

## 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 5日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010 ~ 2012

課題番号：22580081

研究課題名（和文）

糸状菌における環境センサーを用いた生育分化制御とその利用

研究課題名（英文） A sensor histidine kinase controls fungal growth and development in response to low oxygen conditions

研究代表者

金丸 京子 (KANAMARU KYOKO)

名古屋大学・生命農学研究科・助教

研究者番号：00420365

研究成果の概要（和文）：

麹菌 *Aspergillus oryzae* は、醤油、味噌、清酒等の醸造、または試薬、医薬用酵素等を製造するために用いられる重要な産業菌である。しかし、通常調製される種麹は、分生子の着生量が少ないという欠点がある。*A. oryzae* の近縁種 *A. nidulans* では、環境センサータンパク質 HysA が農薬応答や低酸素に反応した分化の制御に関わることが示唆された。HysA の *A. oryzae* におけるオルソログを同定することで、分生子形成の制御を行い、麹菌固体培養における分生子着生の上昇を試みた。

研究成果の概要（英文）：

*Aspergillus oryzae*, which is called as Kouji, is a useful fungus to produce industrial materials such as soy sauce, miso, sake, medicine and so on. However, we still have some problems, because we do not get enough spores to prepare the culture of *A. oryzae*. In *Aspergillus nidulans*, we characterized HysA, a histidine kinase, controls the formation of conidia in response to fungicide or low oxygen conditions. So, we tried to identify HysA ortholog of *A. oryzae* to promote the conidia formation in *A. oryzae*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：糸状菌 環境センサー 生育分化制御 分生子形成

### 1. 研究開始当初の背景

His-Asp リン酸リレー情報伝達機構は、原核生物から酵母、糸状菌、植物などの真核生物まで広く存在する環境応答機構である<sup>(1)</sup>。センサータンパク質 (HK) が環境変化を感知すると、自身の His 残基をリン酸化し、さらに HK 内自身の Asp 残基にリン酸基を転移したのち、中間因子 (HPt) の His 残基を介して、レスポンスレギュレーター (RR) の Asp

残基にリン酸転移する。このように、His 残基と Asp 残基間のリン酸転移によって情報が伝達され、最終的には環境変化に反応した遺伝子発現調節が行われる。モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* には15種類の HK、1種類の HPt 因子 (YpdA)、4種の RR が存在し、浸透圧や農薬、光、酸素に反応した生育分化に重要な働きをしていることが明らかに成りつつある。

申請者は、近年、農薬応答に機能するHKであるNikAの解析を行った(図1)(2)、(3)。野生株では、農薬存在下MAPキナーゼカスケードであるHOG経路が異常に活性化されるため、正常な生育が抑制され死に至るが、*nikA*を破壊するとHOG経路が農薬に応答せず、破壊株は農薬存在下でも生育することができた。さらに、RRである*sskA*、*srrA*の二重破壊株が単独破壊株よりも農薬に強い耐性を示したことから、NikAの情報はYpdAを介してSskA、SrrAに伝達されることが明らかになっている。農薬応答に重要なNikAのドメイン解析なども含め、NikAを中心とした情報伝達機構の解明は糸状菌特異的な農薬の開発改良に有効である。

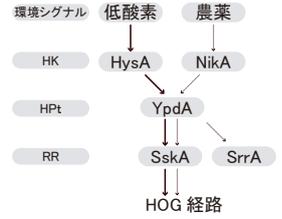


図1：糸状菌 His-Aspリン酸リレー情報伝達機構

一方、His-Aspリン酸リレー情報伝達機構の機能を網羅的に解析するために、様々な生育条件における各情報伝達因子の発現量をReal Time PCRにより解析した。その結果、低酸素条件下でHysAと名付けるHKのみが高い発現レベルを示した。通常、野生型*A. nidulans*の分生子形成(無性生殖)には酸素が不可欠で、低酸素条件下で培養すると分生子形成は抑制され(図2: WT)、有性生殖が誘導される。ところが、HysAの過剰発現株(図2: OP)では野生株より強く分生子形成が抑制され、HysAのリン酸化部位に変異を導入した株(図2: H566Q、D1134N)では低酸素条件下でも通常条件下と同程度の分生子形成を示した。すなわち、HysAは低酸素シグナルを認識して分生子形成を抑制するのに機能することが明らかになった。また、*hogA*欠損のバックグラウンドでは、過剰発現株やリン酸化部位の変異株の示す分生子形成が野生株と同等であったことから、HysAの認識する低酸素シグナルはHOG経路に伝達されることも明らかになっている(図1)。

