

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K05802

研究課題名(和文) 産業微生物の転写因子研究の分子レベルアプローチ

研究課題名(英文) Approaches to transcription factor research in industrial microorganisms at molecular level.

研究代表者

日高 将文(Hidaka, Masafumi)

東北大学・農学研究科・助教

研究者番号：00584848

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)：微生物酵素の発現制御の分子メカニズムは、いわばブラックボックスとなっているものが多く、微生物の応用を妨げる一因ともなっている。本研究は、麹菌の転写因子、FibCを研究ターゲットとして機能解析、構造解析を目指し、まず大腸菌による発現系の構築した。大腸菌1リットル培養当たり12ミリグラムのタンパク質獲得に成功した。結晶化を試みたところ、結晶が得られたが、解析に供するには不十分な質であることが分かった。一方、精製FibCが得られたことから、in vitroの解析も進めることが可能となった。ゲルシフト電気泳動解析により、FibCは特定DNA配列に結合する機能を有していることを確認することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

微生物のタンパク質発現を司る転写因子について、特に麹菌においては、これまでにタンパク質発現系、精製系の構築に成功した例がなく、本研究で初めて機能を有した形で大量の転写因子タンパク質の獲得に成功した。学術的には、タンパク質の大量発現系構築に成功したことは、今後の転写因子研究に大きく寄与する。また、産業的な成果として期待されることは、タンパク質発現システムを、科学的なエビデンスに基づいてデザインすることで、より効率的なタンパク質生産システムを構築するための基盤研究へと発展することである。

研究成果の概要(英文)：The molecular mechanisms that regulate the expression of microbial enzymes are often a black box, and this is one of the factors that hinder the application of microorganisms. In this study, we aimed at functional and structural analysis of FibC, a transcription factor of *Aspergillus oryzae*, and first constructed an expression system using *E. coli*. We succeeded in obtaining 12 milligrams of protein per liter of *E. coli* culture. Crystallization was attempted, and crystals were obtained, but the quality of the crystals was found to be insufficient for analysis. On the other hand, since purified FibC was obtained, in vitro analysis could proceed. Gel-shift electrophoresis analysis confirmed that FibC has the ability to bind to specific DNA sequences.

研究分野：構造生物学

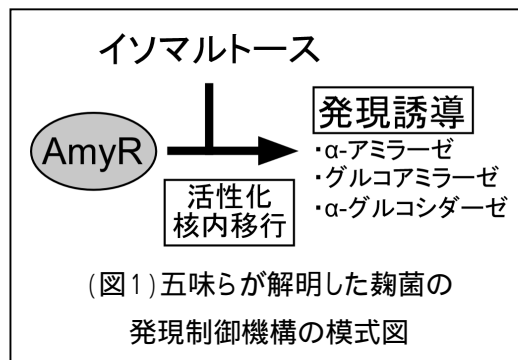
キーワード：タンパク質工学 転写因子 タンパク質発現・精製

1. 研究開始当初の背景

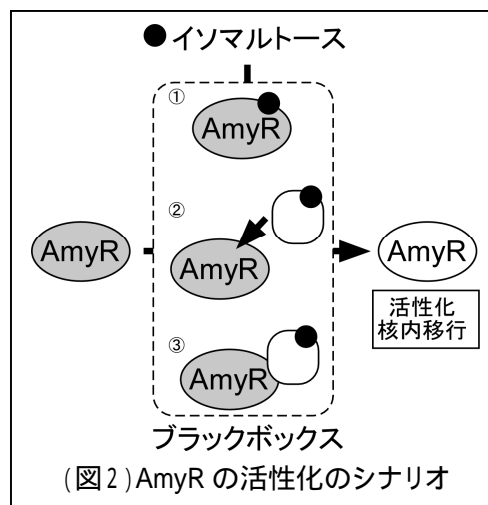
微生物学的研究背景

微生物は化学物質の濃度、温度変化などのストレスに応答し、遺伝子発現、タンパク質発現、酵素活性などを制御することで環境の変化に対応する。その分子レベルのメカニズムは、タンパク質のリン酸化を伴う二成分制御系などが知られているが、応答速度、ストレスに対する感度などの解析は難しく、例えばどのような物質に、どのくらいの濃度に対して、どのくらいの速度で応答するのか全く分かっていない物が多い。

東北大学大学院農学研究科・五味勝也教授のグループは、長年に渡って産業用微生物(麹菌)における有用遺伝子発現機構の解明とその応用研究に関して研究し、詳細なメカニズムを解明してきた[1]。特に注目されているのは AmyR、MalR というアミラーゼ遺伝子発現に必須な 2 種類の転写因子である。欠損株を用いた解析などから、AmyR、MalR はそれぞれイソマルトース、マルトースで活性化され、下流遺伝子の発現を促進していることが分かった(図1)。



