) が強いことが分かっていることから、菌糸の位置による違いを含めて、蛍光強度の正確な測定は困難であることも予想された。そこで、GFP とは別に、分泌型のルシフェラーゼを用いたレポーター系の構築も試みた。

(2) 次に、上記で構築および性能評価を行ったレポーター系を用いて、代表的および新規の SMB 遺伝子クラスターの遺伝子の転写発現強度の解析を行った。培養条件としては、温度、時間を基本として、固体培地 (植物固形成分)、塩強度などのストレスを用いた。また、シグナル伝達系との関連性を解析する目的で、代表的なシグナル伝達系遺伝子の破壊株を作製した。最終的に、上記の結果を数値化し、シグナル伝達系との関連を含めて解析した。

### 4. 研究成果

(1) EGFP をコードする遺伝子を *malP*、*tef1*、*amyB* などの比較的強力と考えられるプロモーターの下流に接続して、麹菌 (相同組換え効率の向上を目的として *ligD* 遺伝子を破壊した *Aspergillus oryzae* NS4 株) に対して、*pyrG* をマーカーとして同領域に相同組換えによって形質転換した。得られた組換え体数株を用いて、顕微鏡下で蛍光を観察したところ、GFP 遺伝子の形質転換の有無による蛍光強度の際は明確に観察されたが (図 1)、*amyB* プロモーターによる glucose の有無や maltose の添加による蛍光強度の違いは明確に観察することができなかった。この理由として、EGFP の波長域での菌糸からの比較的強い自家蛍光がある。また、菌糸の場所による蛍光強度の違いも存在することから、顕微鏡観察や小さい蛍光スポットを用いたプレートリーダーによる測定では、遺伝子発現強の解析を目的とした定量的測定は非常に難しいと考えられた。さらに、本研究で予定しているふすまなどの植物固形成分は、EGFP の波長域に非常に強い蛍光を持つことが分かり、この微細な固形成分を菌糸塊から除去することも困難であることが明らかとなった (図 1)。

(2) EGFP をレポーター系として定量性を改善する手段として、培養条件などの厳密な制御によって菌糸の成長を抑制し、得られた多数の微小な菌糸をフローサイトメトリーで測定して統計的に評価することで、自家蛍光を背景とした微弱な蛍光の増加を有意差を以て測定できる可能性がある。しかし、高額な装置が必要で確実性も不明確であることなどから、EGFP に代わる方法として、分泌型のルシフェラーゼを用いる方法を優先して検討した。

