

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 18 日現在

機関番号：33919

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580080

研究課題名（和文）

糸状菌 CCAAT 配列結合複合体による鉄のホメオスタシス制御機構

研究課題名（英文）

Iron homeostasis regulated by the CCAAT-binding complex 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

研究成果の概要（和文）：

糸状菌における鉄の恒常性に関わる転写因子 HapX に関して以下の新しい知見が得られた。1) チトクローム c などのように鉄を含んだタンパク質をコードする遺伝子プロモーターへの HapX の結合様式 (HapB/C/E との協調的結合と鉄関連遺伝子への特異的結合) を解明した。2) *in vivo* 解析により HapX の鉄ホメオスタシスへの関与を示した。3) HapX の機能ドメインを調べるための部分欠失変異の作成と部分欠失リコンビナントタンパク質を取得した。

研究成果の概要（英文）：

Research on the HapX, a regulator involved in iron homeostasis in filamentous fungi led to some new findings, as follows. 1) Hap B/C/E complex-dependent specific binding property of HapX to the promoters of genes coding iron containing proteins such as cytochrome c. has been elucidated. 2) *In vivo* analysis revealed the involvement of HapX in the iron homeostasis. 3) Truncated mutants of HapX and the truncated recombinant HapX were obtained to use for the future domain analysis of HapX.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：麴菌、糸状菌、転写因子、鉄、恒常性

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のひとつである。CCAAT-box に結合する因子は酵母からヒトまでに存在し、それぞれ Hap 複合体および NF-Y と呼ばれている。申請者らは麴菌 (*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)、本因子が様々な遺伝子の発現を上昇させる広域転写促進因子であることを明らかにしてきた。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。当初機能は不明であったが、日独壌の共同研究により、既に以下のことが明らかになっている。

i) HapX は鉄の欠乏時に緊急的に鉄の使用を押

さえつつ、鉄の取り込みを亢進させる。

- ii) 出芽酵母 *S. cerevisiae* には HapX 類似因子がない。
- iii) 鉄欠乏条件下で HapB/C/E 複合体と HapX は物理的に相互作用し、抑制的に働く。

プロモータに CCAAT-box を有する遺伝子は膨大な数になるが、すべて HapX 支配ではなく、鉄関連遺伝子は限られている。また、HapX にはこれまで、DNA 結合活性が見出されていなかった。ここに現段階での最大の謎があり、HapX による鉄関連遺伝子プロモータの選択的な認識機構を調べるのが重要であるとの結論に至った。研究開始当時、糸状菌では我々のグループと A. A. Brakhage ら (独、Hans-Kunoell Institute) および H. Haas ら (オーストリア、Innsbruck Medical University) 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かった。同様の研究が *S. pombe* 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、ややアドバンテージを持っていた。この分野は今後急速に進展する可能性があり、本研究費はこの分野での研究を主導的に進めるために不可欠であった。

2. 研究の目的

本研究では以下を目的とし研究を遂行する。

- (1) DNA 結合能を持たないように思われていた HapX の鉄関連遺伝子の認識機構を明らかにする。
- (2) 明らかとなった認識機構が鉄関連遺伝子の転写抑制に重要であることを証明する。
- (3) HapB/C/E と HapX との相互作用を分子レベルで詳細に理解する。
- (4) 以上の知見を総合し、これまで明らかにされていなかった真菌類における鉄関連遺伝子の転写抑制機構の詳細を解明する。

3. 研究の方法

- (1) ゲルモビリティシフトアッセイや DNaseI フットプリンティング法により HapB/C/E 依存の HapX の DNA 結合性を調べ、HapX の認識配列を *in vitro* で定性的に調べる。明らかになった認識配列に変異を導入し、HapX, HapB/C/E, プロモータ DNA の相互作用を Biacore システム (表面プラズモン共鳴) により定量的に解析する。
- (2) 鉄関連遺伝子より代表 (チトクローム c を計画) に選び、明らかになったプロモータ内の HapX 認識配列に変異を導入

し、*lacZ* 遺伝子をレポーターとして連結する。これを *A. nidulans* に導入することにより *in vivo* での HapX 結合の影響を調べる。

- (3) 既に作製してある HapB, HapC, HapE 部分欠失変異リコンビナントタンパク質に加え、HapX の部分欠失変異リコンビナントタンパク質を作製し、*in vitro* DNA 結合実験に利用し、それぞれの相互作用を始めとする機能ドメイン解析に用いる。