欠損株を用いた研究によって、微生物の転写制御に関わるタンパク質が明らかになっている一方、分子レベルでは最も重要な部分がいまだ解明されていない。すなわち、一口に「AmyR がイソマルトースで活性化される」と言っても、どのように活性化されるのか? という部分についてはブラックボックスのままとなっている。例えば、イソマルトースが AmyR を活性化するメカニズムとして次のようなシナリオが考えられる(図2)。



イソマルトースが AmyR と直接結合し構造を変化させ活性化する。イソマルトースによって活性化されたタンパク質・酵素が AmyR を修飾する。イソマルトースが結合したタンパク質が AmyR と複合体を形成して核内にリクルートする。これらの仮説については検証もできていない。その理由は、有効な研究手法がないからである。

産業的研究背景

我が国の発酵微生物産業の根幹をなす麹菌は、長年に渡って微生物物質生産に関する多くの知見を蓄積してきた。上述の糖質加水分解酵素の発現制御に関わる AmyR、MalR に加え、醤油の生産に関わるプロテアーゼの発現を制御する FlbC、 α -1,3-グルカンの生合成関連タンパク質の発現制御に関わる CreA など、「名前」は明らかになっている発現制御タンパク質は多い。これらのタンパク質は応用研究における重要なターゲットタンパク質となりうる。一方、応用研究のためには分子レベルの情報の蓄積が重要であるが、タンパク質分子レベルの知見はほとんどない。

[1] Suzuki et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 99(4) 1805-1815 (2015)

2. 研究の目的

産業用微生物の機能向上は、タンパク質工学的手法を用いて酵素そのものの機能を向上させる手法、微生物の生育量を増加させる手法に着目されるが、本研究では酵素の生産力を向上させる手法に着目し、微生物の発現制御機構の解明と応用研究を展開する。

東北大学・五味勝也教授のグループが明らかにしてきた微生物の生理現象について、より高分解能の世界を解明することで、さらなる応用につなげることを目的としている。そこで本研究では、麹菌の外的要因に応じた発現制御の鍵となっている AmyR、CreA、FlbC、MalR の 4 種類をメインターゲットとする。以下に明らかになっている生理機能を示す。

AmyR	イソマルトースによるアミラーゼ関連タンパク質の発現誘導
MalR	マルトースによるマルトース資化遺伝子群の発現誘導
CreA	α -1,3-グルカン生産に関わる遺伝子発現誘導
FibC	プロテアーゼの発現

微生物の生理機能に関する蓄積された成果を、分子レベルの解析に習熟した申請者が従来とは異なるアプローチで深めることで、応用を加速することができる。

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* は日本の発酵食品生産におけるデンプンやタンパク質の分解酵素生産を担っている。本研究では黄麹菌の糖代謝に関与する転写因子の一つである FibC に着目した。FibC は DNA と結合する性質を持つ C₂H₂ 型の zinc finger ドメインを持つことが知られている転写因子で、固体培養条件下でのみ機能しグルコアミラーゼや酸性プロテアーゼの発現を大量に誘導する。FibC が酵素生産を誘導するメカニズムを解明することは、固体培養時と同等の酵素生産能を発揮する液体培養法の確立に繋がり産業的に重要であるため、FibC の結晶構造解析と、ゲルシフトアッセイ (EMSA) などの生化学的手法による機能解析から、FibC の構造機能相関を解明することを目指している。本研究では、結晶構造解析、機能解析に供することを目的として、FibC の大腸菌発現・精製系を構築した。

3. 研究の方法

(1) AmyR, MalR, CreA, FibC の結晶構造解析

近年、数多くのタンパク質の立体構造が報告されているが、非常に奇妙なことに麹菌・*Aspergillus oryzae* の転写因子の立体構造は一つも明らかになっていないため、解明された際のインパクトは非常に大きい。そこで、4 種のタンパク質の X 線結晶構造解析を目指した。

具体的な課題と対策：タンパク質の結晶化、また in vitro の解析には多くのタンパク質を必要とするが、先行研究でこれら 4 種類のタンパク質の大腸菌発現は難しいことが分かっている。そこで、培地の検討、可溶化用タグタンパク質との共発現を試みる。発現、精製が進んだものから順次、タンパク質の結晶化に供し、放射光を利用した X 線結晶構造解析へと進めることを企図した。

