

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23658065

研究課題名(和文)糸状菌のサイレントパラログの選択的発現活性化機構の解明

研究課題名(英文)Regulatory mechanism for selective expression of silent paralogous genes in filamentous fungi

研究代表者

五味 勝也(Gomi, Katsuya)

東北大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：60302197

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：麹菌には2種類のパラロガスなマルトース資化クラスターが存在するが、正常に発現しているクラスター(MALクラスター)の遺伝子破壊により、通常は休眠(サイレント)状態にあるそのパラログ(MALホモログクラスター)が強く誘導発現されるという興味深い現象を見出した。相補試験によりパラログクラスターに存在するトランスポーターはマルトース取込み能を有していることが示されたが、発現量はきわめて低く、本来のマルトーストランスポーターの破壊株においてこのホモログを二重破壊しても、アミラーゼ生産には大きな影響は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：Two paralogous gene clusters that are deduced to be involved in maltose assimilation exist in the genome of *Aspergillus oryzae*. These clusters are both consisting of three genes that each encodes a transporter, alpha-glucosidase, and a transcription factor, respectively, and one of them is functional but the other seems to be transcriptionally silent. However, interestingly, these silent genes are induced to be transcribed when the functional genes are disrupted. The paralogous transporter gene was proved to encode a functional maltose transporter by complementation experiment. Double disruption of the transporter genes did not result in the defect in growth on maltose medium and also in alpha-amylase production, probably due to a significantly low transcription level of the paralogous transporter gene.

研究分野：遺伝子発現制御

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 遺伝子クラスター トランスポーター 転写因子 ホモログ遺伝子 アミラーゼ生産 マルトース資化

1. 研究開始当初の背景

申請者は、麹菌のデンプン分解酵素遺伝子のマルトースによる誘導発現に関与する転写因子 AmyR を世界に先駆けて単離し、その機能を明らかにした。さらに AmyR の活性化には誘導基質であるマルトースの細胞内取込みが重要であり、これに関与するマルトーストランスポーター (MalP) がゲノム上でマルターゼ (MalT) とこれらの遺伝子発現を制御する転写因子 (MalR) の遺伝子とクラスターを形成していることを明らかにした。一方、*malP* 破壊株では AmyR 制御下にある α -アミラーゼの生産量は誘導条件下の培養初期に著しく低く、培養後期に徐々に上昇してくることから、 α -アミラーゼの誘導生産に必要なマルトース取込みの主要なトランスポーターは MalP であるが、これ以外にもマルトース取込みに関わるトランスポーターの存在が示唆された。麹菌ゲノム情報から本 *MAL* クラスターと相同性の高いクラスターが見出され、非常に興味深いことに、*malP* と *malR* の破壊株ではこのクラスター遺伝子の発現が誘導される可能性が示唆された。このクラスターを構成するパラログは通常の培養条件ではほとんど発現が認められず、本来の *MAL* クラスターの機能が失われると同時に発現が誘導され、麹菌のマルトース資化能の回復に機能している可能性がある。このように、通常は休眠 (サイレント) 状態にあるホモログクラスターが、主に働く *MAL* クラスターが機能しない場合に限って発現するという仕組みは、緊急避難的な細胞応答機構とも考えられ、その遺伝子発現制御機構に大きな興味を持たれたため、本研究で解析に取り組むこととしたものである。

2. 研究の目的

麹菌ゲノム上に存在するパラログ的な 2 種類のマルトース資化関連クラスターのうち、正常に発現しているクラスター (*MAL* クラスター) の遺伝子破壊により、通常は休眠 (サイレント) 状態にあるそのパラログ (*MAL* ホモログクラスター) が誘導発現されてくる可能性を示唆する結果を見出した。この現象をもとに、本研究では、正常に機能している遺伝子クラスターとそのサイレントパラログが、マルトース資化においてどのように機能を分担しているかを明らかにするとともに、サイレントパラログの発現活性化の機構を分子レベルで解析することにより、糸状菌ゲノムに存在するパラログ的な代謝遺伝子 (群) の条件選択的・相補的な発現制御機構

の解明につなげる。

3. 研究の方法

MAL クラスターのマルトース取込みと α -アミラーゼ生産の関係の検証を行うとともに、その破壊株における発現プロファイルを解析する。*MAL* ホモログクラスター構成遺伝子が機能するタンパク質をコードしているか調べるとともに、ホモログクラスターに存在する転写因子 MalR ホモログの遺伝子破壊を行い、*malP* ホモログ・*malT* ホモログの発現に及ぼす影響を調べる。ホモログクラスターの *malP* ホモログ-*malT* ホモログ間のプロモーターの詳細な解析を行う。さらに、マルトース取込みの有無による発現制御の有無について解析するとともに、MalP または MalR タンパク質が存在することによりホモログクラスター遺伝子の発現抑制が起こるか調べる。

4. 研究成果

(1) *MAL* クラスターのマルトース取込みと α -アミラーゼ生産

MAL クラスターに存在するトランスポーター MalP と転写因子 MalR のマルトース取込みと α -アミラーゼ生産に及ぼす影響を検証するため、それぞれの遺伝子破壊株を用いて、カザミノ酸培地で前培養した後に、マルトース培地に移して経時的に α -アミラーゼ生産と菌体内へのマルトース取込みを測定した。

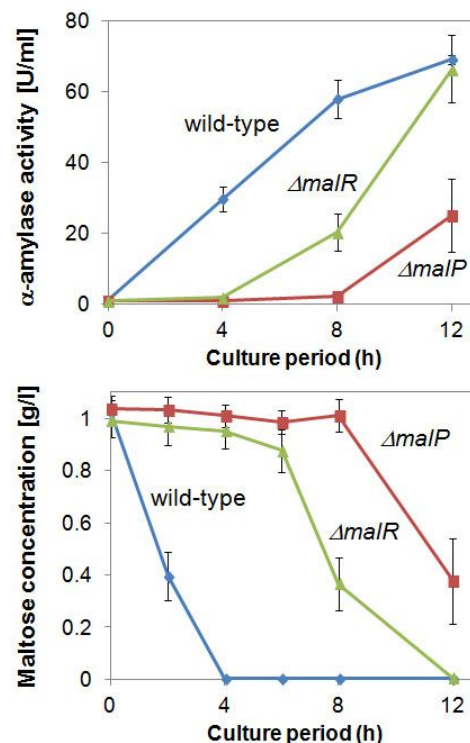


図1 *MAL* クラスター破壊株の α -アミラーゼ生産とマルトース取込み

その結果、図1に示すように、マルトースによる誘導初期における培養液中の α -アミラーゼ活性は *malP* 破壊株で顕著に低くなった。*malR* 破壊株も野生株に比べて低くなっており、*MAL* クラスタ中の *MalP* と *MalR* の α -アミラーゼ生産への関与があらためて示された。また、細胞内へのマルトース取込みを調べるため、培地中に残存するマルトース量を測定したが、*malP* 破壊株ではマルトースの取込みがきわめて低下していることが認められ、 α -アミラーゼ活性のパターンに良く一致していた。同様に、*malR* 破壊株もマルトース取込みの遅れが認められ、この遅れと α -アミラーゼ生産のパターンはほぼ一致していた。

(2) *MAL* ホモログクラスタ構成遺伝子の発現プロファイルの解析

麹菌の *MAL* クラスタを構成する *malP* と *malR* の破壊株の解析から、マルトース誘導後期の α -アミラーゼ生産量の上昇に関する *MalP* 以外のトランスポーターの候補として、*MAL* クラスタと相同性の高いホモログクラスタの *MalP* ホモログが考えられた。しかし、マルトース培養ではこのホモログクラスタ内の遺伝子 (*malP* ホモログ、*malT* ホモログ、*malR* ホモログ)のいずれもほとんど発現が検出されず、偽遺伝子である可能性が示唆された。一方、*malP* と *malR* の破壊株を用いた DNA マイクロアレイ解析により、興味深いことに、ホモログクラスタの *malP* ホモログと *malT* ホモログの発現が特異的に誘導されてくることを見出された(表1)。

表1 *ΔmalP*, *ΔmalR*株のマイクロアレイ解析

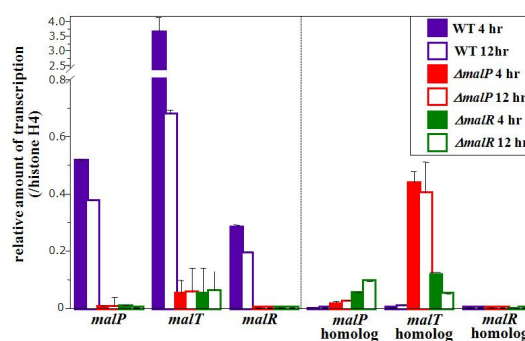
Description	Ratio of <i>malP</i> disruptant induction	
	4 hr	12 hr
574 aa maltase <i>MalT</i>	0.24	0.34
584 aa maltase <i>MalT</i> homolog	364.1	1849.1
531 aa predicted transporter <i>MalP</i> homolog	12.27	13.55
499 aa alpha-amylase <i>AmyA</i> , <i>AmyB</i> , <i>AmyC</i>	0.24	0.42

Description	Ratio of <i>malR</i> disruptant induction	
	4 hr	12 hr
574 aa maltase <i>MalT</i>	0.18	0.33
584 aa maltase <i>MalT</i> homolog	60.22	44.23
531 aa predicted transporter <i>MalP</i> homolog	34.42	54.38
499 aa alpha-amylase <i>AmyA</i> , <i>AmyB</i> , <i>AmyC</i>	0.25	0.43

これを確認するため、同様の培養で得られた RNA を用いてノーザン解析を行ったところ、シグナルは弱いものの *malP* と *malR* の破壊株で特異的に *malP* ホモログと *malT* ホモログの発現が認められた。野生株ではほとんど発現が認められないため、アレイ解析で野生株と破壊株における発現比が非常に大きな差として検出されたものの、実際の発現量はあまり高いものではなかった。しかし、このような主に機能する遺伝子が欠損することに

よって、通常は発現が認められない相同性の高いホモログ遺伝子の発現が誘導される現象は非常に興味深いものである。さらに、定量 PCR によって発現プロファイル調べたところ、アレイ解析とノーザン解析の結果と同様、*malP* と *malR* の破壊株において *MAL* ホモログクラスタ中に存在する 3 遺伝子の発現が誘導されていることが示された(図2)。

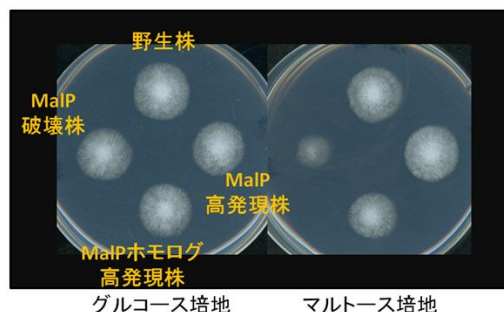
図2 *ΔmalP*, *ΔmalR*株の定量RT-PCR解析



(3) *MAL* ホモログクラスタ構成遺伝子の機能解析

malP ホモログと *malR* ホモログについて、構成的なプロモーターに連結してそれぞれ酵母の *MAL11* および *MAL13* 遺伝子破壊株に導入し、マルトース培地上での生育を調べたところ、*malP* ホモログ導入株では生育が見られたが *malR* ホモログ導入株では生育は認められなかった。次に、*malP* ホモログと *malR* ホモログを麹菌 *malP* プロモーター下で発現するよう連結して、麹菌の *malP* および *malR* 破壊株に導入した。その結果、酵母での実験と同様、*malP* ホモログは *malP* 破壊を相補した(図3)ものの、*malR* ホモログは *malR* 破壊を相補できなかった。

図3 *malP*ホモログのトランスポーター機能相補解析



以上のことから、*MalP* ホモログはマルトーストランスポーターの機能を有することが明らかとなった。一方、*MalR* ホモログは *MalR* と zinc finger motif が高い相同性を示すものの相補できる機能を有していないことが示された。

さらに、ホモログクラスタ遺伝子が特殊

な環境下で発現する可能性を検討するため、マルトース、グルコース、グリセロールなどの各種炭素源を含む液体培養や炭素源飢餓培養におけるそれぞれの遺伝子の発現プロファイルを解析したが、野生株では *malP* または *malR* の遺伝子破壊株のような誘導発現は認められなかった。

(4) MAL クラスター及びホモログクラスターの二重破壊株の作製と機能解析

MAL ホモログクラスター中の転写因子 *malR* ホモログが *malP* ホモログと *malT* ホモログの発現に関与しているか明らかにするため、*malR* 破壊株を用いてさらに *malR* ホモログを破壊した二重破壊株を作製したが、生育に明瞭な差は認められなかった。一方、*malP* ホモログについても同様に *malP* との二重破壊株を作製し、マルトースおよびデンプンプレートにおける生育を調べたが、*malP* 破壊株とほとんど差は認められず、-アミラーゼ生産がさらに遅延することも見られなかった。*malP* 破壊株において *malP* ホモログの発現が誘導されても、おそらくその発現量が十分高くないことにより、細胞内へのマルトース取込みには大きな寄与はしないのではないかと思われる。*malP* 破壊株でマルトース誘導後期に -アミラーゼ生産が徐々に回復してくるのは、親和性は低いものの高発現している MalP ホモログとは異なる糖トランスポーターによるものと考えられる。

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔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

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