

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：33919

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05802

研究課題名(和文) 糸状菌における鉄ホメオスタシスのマスターレギュレータHapXの鉄感知の分子機構

研究課題名(英文) Molecular Mechanism of Iron Sensing by HapX, the Master Regulator of 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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：HapXは申請者らが初めて見出した真菌類に特異的な転写制御因子であり、鉄のホメオスタシスに重要な働きをしている。本研究では、モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* を用い、以下の研究を遂行した。

- 1) C末端に存在する3つのシステインリッチ領域(CRR)へ変異を導入し、鉄硫黄クラスタへの影響を調べた。変異タンパク質の解析の結果、HapX内には少なくとも2箇所に鉄硫黄クラスタが含まれることが明らかとなった。
- 2) HapXに存在するCRRへ変異を導入した株の解析の結果、1番目と2番目のCCRが鉄制限下での生育に重要であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題のカビの転写因子HapXが調節している酵素は、アコニターゼ(TCA回路)、チトクロームc(電子伝達系)、シスアコニターゼ(リジン合成)、カタラーゼ(酸化ストレス応答)、SreA(鉄取り込み系の転写抑制因子)など生理的に重要なものが多く、学術的に意義深い。さらに、病原性菌類や植物病原菌の病原性に関わることも知られており、研究成果は新規の抗真菌剤開発などの知的基盤になるなど、臨床医学、薬学、農薬学の分野でも役立つ。

研究成果の概要(英文)：HapX is the fungal-specific transcriptional regulator interacting with the wide domain transcription factor CCAAT-box binding protein (Hap complex), and plays an important role in iron homeostasis.

In this study, the following research was carried out using the model filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. 1) Effects of mutagenesis into the three cysteine-rich regions (Crrs) present in the C-terminus on binding capacity of iron-sulfur (Fe/S) clusters. Analysis of spectra of the recombinant proteins was carried out to examine the contribution of each CCR. We found that HapX contained at least two iron-sulfur clusters. 2) In order to investigate the growth of wild and mutated HapX strains under iron depleted and repleted conditions, mutant strains in which the cysteine residues in the CRR were replaced with serine residues were constructed and growth was examined. We found that the first and second CCRs (CrrA and CrrB) were important for growth under iron depleted conditions.

研究分野：応用微生物学

キーワード：鉄の恒常性 糸状菌 HapX *Aspergillus* 鉄硫黄クラスタ 転写因子

1. 研究開始当初の背景

CCAAT-box は真核生物の典型的なシス配列である。申請者らは糸状菌 *A. nidulans* および麹菌 *A. oryzae* より CCAAT 結合因子を生化学的手法で同定 (HapB/C/E 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¹⁾。その研究の過程で申請者らは HapB/C/E 複合体と相互作用する因子 HapX を発見した²⁾。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た³⁻⁷⁾。(図1参照)

(1) HapX は鉄欠乏時に緊急的に鉄の使用を押さえ、鉄の取り込みを亢進させる³⁾。

(2) 出芽酵母 *S. cerevisiae* には HapX のホモログが存在しない³⁾。

(3) 鉄欠乏時に HapB/C/E 複合体と HapX は相互作用し働く³⁾。

(4) HapX は転写の抑制・誘導の両方に働く 2 面性因子である⁴⁾。

(5) HapX は HapB/C/E との協調的 DNA 結合により、鉄関連遺伝子を認識する⁵⁾。

(6) HapX は病原性糸状菌の感染に不可欠であり、臨床医学上重要な因子である^{6,7)}。

以上のように HapX は、糸状菌における鉄ホメオスタシスに関するマスターレギュレータ(主要制御因子)ともいべき重要な因子である。本研究では、いかに微生物が鉄の恒常性を保っているか? という学問的問いに対して分子レベルでの解明を目指した。シンプルな真核生物でもあり、医学、農学、応用微生物学上重要な糸状菌を用いてアプローチするところに本研究の特色があった。