(2) 放射光 X 線を使った発現・精製タンパク質の確認

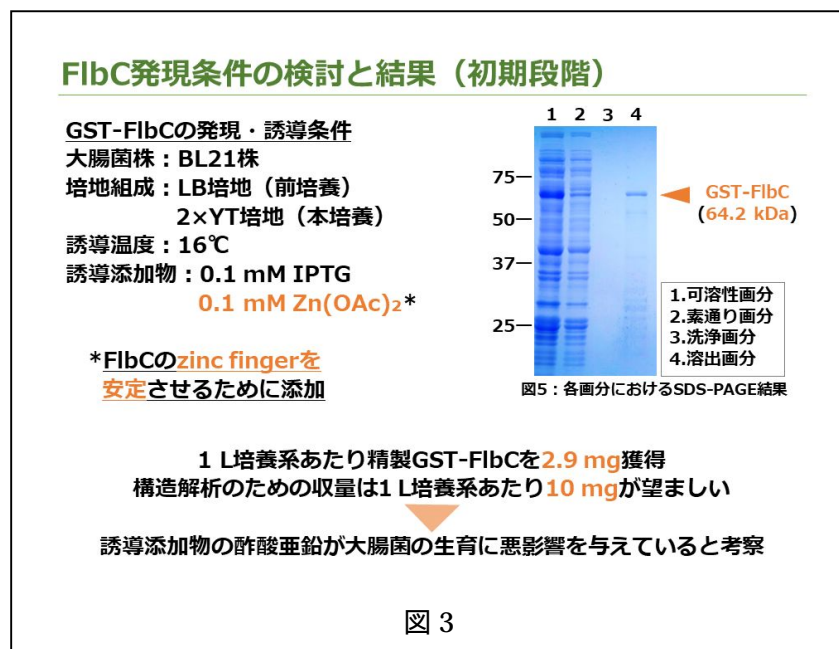
精製したタンパク質は、Zn を取り込むことができているかどうかを調べるため、九州シンクロトロン光研究センター、BL11 の蛍光 X 線分析ビームラインを使って、Zn の取り込みを確認した。

(3) AmyR, MalR, CreA, FibC の機能解析

発現精製ができた転写因子については、結合する DNA の配列特異性を調べた。具体的には、DNA に結合することで生じる構造差を検出するために、ゲルシフトアッセイを試みた。

4. 研究成果

本研究の初期段階では、FibC 遺伝子を発現ベクター pGEX_2T へ組み込み、大腸菌 BL21 株に形質転換した発現系を構築した。この発現系で FibC と GST の融合タンパク質 (GST-FibC) の発現および精製は成功し、リコンビナントタンパク質の取得に成功したが、収量は 1 L 培養系あたり 2.9 mg であり、構造・機能解析を行う上では不十分であった。(図 3)



初期段階では、FibCがZn含有タンパク質であることから、培地に酢酸亜鉛を添加した発現系を用いた。一方、培地へ添加していた酢酸亜鉛(0.1 mM)が大腸菌の生育を阻害している可能性を考え、酢酸亜鉛添加条件や培養温度(16 もしくは 25)について検討した。発現条件の精密化によって、図4の条件で、1 L培養系あたり11.8 mgの精製 GST-FibC を得ることに成功した(図4)。

FibCタンパク質発現・精製(精密化後)

GST-FibC誘導における添加物条件*

(変更前) 0.1 mM IPTG
0.1 mM Zn(OAc)₂

(変更後) 0.1 mM IPTG

*添加物以外の発現・誘導条件は変更していない

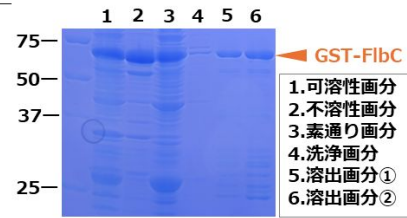


図6: 誘導条件変更後の各画分におけるSDS-PAGE結果

1 L培養系あたりの精製GST-FibCが11.8 mgへ向上

誘導時に添加していた酢酸亜鉛が大腸菌を阻害していたと考えられる

図4

AmyR、CreA、MaIRの3種の転写因子についても発現条件を検討したが、すべて封入体を形成し、タンパク質を獲得することができなかった。以降の研究は、発現・精製系の構築に成功し、諸々の実験に供するのに十分なタンパク質を獲得することができたFibCについてのみ進めることとした。

精製FibCについて、タンパク質の結晶化条件探索を試みたところ、市販のスクリーニングキットを用いた条件探索の結果、図5に示す条件で結晶が得られた。すべての結晶について、フロンファクトリー(つくば市)のBL-NW12でX線照射実験を試みたが、いずれの結晶も回折像を得ることができなかった。

結晶化条件検討

表: 結晶形成を確認した条件

---	塩	バッファー	沈殿剤
11	無し	0.1 M bicine pH 9.0	10%(w/v) PEG 6000 Final pH 9.0
12	0.04 M Potassium phosphate	無し	16%(w/v) PEG 8000 20%(v/v) Glycerol
13	0.2 M Calcium acetate	0.1 M Sodium cacodylate pH 6.5	40%(v/v) PEG 300
14	2 M Ammonium sulfate pH 9.0	0.1 M Sodium acetate pH 4.6	無し