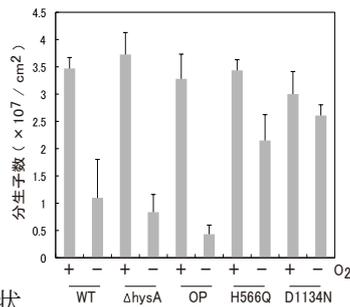


図2：HysAによる分生子形成の制御

このように糸状菌の環境応答を解明することで、その生育や分化を人為的に制御することが可能になり、糸状菌の高い物質生産性を利用した醸造産業に応用することが期待される。しかしながら、糸状菌には機能未知のHKがまだ複数存在し、情報伝達ネットワーク全体の解明に至っていない。そこで、本ネットワークが一つのリン酸転移中間因子YpdAを介していることに注目し、一つの

環境シグナル伝達システムを利用して生育分化を制御することを試みる。これにより、他の複数あるいは機能未知のHKを介した環境シグナルの影響を受けない醗酵培養系を構築できる。

## 2. 研究の目的

本研究では、前述のHysAを介した低酸素応答を利用して、糸状菌の分生子形成を制御する培養系の確立を最大目標に掲げる。また、醗酵培養の培養槽内では低酸素条件が生育や分生子形成の低下を引き起こしており、低酸素培養の改善あるいは低酸素に影響されない株の構築が必要である。そこで、HysAの低酸素シグナルを認識(伝達)しない変異体を利用することで分生子形成率の向上を目指す。具体的には、麹菌*Aspergillus oryzae*を用いて、(1)*A. oryzae*のHysAオルソログを同定し、*A. nidulans*と同様に低酸素シグナルを認識しないHysA変異株を作成する。(2)作成した麹菌のHysA変異株において、小麦フスマを用いた固体培養の孢子形成率が上昇するか、菌体外酵素量(アミラーゼ、セルラーゼ、キシラナーゼ等)が増加するか検討する。(3)固体培養における低酸素環境を改善し醗酵生産性を上げるためには、HysAの活性に影響する低酸素シグナルの実体あるいは培養条件を理解する必要がある。すなわち、培養酸素のレベルや培地中の酸化還元状態が分生子形成率にどのように影響するか検討する。(4)麹菌HysA変異株において、他の環境シグナル(農薬、浸透圧など)に対する応答性を確認する。

## 3. 研究の方法

(1)*Aspergillus oryzae*におけるHysAオルソログ(AoHysA)の同定

Families	<i>Aspergillus nidulans</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
HK1	1( <i>tcsB</i> )	1	1
HK2	1	1	1
HK3	1( <i>tcsA</i> )	1	1
HK4	1( <i>phkA</i> )	1	1
HK5	1( <i>phkB</i> )	1	1
HK6	1( <i>nikA</i> )	3( <i>nikA,B,C</i> )	1
HK7	1( <i>fphA</i> )	1	1
HK8	7( <i>hysA</i> )	5	5
HK9	1	1	1

図3：Aspergillus sp.におけるHKの種類と数

全ゲノム配列の決定により、モデル糸状菌*Aspergillus nidulans*には15種類のHK、近縁種で麹菌である*Aspergillus oryzae*にも15種類のHKの存在が示されているが、図3のように、それら糸状菌の間ではHKの構成に多少の相違がある。さらに、*A. nidulans*のHysA(AnHysA)は、お互いに相同性の高いHK8ファミリーに属するため、アミノ酸配列上の相同性のみで*A. oryzae*のHysAオルソログ(AoHysA)を同定することはできない。そのため、*A. oryzae*においても低酸素条件下での各HKの発現レベルを解析し、AoHysAを同定する必要がある。一方、*A. oryzae*には*A. nidulans*のように低酸素シグナルで誘導

