

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：33919

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450116

研究課題名(和文)糸状菌の鉄ホメオスタシスに関わる転写制御因子HapXの機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of the transcriptional repressor HapX involved in iron homeostasis in filamentous fungi

研究代表者

加藤 雅士(Kato, Masashi)

名城大学・農学部・教授

研究者番号：70242849

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：(1) 部分欠失変異HapX をゲルシフト法にて解析したところ、N末端の17アミノ酸からなる部分がHapB/C/E複合体との相互作用に重要であることが強く示唆された。(2) in vivo解析の結果、HapXの機能には上記17アミノ酸が重要であることが示された。(3) C末端部分のリコンビナントタンパク質を調製することに成功した。分光学的解析から鉄硫黄クラスターを含むことが示唆された。(4) TAPタグを融合したHapXを発現する系を構築し、温和な条件でHapXを精製したところ、HapXと相互作用している因子がいくつか検出された。

研究成果の概要(英文)：(1) Results of EMSA (Electrophoresis Mobility Shift Assay) with some HapX deletion mutants strongly suggested that the 17 amino acid residues in the N-terminal domain plays an important role in the interaction of HapX and HapB/C/E complex. (2) The results of the in vivo analysis showed that the 17 amino acid residues is required for the function of HapX. (3) We have succeeded in obtaining sufficient amount of the recombinant C-terminal domain containing the Cysteine-rich regions. The results of spectroscopic analysis suggested the existence of iron-sulfur clusters. (4) We established the expression system for a HapX protein with TAP (Tandem Affinity Purification) tag in *Aspergillus nidulans*. When the HapX was purified under the mild conditions, some proteins interacting with HapX were detected.

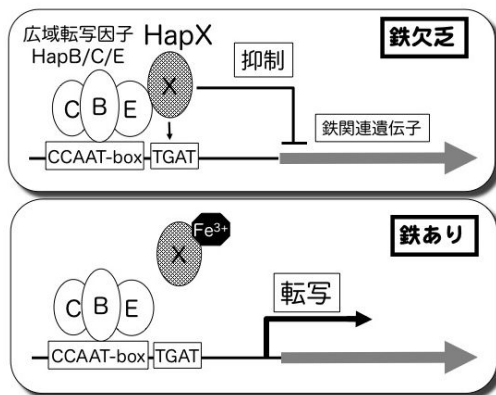
研究分野：応用微生物学

キーワード：HapX 鉄の恒常性維持 ホメオスタシス CCAAT配列 Hap複合体 転写抑制 転写因子 転写調節

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である。申請者は麹菌 (*Aspergillus oryzae*) より CCAAT 結合因子を生化学的手法で同定 (Hap 複合体と命名)、本因子が広域転写促進因子であることを明らかにしてきた。<sup>1)</sup> その研究の過程で申請者は HapB/C/E 複合体と相互作用する因子 HapX を発見した。<sup>2)</sup> 当初機能は不明であったが、その後の研究により以下のことが明らかにされていた。<sup>3-5)</sup>

- 1) HapX は鉄欠乏時に緊急的に鉄の使用を押しさえ、鉄の取り込みを亢進させる。<sup>3)</sup>
- 2) 出芽酵母 *S. cerevisiae* には HapX のホモログが存在しない。<sup>3)</sup>
- 3) 鉄欠乏時に HapB/C/E 複合体と HapX は相互作用し、抑制的に働く。<sup>3)</sup>
- 4) HapX は HapB/C/E との協調的 DNA 結合により、鉄関連遺伝子プロモータを認識する (加藤ら、申請時に投稿準備中)。
- 5) HapX は病原性糸状菌 *A. fumigatus* やクリプトコッカスの感染に不可欠であり、臨床医学上重要な因子である。<sup>4,5)</sup>



HapB/C/E-HapXによる鉄関連遺伝子の抑制モデル

図1. HapB/C/E-HapXによる鉄関連遺伝子の抑制機構のモデル図

HapX による鉄関連遺伝子の制御の詳細が明らかになりつつある一方、HapX の機能についてはまだ不明な点が多かった。機能ドメインに関しては、既に DNA 結合ドメイン (bZip ドメイン) と、核移行シグナルの解析を進めてきたが、存在が示唆されている Hap 複合体との相互作用ドメイン (N 末端に推定相互作用ドメインを見出している) や鉄の濃度センサードメイン (C 末端側のシステインに富む領域には鉄硫黄クラスターの推定モチーフが存在する) については、まだ、手つかずの状態であった。