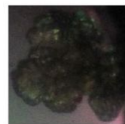


図11



図12



図13



図14

図5

精製FibCが正しく発現・フォールディングしているか確認するため、FibCのZn含有量とDNA結合能を調べた。Znの含有は、蛍光X線を用いて検出を試みた。図6に示す蛍光X線のスペクトルからは、FibCの溶液に含まれるZn由来のシグナルが、外液に比べて有意に高いことが示され、本研究の発現・精製系において獲得したFibCがZnを正しく取り込んでいることが示唆された。

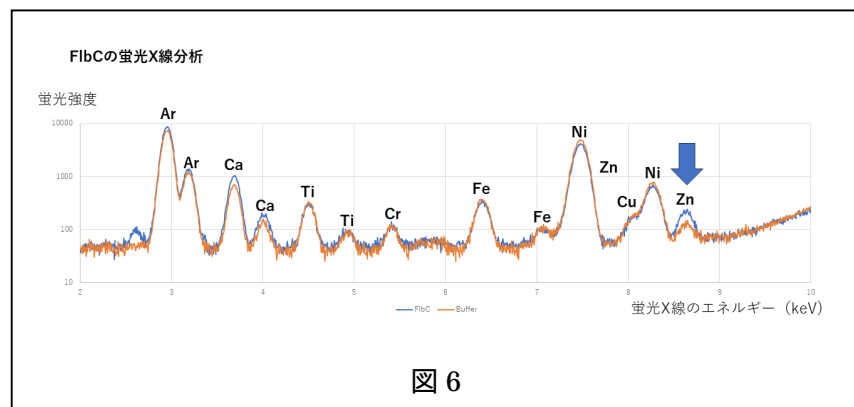


図6

精製FibCのDNA結合能は、ゲルシフトアッセイにより評価した。FibCの推定結合配列は、グルジアミラーゼのプロモーター領域に存在するCTAGCCGの6塩基配列と考えられている。この配列をプローブとして、DNAの添加によりFibCの電気泳動度が変化するかどうかを調べたところ、明確なゲルシフトが観察された(図7)。この結果は、FibCの結合配列が、推定されていた通りCTAGCCGの配列であったこと、ならびに本研究で獲得したリコンビナントFibCがDNA結合能という正常な機能を有する形で獲得されたことを意味している。

F1bCの機能性解析

ゲルシフトアッセイによる 精製GST-F1bCの機能性解析

● 反応系 (20 μ L)

Labeled Probe 1.55 nM
精製GST-F1bC 0 ~ 2 μ M

● 結果

(NCと比較して) 精製GST-F1bCが
推定結合配列を含むDNAプローブと
結合しシフトバンドとして検出できた

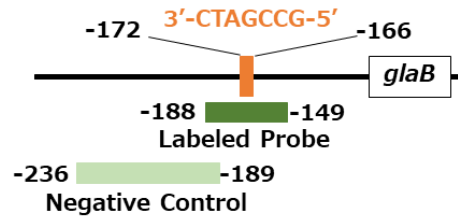
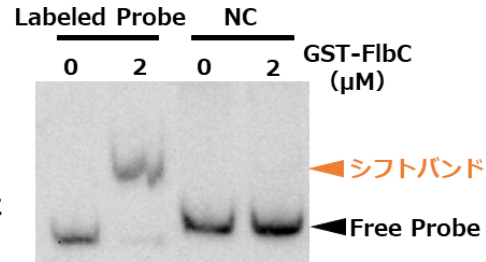


図9：解析に使用したDNA配列



ゲルシフトアッセイの結果

精製GST-F1bCがF1bCの推定結合配列との結合性を示したことより
精製GST-F1bCが機能性を持つことが示唆された

図7

以上の結果より、転写因子 F1bC のリコンビナントタンパク質について、機能を有する形での大量発現・精製に成功した。これは麹菌の転写因子としては非常に画期的なことであると言える。タンパク質の結晶化により、X線結晶構造解析に供する結晶を獲得することができたが、解析に必要な質を満たしていなかった。引き続き、結晶化によって構造を解析することが望まれる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小嶋 慧、小川 智久、二井 勇人、五味 勝也、日高 将文
2. 発表標題 黄麹菌の転写因子MaIRの構造・機能解析に向けた発現系の構築
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松畑 達哉、小嶋 慧、青西 洋平、小川 智久、二井 勇人、五味 勝也、日高 将文
2. 発表標題 黄麹菌の デンプン分解酵素生産に 関与する転写因子F1bCの 大腸菌発現・精製系の構築
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度東北支部大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------