

平成22年3月31日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007年度～2008年度  
 課題番号：19580075  
 研究課題名（和文） 糸状菌解糖系酵素遺伝子の選択的転写開始機構の解明  
 研究課題名（英文） Carbon source-dependent alternative transcription initiation of fungal glycolytic genes  
 研究代表者  
 五味勝也（GOMI KATSUYA）  
 東北大学・大学院農学研究科・教授  
 研究者番号 60302197

## 研究成果の概要：

麹菌において解糖系のエノラーゼ遺伝子が、グルコースなどの解糖系で代謝される炭素源と酢酸やエタノールなどの糖新生を伴う炭素源の違いによって、450塩基ほど離れた異なる転写開始点を利用することが見出だされた。エノラーゼ遺伝子のプロモーター領域の欠失変異の解析により、上流と下流の異なる転写開始点から転写が開始されるために必要なシスエレメントがそれぞれ存在することが示された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

## 研究分野：応用微生物学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：糸状菌、転写制御、転写開始、解糖系遺伝子、糖新生、エノラーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

エノラーゼやグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素は解糖系の酵素として重要な働きをしており、その遺伝子はグルコースなどの解糖系に関わる炭素源の培地では非常に高発現している。麹菌（*Aspergillus oryzae*）のEST解析ならびにゲノム解析の結果を比較したところ、非常に興味深いことにエノラーゼ遺伝子（*enoA*）の5'非翻訳領域（5'-UTR）に約0.5 kbの長いイントロ

ンの存在が予想され、培養条件によって異なる転写開始点が生じている可能性を見出した。これはグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素遺伝子（*gpdA*）でも同様であり、*enoA*ほど厳密ではないが、条件により離れた転写開始点を利用していることが示唆された。解糖系という生物の基幹代謝経路の重要な酵素遺伝子の転写が、炭素源の違いにより500 bpも離れた位置から開始されるということは、これまで報告されて

おらず、全く新規な発見であった。

解糖系の酵素遺伝子の発現制御は、主として解糖、すなわちグルコースやフルクトースなどの糖類の代謝という観点から解析がされてきたことから、構成的な遺伝子発現に関わる重要な転写因子を含む発現制御機構に関する研究成果が豊富に蓄積されており、ほとんど解析が終了したように思われている。しかし、糖新生を伴って資化されるような炭素源（酢酸やエタノールなど）での発現制御についてはあまり重点が置かれて解析がなされておらず、ましてや炭素源によって異なる転写開始点を利用されるという現象は全く知られていなかった。

## 2. 研究の目的

糸状菌の解糖系酵素遺伝子が、解糖（glycolysis）と糖新生（gluconeogenesis）に関わる炭素源によって、それぞれ異なる開始点から転写される可能性を見出したことから、本研究ではこの興味深い転写制御機構を解明し、その制御機構が炭素源代謝に対してどのような意義を有するかを明らかにすることを目的とした。具体的には、①麴菌と *Aspergillus nidulans* のエノラーゼ遺伝子 (*enoA*) およびグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素遺伝子 (*gpdA*) を対象として、グルコース（解糖）と酢酸やエタノール（糖新生）を炭素源とした場合の転写開始に関わるシスエレメントと転写因子を解明する。②転写因子の解糖系および糖新生系遺伝子の発現制御に及ぼす影響を明らかにする。③酢酸のような糖新生を伴う炭素源の解糖系・糖新生系遺伝子の発現制御に関与する情報伝達機構の一端を解明する。

## 3. 研究の方法

(1) 麴菌の EST データベースから *enoA* と *gpdA* の EST クローンの配列情報を抽出し、上流から転写が開始され5'-UTR内のイントロンがスプライシングを受けたものとイントロン内から転写開始されたものを培養条件ごとに分類することにより、培養条件の違いによる転写開始部位を解析した。

(2) *enoA* と *gpdA* を含む麴菌の発現遺伝子の転写開始点を決定するため、液体富栄養培養ならびに小麦フスマ固体培養した麴菌

体から調製した mRNA をもとに、5'-SAGE 法により転写開始点を含む断片を収集し、次世代シーケンサーを用いて塩基配列を決定した。得られた解析データのゲノム情報へのマッピングを行った。なお、5'-SAGE 及びシーケンシングはポストゲノム研究所に解析委託した。

(3) 5'-SAGE により推定された転写開始点をもとに、上流側または下流側から転写開始された mRNA を区別して定量できるようなプライマーを設計し、種々の培養条件で培養した菌体から抽出した RNA を用いて定量 RT-PCR 解析を行うことにより、異なる部位から転写開始される転写産物量を測定した。

(4) *enoA* 遺伝子のプロモーター領域について、5'上流からの欠失変異シリーズ、イントロン領域の欠失変異及び推定 TATA ボックスの塩基置換変異体を作製し、GUS をレポーターとしたプロモーター活性測定を行い、転写制御に関与するシスエレメントの存在領域を調べた。

(5) *A. nidulans* で報告されている糖新生に関与する転写因子 AcuK 及び AcuM の麴菌オーソログの破壊株と高発現株を作製し、その生育ならびに酵素生産性について検討した。さらに、グルコースおよびグルコースから酢酸またはエタノールを炭素源とする培地に置換した場合における *enoA* および *gpdA* 遺伝子の転写開始点を解析した。

## 4. 研究成果

(1) 麴菌EST解析とゲノム解析の結果を図示して比較したところ、*enoA* 遺伝子の5'非翻訳領域（5'-UTR）に約0.5 kbの長いイントロンの存在が予想された（図1）。

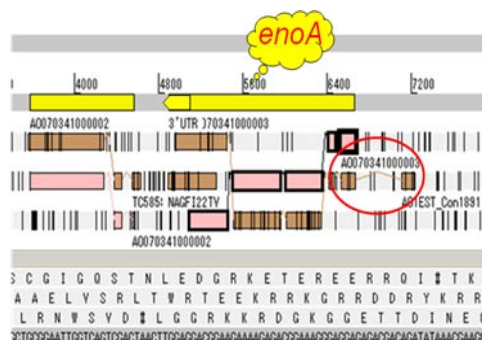


図1. ゲノム解析とEST解析から見出された *enoA* 遺伝子の5'-UTR内のイントロン

麹菌のESTデータベースから抽出された *enoA* と *gpdA* のESTクローンの配列をもとに、転写開始点と培養条件との関連性を調べたところ、図2に示すように、いずれの遺伝子も培養条件によって転写開始点が変わることが示唆された。特に、*enoA* についてはグルコース液体培養では下流の転写開始点を、固体培養または炭素源飢餓培養では上流の転写開始点を主に利用していることが示された。一方、*gpdA* は *enoA* ほど厳密ではないが、固体培養で上流の転写開始点を利用していることが推定された。

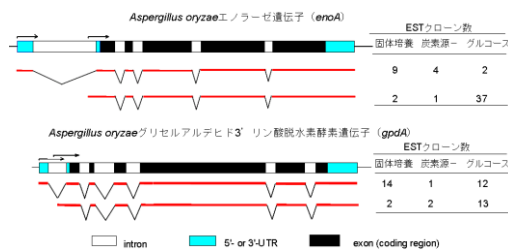


図2. 麹菌 *enoA* および *gpdA* の培養条件による転写開始点の相違

(2) 液体培養と固体培養で培養した菌体から調製した RNA を用いて、5'-SAGE を行うことにより発現遺伝子の網羅的な転写開始点解析を行った結果を図3に示す。

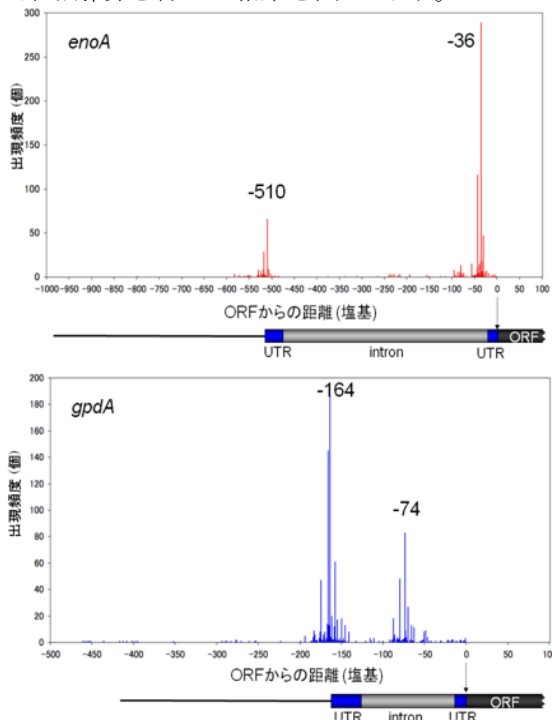


図3. 5'-SAGE による *enoA* および *gpdA* の転写開始点の同定

得られた解析データのゲノム情報へのマッピングを行ったところ、*enoA* の上流からの主要な転写開始点は翻訳開始点の上流-510 nt に位置していること、また下流からの転写開始点は主として-43 nt および-36 nt の2箇所であることが明らかとなった。また、同様に *gpdA* についても、上流の転写開始点が-164 nt、下流の転写開始点が-74 nt が主であることを特定することができた。いずれの遺伝子も下流の転写開始点は5'UTRのイントロン内にあることも確認された。

(3) 上流または下流の転写開始点から転写された mRNA を区別して増幅可能なプライマーを用いて、各種炭素源で培養した菌体から抽出した RNA を用いて定量 RT-PCR 解析を行ったところ、*enoA* については、グルコースやフルクトースのような解糖系で代謝される炭素源では主に下流からの転写開始点を利用され、酢酸やエタノールなどの糖新生系で代謝される炭素源や炭素源飢餓条件では主として上流から転写が開始されることが明らかとなった (図4)。一方、*gpdA* では *enoA* のように炭素源の違いによって転写開始点を使い分けるような現象は認められず、解糖系の炭素源で若干下流からの転写産物が多くなる傾向が見られたものの、主として上流の転写開始点を利用されていることが分かった (data not shown)。