糸状菌では我々のグループとドイツのグループおよびオーストリアのグループが共同して解析を進めており、他に追従するグループはない状況であった。同様の研究が *S. pombe* やクリプトコッカスの研究グループでも進められていたが、既に *in vitro*, *in vivo* 両面で広範な解

析を進めている我々のグループの方が、アドバンテージを持っていた。

2. 研究の目的

申請者は既に、リコンビナント HapB, HapC, HapE および HapX サブユニットからの HapB/C/E/X 複合体の再構成に成功しており、鉄関連遺伝子のプロモータへの結合実験に成功していた。HapX は単独では DNA に結合できないが、bZip ドメインを有しており、鉄欠乏時に HapX と HapB/C/E 複合体との親和性が上昇すると、鉄関連遺伝子のプロモータに存在する CCAAT-box とその下流の TGAT 配列に協調的に結合し、転写を抑制する (図参照)。この時、TGAT 配列のない CCAAT-box のみのプロモータには HapX は結合しないので、厳密に鉄関連遺伝子を区別することができることを明らかにした。

本研究では以下の項目を目的とする。

HapB/C/E と HapX の相互作用を分子レベルで詳細に理解する。

C 末端のシステインに富む領域に着目し、鉄濃度の感知機構を解明する。

HapX との相互作用タンパク質を同定し、発現抑制機構の手掛かりを得る。

以上の知見を総合し、真菌における鉄関連遺伝の転写調節機構を解明する。

3. 研究の方法

(1) HapX 部分欠失変異タンパク質の調製: 推定相互作用ドメインを欠くような部分欠失変異 HapX や同ドメイン内に変異を有するリコンビナントタンパク質を作製した。ターゲットとする推定相互作用ドメイン全体と高度な保存が確認された二箇所に対して KOD -Plus- Mutagenesis Kit (TOYOBO) を用いてネイティブな HapX を発現するプラスミドに対し変異を導入した (図2)。

HapX	037-SVTSKEWIIIPRPKPGRKPAT-057
HapXΔHCID	037-SV-----AT-057
HapXΔPGR	037-SVTSKEWIIIPRPK---KPAT-057
HapXΔSK	037-SVT--EWIIIPRPKPGRKPAT-057

図2. 各 HapX 変異体における欠失変異部分のアミノ酸配列

(2) 蛍光標識を用いたゲルモビリティシフトアッセイ (蛍光 EMSA)

Kato らの方法<sup>6)</sup>に、若干の変更を加えた。EMSA に用いるプローブ DNA の放射性標識 DNA の代わりに、蛍光色素で標識された DNA を用いた。すなわち、プライマーを増幅断片の 5' 末端に 6-FAM (Fluorescein) が付加されるように設計し、PCR を用いてプローブ DNA (cytochrome c プロモータ DNA) を調製後、実験に用いた。リコンビナントタンパク質は精製後、2 M グアニジン溶液で変性させ、透析により再生し

たものを用いた。変性・再生は次に示す手順で行った。濃度調整済みのタンパク質溶液を 6 M グアニジン溶液が終濃度 2 M となるように混合し、透析用チューブに入れ、透析 buffer [15 mM Hepes-KOH (pH7.9), 60 mM KCl, 1 mM EDTA, 2 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 1.5% (w/v) glycerol] 500 mL を用いて、室温で 30 分間、4 で 90 分間を 3 回の合計 4 回分を行った。非特異的結合を抑えるために、EMSA に供するサンプルには Ligtshtift™ poly dI-dC (1 µg/µL) (Thermo Scientific) を加えた。サンプル調製は以下の手順で行った。プローブ DNA と poly dI-dC、5x Binding buffer [125 mM Hepes-KOH (pH7.9), 300 mM KCl, 5 mM EDTA, 5 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 50% glycerol]、透析後のタンパク質を混合し、透析バッファーを用いて 10 µL とした。その後、28 で 5-10 分間、室温でさらに 5-10 分間放置した。泳動は 4%ポリアクリリルアミドゲル (表 3) を使用し、電圧 150 V 一定の条件で、4 にて行った。サンプル調製から泳動まで、色素保護のためにアルミホイルで遮光した。泳動後、ゲルをガラス板ごとアルミホイルで包み、Typhoon 9410 (GE Healthcare) にて検出を行い、イメージ解析ソフトウェア ImageQuant TL (GE Healthcare) を用いて画像解析を行った。

### (3) 推定相互作用ドメインの *in vivo* 解析:

上記の変異 *hapX* 遺伝子を *Aspergillus nidulans* *hapX* 欠失株に導入した。鉄の存在下および欠乏条件下で培養し、生育の違いを調べた。

(4) C 末端のシステインに富む領域に着目した解析: 大腸菌を用い、C 末端のシステインに富む領域を含むリコンビナントタンパク質を mg オーダーで調製することに成功した。分光光度計により、このリコンビナントタンパク質の吸収スペクトルを解析した。

(5) HapX と相互作用するタンパク質の同定: *hapX* 欠失株に TAP タグ(Tandem Affinity Purification Tag) 等を融合した HapX を発現する系を構築した。温和な条件で HapX を精製し、HapX と相互作用していると思われるタンパク質を TOF-MS にて解析した。

## 4. 研究成果

(1) 蛍光プローブ DNA を用いたゲルモビリティシフトアッセイ系の確立: 本研究では DNA と HapB/C/E および HapX の相互作用を安全かつ迅速に解析するため、非放射性標識 DNA を用いたゲルモビリティシフトアッセイ (EMSA; Electrophoresis Mobility Shift Assay) の系の確立を試みた。EMSA では DNA の高感度の検出が必要である。検出効率が良く、オリゴ

DNA の標識によく用いられる蛍光試薬 6-FAM (Fluorescein) で標識された合成 DNA を用いて PCR を行ない、cytochrome *c* プロモータに由来する DNA 断片を調製した。我々は既に cytochrome *c* プロモータには HapB/C/E と HapX が協調的に結合することを明らかにしている (Hortschansky, Kato ら、未発表データ(当時))。上記の標識 DNA に再構成した HapB/C/E 複合体を加えたところ、特異的な結合を示すシフトバンドが見られた (図 A-C lane 2)。HapB/C/E に加えて HapX を添加したところ、濃度に依存して、さらに移動度の小さいシフトバンド (図 3 A-C lane 5, 6) が観察された。本実験系で HapB/C/E 複合体と HapX との相互作用が十分に解析できることが明らかとなった。以上の結果より、放射標識 DNA を用いた EMSA と同等かつ、迅速で簡便かつ安全な実験系を確立することができたと結論した。

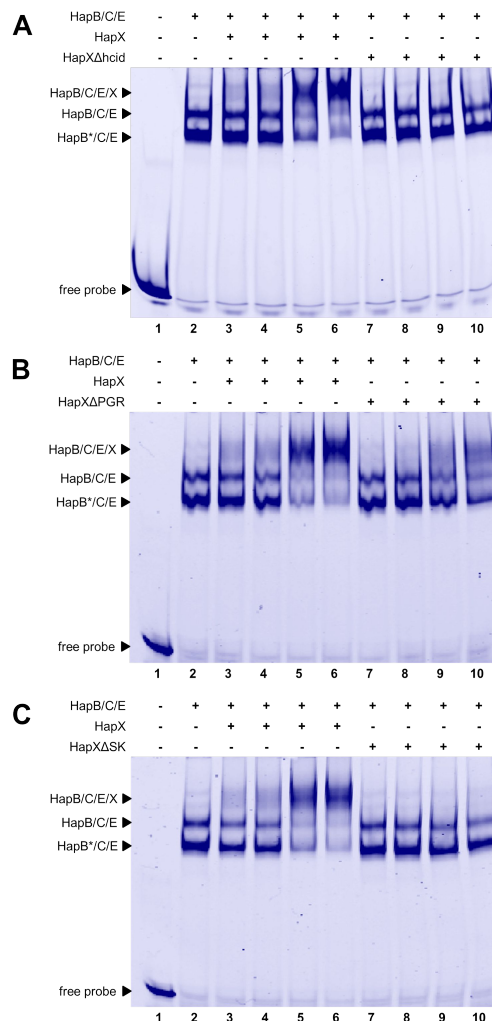


図3. 非放射性標識 DNA を用いた EMSA による DNA, HapB/C/E, HapX (野生型および欠失変異タンパク質) の相互作用の解析。HapXΔhid (A), HapXΔPGR (B), HapXΔSK (C) を解析に用いた (レーン 7-9)。それぞれ、対照として野生型 HapX を用いた実験も行なった (レーン 3-6)。

(2) 推定相互作用ドメインの *in vitro* 解析  
*in vitro* において HCID の機能を検証するために変異体 HapX および HapB/C/E 複合体を上記の EMSA に供した。図 3 にて、HapB/C/E 複合体と野生型 HapX との相互作用を示す移動度の小さいバンド (図 3 A-C lane 5, 6) が、HapXΔHCID を用いた場合には、検出限界以下まで減少していることが明らかとなった (図 3A)。この結果は、<sup>39</sup>TSKEWIIIPRPKGRKP<sup>55</sup> の 17 アミノ酸からなる部分が HapB/C/E 複合体との相互作用に重要な働きをしていることが強く示唆された。この領域のうち、とくに保存されている連続したアミノ酸残基に注目し、40, 41 番目のアミノ酸 SK を欠失した HapXΔSK、51-53 番目のアミノ酸 PGR を欠失した HapXΔPGR を用いて同様の解析を行なった。その結果、HapXΔPGR (図 3B) では、高濃度の条件において HapB/C/E と HapX が結合していると思われる位置に若干シフトバンドが確認されるものの、結合量は顕著に低下していることが分かった。この結果は、51-53 番目のアミノ酸 <sup>51</sup>PGR<sup>53</sup> は HapB/C/E と HapX との相互作用に必須ではないものの、安定な結合には必要であることを強く示唆している。一方、HapXΔSK (図 3C) では、HapXΔHCID と同じく、検出限界以下まで変異 HapX との複合体の量が減少していることが明らかとなり、40, 41 番目のアミノ酸残基 <sup>40</sup>SK<sup>41</sup> が HapB/C/E と HapX との複合体形成に極めて重要な役割をしていることが示唆された。以上の結果から、HapX の N-末端部分にある 17 アミノ酸からなる部分、特にその中の 40 番目のセリンと 41 番目のリジンは HapB/C/E 複合体と HapX の相互作用に重要であることが予想される。セリン残基の側鎖は水素結合の形成に参与する可能性があり、リジン残基に関しては水素結合に加え、静電的な相互作用にも関与できることから、HapB/C/E のいずれかの部分と直接に接触し、HapX-HapB/C/E 複合体の安定化に寄与しているのかもしれない。ただし、これらの相互作用は非常に弱いものであるため、HapX の bZip ドメインを介した DNA の相互作用の助けを借りて DNA-HapX-HapB/C/E 複合体全体の安定化を図っていると思われる。実際に、HapX の認識する DNA 配列に変異を加えることで複合体に HapX が結合できなくなること<sup>6)</sup> は上記の考えを支持している。

(3) 推定相互作用ドメインの *in vivo* 解析:  
変異 HapX を HapX 欠失株に導入して鉄の欠乏条件下で解析したところ、推定相互作用ドメインに変異を導入すると、HapX の機能がほとんど無くなることが明らかとなり、*in vivo* での HapB/C/E 相互作用ドメインの重要性が示された。

(4) C 末端のシステインに富む領域に着目した鉄硫黄クラスターの存在の証明:大腸菌を用い、リコンビナントタンパク質を mg オーダーで調製することに成功した。分光学的にこのリコンビナントタンパク質を解析したところ、鉄硫黄クラスタータンパク質様の吸収スペクトルを示すことができた。詳細な解析は今後の研究課題とする。

(5) HapX と相互作用するタンパク質の同定:hapX 欠失株に TAP タグ(Tandem Affinity Purification Tag) 等を融合した HapX を発現する系を構築した。温和な条件で HapX を精製したところ、HapX と相互作用している因子がいくつか検出された。TOF-MS で解析を行ったところ、CDC28 の相同タンパク質を始め、興味深い因子がいくつか同定できた。詳細な解析は今後の研究課題とする。

#### < 引用文献 >

- 1) Kato M. An Overview of the CCAAT-binding factor in filamentous fungi: assembly, nuclear translocation and transcriptional enhancement. (Review) *Biosci. Biotech. Biochem.* 69, 663-672 (2005)
- 2) Tanaka A., Kato M., Nagase T., Kobayashi T., and Tsukagoshi N. Isolation of genes encoding novel transcription factors which interact with the Hap complex from *Aspergillus* species. *Biochim. Biophys. Acta*, 1576, 176-182 (2002).
- 3) Hortschansky P., Eisendle M., Al-Abdallah Q., Schmidt A.D., Bergmann S., Thön M., Kniemeyer O., Abt B., Seeber B., Werner E.R., Kato M., Brakhage A.A., Haas H. Interaction of HapX with the CCAAT-binding complex-a novel mechanism of gene regulation by iron. *EMBO J.* 26(13):3157-68. (2007)
- 4) Schrettl M., Bschmann N., Varga J., Heinekamp T., Jacobsen I. D., Jöchl C., Moussa T. A., Wang S., Gsaller F., Blatzer M., Werner E. R., Niermann W.C., Brakhage A. A. and Haas H. HapX-mediated adaption to iron starvation is crucial for virulence of *Aspergillus fumigates*. *PLoS Pathog.* 6(9): e1001124.
- 5) Jung W. H., Saikia S., Hu G., Wang J., Fung C. K., D'Souza C., White R., Kronstad J. W. HapX positively and negatively regulates the transcriptional response to iron deprivation in *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Pathog.* 6(11): e1001209.
- 6) Gsaller F. Hortschansky P. Beattie S. R. Klammer V. Tuppatsch K. Lechner B. E. Rietzschel N. Werner E. R. Vogan A. A. Chung D. Muhlenhoff U. Kato M. Cramer R. A. Brakhage A. A. and Haas, H. (2014) *EMBO J.* 33, 2261-2276.