される有性生殖が存在しないため、低酸素条件における HysA の発現プロファイルが両糸状菌間で異なることも考えられる。この場合、AoHysA を同定するもう一つの条件として、HysA の農薬ストレス下での発現誘導<sup>(4)</sup>を判断基準にすることが可能である。このようにして同定した AoHysA の自己リン酸化部位 (His 残基) およびリン酸基受容部位 (Asp 残基) は、すべてのヒスチジンキナーゼ間で高く保存されているため容易に推定することができる。野生型 *AohysA* とそのリン酸化部位に変異を導入したものを *A. nidulans* の *hysA* 破壊株に導入し、低酸素シグナルに応答した分生子形成を観察し (前述の図 2)、推定した AoHysA が AnHysA のオルソログであることを確定する。

#### (2) 低酸素シグナルに応答した AoHysA の機能解析

*A. oryzae* においても、低酸素条件下で分生子形成の抑制が観察されるため、同定した AoHysA が *A. oryzae* における分生子形成の制御に機能する可能性がある。まず、*A. oryzae* において *hysA* 破壊株を作成し、前述の *AohysA* とそのリン酸転移変異体を導入し、低酸素に応答した分生子形成の機能を観察する。*A. oryzae* においても、HysA のリン酸転移変異株は、低酸素条件下で十分な分生子形成をすることが期待される。

最も重要なことは、HysA の機能が小麦フスマを用いた固体培養で効果的かどうかである。*A. oryzae* は一般的に、液体や寒天培地での培養よりも固体培養において分生子や酵素 (アミラーゼ、セルラーゼ、キシラーゼ等) を高生産することが知られている。実際に、同定した AoHysA の過剰発現株やリン酸転移変異株において、固体培養の分生子形成を制御できるか観察する。その際、固体培養に麹菌を接種後、生育した菌体や分生子とフスマを分離するのは容易ではないため、生育や分生子形成は実体顕微鏡等を用いて確認する。さらに、培養後の固体培養から粗酵素抽出液を調整し、アミラーゼやセルラーゼなどの酵素活性を測定することで HysA の機能を評価する。

#### (3) HysA の活性に影響する低酸素シグナルの実体は何か?

本研究では、寒天培地のプレートの周りをビニールテープで密閉して培養した場合を低酸素条件としている。実際に、*A. nidulans* を液体培養後、菌体を回収して寒天培地に移し、直ちにビニールテープで密閉すると、1.5 時間で HysA 下流の MAP キナーゼである HogA のリン酸化が検出される。すなわち、低酸素状態はビニールテープの密閉後直ちに生じ、そのシグナルが HogA に伝達された (未発表データ)。この低酸素シグナルは、さらに数日後、分生子形成への影響として現れる。しかしながら、

空气中に存在する酸素が具体的にどの程度まで低下すると HysA の活性に影響するかは明らかでない。そこで、本申請の O<sub>2</sub> 濃度を調節できるインキュベーターで、分生子形成に影響する酸素レベルを明確にすることができる。逆に、当インキュベーターで、酸素濃度を一定に保ち、固体培養内部の低酸素環境を改善できると期待される。

AnHysA の解析から、現在のところ酸素が直接 HysA に作用するかどうか不明であるが、低酸素条件によって生じる還元状態が HysA を活性化することが明らかになりつつある (論文準備中)。すなわち、培地中にグルタチオンなどの還元剤を添加すると分生子数が低下するが、AnHysA のリン酸転移変異株では還元剤に反応することなく分生子を形成する。*A. oryzae* の固体培養においても酸化還元状態を調節することで分生子形成を制御できるか検討していく。