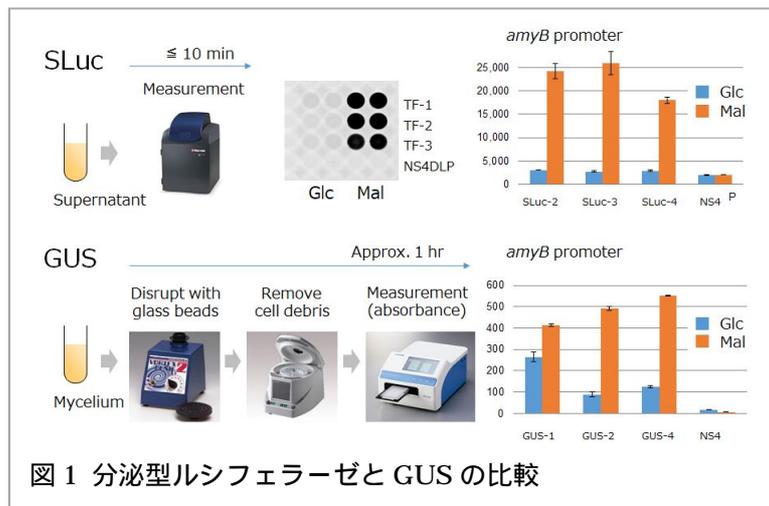


図 1 分泌型ルシフェラーゼと GUS の比較

分泌型のルシフェラーゼを用いたものとして、酵母用のレポーター系が販売されているが、そのまま麹菌に形質転換しても活性は検出できなかった。そこで、細胞外分泌を目的として、N 末端を改変した分泌型のルシフェラーゼ遺伝子を構築し、麹菌に形質転換することにより、細胞外でのルシフェラーゼ活性の検出に成功した。このレポーター系を用いて *amyB* 遺伝子プロモーターの誘導性を検討した。この結果、細胞内に蓄積される GUS タンパク質の活性を測定する方法と比較して、高い再現性を以て測定できることが湿された (図 2)。計測に必要な時間と労力も大幅に軽減されることから、多数のサンプルの測定が必要な本研究にとって、非常に重要なレポーター系が構築されたと考えられる。

このルシフェラーゼは、至適 pH の存在が知られている。そこで、麹菌から分泌されたルシフェラーゼを用いて、pH に対する安定性を解析した。この結果、pH 4.5 程度の酸性条件下では、短時間で活性が失われることが明らかとなった。一方、pH 6.0 程度であれば、数時間程度以下であれば温度に依らず安定であることが分かった。このことから、長時間の培養を擁する実験では、pH が極端に下がらないようにリン酸バッファなどを添加しておくことが望ましい。また、得られた結果は培養過程の全体で蓄積された物ではなく、過去数時間程度に分泌されたルシフェラーゼの量を反映していると考えられる。GFP は細胞内での安定性が高く、薬剤の添加などで培養の途中で発現を抑制した場合でも、その効果が反映されにくいことが知られている。本研究でのルシフェラーゼによる特性は、この様な場合にはメリットになると考えられる。

(3) 分泌型のルシフェラーゼを用いたレポーター系の特性がほぼ解明されたことから、メラニン合成に関わる二次代謝系遺伝子である *melB* について発現制御の解析を行った。*melB* は固体培養で誘導されることが知られていることから、CD-P 液体培地をベースとして、ふすまなどの植物由来の固形物を添加した培地を用いて行った。この結果、

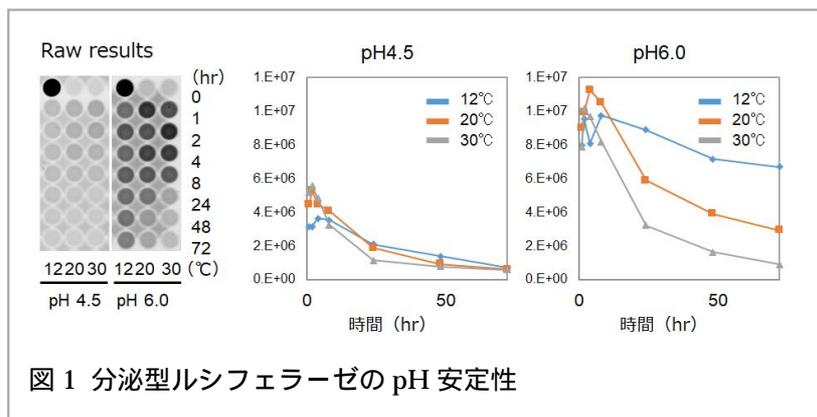


図 1 分泌型ルシフェラーゼの pH 安定性

ふすま、きなこ、煎り麦などの添加によって発現が誘導されること、ふすまの場合には、温度を 30 から 25 に下げることにより、強く誘導されることが明らかとなった。わずかな温度低下による誘導は本研究によって初めて明らかにされたものである。

次に、液体培地を用いず、固体そのもので培養した場合の発現の解析を行った。その結果、CD-P をベースとした場合と類似した結果が得られたが、ふすまにおいては 30 でも強い誘導が見られた。従来、固体培養での発現誘導は、固形物の中に入り込んだ菌糸を含めて破碎して、抽出された mRNA の PCR などによる定量が行われていたが、技術的に難しく再現性の確保が難しかった。分泌型のルシフェラーゼを用いた方法では、固形物にバッファを添加して混合し、上清のルシフェラーゼ活性を測定するため、非常に簡便で再現性も高い。