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 4件)

村田俊輔・中村隼人・志水元亨・加藤雅士：  
糸状菌における鉄恒常性のマスターレギュ  
レーター HapX と CCAAT 結合複合体との  
相互作用、名城大学 総合研究所紀要  
(ISSN 1344-8099) 第 21 号、P.77-80 .  
(2016) 査読無

Hortschansky P, Ando E, Tuppatsch K,  
Arikawa H, Kobayashi T, Kato M, Haas H,  
Brakhage AA. Deciphering the Combinatorial  
DNA-binding Code of the CCAAT-binding  
Complex and the Iron-regulatory Basic Region  
Leucine Zipper (bZIP) Transcription Factor  
HapX. *J. Biol. Chem.* 290, 6058-6070 (2015)  
doi: 10.1074/jbc.M114.628677. 査読有

中村隼人, 林口拓実, 増田 裕一郎, 安  
田(吉野) 庄子, 北本則行, 志水元亨、加  
藤雅士：麹菌転写因子 HapX によるシデロ  
フォア生産調節機構、名城大学 総合研  
究所紀要 (ISSN 1344-8099) 第 19 号、P.33-36 .  
(2014) 査読無

Gsaller F, Hortschansky P, Beattie SR,  
Klammer V, Tuppatsch K, Lechner BE,  
Rietzschel N, Werner ER, Vogan AA, Chung  
D, Mühlenhoff U, Kato M, Cramer RA,  
Brakhage AA, Haas H. The Janus transcription  
factor HapX controls fungal adaptation to both  
iron starvation and iron excess. *EMBO J.* 33,  
2261-2276 (2014)  
doi: 10.15252/embj.201489468. 査読有

〔学会発表〕(計 5件)

Masashi Kato. “Molecular Breeding of  
*Aspergillus oryzae*, an Important Mold for  
Japanese Fermentation Industry, Based on the  
Post-genomic study.” 2015 International  
Conference on Fermentation. Oct. 23, Jeonju,  
Jeonbuk, Korea. (2015)

村田俊輔・中村隼人・金子優平・志水元亨・  
加藤 雅士：糸状菌における鉄恒常性のマ  
スターレギュレーター HapX の機能解析。  
日本農芸化学会 2015 年度大会, 3月28日,  
岡山, (2015)

中村隼人・金子優平・志水 元亨・加藤 雅  
士：鉄恒常性に関わる転写因子 HapX と  
CCAAT-box 結合因子 HapB/C/E との相互  
作用. 第 14 回糸状菌分子生物学コンフ  
アレンス, 11月16日, 仙台, (2014)

金子 優平、中村 隼人、祖父江 衣純、志  
水 元亨、加藤 雅士：糸状菌の鉄恒常性に

関わる転写因子 HapX の機能解析. 日本  
農芸化学会 2014 年度大会, 3月28日, 東  
京, (2014)

Masashi Kato. “Fermentation is a modern  
alchemy: microbes add value to a product.”  
The 2014 international annual conferences  
of 4<sup>th</sup> Basic science in conjunction with 5<sup>th</sup>  
global resource conservation. Feb. 12. (基調  
講演) Batu, Indonesia. (2014)

〔図書〕(計 1件)

志水元亨、小林哲夫、加藤雅士(2015 .2 .  
13)第 18 章 ゲノム情報を活用した麹菌  
の新たな分子育種の可能性。「発酵・醸  
造食品の最前線(監修：北本勝ひこ)」  
151-157, CMC 出版.

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.agr.meijo-u.ac.jp/labs/nn008/  
index.html](http://www.agr.meijo-u.ac.jp/labs/nn008/index.html)

6. 研究組織

(1)研究代表者

加藤 雅士 (KATO MASASHI)  
名城大学・農学部・教授  
研究者番号：70242849

(2)研究分担者

志水 元亨 (SHIMIZU MOTOYUKI)  
名城大学・農学部・助教  
研究者番号：20423535

(3)連携研究者

小林 哲夫 (KOBAYASHI TETSUO)  
名古屋大学・生命農学研究科・教授  
研究者番号：20170334

高谷 直樹 (TAKAYA NAOKI)

筑波大学・生命環境科学研究科・教授  
研究者番号：50282322