#### (4) *In vitro* 実験系をもちいて HysA 活性に影響する新たな培養条件を模索する。

すでに申請者は HysA タンパク質の精製系と *in vitro* におけるリン酸化実験系を確立している<sup>(5)</sup>。そこで、HysA の活性に影響する培養条件をこれら *in vitro* 系で評価することを試みる。実際に、上述の還元条件において、HysA タンパク質の自己リン酸化能が上昇する結果が得られている。O<sub>2</sub> 濃度を調節できるインキュベーターで *in vitro* 実験を行い、酸素が直接 HysA 活性に影響するか確定したい。また、その他さまざまな反応温度や塩濃度の条件で HysA の自己リン酸化活性を観察することで *in vivo* における培養条件設定の参考にする。

#### 参考文献

(1) Loomis WF, Shaulsky G, Wang N.; Histidine kinases in signal transduction pathways of eukaryotes; *J Cell Sci.* 110:1141-5 (1997).

(2) Daisuke Hagiwara *et al.*: Characterization of the NikA histidine kinase implicated in the phosphorelay signal transduction of *Aspergillus nidulans*, with special reference to fungicide responses; *Biosci Biotechnol Biochem.* 71, 844-847 (2007)

(3) Daisuke Hagiwara *et al.*: The SskA and SrrA response regulators are implicated in oxidative stress responses of hyphae and asexual spores in the phosphorelay signaling network of *Aspergillus nidulans*; *Biosci Biotechnol Biochem.* 71, 1003-1014 (2007)

(4) Hagiwara D, Asano Y, Marui J, Yoshimi A, Mizuno T, Abe K; Transcriptional profiling for *Aspergillus nidulans* HogA MAPK signaling pathway in response to fludioxonil and osmotic stress.; *Fungal Genet Biol.* 46:868-878 (2009).

<sup>6)</sup> Nobuhiro Azuma, Kyoko Kanamaru, Akinori Matsushika Takafumi Yamashino Takeshi Mizuno, Masashi Kato, and Tetsuo Kobayashi : *In vitro* analysis of His-Asp phosphorelays in *Aspergillus nidulans* : The first direct biochemical evidence for the existence of His-Asp phosphotransfer systems in filamentous fungi ; *Biosci Biotechnol Biochem.* 71, 2493-2502 (2007)

#### 4. 研究成果

(1) *Aspergillus oryzae* に存在する HK のさまざまな生育条件下における発現

*Aspergillus nidulans* HysA が、低酸素応答や、農薬応答に関与することが示唆された。このことから、近縁種であり、重要な産業菌でもある、麹菌 *Aspergillus oryzae* における HysA のオルソログの同定とその機能を解析し、産業的な応用へと繋げることを目的として研究を行った。また同時に、HysA 探索の一環として *A. oryzae* におけるすべての HK の発現様式を解析することで、*A. oryzae* の生育分化の制御機構解明の手がかりとすることを第 2 の目的とした。

ゲノム解析の結果より、*hysA* は *Aspergillus* 属特異的に存在する HK8 ファミリーに属し、*A. oryzae* には 5 種類の HK8 ファミリーに属する HK が存在すると推定されている(図 3)。これら 5 つの HK をそれぞれ *Aohk8-a* (A0090020000218), *Aohk8-b* (A0090701000517), *Aohk8-c* (A0090010000516), *Aohk8-d* (A0090003001384), *Aohk8-e* (A00901384000024) と記すこととする。

HysA オルソログを探索するため、まず始めに、*A. oryzae* に存在する 15 種類の HK すべてについて、さまざまな生育条件下での発現レベルを、*A. nidulans* における解析と同様の条件下で解析した。その結果、多くの HK (*AotcsB*, *Aohk2*, *AophkA*, *AophkB*, *AonikA*, *AofpHA*, *Aohk8-a*, *Aohk8-b*, *Aohk8-d*, *Aohk8-e*, *Aohk9*) において、栄養増殖を行う液体培養時 (veg 18hr) に発現量が最も多く、液体培養から寒天培地へ移し無性生殖を誘導した条件 (air 48hr)、寒天培地上で酸素を制限した条件 (seal 48hr) では発現量が抑えられることが示された。また、*Aohk8-c*, *Aohk8-e* を除き、air 48hr と seal 48hr で発現量に大きな差は見られなかった。これらの結果は *A. nidulans* での解析結果 (栄養増殖時と酸素制限時に多くの HK の発現が抑制される) と一致せず、*A. oryzae* では *A. nidulans* と HK の発現様式が大きく異なることを示唆している。また、*hysA* は酸素制限条件下においても発現が抑制されないという特徴を持っているが、*A. oryzae* において同様の発現様式を持つ HK8 ファミリーは