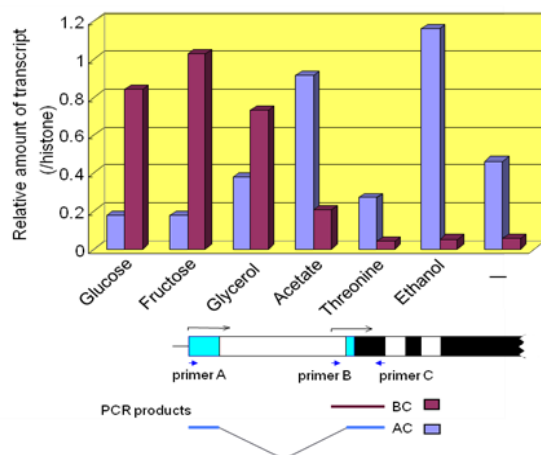


図4. 各種炭素源における *enoA* の異なる転写開始点からの転写産物量

(4) *enoA* 遺伝子のプロモーター領域の欠失変異株を作製し、グルコースおよび酢酸を

単一炭素源とする培地で培養した際のレポーター活性を測定した。酢酸培養においては、翻訳開始点上流の-696 nt まで欠失させると活性の低下が認められたが、さらに-512 nt まで欠失させた場合に活性が大きく低下し、それ以降は-224 nt まで同レベルで活性は維持された。しかし、-121 nt まで欠失させるとほとんど活性が認められなくなった。一方、グルコース培養では、-224 nt まで欠失させてもプロモーター活性の低下はほとんど観察されず、-121 nt まで欠失させると活性の著しい低下が認められた (図5)。酢酸のような糖新生を伴う炭素源存在下では、-700 nt より上流のシスエレメントが転写促進に関わっており、推定 TATA 配列が失われると転写効率が著しく低下するものと思われる。しかし、これらの配列がない場合には発現量は低いもののグルコースと同じように下流のシスエレメントを利用して転写が行われることが示唆された。ゲルシフト解析によって、グルコース存在下では翻訳開始点の上流-200 nt 付近に存在する配列がシスエレメントとして機能することが明らかとなっており、プロモーターの欠失解析による結果と一致した。

さらに5'-UTR 内のイントロンを欠失させたプロモーターならびに上流と下流の推定 TATA 配列を欠失したプロモーターについて解析を今後試みる予定である。

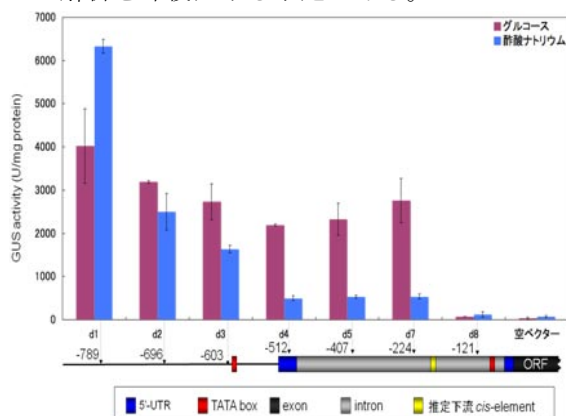


図5. *enoA* プロモーター領域の欠失変異シリーズのレポーター活性

(5) 糖新生に関与することが報告されている転写因子 *AcuK* 及び *AcuM* の麹菌オーソログの破壊株を作製したところ、酢酸やエタノールを単一炭素源とする培地では生育

することができなかった。今後はグルコースで前培養後に酢酸またはエタノール培地に移して培養することで、*enoA* 遺伝子の転写開始点を解析することを予定している。一方、*acuK* と *acuM* の高発現株を作製したところ、*acuK* 高発現株でキシラナーゼ生産性が高くなっていることが判明した (図6)。

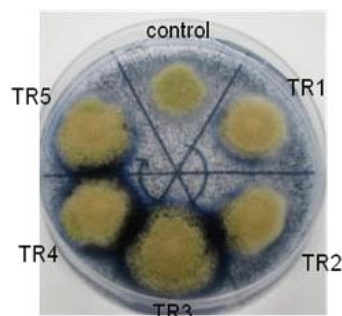


図6. *acuK* 高発現株のキシラナーゼ高生産

## 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0件)

[学会発表] (計3件)

①高間充、香曾我部恵子、戸田智美、町田雅之、新谷尚弘、五味勝也：麹菌の解糖系酵素遺伝子の選択的転写開始機構の解析、2010年度日本農芸化学会大会 (東京)、2010年3月30日

②齊藤朱美、五味勝也：麹菌の転写因子高発現ライブラリーを用いた有用酵素生産関連転写因子の探索、第4回日本ゲノム微生物学会年会 (福岡)、2010年3月9日

③高間充、香曾我部恵子、戸田智美、町田雅之、新谷尚弘、五味勝也：麹菌の解糖系酵素遺伝子の選択的転写開始機構の解析、第9回糸状菌分子生物学コンファレンス (東京)、2009年11月18日

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

五味 勝也 (GOMI KATSUYA)

東北大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：60302197

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者