(4) 次に、*melB* および二次代謝系の広範な制御因子と考えられている *laeA* 遺伝子の発現に関して、高塩濃度のストレス応答と浸透圧応答に関係するシグナル伝達系と知られている HogA MAPK カスケードに属すると考えられる遺伝子の破壊との関連に関する解析を行った

(Hagiwara et al., 2007) まず、元株である *A. oryzae* NS4 株において、*melB*、*laeA* のいずれも高塩濃度で発現が誘導されることが分かった。そこで、HogA カスケードに属すると考えられる *hogA2* と *sskA* の各遺伝子破壊株での発現応答を解析したところ、*laeA* に関してはこれらの遺伝子の破壊による発現応答に変化は見られなかった。一方、*melB* に関しては、 $\Delta$ *sskA* による発現応答の変化は見られなかったが、 $\Delta$ *hogA2* の破壊株においては高塩濃度による誘導の顕著な抑制が観察された。これらの結果から、(1) *melB* は HogA カスケードの制御下にあること、*laeA* は HogA カスケードとは別の制御系による制御を受けていることが明らかとなった。また、 $\Delta$ *sskA* によって *melB* の応答性が失われなことから、HogA カスケードの入力として、*sskA* とは別の系統の存在が示唆された。これまでに、*srrA* 系の存在が示唆されており、今回の結果はそれを裏付けるものと解釈することができる。

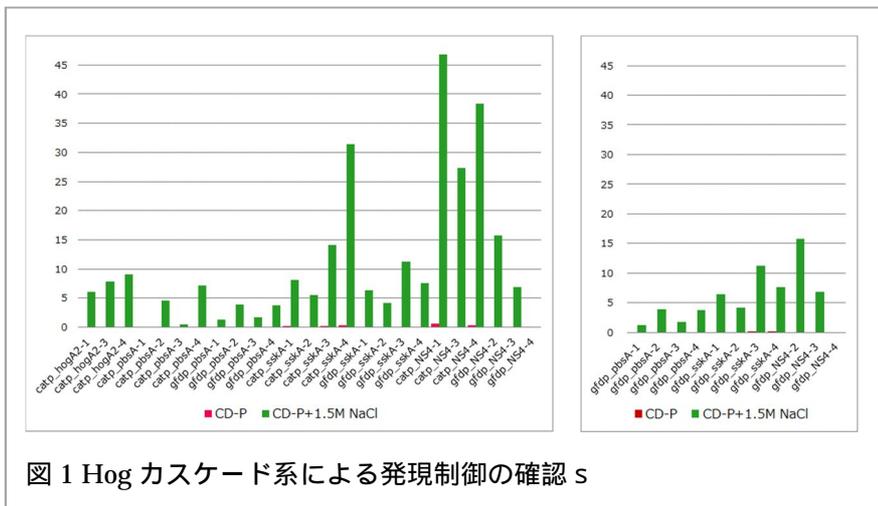


図 1 Hog カスケード系による発現制御の確認

なお、上記で用いた *HogA2*、*sskA* などの破壊株については、その制御下にあると考えられている遺伝子である *catA*、*gfdB* (Furukawa et al., 2005) に関して、高塩濃度による発現誘導について解析を行った。この結果、親株である NS4 株での高塩濃度による発現誘導と比較して、*catA*、*gfdB* のいずれも、破壊株では誘導能が減少していることが明らかとなった。

以上より、本研究で構築したルシフェラーゼを用いたレポーター系が遺伝子の転写発現解析に有効であることが明らかとなったため、多数の二次代謝系遺伝子について検討することとした。候補とする SMB 遺伝子クラスタとして、*A. flavus* の多数の発現解析の結果に基づいて MIDDAS-M で予測された同クラスタのうち、*A. oryzae* の発現解析で発現が確認されたものを選択した。これらのクラスタ中で発現強度が比較的高い遺伝子を選択し、そのプロモーターの下流に分泌型のルシフェラーゼをレポーターとして組込んだ麹菌株を作製した。これらについて発現解析を行ったところ、約 8 割が高塩濃度下で発現が誘導された。また、24 時間に比較して 48 時間でより強く誘導されるものが多く見られた。

GFP の蛍光観察による発現解析は、菌系の自家蛍光や菌糸間での蛍光強度のばらつきが多きことなどから、定量的解析には難しいことが明らかとなった。微粒子に閉じ込めることなどによって、多数の菌糸をフローサイトメトリーで測定して統計解析することでこの問題を解決できる可能性はある。

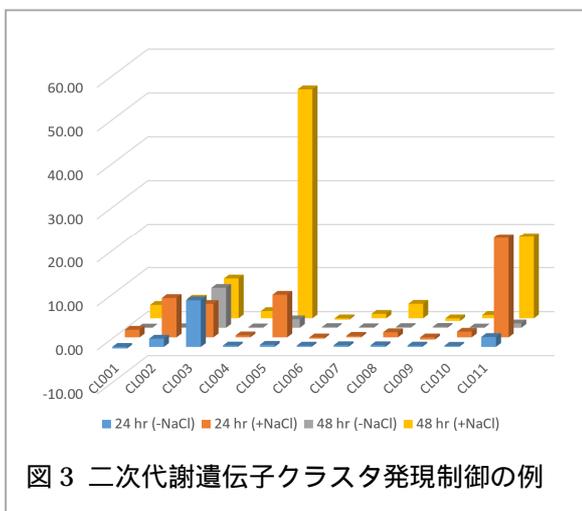


図 3 二次代謝遺伝子クラスタ発現制御の例

< 引用文献 >

Furukawa, K., Hoshi, Y., Maeda, T., Nakajima, T. & Abe, K., Mol Microbiol, 56, 1246-1261 (2005)

Hagiwara, D., Asano, Y., Marui, I., Furukawa, K., Kanamaru, K., Kato, M., Abe, K., Kobayashi, T., Yamashino, T., Mizuno, T., Biosci Biotechnol Biochem, 71, 1003-1014 (2007)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 町田雅之、佐野元昭、石井智子
2. 発表標題 麹菌二次代謝系の転写制御の分泌性ルシフェラーゼによる迅速な解析
3. 学会等名 第13回日本ゲノム微生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 町田雅之、佐野元昭、石井智子
2. 発表標題 麹菌二次代謝系の転写制御の分泌性ルシフェラーゼによる迅速な解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 町田雅之
2. 発表標題 Genome based analysis of secondary metabolism gene clusters from filamentous fungi
3. 学会等名 KSMB 2018 Annual Meeting & International Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 町田雅之、石井智子、佐野元昭
2. 発表標題 麹菌の二次代謝系遺伝子の転写制御の迅速な解析
3. 学会等名 第18回糸状菌分子生物学コンファレンス
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masayuki Machida, Yuki Miyamura, Takashi Kubo, Shigenari Yamaguchi, Tomonori Fujioka, Kiyoshi Kawai, Hiroya Itoh, Makoto Matsui, Tatsuya Yokoyama, Takashi Shibata, Kyotetsu Enai, Hitohiro Saitoh, Akira Ohyama
2. 発表標題 Genome based analysis and engineering of secondary metabolism gene clusters from filamentous fungi - systematic expression optimization and gene swapping
3. 学会等名 Asian Mycological Conference 2017 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 町田雅之
2. 発表標題 糸状菌二次代謝物の生合成酵素など遺伝子の探索と利用
3. 学会等名 第21回生体触媒化学シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

糸状菌の二次代謝系遺伝子の研究 <a href="https://www.kanazawa-it.ac.jp/wwwr/seeds/data201808/KIT_seeds201808-140.pdf">https://www.kanazawa-it.ac.jp/wwwr/seeds/data201808/KIT_seeds201808-140.pdf</a>
--

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	佐野 元昭	金沢工業大学・バイオ・化学部・教授	
	(Sano Motoaki)  (80410299)	  (33302)	