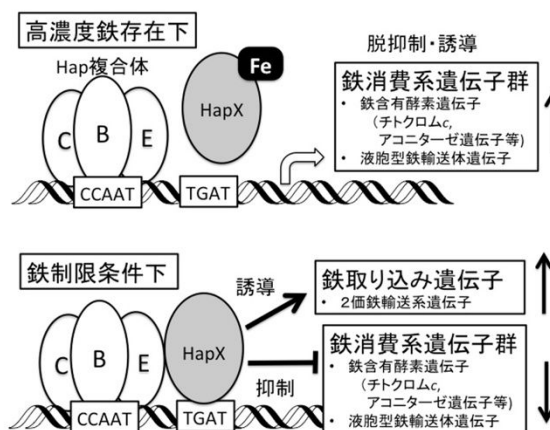


図1. HapXによる鉄関連遺伝子の制御モデル

- 1) Kato M. (単著) (Review) *Biosci. Biotech. Biochem.* 69, 663-672 (2005).
- 2) Tanaka A, Kato M (責任著者) *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1576, 176-182 (2002).
- 3) Hortschansky P, Kato M (日本側責任者) *et al.*, *EMBO J.* 26(13):3157-3168 (2007).
- 4) Gsaller F, Kato M (日本側責任者) *et al.*, *EMBO J.* 33(19):2261-2276 (2014).
- 5) Hortschansky P, Kato M (日本側責任者) *et al.*, *J. Biol. Chem.* 290, 6058-6070 (2015).
- 6) Schrettl M. *et al. PLoS Pathog.* 6(9): e1001124 (2010). *A. fumigatus* の病原性研究
- 7) Jung W. *et al. PLoS Pathog.* 6(11): e1001209 (2010). クリプトコッカスの病原性研究

2. 研究の目的

本研究では糸状菌における鉄の恒常性維持機構の解明を目指し、そのマスター転写因子ともいべき HapX の構造と機能の関連性 (特に C 末端部分と鉄感知のメカニズム) を解明すること目的とした。本研究で対象となる因子 HapX は、CCAAT 結合因子と相互作用する因子として、申請者が世界に先駆けて独自に分離した新規の因子である。その後の研究で菌類における新たな鉄依存の制御系の解析を可能にした点で学術的特色および独創性があった。高等真核生物において CCAAT 結合因子は多くの遺伝子の転写を促進している因子として認識されてきた。抑制的に働く例も若干報告されていたが、本研究のように鉄のホメオスタシスに関わるというように、明確に生理的意義を明らかにする研究は珍しいと思われた。また、HapX が制御している酵素はアコニターゼ (TCA 回路)、チトクローム c (電子伝達系)、シスアコニターゼ (リジン合成)、カタラーゼ (酸化ストレス応答)、SreA (鉄取り込み系の転写抑制因子) など生理的に重要なものが多く、学術的にも、応用上も意義深いといえる。さらに、病原性菌類や植物病原菌の病原性に関わることが明らかとなっているため、本研究成果は新規の抗真菌剤開発などの知的基盤になると考えられ、臨床医学、薬学、農薬学分野でも重要な課題であると考えている。

3. 研究の方法

(1) HapX に存在する 3ヶ所のシステインリッチ領域 (CRR) に対する変異リコンビナントタンパク質の取得と *in vitro* 解析

野生株および 3ヶ所の CRR 内の全てのシステイン残基をセリンに置換した変異リコンビナント HapX タンパク質を大腸菌にて His-tag を有した形で異種発現させ、His-tag によるアフィニティー精製を試みた。HapX の Fe/S クラスタは酸素に弱いことが予備的な検討で明らかになったので、厳密な解析には酸素の非存在下での精製が必要であった。そのため、精製は嫌気チャンパー内で行い、スペクトルの測定に供した。得られたタンパク質を分光光度計による可視領域のスペクトル解析を行うことにより、鉄硫黄クラスタに特有の吸収波長の強度を調べた。

(2) HapX に存在する CRR へ点変異を導入した株の *in vivo* 解析

野生株および変異 HapX 株を鉄欠乏条件、鉄十分条件で生育させることにより、CCR への変異導入の影響を調べた。HapX の欠失株では鉄欠乏条件のみでなく、鉄過剰条件においても顕著な生育阻害が起こることが明らかとなっているため、それぞれの応答に別の CCR が関与することも予想された。条件を変え各変異株の生育を比較した。

鉄欠乏条件で抑制される遺伝子(チトクローム *c* 遺伝子など)や鉄過剰条件で誘導される遺伝子(例えば液胞の鉄トランスポータ等)について、各条件での各変異株の転写発現量をリアルタイム PCR により定量し、各 CCR の鉄ホメオスタシス機構における役割を調べた。