見いだされなかったため、この解析では HysA オルソログの同定に至らなかった。

(2) *Aspergillus oryzae* に存在する HK の農薬に応答した発現の変化

近年の報告により、*hysA* は農薬の添加により発現量が増加し、糸状菌における農薬応答の情報伝達機構に関与することが示されている。そこで、農薬の添加による各 HK の発現量の変化を *A. oryzae* の農薬センサー *AonikA*, *AonikB*, *AonikC* の発現量とともに解析した。その結果、農薬の添加により発現量が減少する HK が多いなか (*AotcsB*, *Aohk2*, *AonikA*, *AonikB*, *Aohk8-a*, *Aohk8-b*, *Aohk8-c*, *Aohk8-d*, *Aohk9*)、5 種類の HK において、農薬添加から 15 分後に 1.5 倍以上の発現量の増加が見られた (*AotcsA*, *AophkB*, *AonikC*, *AofpHA*, *Aohk8-e*)。この発現量の増加は、どれも農薬添加から 30 分後には減少し、最終的には農薬添加前に近い発現レベルにまで低下した。

(3) 誘導的 *Aohk8-e* 過剰発現株の作製

5 種類存在する HK8 ファミリーの中で、*Aohk8-e* が農薬添加による発現量の増加を示したことから、*Aohk8-e* が HysA のオルソログであると推定された。そこで、*Aohk8-e* の機能を解析するため、*A. nidulans* において *Aohk8-e* を誘導的に過剰発現する株 (*alca(p)::Aohk8-e*) を作製した。具体的には、*alca* プロモーター下流に His-tag 配列 (6×CAC) の付加した *Aohk8-e* 構造遺伝子を連結した DNA 断片を、*A. nidulans*  $\Delta$ *hysA* 株に導入した。*alca* プロモーターは Glucose を C 源とした培地条件下で抑制され (2% Glucose)、Threonine では誘導されるプロモーターである (0.1 M Threonine + 0.1 % Fructose)。

BPU1 (野生株),  $\Delta$ *hysA*, *alca(p)::hysA* 株について、Glucose 培地、Threonine 培地上で、通常酸素レベル条件 (air) と、ビニールテープでシャーレを密閉して酸素を制限した条件 (seal) において、37°C、4 日間培養後し、生育を比較した。その結果、Glucose 培地では酸素制限の有無に関わらず、すべての株において BPU1 株と同様の生育を示した (Glucose air, Glucose seal)。Threonine 培地で酸素を制限した場合において *A. nidulans* の *alca(p)::hysA* 株では気中菌糸の増加が観察されるが、*alca(p)::Aohk8-e* 株では認められなかった (Threonine seal)。

(4) 誘導的 *Aohk8-e* 過剰発現株における分生子数の変化

*A. nidulans* の *hysA* を過剰発現すると低酸素条件下において分生子形成が抑制されることが示されている。そこで、誘導的

Aohk8-e 過剰発現株における生育比較と同様の条件で培養後、単位面積辺りの分生子数を測定した。alca(p)::Aohk8-e 株は、Threonine 培地の通常酸素条件下、Glucose 培地の通常酸素条件、酸素制限条件下で BPU1 株と同程度数の分生子を形成した。また、Threonine 培地の酸素制限条件下では、A. nidulans の alca(p)::hysA 株において分生子数の減少が観察されるが alca(p)::Aohk8-e 株では、逆に BPU1 株の 4 倍程度の分生子の増加を観察した。以上の結果から、Aohk8-e は酸素レベルに応じて分生子数を制御するが HysA とは正反対に作用することが示された。

#### (5) 誘導的 Aohk8-e 過剰発現株の農薬耐性試験

hysA を過剰発現することで農薬に耐性になることが示されている。これは情報伝達系下流の HOG 経路のリン酸シグナルを介した不活性化によるものと考えられる。本研究における alca(p)::Aohk8-e 株についても農薬耐性試験を行った。20 µg/ml の Fludioxonil または Iprodione を添加した Glucose 培地、及び Threonine 培地に、BPU1、ΔhysA、alca(p)::hysA、alca(p)::Aohk8-e、Δnika 株の分生子を、それぞれ 10<sup>5</sup>、10<sup>4</sup>、10<sup>3</sup>、10<sup>2</sup> 個スポットし生育を比較した。その結果、alca(p)::Aohk8-e 株は培地に関わらず、BPU1 株と同程度の農薬感受性を示した。この結果から、Aohk8-e は農薬応答には関与しないことが示唆された。

#### 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 3 件)

(1) Yohei Yamakawa, Yoshikazu Endo, Neo Li, Makoto Yoshizawa, Miki Aoyama Ayako Watanabe, Kyoko Kanamaru, Masashi Kato, Tetsuo Kobayashi: Regulation of cellulolytic genes by McmA, the SRF-MADS box protein in *Aspergillus nidulans*.; *Biochemical and Biophysical Research Communications*.; 431. 777-782 (2013) 査読あり

(2) Yuji Noguchi Y, Hisaki Tanaka, Kyoko Kanamaru, Masashi Kato, and Tetsuo Kobayashi: Xylose Triggers Reversible Phosphorylation of XlnR, the Fungal Transcriptional Activator of Xylanolytic and Cellulolytic Genes in *Aspergillus oryzae*.; *Biosci Biotechnol Biochem*. 75, 953-959 (2011) 査読あり

(3) Kyoko Kanamaru: Roles of the His-Asp phosphorelay signal transduction system in controlling cell growth and development in *Aspergillus nidulans*.; *Biosci Biotechnol Biochem*. 75, 1-6 (2011) 査読あり

[学会発表] (計 6 件)

(1) 金丸京子、伊谷優佳里、松井哲児、加藤雅士、小林哲夫: 麹菌農薬センサー AoNikA と AoNikB は正反対のスイッチ機能を持つ; 日本農芸化学会 2013 年度 (平成 25 年度) 大会プログラム集 p50 (仙台)

(2) 林早紀、金丸京子、吉岡めぐみ、松井哲児、加藤雅士、小林哲夫: 糸状菌ヒスチジンキナーゼ HysA による ROS 発生への効果; 日本農芸化学会 2013 年度 (平成 25 年度) 大会プログラム集 p50 (仙台)

(3) 佐古知美、山崎ゆかり、金丸京子、加藤雅士、小林哲夫: *Aspergillus nidulans* における酸化ストレス応答機構の解析; 日本農芸化学会 2012 年度大会 (京都)

(4) 佐古知美、山崎ゆかり、金丸京子、加藤雅士、小林哲夫: 糸状菌 *Aspergillus nidulans* のヒスチジンキナーゼ PhkA, PhkB の機能解析; 第 11 回糸状菌分子生物学コンファレンス (2011) (東京)

(5) 伊谷優佳里、松井哲児、金丸京子、加藤雅士、小林哲夫: 麹菌 *Aspergillus oryzae* の農薬センサー AoNikA, B, C の機能解析; 日本農芸化学会 2011 年度大会 (京都)

(6) 佐古知美、山崎ゆかり、金丸京子、加藤雅士、小林哲夫: 糸状菌 *Aspergillus nidulans* の Histidine kinase PhkA, PhkB の機能解析; 日本農芸化学会 2011 年度大会 (京都)

[図書] (計 0 件)

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金丸 京子 (KANAMARU KYOKO)  
名古屋大学・生命農学研究科・助教  
研究者番号：00420365

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし