

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450106

研究課題名(和文) 白麹菌の特徴を規定する転写制御因子の同定と機能解明

研究課題名(英文) Characterization of transcriptional factors involved in the unique properties of a white koji mold

研究代表者

二神 泰基 (FUTAGAMI, Taiki)

鹿児島大学・農水産獣医学域農学系・准教授

研究者番号：60512027

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：大麦を原料とした麹造りにおいて発現変動する白麹菌の推定転写制御因子を7遺伝子(nosA、rosA、atfA、atfB、AKAW\_01957、AKAW\_02766、AKAW\_02903)同定した。これらを、白麹菌の糖質加水分解酵素やクエン酸の生産を制御する可能性がある転写制御因子として解析した。各推定転写制御因子の遺伝子破壊株を構築して表現型を解析した。その中でもnosAとrosAの二重破壊株は、菌糸伸長は正常であったが顕著な分生子形成能の低下が見られた。また、NosA-GFPとRosA-GFPは核に局在することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The transcriptional change of a white koji mold, *Aspergillus luchuensis* mut. kawachii, during barley koji production was investigated and 7 putative transcriptional factor encoding genes (nosA, rosA, atfA, atfB, AKAW\_01957, AKAW\_02766, AKAW\_02903) were identified among the genes with significant transcriptional changes. These genes were disrupted and the nosA and rosA double disruptant showed radial colony growth similar to the wild type strain, but showed reduced conidia formation. It was also indicated that the NosA-GFP and RosA-GFP fusion proteins localized in the nuclei.

研究分野：応用微生物学

キーワード：白麹菌 *Aspergillus* 転写制御因子 クエン酸

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 白麹菌 (*Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii*) は、焼酎の製造に使用される麹菌である。焼酎製造における白麹菌の役割は、まず、アミラーゼやグルコシダーゼ等の糖質加水分解酵素を高分泌生産し、原料に含まれる多糖類を単糖レベルに分解することである。次に、クエン酸を高生産し、もろみの pH を低く保つことで雑菌の増殖を防ぐことが挙げられる。

(2) 先行研究において、白麹菌 IFO (NBRC) 4308 株のゲノム解析を行った( )。その結果、約 36.6 Mbp のドラフトゲノム情報を取得して、11,488 の推定 CDS を同定した。例えば、糖質加水分解酵素をコードする遺伝子は、機能既知および未知のものを合わせて 247 遺伝子見つかった。次に、白麹菌の高効率遺伝子組換え宿主を構築した( )。具体的には、非相同末端結合に関わる DNA ligase IV をコードする *ligD* 遺伝子を破壊することにより効率的な相同組換えが可能になった。

## 2. 研究の目的

先行研究で構築した白麹菌の研究基盤を活用して、糖質加水分解酵素やクエン酸の高生産に関わる転写制御因子を同定し、機能を解明することを目的とした。白麹菌のもつ高度な物質生産能力を解明することによって糸状菌を宿主とした有用タンパク質や有機酸の生産に役立つ知見が得られることを期待した。

## 3. 研究の方法

(1) マイクロアレイのデータ解析  
大麦を原料として *Aspergillus luchuensis* SH46 株 (株式会社樋口松之助商店) による製麹を行い、DNA マイクロアレイ (Agilent、e-Array) により遺伝子発現情報を取得した。有意な発現変動 ( $\log_2$  fold change  $< -0.5$  あるいは  $> 0.5$ 、かつ  $q$ -value  $< 0.01$ ) が示唆された遺伝子から推定転写制御因子をコードする遺伝子を解析対象として選択した。なお、モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* において転写制御因子のアノテーションがついている Orf のアミノ酸配列を AspGD (<http://www.aspgd.org/>) から取得して、BLASTP 解析を行うことで、白麹菌の遺伝子にアノテーションを付与した。

### (2) 遺伝子破壊株の構築

白麹菌の *ligD argB sC* 株 (*ligD::ptrA argB::hph sC-*) を宿主として、*A. nidulans* 由来の *argB* 遺伝子を選択マーカーとして解析対象の推定転写制御因子遺伝子を破壊した。各遺伝子破壊に用いたカセットは、リコンビナント PCR により構築し、pGEM-T Easy ベクター (プロメガ) にクローニングした後、*EcoRI* あるいは *NotI* で破壊カセットを切り出して使用した。白麹菌の形質転換はプロトプ

ラスト-PEG 法により行った。

### (3) 培養条件

コントロール株、および各転写制御因子遺伝子の破壊株の培養に以下の培地を用いた。形質転換には、M 培地 (NaNO<sub>3</sub> 6 g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.52 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.52 g, KCl 1.52 g, Glucose 10 g, Hunter 's trace element 2 ml, Agar 15 g, all per L, pH 6.5) を用いた。必要に応じて、L methionine 2.24 g/L と L arginine 2.1 g/L を培地に添加した。分生子形成の観察のために、分生子形成培地 (Bacto peptone 1 g, Bacto Yeast extract 5 g, NaNO<sub>3</sub> 1 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g, MgSO<sub>4</sub> 0.5 g, Glucose 10 g, Malt extract 10 g, Agar 15 g, all per L, pH 7) を用いた。Sclerotium (菌核) の形成の有無を観察することを目的として、CYA (Czapek Yeast Autolysate Agar) 培地 (Sucrose 30 g, Agar 15 g, Yeast extract 5 g, NaNO<sub>3</sub> 3 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g, KCl 0.5 g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.5 g, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.01 g, all per L, pH 7.3) を用いた。また、同様に菌核形成を調べるために、分生子を 1% 水寒天に懸濁し、M 培地に重層して培養した。

### (4) GFP 融合による局在解析

*nosA*、および *rosA* の GFP 融合遺伝子 (C 末端側に GFP) を、TetOn プロモーターで発現制御可能な pVG2.2 (Fungal Genetics Stock Center, <http://www.fgsc.net/>) ( ) に連結した。なお、pVG2.2 の *pyrG* 遺伝子を制限酵素 *PmeI* により切り出して、PCR 増幅した *sC* 遺伝子を Infusion (クロンテック) により連結した。GFP 融合タンパク質の局在は、蛍光顕微鏡 (ライカ、DMI6000B/AF6000) により観察した。

### (5) RNA-seq 解析

コントロール株と *nosA* 遺伝子破壊株における遺伝子発現の比較を RNA-seq 解析により行った。コントロール株と *nosA* 遺伝子破壊株を液体培地で培養した後、ガラス濾過器で菌体を回収して寒天培地に移すことで分生子形成を誘導した後に集菌した。RNAiso Plus (タカラバイオ) により菌体から RNA を抽出し、HiSeq 2000 (Illumina) による RNA-seq 解析を行った (ユーロフィンジェノミクス)。

## 4. 研究成果

(1) 大麦を原料とした製麹において発現変動する推定転写制御因子を同定した。クエン酸の高生産に関わる転写制御遺伝子に着目するために、製麹 25 時間目に 40 から 30 へ温度を低下させた通常条件 (クエン酸生産誘導条件) と、40 を維持した条件 (クエン酸生産非誘導条件) の遺伝子の発現変動をマイクロアレイにより比較し、クエン酸生産誘導条件において顕著に発現量が上昇した 2 遺伝子と、減少した 5 遺伝子を同定した (テーブル 1)。

テーブル1 解析対象の転写制御因子のリスト

A. kawachii Locus tag	Function	Fold change
AKAW_03658	Putative C6 transcription factor (RosA)	3.00
AKAW_09811	Putative C6 transcription factor (NosA)	2.00
AKAW_02766	Putative C6 transcription factor	0.45
AKAW_01957	Putative C6 transcription factor	0.42
AKAW_02903	Putative Zn(II)2Cys6 transcription factor	0.37
AKAW_09548	Putative bZIP transcription factor (AtfB)	0.28
AKAW_06968	Putative bZIP transcription factor (AtfA)	0.27

(2) 解析対象遺伝子の破壊株を構築した。また、NosA と RosA に関しては、GFP 融合タンパク質発現株を構築した。

テーブル2 本実験に用いた菌株の遺伝子型

Strain	Genotype
IFO 4308 $\Delta$ ligD	ligD::ptrA
IFO 4308 $\Delta$ ligD $\Delta$ sC	ligD::ptrA Sc <sup>-</sup>
$\Delta$ rosA	ligD::ptrA argB::hph Sc <sup>-</sup> rosA::argB
$\Delta$ nosA	ligD::ptrA argB::hph Sc <sup>-</sup> nosA::argB
$\Delta$ rosA $\Delta$ nosA	ligD::ptrA argB::hph Sc <sup>-</sup> rosA::argB nosA::sC
$\Delta$ rosA::rosA-GFP	ligD::ptrA argB::hph Sc <sup>-</sup> rosA::argB pVG2.2-sC-rosA-GFP
$\Delta$ nosA::nosA-GFP	ligD::ptrA argB::hph Sc <sup>-</sup> nosA::argB pVG2.2-sC-nosA-GFP

(3) クエン酸生産誘導時に発現が上昇した 2 遺伝子 (nosA と rosA) に着目した。図 1 に NosA と RosA の系統樹を示す。

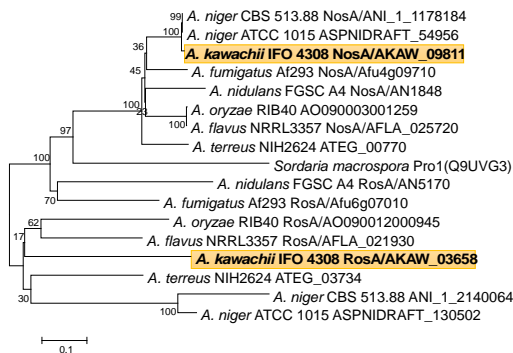


図 1 NosA と RosA の系統樹

まず、nosA と rosA は単独遺伝子破壊株の他に二重遺伝子破壊株を構築した。nosA と rosA は温度変化時に発現変動する遺伝子として同定されたが、各遺伝子破壊株の M 平板培地での生育 (経時的なコロニー径の増大) は、25、30、37、42 度の異なる温度においてコントロール株と同様であった。一方、分生子形成能については、rosA 破壊株はコントロール株と同様であったが、nosA 破壊株と nosA rosA 二重破壊株は、分生子形成能が顕著に低下 (nosA rosA 二重破壊株は、野生株の約 20%) した (図 2)。



図 2 分生子形成培地における生育 (30 )

NosA と RosA は、A. nidulans において有性生殖に関与することが報告されていた ( , )。しかし、白麹菌には有性世代は見出されていない。そこで、白麹菌と近縁の Aspergillus niger において菌核形成が観察された CYA 培地 ( ) を用いて培養した。CYA 培地で 25 、あるいは 32 の暗所で 2 週間以上培養した。しかし、いずれも菌核形成は確認されなかった (図 3)。また、分生子を 1%水寒天に懸濁して M 培地に重層し、同様に暗所で培養したが、菌核形成は観察されなかった。

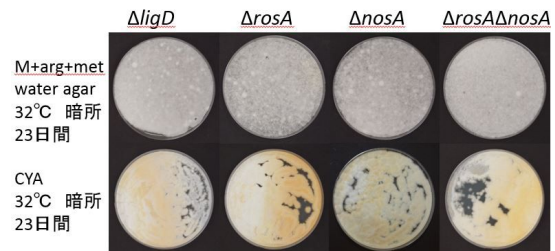


図 3 菌核形成を誘導するための培養

(4) 各遺伝子破壊株を宿主として、Tet-On プロモーターにより NosA-GFP および RosA-GFP を強制発現する相補株を構築した。ドキシサイクリンにより発現誘導し、蛍光顕微鏡により局在を観察した。DAPI 染色と比較した結果、NosA-GFP と RosA-GFP は核に局在することが示唆された。表現型の観察結果を合わせて、NosA は白麹菌において分生子形成に関わる遺伝子発現制御に関与する可能性が示唆された。

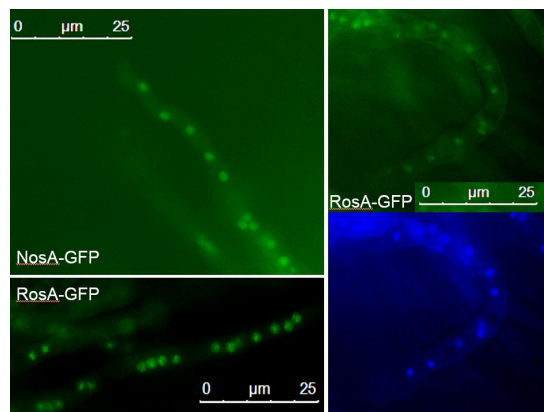


図 4 NosA-GFP および RosA-GFP の観察

(5) NosA が発現を調節している遺伝子を同定するためにコントロール株と nosA 遺伝子破壊株の比較トランスクリプトーム解析を行った。コントロール株と nosA 遺伝子破壊株を液体培地で培養した後、菌体を寒天培地に移して分生子の形成を誘導した際の転写産物を RNA-seq により解析した。その結果、コントロール株と nosA 遺伝子破壊株とで発現レベルの異なる 293 遺伝子 (上昇: 128 遺伝子、減少: 165 遺伝子、q-value < 0.05) を同定した。

<引用文献>

Futagami T, Mori K, Yamashita A, Wada S, Kajiwara Y, Takashita H, Omori T, Takegawa K, Tashiro K, Kuhara S, Goto M. Genome sequence of the white koji mold *Aspergillus kawachii* IFO 4308, used for brewing the Japanese distilled spirit shochu. *Eukaryot. Cell.* 2011, 10, 1586-1587.

Tashiro S, Futagami T, Wada S, Kajiwara Y, Takashita H, Omori T, Takahashi T, Yamada O, Takegawa K, Goto M. Construction of a *ligD* disruptant for efficient gene targeting in white koji mold, *Aspergillus kawachii*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 2013, 59, 257-260. doi: 10.2323/jgam.59.257.

Meyer V, Wanka F, van Gent J, Arentshorst M, van den Hondel CA, Ram AF. Fungal gene expression on demand: an inducible, tunable, and metabolism-independent expression system for *Aspergillus niger*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2011, 77, 2975-2983.

Vienken K, Fischer R. The Zn(II)2Cys6 putative transcription factor NosA controls fruiting body formation in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* 2006, 61, 544-554.

Vienken K, Scherer M, Fischer R. The Zn(II)2Cys6 putative *Aspergillus nidulans* transcription factor repressor of sexual development inhibits sexual development under low-carbon conditions and in submerged culture. *Genetics.* 2005, 169, 619-630.

Frisvad JC, Petersen LM, Lyhne EK, Larsen TO. Formation of sclerotia and production of indoloterpenes by *Aspergillus niger* and other species in section Nigri. *PLoS One.* 2014, 9, e94857. doi: 10.1371/journal.pone.0094857. eCollection 2014.

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2件)

Kadooka C, Onitsuka S, Uzawa M, Tashiro S, Kajiwara Y, Takashita H, Okutsu K, Yoshizaki Y, Takamine K, Goto M, Tamaki H, Futagami T. Marker recycling system using the *sC* gene in the white koji mold, *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 査読有, 2016, 62, in

press, doi: 10.2323/jgam.2016.01.001

Futagami T, Mori K, Wada S, Ida H, Kajiwara Y, Takashita H, Tashiro K, Yamada O, Omori T, Kuhara S, Goto M. Transcriptomic analysis of temperature responses of *Aspergillus kawachii* during barley koji production. *Appl. Environ. Microbiol.* 査読有, 2015, 81, 1353-1363. doi: 10.1128/AEM.03483-14.

[学会発表](計8件)

二神泰基. *Aspergillus* 属糸状菌のストレス応答に関する研究. 平成 27 年度(第 313 回)日本農芸化学会西日本支部例会および講演会. 2016 年 1 月 23 日. 九州大学(福岡県福岡市).

門岡千尋、泉津弘佑、奥津果優、吉崎由美子、高峯和則、後藤正利、玉置尚徳、二神泰基. 白麹菌 *Aspergillus kawachii* におけるクエン酸合成関連遺伝子の機能解析. 2015 年 12 月 6 日. 微生物学の新たな発展, ゲノムから機能・実用に関する九州シンポジウム. ANA ホリデイ・イン リゾート(宮崎県宮崎市).

門岡千尋、泉津弘佑、奥津果優、吉崎由美子、高峯和則、後藤正利、玉置尚徳、二神泰基. 白麹菌 *Aspergillus kawachii* におけるクエン酸合成関連遺伝子の機能解析. 2015 年 11 月 19-20 日. 第 15 回糸状菌分子生物学コンファレンス. ルミエール府中(東京都府中市).

門岡千尋、泉津弘佑、奥津果優、吉崎由美子、高峯和則、後藤正利、玉置尚徳、二神泰基. 白麹菌におけるクエン酸生産関連遺伝子の解析. 第 67 回日本生物工学会大会. 2015 年 10 月 26-28 日. 城山観光ホテル(鹿児島県鹿児島市).

二神泰基. 焼酎麹菌のクエン酸高生産機構に関する研究. 第 18 回真核微生物交流会. 2015 年 6 月 12 日. 独立行政法人酒類総合研究所(広島県東広島市).

二神泰基、田代智史、梶原康博、高下秀春、竹川薫、玉置尚徳、後藤正利. 白麹菌における推定転写制御因子 NosA と RosA の解析. 第 14 回糸状菌分生物学コンファレンス. 2014 年 11 月 15-16 日. 東北大学(宮城県仙台市).

二神泰基. 焼酎麹菌のクエン酸高生産機構の解明への取り組み. 糸状菌分子生物学研究会若手の会第 2 回若手の会ワークショップ. 2014 年 11 月 14 日. 秋保温泉 岩沼屋(宮城県仙台市).

二神泰基、森一樹、和田正太郎、梶原康博、高下秀春、大森俊郎、田代康介、久原哲、後

藤正利. 麦麹の製造過程における白麹菌のマイクロアレイ解析. 第 65 回日本生物工学会大会. 2013 年 9 月 18-20 日. 広島国際会議場 (広島県広島市).

〔図書〕(計 2 件)

Takuji Oka, Taiki Futagami, Masatoshi Goto. Cell wall biosynthesis in filamentous fungi. In: Takagi H, Kitagaki H (eds), Stress Biology of Yeasts and Fungi. Springer Japan, pp. 151-168, 2015.

後藤正利, 二神泰基, 梶原康博, 高下秀春. 焼酎麹菌の Identity を探る. 日本醸造協会誌. 109, 219-227, 2014.

〔その他〕

ホームページ等

[http://chem.agri.kagoshima-u.ac.jp/Shochu\\_new/index.html](http://chem.agri.kagoshima-u.ac.jp/Shochu_new/index.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

二神 泰基 (FUTAGAMI, Taiki)

鹿児島大学・学術研究院農水産獣医学域農学系・准教授

研究者番号：6 0 5 1 2 0 2 7

### (2) 研究分担者

後藤 正利 (GOTO, Masatoshi)

九州大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号：9 0 2 7 4 5 2 1