4. 研究成果

HapX は申請者が初めて見出した真菌類に特異的な転写制御因子であり、広域転写因子 CCAAT-box 結合因子と相互作用し、鉄のホメオスタシスに重要な働きをしている。本研究では、モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* を用い、以下の研究を遂行した。

(1) C 末端に存在する 3 つのシステインリッチ領域(CRR)への変異導入をしたリコンビナントタンパク質を用いた生化学的解析:

野生株および 3ヶ所それぞれの CRR (CrrA, CrrB, CrrC) 内の全てのシステイン残基をセリンに置換した変異リコンビナント HapX タンパク質の調製に成功した(図 2)。各種スペクトルの解析を進め、各 CCR の寄与率を検討した。各タンパク質の大量精製の条件を行い、生化学的解析に十分な試料を得ることに成功した。解析の結果、HapX 内には少なくとも 2 個の鉄硫黄クラスターが含まれることが明らかとなった。

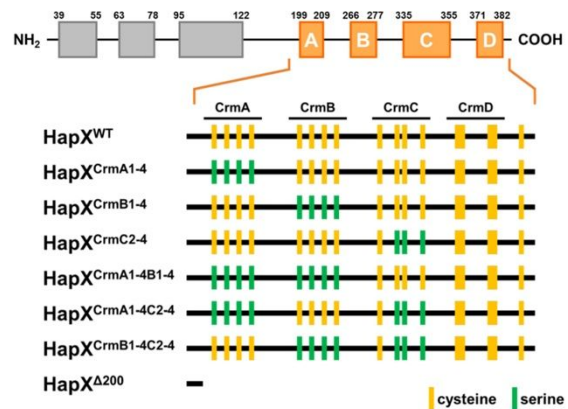


図2. システインリッチ領域への変異の導入

(2) HapX に存在する CRR へ点変異を導入した株の生理学的解析:

野生株および変異 HapX 株の鉄欠乏条件、鉄十分条件での生育を調べるため、CRR 内の全てのシステイン残基をセリンに置換した変異株を作成し、生育差を調べた。その結果、1番目と2番目の CCR (CrrA および CrrB) が鉄制限下での生育に重要であることが明らかとなった(図.3)

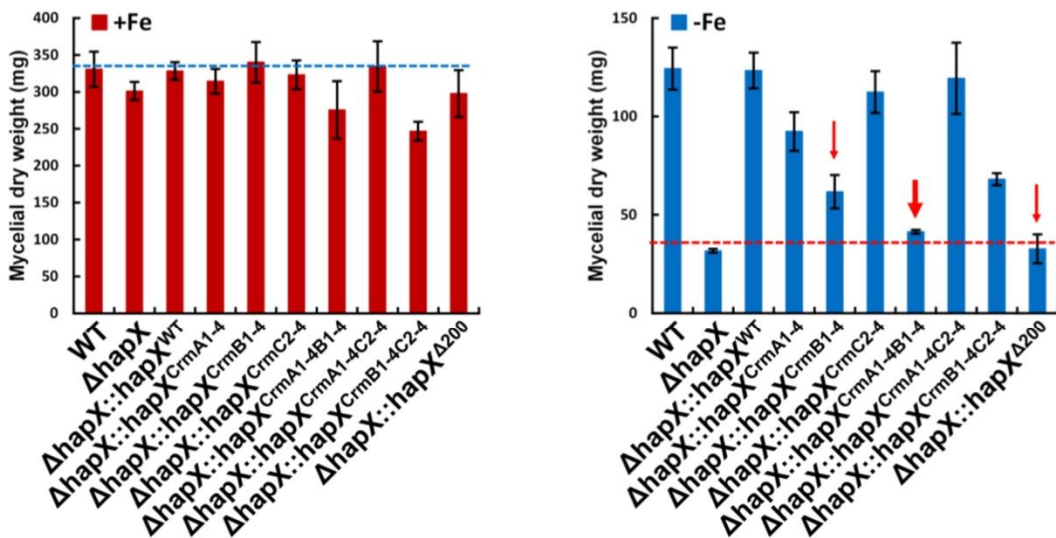


図3. Crrへの変異導入の生育に対する影響

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Sakai Kiyota, Yamaguchi Aya, Tsutsumi Seitaro, Kawai Yuto, Tsuzuki Sho, Suzuki Hiromitsu, Jindou Sadanari, Suzuki Yoshihito, Kajimura Hisashi, Kato Masashi, Shimizu Motoyuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Characterization of FsXEG12A from the cellulose-degrading ectosymbiotic fungus <i>Fusarium</i> spp. strain EI cultured by the ambrosia beetle	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 AMB Express	6. 最初と最後の頁 96
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13568-020-01030-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ito Shou, Sakai Kiyota, Gamaleev Vladislav, Ito Masafumi, Hori Masaru, Kato Masashi, Shimizu Motoyuki	4. 巻 13
2. 論文標題 Oxygen radical based on non-thermal atmospheric pressure plasma alleviates lignin-derived phenolic toxicity in yeast	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biotechnology for Biofuels	6. 最初と最後の頁 18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13068-020-1655-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yamashita Miharuru, Tsujikami Masaya, Murata Shunsuke, Kobayashi Tetsuo, Shimizu Motoyuki, Kato Masashi	4. 巻 145
2. 論文標題 Artificial AmyR::XlnR transcription factor induces α -amylase production in response to non-edible xylan-containing hemicellulosic biomass	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Enzyme and Microbial Technology	6. 最初と最後の頁 109762 ~ 109762
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.enzmictec.2021.109762	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tsutsumi Seitaro, Mochizuki Mai, Sakai Kiyota, Ieda Akane, Ohara Reiji, Mitsui Shun, Ito Akitoshi, Hirano Tatsuya, Shimizu Motoyuki, Kato Masashi	4. 巻 9
2. 論文標題 Ability of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> MC87-46 to assimilate isomaltose and its effects on sake taste	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13908
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-50384-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kamijo Junya, Sakai Kiyota, Suzuki Hiromitsu, Suzuki Kengo, Kunitake Emi, Shimizu Motoyuki, Kato Masashi	4. 巻 276
2. 論文標題 Identification and characterization of a thermostable pectate lyase from <i>Aspergillus luchuensis</i> var. <i>saitoi</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Food Chemistry	6. 最初と最後の頁 503 ~ 510
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.foodchem.2018.10.059	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nomura Ryo, Tsuzuki Sho, Kojima Takaaki, Nagasawa Mao, Sato Yusuke, Uefune Masayoshi, Baba Yasunori, Hayashi Toshiya, Nakano Hideo, Kato Masashi, Shimizu Motoyuki	4. 巻 4
2. 論文標題 Administration of <i>Aspergillus oryzae</i> suppresses DSS-induced colitis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Food Chemistry: Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 100063 ~ 100063
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.fochms.2021.100063	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kato Hiroyuki, Sakai Kiyota, Itoh Shou, Iwata Naoyuki, Ito Masafumi, Hori Masaru, Kato Masashi, Shimizu Motoyuki	4. 巻 7
2. 論文標題 Enhanced Bioremediation of 4-Chlorophenol by Electrically Neutral Reactive Species Generated from Nonthermal Atmospheric-Pressure Plasma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 16197 ~ 16203
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsomega.2c01615	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 山下 美春、辻上 誠也、村田 俊輔、志水 元亨、加藤 雅士
2. 発表標題 真菌特有の bZIP 型転写因子 HapX と HapB/C/E 複合体との相互作用 : HapX の N-末端ドメインの機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2020大会 (大会ホームページ上での発表)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加藤雅士
2. 発表標題 愛知の発酵食品の魅力
3. 学会等名 日本食生活学会 第61回大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加藤雅士、志水元亨
2. 発表標題 持続可能な開発目標(SDGs)と糸状菌によるバイオマス分解の研究
3. 学会等名 日本マイコトキシン学会 第85回学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小林 吉生, 三浦 綾夏, 榊原 誠也, 辻上 誠也, 志水 元亨, 加藤 雅士
2. 発表標題 糸状菌における鉄恒常性維持のマスター制御因子 HapX と相互作用するタンパク質の機能解析
3. 学会等名 第73回 日本生物工学会大会(沖縄, Web開催)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 阪井 康能、竹川 薫、橋本 渉、片山高嶺	4. 発行年 2020年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 186
3. 書名 遺伝子・細胞から見た 応用微生物学（トピックスの執筆）	

〔産業財産権〕

〔その他〕

名城大学農学部 応用生物化学科 応用微生物学研究室
<http://www-agr.meijo-u.ac.jp/labs/nn008/index.html>

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	志水 元亨 (Shimizu Motoyuki) (20423535)	名城大学・農学部・准教授 (33919)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------