本研究で対象となる因子 HapX は申請者らが分離した新規の因子であり、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的な点があった。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、クリア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、糸状菌における転写制御研究において、転写抑制機構を分子レベルで詳細に研究した例は少なく、HapX による機構が明らかになれば、転写抑制機構の良い研究例になると考えられた。

また、HapX は呼吸鎖 (チトクローム c)、TCA 回路 (アコニターゼ)、リジン生合成 (ホモアコニターゼ)、酸化ストレス応答 (カタラーゼ) など、生理的に非常に重要な酵素類を制御しているので、糸状菌の生育の制御を通じて、酵素や二次代謝産物など有用物質の高生産に役立てることができると考えられ、応用的にも意義深い。さらに、HapX が抑制すると考えられる転写因子 SreA は鉄の取り込みに働くシデロフォアの生産を抑制するが、麹菌が生産するシデロフォアは清酒製造において着色を起こし、品質の低下を引き起こすことが知られている。本機構を正しく理解し、シデロフォア生産をコントロールすることは、醸造業界にもメリットが少なくないと考えられた。

4. 研究成果

- (1) HapB/C/E 依存の HapX の DNA 結合性を *in vitro* で解析し、HapX の認識配列に関して以下の結果を得た。
 - ① EMSA (ゲル電気泳動度シフトアッセイ) による結合領域の絞込み: チトクローム c 遺伝子プロモータ由来の DNA 断片を各種調製し、プローブを作製した。HapB/C/E 複合体については既にリコンビナントサブユニットから複合体を再構成をする条件を見出していたので、そこに HapX を加えることにより HapB/C/E-HapX 複合体とチトクローム c プロモータとの結合を調

べ、HapB/C/E-HapX 複合体の認識配列を絞り込んだ。

②DNaseI フットプリント法による結合領域の決定: DNaseI フットプリント法は複合体がプロモータのどの領域と相互作用しているかの情報を詳しく得るための有力な手法である。チトクローム *c* プロモータに対しての HapB/C/E の結合パターンと HapB/C/E-HapX のパターンを比較し、HapX が実際に DNA にコンタクトしていることを示すことが明らかとなった。保護部位の比較により HapX は CCAAT 配列の約 10 塩基対上流に結合することが判明した (図 1)。即ち、鉄が欠乏すると HapB/C/E と HapX の親和性が上昇し、HapX は CCAAT 配列近傍の HapX 認識配列と結合することにより、HapB/C/E と HapX およびプロモータ DNA の 5 者で複合体をつくり、安定化する。この複合体を通じて、転写の抑制を引き起こす。ただし、HapX は単独では DNA 結合が出来ないので、HapX のプロモータへの結合には近傍に CCAAT 配列に結合した HapB/C/E が存在することが必要条件となる。

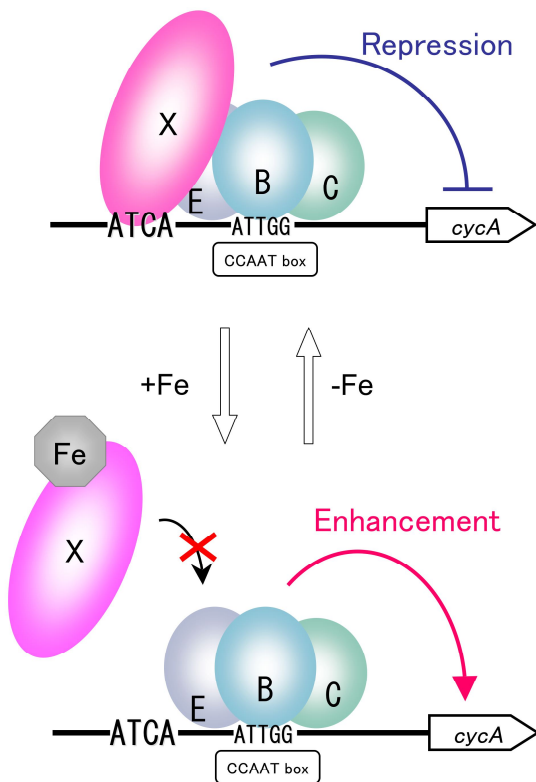


図 1. HapX および HapB/C/E 複合体による鉄関連遺伝子の転写抑制のモデル。

すなわち、これが鉄関連遺伝子とそれ以外の、単に CCAAT 配列を有するプロモータを識別する機構であると考えられた。一方、十分に鉄の存在する条件では、HapX と HapB/C/E 複合体の親和性が低下するために、結合部位があ

ろうともプロモータに結合することはできないので、抑制が解除することになると考えられる。

- ③その他の鉄関連遺伝子の解析: チトクローム *c* の解析と同様に、その他の鉄関連遺伝子 (アコニターゼ遺伝子 *acoA*、シスアコニターゼ遺伝子 *lysF*、鉄取り込み系抑制因子遺伝子 *sreA* についても解析を行い、チトクローム *c* の解析で得られた結論を支持する結果を得た。
- (2) HapX 認識配列に変異を導入し、*in vivo* での HapX 結合の影響を調べた。*in vitro* の解析で明らかになった HapX が結合できなくなるような変異プロモータを用い、HapX 結合の抑制機構への影響を *in vivo* で調べた。具体的には野生型のチトクローム *c* プロモータと変異プロモータをレポーター遺伝子 (*lacZ* を用いる) に連結し、*A. nidulans* に導入後、 β -ガラクトシダーゼ活性を調べることで解析をした。その結果、鉄欠乏時にチトクローム *c* の発現が抑制されるのには HapX およびチトクローム *c* プロモータ上の推定 HapX 結合配列が必要であることが明らかとなった。
- (3) HapX の部分欠失変異リコンビナントタンパク質を作製した。HapX は N 末端部分に HapB/C/E 複合体と相互作用すると推定されているドメイン、それに続く塩基性のドメイン、鉄と相互作用することが推定されているシステインに富む C 末端ドメインを有する。これらのドメインに着目して、各ドメインを分割するように部分欠失変異リコンビナントタンパク質を生産するような大腸菌の発現系を構築し、各欠失リコンビナントタンパク質を調製した。具体的には全長の HapX および DNA 結合に重要と思われる N 末端部分の HapB/C/E 複合体との相互作用ドメインとそれに続く塩基性のドメインを含むような複数のリコンビナントタンパク質の発現系を構築し、リコンビナントタンパク質を取得することに成功した。
- (4) HapB/C/E および HapX の部分欠失変異体を利用し、それぞれの機能ドメインを同定する実験に関しては、時間の都合上行われなかった。
- (5) ゲノム配列が明らかになっている近縁の真菌類についても、今回得られた知見が一般化できるかを調べた。その結果、子囊菌類のみでなく、担子菌類の一部にも HapX 様の因子が存在することが明らかとなった。現在、担子菌の HapX についても機能解析を進めている段階であるが、当初予想したよりも、広くこの転写因子が分布していることを示している。菌類の鉄の恒常性の維持機構の解明が、菌類によるヒトを含むほ乳類に対する病原菌や植物病原菌の防除のための創薬や、麹菌やキノコ類などの有用菌類の育種のための重要な知的基盤の構築に役

立つことが期待される。

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1件)

- (1) Masashi Kato (2010) Analysis on the transcriptional regulation mechanisms controlled by the CCAAT-box binding complex as a key factor in filamentous fungi. Report of the Noda Institute for Scientific Research 54: 37-40 (査読無)

[学会発表] (計5件)

- (1) 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 (2013) 麹菌転写因子HapXによるシデロフォア生産調節機構. 日本農芸化学会2012年度大会(宮城)
- (2) 中村隼人、林口拓実、安田(吉野) 庄子、北本則行、志水元亨、加藤雅士 (2012) 麹菌転写因子HapXの高発現はシデロフォア生産を顕著に増大させる. 第12回糸状菌分子生物学コンファレンス(名古屋)
- (3) 増田裕一郎、安田(吉野) 庄子、北本則行、志水元亨、加藤雅士 (2012) *LigD* 遺伝子破壊による実用麹菌*hapX*破壊株の取得とその解析. 第12回糸状菌分子生物学コンファレンス(名古屋)
- (4) M. Kato, (2012) Studies on the Genome and Transcriptional Regulations of *Aspergillus oryzae*, an Important Japanese Industrial Fungus. Symposium on Bioresources Science for Sustainable Development of Japan and Thailand. (招待講演) 2012年08月28日, Bangkok, Thailand
- (5) Kato M. (2010) Future progress of the genetic Research on *Aspergillus oryzae*. Conference of the Institute of the Sunchang Fermented Soybean Products. Sunchang County, Korea (招待講演)

[図書] (計1件)

- (1) Kobayashi T. and Kato M. (2010) Transcriptional regulation in *Aspergillus*. *Aspergillus: Molecular biology and Genomics*. Eds by M. Machida and K. Gomi. Norfolk, Caister Academic Press. 85-114

[産業財産権]

○出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://www.agr.meijo-u.ac.jp/cgi-bin/labo08/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 なし
()

研究者番号:

(3) 連携研究者 なし
()

研究者番号: