

麹菌 *Aspergillus oryzae* における
新規二次代謝制御因子 KpeA の機能解析

2020 年

荒川 弦矢

目次

緒論.....	1
第1章 コウジ酸生産を指標とした転写因子破壊株ライブラリーのスクリーニング	7
第2章 <i>in silico</i> 解析による <i>kpeA</i> の特徴付け.....	18
第1節 <i>kpeA</i> の転写領域の推定	19
第2節 タンパク質のモチーフ予測と系統解析	25
第3章 <i>kpeA</i> 遺伝子破壊及び高発現による形態形成への影響.....	34
第1節 <i>kpeA</i> 高発現株及び相補株の作製	36
第2節 分生子形成への影響	46
第1項 顕微鏡観察.....	46
第2項 走査型電子顕微鏡観察	52
第3節 分生子形成関連遺伝子の発現解析	56
第4章 <i>kpeA</i> 遺伝子破壊及び高発現による二次代謝産物生産への影響.....	63
第1節 コウジ酸生産への影響	65
第1項 コウジ酸生産量の定量及び関連遺伝子の発現解析.....	65

第2項 <i>brlA</i> 及び <i>laeA</i> との関与	72
第2節 ペニシリン生産への影響	80
第3節 シクロピアゾン酸生産への影響	86
第5章 KpeA の Zn(II) ₂ -Cys ₆ モチーフの解析	93
第6章 醸造環境における形態及び物質生産への影響	100
第1節 種麴への影響	102
第2節 米麴への影響	109
第1項 米麴の観察と酵素活性	109
第2項 醸造環境における二次代謝産物生産	117
第3項 チロシナーゼ活性と褐変	124
総括	128
要約	134
参考文献	136
発表論文	154
謝辞	155

英文要旨.....	156
-----------	-----

緒論

麹菌 *Aspergillus oryzae* は日本の醸造食品に欠かせない糸状菌であり、その安全性は長きに渡る食経験が証明している。しかし、近縁種である *Aspergillus flavus* が強力なカビ毒であるアフラトキシンを生産することが報告された際には、*A. oryzae* の安全性が疑問視され、当時の日本の科学者が産学官協同で膨大な研究の末、どのような環境条件下でも *A. oryzae* がアフラトキシンを生産しないことを報告した(村上, 1986)。その後、分子生物学的な研究により遺伝子の欠損や転写抑制、生合成経路の断絶などの遺伝的要因によりアフラトキシンやアフラトレム、シクロピアゾン酸(CPA)などのカビ毒を生産しない、または弱毒化していることが証明された(Kusumoto et al., 1998; Tominaga et al., 2006; Kiyota et al., 2011; Nicholson et al., 2009; Rank et al., 2012; Tokuoka et al., 2008; Shinohara et al., 2011; Kato et al., 2011)。また、*A. oryzae* はキレート作用を持つデフェリフェリクリシン(DF)やチロシナーゼ阻害活性を持つコウジ酸(KA)、抗生物質であるペニシリン(PN)などの、カビ毒とは異なる二次代謝産物を生産する(Terabayashi et al., 2010; Marui et al., 2010; Tadenuma and Sato., 1967)。近年ではこれら二次代謝産物に関する分子生物学的な研究が精力的に行われており、特に生合成酵素についての研究は進展が著しく、KA や DF, CPA などの二次代謝産物について、合成酵素や遺伝子クラスターが同定されている(Terabayashi et al., 2010; Marui et al., 2010; Yamada et al., 2003)。一方で、二次代謝の制御については近縁種のモデル糸状菌でヒストンメチル化に関わる *LaeA* や分生子形成の鍵因子 *BrlA*、形態形成に関わる *VeA* などの制御因子が関わるということが明らかにされているものの

(Reyes-Dominguez et al., 2010; Adams et al., 1988; Lind et al., 2018; Mooney and Yager, 1990; Kato et al., 2003), その全貌は明らかにされていない。

Aspergillus 属の二次代謝制御因子は遺伝子クラスター特異的な制御因子と複数の二次代謝を制御する広域制御因子に別けられる。通常, 遺伝子クラスター特異的な制御因子は $Zn(II)_2-Cys_6$ 型であり, このタイプの制御因子はホモ二量体を形成し, 標的遺伝子のプロモーター領域に結合することで遺伝子発現を制御する(MacPherson et al., 2006)。例えば, *A. oryzae* が保持する $Zn(II)_2-Cys_6$ 型の転写制御因子であり, KA 生合成遺伝子クラスターに属する *KojR* は, 両隣の遺伝子 *kojA*, *kojT* の転写活性化因子として機能する(Marui et al., 2011)。他にもアフラトキシン生合成遺伝子クラスターに属する *AflR* やグリオトキシン生合成遺伝子クラスターに属する *GlzZ* が知られており, これらの遺伝子を破壊すると特定の二次代謝産物を生産しなくなる(Yu et al., 1996; Bok et al., 2006)。しかし, 全ての $Zn(II)_2-Cys_6$ 型制御因子が遺伝子クラスター特異的ではなく, 遺伝子クラスターに所属しない制御因子も存在する。例えば, アミラーゼ系酵素遺伝子の転写活性化因子 *AmyR* は, 第 4 染色体に存在する *glaB* や第 6 染色体に存在する *amyB*, 第 7 染色体に存在する *agdB* を制御する(Nakamura et al., 2006)。AmyR の他にも $Zn(II)_2-Cys_6$ 型制御因子としてプロテアーゼ系酵素遺伝子の転写活性化因子 *PrtT* や分生子形成の抑制因子 *SfgA* などは遺伝子クラスターに所属していない(Punt et al., 2008; Seo et al., 2006)。一方, 広域制御因子には *BrlA* や Nitrogen metabolite repression に関わる *AreA*, pH 応答に関わる *PacC* などの DNA 結合型の制御因子の他(Lind et al., 2018; Tudzynski, 2014; Keller et al., 1997), ヒス

トンのメチル化に関わる *LaeA* や *CclA*, 脱アセチル化に関わる *HdaA* などのクロマチンリモデリングを介したエピジェネティックな制御を行う因子が存在する(Reyes-Dominguez et al., 2010; Palmer et al., 2013; Lee et al., 2009)。それらが光や温度, 栄養源などの環境シグナルに応答して複数の二次代謝を制御する(Brakhage, 2013)。

LaeA と *BrlA* は *Aspergillus* 属における二次代謝制御と分化の中心的な制御因子である。*laeA* は破壊によりアフラトキシン生合成遺伝子クラスターの制御因子 *AflR* の発現が喪失する遺伝子 (loss of *aflR* expression A) として発見され, 以後の研究でロバスタチンや PN, KA など, 多くの二次代謝を制御することが明らかにされた(Bok and Keller, 2004, Oda et al., 2011)。その制御メカニズムについては *Aspergillus nidulans* や *Aspergillus fumigatus* で研究が進んでおり, *LaeA* が *VeA*, *VelB* と *Velvet* 複合体を形成し, ヒストン H3 の 9 番目の Lys 残基をメチル化することで, 二次代謝や分化を制御することが報告されている(Bayram et al., 2008; Reyes-Dominguez et al., 2010)。

一方, *BrlA* は剛毛な変異体(bristle mutant)として変異株が取得され, 後に遺伝子の同定が行われた(Clutterbuck, 1969; Johnstone et al., 1985)。*BrlA* は分生子形成のトリガーとなる制御因子であり, その遺伝子発現は複数の制御因子により複雑に制御される(Adams et al., 1998; Krijgsheld et al., 2013)。また, 近年の研究から *A. fumigatus* において gliotoxin や fumigaclavine, endocrocin など一部の二次代謝を制御することが明らかになり(Lind et al., 2018), 詳細なメカニズムは不明であるが, *BrlA* と *LaeA* によって分化と二次代謝が協調的に制御されることが予想されている。ここ数 10 年における遺伝子工学の進歩により *Aspergillus* 属糸状菌の二次代謝や分化の制御機

構の研究は日進月歩で成果を上げているが、近年の研究は、既知の制御因子の環境応答や相互作用など、それら制御因子のより詳細な機能解析が主流となり、新規の制御因子の報告は少ない。

A. oryzae における分子生物学的な研究はこの 10 数年で飛躍的に進歩した。その背景には 2005 年に *A. oryzae* の全ゲノムの解読が完了し、ゲノム情報が開示されことと(Machida et al., 2005), 2006 年, 2008 年に非相同末端結合修復系に関わる *ku70* と *ligD* の発見による遺伝子ターゲットング技術の飛躍的な発展がある(Takahashi et al., 2006; Mizutani et al., 2008)。ゲノム情報の開示と遺伝子ターゲットング技術の発展によりゲノム情報を基にした逆遺伝子的アプローチが容易になり、*A. oryzae* における遺伝子機能解析の報告は急激に増加した。また、マイクロアレイや RNA-seq などのトランスクリプトーム解析により様々な培養条件における遺伝子発現プロファイルが明らかにされ、*Aspergillus* Genome Database (<http://www.aspgd.org/>) や Comprehensive *Aspergillus oryzae* Genome Database (<https://nrif21.nrib.go.jp/CAoGD/>) から遺伝子発現プロファイルや推定アミノ酸配列が容易に入手可能になった。ゲノムデータベースが整備されたことにより、他の真菌等において機能解析された遺伝子のホモログ遺伝子を対照とした逆遺伝学的研究が増加したが、未知機能の遺伝子の解析には有効な手法とは成り得なかった。そのような状況の中、公益財団法人野田産業科学研究所を中心として産学官共同で生物系特定産業技術研究支援センターの「麹菌における染色体工学の確立と高機能性麹菌の育種」プロジェクトを遂行し、プロジェクトの一環として *A. oryzae* の転写因子遺伝子破壊株ライブラリー

が構築された。糸状菌における遺伝子破壊株ライブラリーを活用した研究は *Neurospora crassa* で報告が多く、遺伝子破壊株ライブラリーに対するスクリーニング実験が新規遺伝子の発見に有効なことが証明されている(Colot et al., 2006; Coradetti et al., 2012; Gonçalves et al., 2011; Chinnici et al., 2014; Nargang et al., 2012; Watters et al., 2018)。 *A. oryzae* においても転写因子遺伝子破壊株ライブラリーを活用した研究が行われ、これまでに破壊により分生子形成が遅れる EcdR, β -マンナーゼの制御因子 ManR が発見されてきた(Jin et al., 2011; Ogawa et al., 2012)。

そこで、本研究では新規二次代謝制御因子の発見及びその機能解析を目的に *A. oryzae* の転写因子遺伝子破壊株ライブラリーに対して二次代謝産物の生産量を指標としたスクリーニングを行った。さらに、スクリーニングにより見出した新規二次代謝制御因子 KpeA (kojic acid production enhancement A)に対して *in silico* 解析による構造予測、二次代謝及び分生子形成への関与を調べた。また、*A. oryzae* は醸造現場では穀物上に生育させる固体培養と呼ばれる特殊な培養系で使用されるため、固体培養における KpeA の役割についても解析を行った。

本研究に使用した試薬は記載がない限り、富士フイルム和光純薬株式会社製の試薬を使用
した。また、プライマーはシグマ アルドリッチ ジャパン合同会社のカスタム DNA オリゴで作製し
たプライマーを使用した。

第1章 コウジ酸生産を指標とした転写因子破壊株ライブラリーのスクリーニング

緒言

本研究では、最初に新規二次代謝制御因子の発見及びその機能解析を目的に *A. oryzae* の転写因子遺伝子破壊株ライブラリーに対して二次代謝産物の生産量を指標としたスクリーニングを試みた。指標とする二次代謝物として *A. oryzae* が生産する代表的な二次代謝産物であるコウジ酸(KA)を選択した。KA は一部の糸状菌が生産する二次代謝産物であり、チロシナーゼ阻害作用を有するため美白成分として化粧品に使用されるほか、KA やその類縁化合物が抗菌作用を示すことから添加物として製薬や農業、食品産業で利用されている(Nohynek et al., 2004; Kotani et al., 1976; Baláz et al., 1993; Saruno et al., 1979; Chen et al., 1991; Noh et al., 2009; Lee et al., 2006)。KA は 1907 年に齋藤らにより *A. oryzae* の培養物から単離され(Saito, 1907), その後、構造決定や生産条件の検討、生合成経路の探索が行われた(Yabuta, 1924; Mohamad et al., 2010; Chaudhary et al., 2014; Arnstein and Bentley, 1950;)。 *A. oryzae* のゲノム情報が公開されてからは生合成遺伝子クラスターが同定され(Terabayashi et al., 2010), KA 生産の制御因子として *LaeA* や *HstD*, *MsnA* が報告されている(Oda et al., 2011; Kawauchi et al., 2013; Chang et al., 2011)。 *LaeA* はヒストン修飾を介して KA を含む複数の二次代謝を制御し, *HstD* は *laeA* の遺伝子発現制御を介して二次代謝を制御する(Reyes-Dominguez et al., 2010; Oda et al., 2011; Kawauchi et al., 2013)。 *MsnA* は酸化ストレスに応答する DNA 結合型の制御因子であり, 破壊すると KA 生産が増加する(Chang et al., 2011)。 KA は炭素源や窒素源, 温度, pH によって生産

量が異なるため(Mohamad et al., 2010; Chaudhary et al., 2014), 現在報告されている制御因子以外に, さらに多くの制御因子が KA 生産に関わることが考えられた。上記のように KA は *A. oryzae* の代表的な二次代謝産物であり, 産業利用されている有用物質であるにも関わらず分子生物学的な知見が少ないことと, KA と鉄が形成する赤色の錯体化合物を利用した検出培地により簡易的に生産量を比較できることから(Bentley, 1957), KA をスクリーニングの指標とする二次代謝産物として選択した。

本章では KA 生産に関わる新規制御因子の選抜を目的として, *A. oryzae* の転写因子遺伝子破壊株ライブラリーを活用したスクリーニングを行った。

目的

本研究では、最初に *A. oryzae* の新規二次代謝制御因子の発見を目的に転写因子遺伝子破壊株ライブラリーに対するスクリーニングを行う。スクリーニングの指標として *A. oryzae* の代表的な二次代謝産物であるが、その制御機構に不明な点が多く、検出が簡便な KA を選択した。本実験では KA 生産に関わる制御因子の網羅的な選抜と新規二次代謝制御因子の発見を目的に KA 検出培地を用いた転写因子遺伝子破壊株ライブラリーに対するスクリーニングを行った。

方法

スクリーニング

KA 検出培地(100 g Glucose, 1 g Yeast extract, 1 g K_2HPO_4 , 0.5 g KCl, 0.5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.8 g $FeCl_3$, 20 g Agar per L) を 24 穴マイクロタイタープレート(Techno Plastic Products AG)に 2 ml 分注し、各ウェルに転写因子遺伝子破壊株ライブラリー351 株の分生子懸濁液を 2 μ l 接種し、30 °C で 14 日間培養した。対照株としてライブラリー株と遺伝的背景を揃えた E-F1 株 ($\Delta ku70::ptrA^+$, $pyrG^+$)と E-F1 AF-del 株($\Delta ku70::ptrA^+$, $pyrG^+$, $\Delta cypX-pksA$)を用いた(Ogawa et al., 2010)。KA 生産量は培地の呈色で評価した。1-5 段階で評価し、対照株である E-F1 株及び E-F1 AF-del 株の培地呈色度を 3 として呈色が濃く KA 生産量の増加した株を 4 または 5, 呈色の薄く KA 生産量の減少した株を 1 または 2 として評価した。評価は培養 7 日目及び 14 日目に

行った。また、スクリーニングは 2 回行い、顕著に KA 生産が変化し、再現性がある株を選抜した。

サザン解析

nsdD 破壊株及び *creB* 破壊株, *lreA* 破壊株, *kpeA* 破壊株, E-F1 株を YPD 液体培地(5 g yeast extract, 10 g polypeptone, 10 g glucose per L)に接種し, 30 °C の恒温器において 180 rpm で振とう培養を行い, その菌体から徳岡らの方法でゲノム DNA を抽出した(Tokuoka et al., 2008)。各株の抽出したゲノム DNA 10 µg を 20~30 U の制限酵素で消化した。制限酵素は *nsdD* 破壊株に *Pst*I, *lreA* 破壊株に *Xho*I, *creB* 破壊株と *kpeA* 破壊株に *Hind*III を使用した。制限酵素は全てタカラバイオ株式会社製のものを使用した。制限酵素で消化したゲノム DNA はアガロースゲル電気泳動し(アガロースゲル濃度: 0.8%, 電圧: 50 V, 泳動時間: 90 分, 泳動 buffer: TAE buffer), 分離した。電気泳動したゲルを臭化エチジウム溶液に 15 分浸けて染色し, トランスイルミネーターにより泳動の確認を行った。その後, Roche 社の DIG application manual に従ってトランスファーとハイブリダイゼーション, 抗体反応, 検出を行った。トランスファーはキャピラリー式で行い, Amersham HybondTM-N⁺ membrane (GE Healthcare Life Sciences)にトランスファーした。ハイブリダイゼーションはハイブリ・バック(コスモ・バイオ)と DIG Easy Hyb(Roche)を用いて行い, DIG probe 濃度が DIG Easy Hyb に対して 25 ng/ml になるようにプローブ溶液を添加し, 50 °C で一晩ハイブリさせた。抗体は Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments (Roche) を使用し, ブロッキング

試薬は Blocking Reagent (Roche)を使用した。検出試薬は CDP-Star (Roche)を用い、ChemiDoc™ Touch imaging system (BioRad)で検出した。露光は 10~20 分で行った。DIG probe は Takara Ex taq(タカラバイオ株式会社)のプロトコルにおける dNTPs を PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche)の PCR DIG labeling mix に変更し、RIB40 株のゲノムを鋳型とした PCR により作製した。本実験で使用したプライマーと PCR 条件は Table 1 に示した。

Table 1 Primers used in southern blot analysis

primers	sequences (5'-3')	experiments	conditions
kpeA_southern_rv	AATAAACGACAGGCGGGTGGTAC	Generation DIG probe of <i>kpeA</i> for Southern analysis	94 °C for 2 min, followed by 30 cycles of 98 °C for 10 s, 60 °C for 30 s and 72 °C for 90 s
kpeA_southern_fw	ATTAGGAAACGCCACCGCTAAGCA	Generation DIG probe of <i>kpeA</i> for Southern analysis	94 °C for 2 min, followed by 30 cycles of 98 °C for 10 s, 60 °C for 30 s and 72 °C for 90 s
nsdD_southern_rv	ACCCGACTTCCATGTAGTACCGT	Generation DIG probe of <i>nsdD</i> for Southern analysis	94 °C for 2 min, followed by 30 cycles of 98 °C for 10 s, 60 °C for 30 s and 72 °C for 90 s
nsdD_southern_fw	CGACTGATGGTGCATGAGGTCAA	Generation DIG probe of <i>nsdD</i> for Southern analysis	94 °C for 2 min, followed by 30 cycles of 98 °C for 10 s, 60 °C for 30 s and 72 °C for 90 s
ireA_southern_rv	GACCACCTCAGCAGGGATTTGT	Generation DIG probe of <i>ireA</i> for Southern analysis	94 °C for 2 min, followed by 30 cycles of 98 °C for 10 s, 60 °C for 30 s and 72 °C for 90 s
ireA_southern_fw	ATTGTCGGGTCTCAAAGCTGAC	Generation DIG probe of <i>ireA</i> for Southern analysis	94 °C for 2 min, followed by 30 cycles of 98 °C for 10 s, 60 °C for 30 s and 72 °C for 90 s
creB_southern_rv	GTTCTGTTCGGAGGAGGGCTTG	Generation DIG probe of <i>creB</i> for Southern analysis	94 °C for 2 min, followed by 30 cycles of 98 °C for 10 s, 60 °C for 30 s and 72 °C for 90 s
creB_southern_fw	AGCCAGAGAGAGAACCCGAAAAG	Generation DIG probe of <i>creB</i> for Southern analysis	94 °C for 2 min, followed by 30 cycles of 98 °C for 10 s, 60 °C for 30 s and 72 °C for 90 s

結果及び考察

KA 生産に関わる新規制御因子の選抜を目的に, *A. oryzae* 転写因子遺伝子破壊株ライブラリー351株に対してKAの生産量を指標としたスクリーニングを行った(Fig. 1)。その結果, 対照株と比較して KA 生産が増加した株が 15 株, KA 生産が減少した株が 18 株取得された。その後, KA 生産の再現性をスクリーニング実験と同様の方法で確認し, 最終的に生産量が顕著に増加した 2 株 (TF162 株, TF422 株)と全く KA を生産しない 2 株(TF131 株及び TF143 株)を取得した(Fig. 2)。各株の破壊遺伝子の Gene ID は TF131 株が AO090012000768 (*nsdD*), TF143 株が AO090009000320 (*creB*), TF162 株が AO090020000046 (*lreA*), TF422 株が AO090003001186 であり, 遺伝子破壊はサザン解析で確認した(Fig. 3)。Gene ID: AO090003001186 以外の 3 遺伝子は *A. oryzae* や近縁種で機能解析されており, *nsdD* は分生子形成と二次代謝, *creB* は Carbon catabolite repression, *lreA* は光応答を介して分化と二次代謝に関わることが報告されている (Table2)(Han et al., 2001; Lee et al., 2014; Lockington and Keller, 2001; Purschwitz et al., 2008; Rugar-Herreros et al., 2011)。これらの 3 遺伝子が KA 生産に関わることは初めての報告であるものの, 特徴づけされた遺伝子であったため, 本研究では機能未知である Gene ID: AO090003001186 の遺伝子に注目して機能解析を行うことにした。また, Gene ID: AO090003001186 の破壊株は KA 生産が増加したことから *kpeA* (kojic acid production enhancement A)と名付けた。



Fig. 1 KA production of a part of library strain in the screening. Conidial suspensions of library strains and control strain (E-F1) were inoculated in 2 ml of KA-detection agar medium in a 24-well microtiter plate. Strains were incubated at 30 °C for 14 days. Red color reflects the KA level in the culture medium. E-F1, E-F1 AF-del, and $\Delta kpeA$ strains are represented by a solid line box, dashed line box, and solid line circle, respectively.

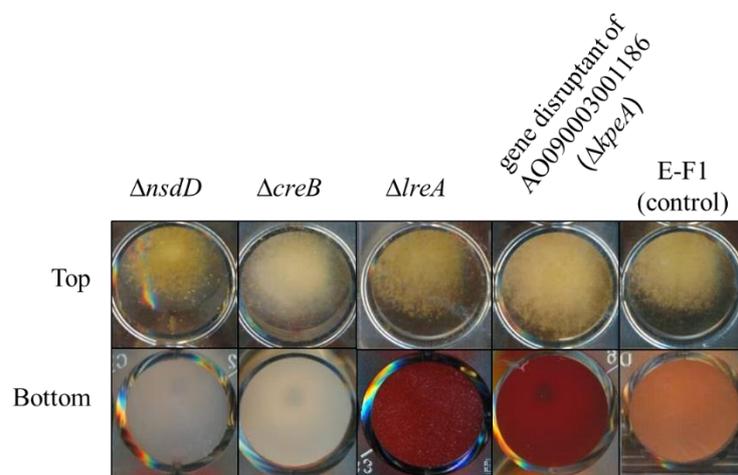


Fig. 2 Screening of regulatory genes involved in KA production from the *A. oryzae* disruption mutant library of transcriptional regulators. Conidial suspensions of library strains and control strain (E-F1) were inoculated in 2 ml of KA-detection agar medium in a 24-well microtiter plate. Strains were incubated at 30 °C for two weeks. Red color reflects the KA level in the culture medium.

Table2 Selected genes by screening from library

Disrupted gene	Gene description
<i>nsdD</i>	Repressor of asexual development ^a
<i>creB</i>	Deubiquitinating enzyme involved in carbon catabolite repression ^b
<i>lreA</i>	Regulator of development and SMs in response to light ^c
AO090003001186	unknown

a: Han et al., 2001; Lee et al., 2014

b: Lockington and Keller, 2001

c:Purschwitz et al., 2008; Rugar-Herreros et al., 2011

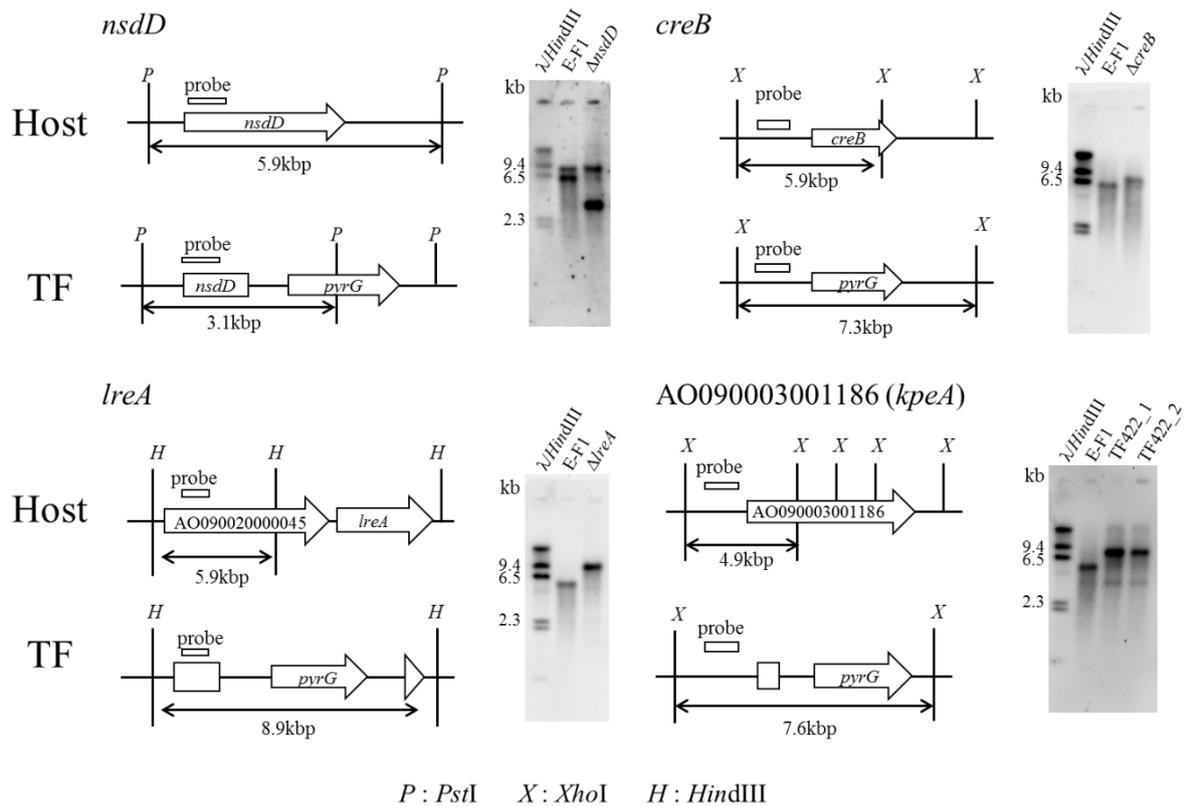


Fig. 3 Southern blot analysis of screened strains

Schematics of the restriction fragment of the host strain (Host) and gene disruption strain (TF) are shown. The approximate probe positions are shown as white bars. Three milligrams of genomic DNAs of *nsdD*, *creB*, *lreA*, and AO090003001186 strains were digested with *Pst*I, *Xho*I, *Hind*III, and *Xho*I, respectively, and loaded on an agarose gel. DNA fragments of approximately 500 bp corresponding to the promoter or ORF regions of the genes were used as probes for each gene. E-F1 strain was used as the control strain. For AO090003001186, two strains isolated independently were confirmed to contain disrupted loci.

第2章 *in silico* 解析による *kpeA* の特徴づけ

緒言

前章で *A. oryzae* の転写因子遺伝子破壊株ライブラリーに対し KA 生産量を指標としたスクリーニングを行い, KA 生産の制御に関わる 4 遺伝子 *nsdD*, *creB*, *lreA*, *kpeA* を見出した。その中の *kpeA* は新規の二次代謝制御因子であったため, 本研究では *kpeA* に注目して機能解析を行うことにした。

二次代謝の制御因子にはヒストン修飾を介したエピジェネティックな制御を行う因子と, 遺伝子のプロモーターに直接結合して転写活性を制御する DNA 結合型の因子が存在する (Brakhage, 2013)。エピジェネティックな制御を行う制御因子の直接的なターゲットがヒストンタンパク質であるのに対して, DNA 結合型の制御因子のターゲットはゲノム DNA であるため, 生体内での機能が全く異なる (Strauss and Reyes-Dominguez, 2011; MacPherson et al., 2006)。前者は Methyltransferase ドメインや Histone deacetylase ドメインなどのヒストン修飾に関わるドメインを持つ制御因子であり (Strauss and Reyes-Dominguez, 2011), 後者は Zinc finger ドメインや Basic Helix-Loop-Helix (bHLH) ドメイン, Basic Leucine Zipper (bZIP) ドメインなどの DNA 結合型のドメインを持つ (Kobayashi et al., 2007)。これらのドメインやモチーフを予測することで, KpeA がどのようなタイプの制御因子であるかを推定できる。そこで, 本章では *kpeA* の転写領域を cDNA のシーケンス解析により決定し, その塩基配列から予測されるアミノ酸配列をクエリとして *in silico* 解析を行い, KpeA がどのような転写制御因子であるかを調べた。

第 1 節 *kpeA* の転写領域の推定

目的

Aspergillus Genome Database (<http://www.aspgd.org/>)において、*kpeA* は 3 つのイントロンを含む 2461 bp の ORF を有し、762 a.a のタンパク質をコードすることが推定されているが、転写領域やイントロンは RNA-seq 解析の結果からの推定であった。タンパク質の機能推定には *kpeA* の転写産物の正確な情報が必要であるため、本実験では *kpeA* の転写領域及び転写産物の配列を明らかにすることを目的として、cDNA のシーケンス解析及び 5'-RACE 解析、3'-RACE 解析を行った。

方法

total RNA 抽出と cDNA のシーケンス解析

total RNA は、ISOGEN (Nippon Gene) を使用して、プロトコルに従って抽出した。DNase (RT Grade, Nippon Gene) で処理した後、oligo(dT)プライマーを使用して、SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen) で逆転写を行った。*kpeA* の 5' および 3' 非翻訳領域 (UTR) を含む cDNA の全長を KOD plus neo (東洋紡績株式会社) を使用して、PCR により増幅した。増幅した PCR 産物は In-Fusion クローニングキット (Takara Bio USA) を使用して、線形化 pUC19 ベクター (Invitrogen) に挿入した。その後、作製したプラスミドを鋳型として cDNA シーケンス解析を行

った。シーケンス解析は株式会社ファスマックの DNA シーケンス解析に依頼した。本実験で使用したプライマーと PCR 条件は Table3 に示した。

5'-RACE 及び 3'-RACE 解析

5'-RACE 及び 3'-RACE 解析に使用する total RNA は cDNA のシーケンス解析と同じ試料を用いた。5'-RACE 解析には 5' Full RACE Core Set(Takara Bio)を使用し, 5'末端リン酸化プライマー kpeA_RT_rv で逆転写した cDNA を試料として, プロトコルに従って行った。3'-RACE 解析では, プライマー GeneRacer3dT で逆転写した cDNA を鋳型として, 1st PCR 及び Nested PCR を行った。PCR 産物を TA クローニングにより TOPO ベクター(Invitrogen)に挿入し, 作製したプラスミドを鋳型としてシーケンス解析を行った。シーケンス解析は株式会社ファスマックの DNA シーケンス解析に依頼した。本実験で使用したプライマーと PCR 条件は Table3 に示した。

Table 3 Primers used in cDNA sequences, 5'-RACE, and 3'-RACE analyses

primers	sequences (5'-3')	experiments	conditions ^a
kpeA_159_fw	ACCACCCCGCTGCTGTTTATTT	Amplification of cDNA region of <i>kpeA</i>	94 °C for 2 min, followed by 30 cycles of 98 °C for 10 s, 58 °C for 30 s and 68 °C for 150 s
kpeA_3388_rv	TGACTTGGCTCTGGCTTCAAGG	Amplification of cDNA region of <i>kpeA</i>	94 °C for 2 min, followed by 30 cycles of 98 °C for 10 s, 58 °C for 30 s and 68 °C for 150 s
pUC19_kpeA3388_fw	GCCAGAGCCAAAGTCATCCTGGCCGTCGTTTTACA	Linearization of pUC19 in cDNA sequence	94 °C for 2 min, followed by 30 cycles of 98 °C for 10 s, 55 °C for 30 s and 68 °C for 150 s
pUC19_kpeA_rv	CGACAGCCGGTGGTCTCGGGTGCCTAATGAGTG	Linearization of pUC19 in cDNA sequence	94 °C for 2 min, followed by 30 cycles of 98 °C for 10 s, 55 °C for 30 s and 68 °C for 150 s
kpeA_540_rv	CATTAAATCAGATTGCAGAT	Sequence analysis of cDNA region of <i>kpeA</i>	
kpeA_26_fw	TTTATTTTTTGTGATGAATTT	Sequence analysis of cDNA region of <i>kpeA</i>	
kpeA_601_fw	CAGAACGTAATAGACAGCAG	Sequence analysis of cDNA region of <i>kpeA</i>	
kpeA_1308_fw	CATTGACATTAAAGGAGATTG	Sequence analysis of cDNA region of <i>kpeA</i>	
kpeA_1969_fw	CTGTATTCCAGCGTATACAG	Sequence analysis of cDNA region of <i>kpeA</i>	
kpeA_2678_fw	TTTCTCCGACAGTATTATAA	Sequence analysis of cDNA region of <i>kpeA</i>	
kpeA_RT_rv	GATTGGGATCCTGAG	RT in 5'-RACE analysis	
kpeA_S1_fw	TTCCCTCTCCCTTGGTAC	First PCR in 5'-RACE analysis	94 °C for 2 min, followed by 30 cycles of 98 °C for 10 s, 60 °C for 30 s and 68 °C for 30 s
kpeA_A1_rv	TGAGCAGAAAGCCCAAGAATC	First PCR in 5'-RACE analysis	94 °C for 2 min, followed by 30 cycles of 98 °C for 10 s, 60 °C for 30 s and 68 °C for 30 s
kpeA_S2_fw	GTCGATATTTCCAAAGCAGG	Nested PCR in 5'-RACE analysis	94 °C for 2 min, followed by 30 cycles of 98 °C for 10 s, 60 °C for 30 s and 68 °C for 30 s
kpeA_A2_rv	GAGGATGATAGGATGAGGCC	Nested PCR in 5'-RACE analysis	94 °C for 2 min, followed by 30 cycles of 98 °C for 10 s, 60 °C for 30 s and 68 °C for 30 s
pUC19_kpeA5_fw	CATCCTATCATCCTCTGGCGAATGGCCGCTGATGC	Linearization of pUC19 in 5'-RACE analysis	94 °C for 2 min, followed by 30 cycles of 98 °C for 10 s and 68 °C for 150 s
pUC19_kpeA5_rv	GTTGGAAATATCGACTTCAAGCTGCCCAACTGTTG	Linearization of pUC19 in 5'-RACE analysis	94 °C for 2 min, followed by 30 cycles of 98 °C for 10 s and 68 °C for 150 s
kpeA_seq5_fw	GTA TGTGTGTGGAAATTGTG	Sequence analysis in 5'-RACE analysis	
GeneRacer3dR	GCTGTCAACGATACGCTACGTAAACGGCATGACAGTGTTT TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	RT in 3'-RACE analysis	
kpeA_gene3_fw	TCCAGCAGCAAACGATGAGC	First PCR in 3'-RACE analysis	94 °C for 2 min, followed by 30 cycles of 98 °C for 10 s, 60 °C for 30 s and 68 °C for 30 s
GeneRacer3	GCTGTCAACGATACGCTACGTAACG	First PCR in 3'-RACE analysis	94 °C for 2 min, followed by 30 cycles of 98 °C for 10 s, 60 °C for 30 s and 68 °C for 30 s
kpeA_gene3nested_fw	GCAACCGAGTTGCCGACGTA	Nested PCR in 3'-RACE analysis	94 °C for 2 min, followed by 30 cycles of 98 °C for 10 s, 60 °C for 30 s and 72 °C for 90 s
GeneRacer3Nested	CGCTACGTAACGGCATGACAGTG	Nested PCR in 3'-RACE analysis	94 °C for 2 min, followed by 30 cycles of 98 °C for 10 s, 60 °C for 30 s and 72 °C for 90 s
kpeA3_seq300_fw	CCGTTGATTTATCTTGATTA	Sequence analysis in 3'-RACE analysis	

^a Conditions for sequence analysis were not described.

結果

kpeA の転写領域の決定を目的に *A. oryzae* RIB40 株の total RNA を逆転写して作製した cDNA を試料としてシーケンス解析と 5'-及び 3'-RACE 解析を行った。シーケンス解析の結果とデータベースで予測されている *kpeA* の転写領域の配列を比較した結果, *kpeA* の ORF の配列はデータベースの情報と一致し, ORF 内に 3 つのイントロン(64 bp 及び 54 bp, 54 bp)が予測された(Fig. 4)。また, データベース上で予測されていた 3'UTR 内にある 11 塩基のチミン残基の連続配列が実際は 1 塩基多く, 12 塩基の連続配列であった(Fig. 4)。5'-RACE 解析及び 3'-RACE 解析から, 翻訳開始点の 251 bp 上流に転写開始点があり, 3,182 bp 下流に polyA 付加部位があることが示され, データベースの予測よりも *kpeA* の 5'UTR は 25 bp 短く, 3'UTR は 79 bp 短かった(Fig. 4)。また, 5'UTR 内には同じフレームに乗る 3 つの開始コドンがあり, *KpeA* をコードする ORF の上流-15~-13 bp の終止コドン(TAG)とフレームが一致したことから, *kpeA* の 5'UTR には 3 つの upstream ORF(uORF; -249~-13 bp 及び-240~-13 bp, -63~-13 bp)があることが分かった(Fig. 4)。これらの結果から *kpeA* は 3 つのイントロンを含む 2,461 bp の ORF を有し, 761 a.a からなる質量 85.5 kDa のタンパク質をコードすると推定された。

考察

kpeA の 3 つのイントロンはそれぞれ 64 bp 及び 54 bp, 54 bp であり(Fig. 4), *A. oryzae* の一般的なイントロンの長さである約 50 bp と同程度の長さであった。*kpeA* の 5'UTR と 3'UTR の長さは

それぞれ 251 bp と 721 bp であったが(Fig. 4), *A. oryzae* の遺伝子の 5'UTR と 3'UTR の長さはそれぞれ 107 bp と 156 bp が中央値であり, DNA 結合型タンパク質に限っても 5'UTR と 3'UTR の長さはそれぞれ約 100 bp と約 200 bp 程度であるため(Wang et al., 2010), *kpeA* は *A. oryzae* の遺伝子の中でも両 UTR が長い遺伝子であることがわかった。

kpeA の 5'UTR 内には 237 bp 及び 228 bp, 51 bp の 3 つの uORF があり, 全て開始コドンは異なるが, 終止コドンは共通であった(Fig. 4)。uORF は *Aspergillus* 属における分生子形成の制御因子遺伝子 *brlA* と *stuA* で見出されており(Miller et al., 1992; Prade and Timberlake, 1993), 詳細なメカニズムは不明であるが *brlA* の uORF は *brlAβ* の発現を抑制することが示されているため(Han et al., 1993), *kpeA* も uORF による転写後制御を受ける可能性が考えられた。ゲノムデータベースを参考に *A. nidulans* 及び *A. fumigatus*, *A. niger* における *kpeA* のホモログ遺伝子の 5'UTR 配列を調べると, *A. oryzae* と同様に uORF が存在した。uORF の存在が *kpeA* の 5'UTR が長いことの理由だと考えられるが, *A. oryzae* が uORF を 3 つ持つのに対し, 上記の 3 菌種は uORF を 1 つ持つのみであったことから, *A. oryzae* と上記の 3 菌種では転写後制御が異なる可能性がある。*kpeA* の uORF の開始コドンを欠失させた場合のタンパク質発現などを調べることで, *kpeA* の転写後制御のメカニズムが明らかになると考えられる。

第2節 タンパク質のモチーフ予測と系統解析

目的

転写制御因子には、ゲノム DNA に直接結合する DNA 結合型制御因子とヒストン修飾を介して広く代謝を制御する広域制御因子があり(Brakhage et al., 2013), それらはドメインやモチーフにより分類される。DNA 結合型の制御因子には bHLH 型や bZIP 型, Zinc finger 型などの分類があり, その中でも Zn イオンを包括したモチーフが分類される Zinc finger 型は真菌の転写制御因子における大きなファミリーとして知られている(Kobayashi et al., 2007; MacPherson et al., 2006)。Zinc finger 型には CreA, BrlA, FlbC などで知られる C₂H₂ 型や, AreA, NsdD, SreA などで知られる GATA 型(Cys₄ 型), AmyR, AflR, Gal4p などで知られる Zn(II)₂-Cys₆ 型がある(Kobayashi et al., 2007)。C₂H₂ 型は原核生物から真核生物まで広く保存されている転写因子で *A. oryzae* の 64 遺伝子が C₂H₂ 型と推定され, GATA 型は真核生物のみに保存された転写因子で *A. oryzae* の 6 遺伝子が GATA 型と推定されている(Kobayashi et al., 2007)。また, Zn(II)₂-Cys₆ 型は真菌特有であり, *Saccharomyces cerevisiae* では 53 遺伝子, *Neurospora crassa* では 77 遺伝子が推定されているが, *A. oryzae* では 187 遺伝子が Zn(II)₂-Cys₆ 型と推定されており, 他菌種と比較しても非常に多い(Kobayashi et al., 2007)。それぞれの転写因子により結合サイトのコンセンサス配列や複合体形成が異なるため, タンパク質のドメイン・モチーフの予測は KpeA の生体内での機能推定に役立つ。そこで, KpeA がどのようなタイプの転写因子であるか明らかにすることを目的に, 前節で明らかにした KpeA の ORF からアミノ酸配列を

予測し、そのアミノ酸配列をクエリとして *in silico* 解析によるモチーフと高次構造の予測を行った。

方法

cDNA 配列から予測した KpeA のアミノ酸配列をクエリとしてモチーフを予測した。モチーフ検索及び保存性の検討には Pfam (<https://pfam.xfam.org/>) 及び NCBI の BLASTp 解析 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) を使用した。coiled-coil の予測には EMBOSS の PEPCOIL (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/pepcoil>) を使用し、Middle homology region(MHR)は典型的な Zn(II)₂-Cys₆ 型制御因子の MHR 配列と KpeA のアミノ酸配列全長をアライメントすることで予測した。Multiple Sequence Alignment 及び系統樹は DDBJ の ClustalW (<https://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/>) で作製し、Molecular Evolutionary Genetics Analysis software(MEGA5; <https://www.megasoftware.net/>) で出力した。系統解析には Kobayashi らの review(Kobayashi et al., 2007)を参考に *Aspergillus* 属の主要な Zn(II)₂-Cys₆ 型転写制御因子を選抜し、用いた。系統解析に用いたアミノ酸配列は *Aspergillus* Genome Database(AspGD)から取得し、系統解析に用いた Zn(II)₂-Cys₆ 型転写制御因子の *A. nidulans* または *A. fumigatus* におけるホモログは AspGD 及びその BLAST 解析から推定した。Multiple Sequence Alignment のアルゴリズムは neighbor-joining 法を採用し、bootstrap 値は 1000 とした。

結果

前節で決定した *kpeA* の cDNA 配列を基に予測したアミノ酸配列をクエリとして Pfam 及び BLASTp 解析よりモチーフを予測したところ、DNA 結合型転写因子のモチーフである Zn(II)₂-Cys₆ モチーフが 365~411 a.a に予測された(Fig. 5, Table4)。通常、Zn(II)₂-Cys₆ 型転写因子は DNA 結合モチーフを N 末端側に持つが(Todd and Andrianopoulos, 1997), KpeA はアミノ酸配列の中央に持っていた(Table4)。既知の Zn(II)₂-Cys₆ 型転写因子のアミノ酸配列とアラignmentしたところ、KpeA には Zn(II)₂-Cys₆ モチーフの特徴的な配列である 6 個の Cys 残基が保存されていた。Zn(II)₂-Cys₆ モチーフは一般的に CX₂CX₆CX₅₋₁₂CX₂CX₆₋₉C のアミノ酸配列だとされており(MacPherson et al., 2006), KpeA は 1 番目から 5 番目の Cys 残基まではこの配列パターンと一致するが、5 番目と 6 番目の Cys 残基の間に 11 残基のアミノ酸があり、一般的な Zn(II)₂-Cys₆ モチーフに比べ 5 番目と 6 番目の Cys 残基の間が長かった(Fig. 5)。KpeA が DNA 結合モチーフをアミノ酸配列の中央に持つことから、N 末端や C 末端に他の機能性ドメインがあることが予想されたが、Pfam や BLAST 解析の結果から他のモチーフは推定されなかった。

Zn(II)₂-Cys₆ 型制御因子は DNA 結合モチーフ以外に coiled-coil 構造からなる二量体化ドメインや標的遺伝子の転写活性に関わる Meddle homology region (MHR)を持つことが知られているため(Schjerling and Holmberg, 1996), それらの予測を行った。EMBOSS の pepcoil により coiled-coil の予測を行ったところ、通常 Zn(II)₂-Cys₆ モチーフの下流 5~41 a.a に保存されている coiled-coil 構造が(Schjerling and Holmberg, 1996), Zn(II)₂-Cys₆ モチーフの上流 28~42 a.a の

領域に予測された(Table4)。一方で、MHR は予測ソフトがないため、Schjerling らの論文を参考に典型的な MHR 配列を抽出し(Schjerling and Holmberg, 1996), KpeA のアミノ酸配列全長とアライメントを行ったが、KpeA から MHR を見出すことはできなかった。

小林らの review(Kobayashi et al., 2007)を参考に 20 個の典型的な Zn(II)₂-Cys₆型制御因子を抽出し、*A. oryzae* 及び *A. nidulans*, *A. fumigatus* の KpeA と他の Zn(II)₂-Cys₆型制御因子のアミノ酸配列全長をクエリとして系統樹を作製した。KpeA と AlcR を含むクレードが他の 18 個の転写因子と異なるグループに分類され、系統解析からも KpeA が特徴的な構造であることが示唆された(Fig. 6)。

また、BLASTp 解析により KpeA の保存性を調べたところ、*Aspergillus* 属を含む *Eurotiomycetes* や *Dothideomycetes*, *Leotiomycetes*, *Sordariomycetes* といった *Pezizomycotina* の一部の綱に保存されていたことから、一部の糸状菌に特有の制御因子であることが推察された。

考察

Chan らは *A. flavus* と *A. nidulans* の Zn(II)₂-Cys₆モチーフを合わせた 270 以上の Zn(II)₂-Cys₆モチーフにおける Cys 残基間のアミノ酸残基数を調べており、その 70%以上が CX₂CX₆CX₆CX₂CX₆C または CX₂CX₆CX₅CX₂CX₆C の配列パターンであると報告している(Chang and Ehrlich, 2013)。KpeA は CX₂CX₆CX₅CX₂CX₁₁C であり、この配列パターンは Chan らの報告の中にもあるが、*A. nidulans* と *A. flavus* においてそれぞれ 1 つだけであった(Chang and

Ehrlich, 2013)。このことから KpeA は Zn(II)₂-Cys₆モチーフの位置だけではなく、モチーフ構造も特徴的であることが分かった。Zn(II)₂-Cys₆型制御因子の DNA 結合配列は CGG-N_x-CCG とされており(MacPherson et al., 2006), KpeA は 5 個目と 6 個目の Cys 残基間が長いが、2 個目と 3 個目の Cys 残基間の Arg/Lys リッチ領域や 4 個目の Cys 残基直前の Pro 残基など一般的な Zn(II)₂-Cys₆モチーフの特徴を持つことから(Fig. 5), KpeA の結合配列も CGGトリプレット配列であると考えられた。

Zn(II)₂-Cys₆モチーフは真菌に広く保存された DNA 結合型制御因子のモチーフであり、現在報告されているほぼ全ての Zn(II)₂-Cys₆型制御因子がアミノ酸配列の N 末端に Zn(II)₂-Cys₆モチーフを持つ(Todd and Andrianopoulos, 1997)。例外として *S. cerevisiae* の UME6p と *Candida albicans* の CZF1p がアミノ酸配列の C 末端に(Todd and Andrianopoulos, 1997), *A. nidulans* の SonC がアミノ酸配列中央に Zn(II)₂-Cys₆モチーフを持つ(Lerson et al., 2014)。 *A. oryzae* が持つ 186 個の Zn(II)₂-Cys₆型制御因子のモチーフ位置を Pfam により確認した結果, KpeA と同様にアミノ酸配列の中央に Zn(II)₂-Cys₆モチーフを持つ遺伝子は *sonC* のホモログ遺伝子である Gene ID AO090038000379 の遺伝子と、特徴づけのされていない Gene ID AO090138000086, AO090003001574 の 3 遺伝子だけであった。SonC は細胞周期の制御に関わるタンパク質リン酸化酵素 NimA の転写抑制因子であるが(Lerson et al., 2014), アミノ酸配列中央に存在する DNA 結合モチーフの解析はされておらず、機能を保持しているかは不明であった。

Zn(II)₂-Cys₆ 型制御因子のほとんどがホモ二量体で機能するが、一部の Zn(II)₂-Cys₆ 型転写因子は単量体や他のタンパク質との複合体で機能する(MacPherson et al., 2006)。Zn(II)₂-Cys₆ 型制御因子の二量体化には短い coiled-coil 構造からなる二量体化ドメインが関わり、KpeA のアミノ酸配列からも coiled-coil 構造が予測されたため(Table 4), KpeA もホモ二量体で機能することが予想された。しかし、通常 Zn(II)₂-Cys₆ モチーフ直後の下流にある二量体化ドメインが(Schjerling and Holmberg, 1996), モチーフ直前の上流に予測されたことから、典型的な Zn(II)₂-Cys₆ 型転写因子のホモ二量体とは異なる構造をしていることが考えられた。Zn(II)₂-Cys₆ 型制御因子は標的遺伝子の転写活性に関わる MHR と呼ばれるドメインが存在するが(Schjerling and Holmberg, 1996), KpeA に MHR と考えられる領域は見出されなかった。Schjerlingらは50個の Zn(II)₂-Cys₆ 型制御因子をアライメントしたが、MHRと考えられる領域100 a.a で33%以上の保存率であったアミノ酸残基は20 a.a 程度であるため、MHR は高度に保存されたドメインではないことが分かっている(Schjerling and Holmberg, 1996)。正確なコンセンサス配列が明らかでないため本実験で行った MHR の予測が不完全であることが考えられ、アミノ酸配列の欠失解析などによる転写活性に関わるドメインの探索が必要である。

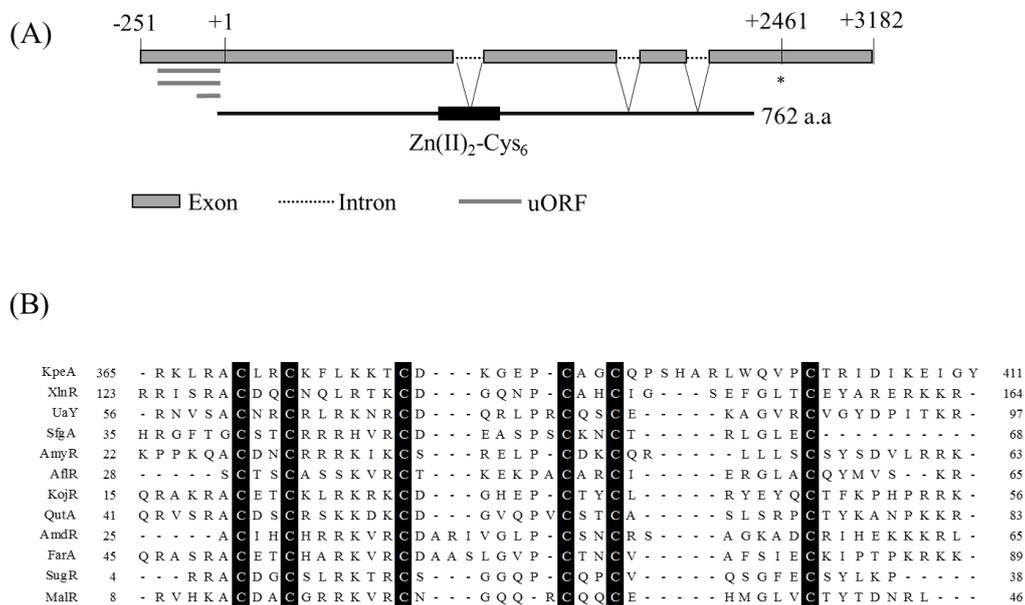


Fig. 5 Structure of *kpeA* and $Zn(II)_2-Cys_6$ motif.

(A) Schematic diagram of the gene model of *kpeA*. The number indicates the distance from the residue of the predicted translational initiation codon, ATG. Asterisk indicates stop codon. Exon, intron, and uORF are shown as grey bar, dashed line, and grey solid line, respectively. The predicted $Zn(II)_2-Cys_6$ motif is shown as a black bar. (B) Amino acid sequence alignment of the $Zn(II)_2-Cys_6$ motif region of KpeA and 11 representative transcriptional factors in *A. oryzae*. Amino acid sequences of each gene were obtained from a database. Pfam was used to predict the $Zn(II)_2-Cys_6$ motif region, and ClustalW was used for alignment. Outlined character in the alignment indicates Cys residue in the $Zn(II)_2-Cys_6$ motif.

Table4 Zn(II)₂-Cys₆ type transcriptional regulators in *A. oryzae*

Name (gene ID)	Zn(II) ₂ -Cys ₆ region ^a	coiled-coil region ^{a,b}	Middle homology region ^{a,b}	full length
KpeA	365-411	323-337	N	762
SugR	4-38	52-66	114-286	506
AlcR	5-64	N	N	826
MalR	8-46	103-122	86-385	465
KojR	15-56	136-150	134-493	555
FacB	18-60	65-101	202-596	863
AmyR	22-63	241-256	157-355	604
AmdR	25-65	163-183	245-618	775
AflR	28-65	N	N	444
RosA	34-72	94-118	262-686	686
SfgA	35-68	N	166-574	575
FarB	38-82	N	227-661	873
QutA	41-83	145-159	273-590	971
Pro1	45-83	N	260-689	689
FarA	45-89	217-225	231-626	909
UaY	56-97	182-199	296-790	1053
Mut3	61-102	108-127	269-687	1046
Otam	62-106	108-123	273-601	711
ArcA	90-124	N	N	705
XlnR	123-164	158-173	412-751	971
AO090003001574 ^c	315-353	536-550	N	754
AO090038000379 ^c	323-361	494-507	N	726
AO090138000086 ^c	614-650	655-672	774-1196	1392

^a Numbers represent the amino acid positions in each protein.

^b N : not predicted.

^c These genes encode proteins harbouring Zn(II)₂-Cys₆ motif at the middle of the sequence.

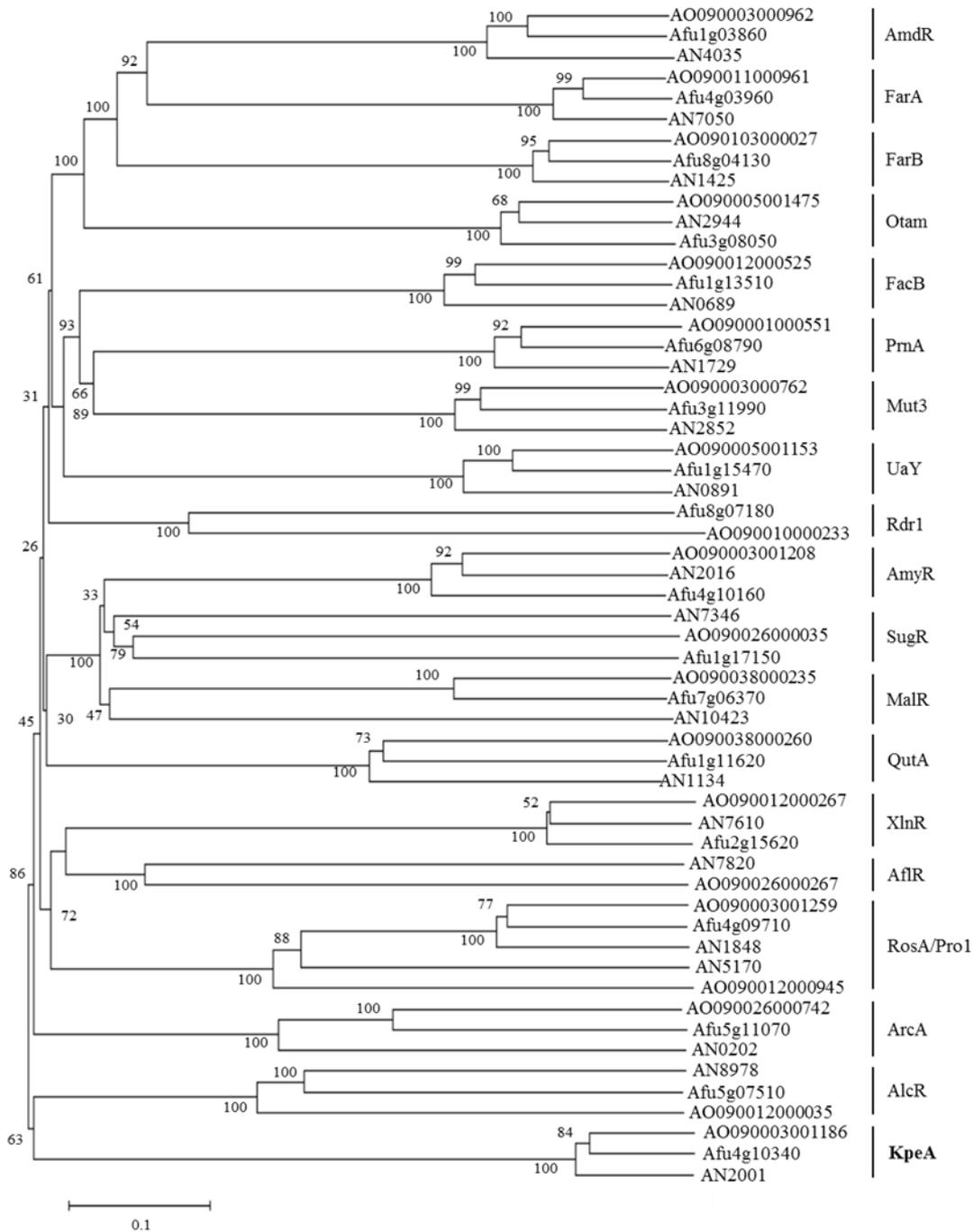


Fig. 6 Phylogenetic analysis of KpeA and other Zn(II)₂-Cys₆-type proteins in *A. oryzae*, *A. nidulans*, and *A. fumigatus*.

Representative Zn(II)₂-Cys₆-type proteins in *A. oryzae* were selected from a previous report (Kobayashi et al., 2007), and their homologues in *A. nidulans* and *A. fumigatus* were extracted from a database (AspGD). The phylogenetic tree was generated using BLOSUM matrix with the NJ distance-based method. The MEGA5 software was used to display the phylogenetic tree. Bootstrap values are shown adjacent to each internal node, representing the percentage of 1000 bootstrap replicates. Identifiers correspond to the ID of each gene in the database.

第3章 *kpeA* 遺伝子破壊及び高発現による形態形成への影響

緒言

LaeA や VeA, BrlA などの一部の二次代謝の制御因子は、分生子形成や有性生殖の制御にも関わるため(Adams et al., 1988; Lind et al., 2018; Mooney and Yager, 1990; Kato et al., 2003), *kpeA* も分生子形成の制御に関わることが予想された。分生子形成の制御系は *A. oryzae* の近縁種である *A. nidulans* において盛んに研究されており, BrlA を中心とした制御モデルが提唱されている(Adams et al., 1998; Krijgsheld et al., 2013)。BrlA は分生子形成の鍵因子であり, 破壊すると分生子を形成しなくなる(Adams et al., 1988)。BrlA の遺伝子発現は分生子形成のトリガーとなるため, その発現に関わる制御因子は注目されており, これまでの研究から *brlA* のプロモーターに直接結合する転写活性化因子 FlbB, FlbC, FlbD や抑制因子 NsdD, VosA が報告されている(Garzia et al., 2009; Known et al., 2010; Lee et al., 2016; Ahmad et al., 2013)。*flbB*, *flbC*, *flbD* の破壊株は BrlA の遺伝子発現が減少し, それに伴い分生子数が減少する(Garzia et al., 2009; Known et al., 2010; Ogawa et al., 2010)。*nsdD* と *vosA* の破壊株は遺伝子発現抑制が解除されることで *brlA* が常に遺伝子発現し, 通常では分生子を形成しない液中においても分生子を形成する(Lee et al., 2016)。以上のように *brlA* の遺伝子発現のタイミングと発現量は分生子形成に深く関わる。また, 分生子形成に関わる制御因子には, *stuA* や *medA* の様に破壊すると異常な形態を示す遺伝子も報告されている(Adams et al., 1998)。

二次代謝と分化は協調的な制御を受けるとされており, 実際に両者の制御に関わる制御因子

が見出されている。第 1 章でコウジ酸生産の新規制御因子としてスクリーニングされた KpeA が二次代謝のみでなく分生子形成にも関わることが予想されたため、本章では KpeA と分生子形成の関与について調べた。まず始めに、遺伝子機能解析において一般的な解析となっている遺伝子破壊株と高発現株の比較解析のために *kpeA* 高発現株を作製した。また、*kpeA* 破壊株に対する相補試験のために *kpeA* 相補株を作製した。次に、平板培養における各株の分生子や頂の観察を行い、最後に *brlA* と *abaA*, *wetA* の遺伝子発現量について調べた。

第 1 節 *kpeA* 高発現株及び相補株の作製

目的

本研究では *kpeA* を破壊または高発現した株の形質を比較することで、*kpeA* の機能解析を試みる。本節では *kpeA* 高発現株と、*kpeA* 破壊株が示す表現形が自然変異ではなく遺伝子破壊の影響であることを確認するための相補株を作製する。

方法

kpeA 高発現用プラスミドの作製

宿主とした E-F1 *pyrG* 株は *ku70* が破壊されているため相同組み換えによる形質転換を行う必要がある(Takahashi et al., 2008)。そこで、*kpeA* のプロモーター領域と ORF の間に選択マーカーである *pyrG* と高発現プロモーター配列を挿入したフラグメントを作製し、そのフラグメントを用いた形質転換を行い、高発現プロモーター下で *kpeA* が発現する *kpeA* 高発現株を作製することとした。高発現プロモーターは *Ptefl* を採用した。pNGAG1(東北大学 五味勝也教授より分譲)を鋳型として PCR により線状化ベクターを作製し、ゲノム PCR により取得した *kpeA* の ORF 上流 1.5kbp から下流 1.0kbp までの配列を In-Fusion クローニングキット(TaKaRa)により線状化ベクターに導入して pN186 を作製した。次に pN186 を鋳型に PCR し、pN186 の *kpeA* プロモーター領域と ORF を開裂させた線状化ベクターを作製し、ゲノム PCR により取得した *pyrG* 配列を In-Fusion クローニングキットにより線状化 pN186 に挿入し、pNPK を取得した。さらに、PCR によ

り pNPK の *pyrG* 領域と *kpeA* の ORF を開裂させた線状化ベクターを作製し、ゲノム PCR により取得した *Ptefl* 1.0 kbp の配列を In-Fusion クローニングキットにより線状化 pNPK に挿入して pNPTK を取得した。本実験で使用したプライマーと PCR 条件は Table5 に示した。

kpeA 高発現株の作製

pNPTK を鋳型とした PCR から *kpeA* 高発現フラグメントを取得し、E-F1 *pyrG*⁻ 株にプロトプラスト PEG 法で DNA フラグメントを導入し、形質転換を行った。ウリジンを添加した YPD 液体培地(5 g yeast extract, 10 g polypeptone, 10 g glucose, 3.7 g uridine per L)で E-F1 *pyrG*⁻ 株を 24 時間振とう培養し、その菌体をミラクロースにより回収し、滅菌水で洗浄、脱水した。0.1 g の Yatalase (TaKaRa)と 0.05 g の Cellulase (Yakult)をプロトプラスト化 buffer(0.8 M NaCl, 10 mM リン酸ナトリウム, pH 6.0)に溶解してプロトプラスト化酵素液を作製し、脱水した菌体を浸してプロトプラスト化した。プロトプラスト化は 30 °C で 3 時間ゆっくりと攪拌し行った。プロトプラストをミラクロースによりろ過し、低速遠心により回収した後、0.8 M NaCl 溶液で洗浄した。さらに低速遠心により回収したプロトプラストに solA(0.6 M KCl, 10m M CaCl₂, 10 mM Tris-HCl, ph 8.0)と solB (40% PEG4000, 50 mM CaCl₂•2H₂O, 50 mM Tris-HCl)を加えてよく混合した後、50 ml 容ファルコンチューブに 0.2 ml ずつ分注し、2 µg の *Ptefl* の高発現用フラグメントをそれぞれ添加し、氷中で 30 分静置した。その後、solB を 1 ml 添加しさらに室温で 20 分静置した後に軟寒天培地(30 g Glucose, 46.5 g NaCl, 3.0 g NaNO₃, 1.0 g K₂HPO₄, 0.5 g MgSO₄•7H₂O, 0.5 g KCl, 0.01 g

FeSO₄·5H₂O, 7 g Agar, per L)と混合し、シャーレに展開した。培養は 30 °C で行い、得られた形質転換体候補株は YPD 液体培地(5 g yeast extract, 10 g polypeptone, 10 g glucose per L)で振とう培養し、その菌体からゲノムを抽出し、PCR により高発現フラグメントの導入を確認した。本実験で使用したプライマー配列と PCR 条件は Table5 に示した。

total RNA の抽出

E-F1 株と *kpeA* 高発現株を KA 生産培地(100 g glucose, 1 g yeast extract, 1 g K₂HPO₄, 0.5 g KCl, 0.5 g MgSO₄·7H₂O per L)において 30 °C で 10 日間液体表面培養した。各株の菌体を回収し、第 2 章第 1 節と同様の方法で total RNA を抽出した。

ノーザン解析

E-F1 株と *kpeA* 高発現株の total RNA 20 µg をホルムアルデヒド変性アガロースゲル電気泳動により分離した。泳動に供した試料は、前処理として 65 °C で 15 分加熱した後に急冷した。泳動は MOPS buffer (0.01 M MOPS, 5 mM 酢酸ナトリウム, 1 mM EDTA)を用い、50 V で 90 分間行った。泳動が終了したゲルをエチブロ-NaOH(1 mg/ml 臭化エチジウム, 50 mM NaOH)に浸して染色し、中和脱色液(0.2 M 酢酸ナトリウム, pH 4.0)による脱色を 2 回繰り返した後、20× SSC buffer(3 M NaCl, 0.3 M クエン酸ナトリウム, pH 7.0)に 2 回浸した。イルミネーターにより UV を照射し、RNA が分解していないことを確認した。

トランスファー及びハイブリダイゼーション, 抗体反応, 検出は第 1 章のサザン解析と同様に行った。また, DIG probe は DIG probe は Takara Ex taq(タカラバイオ株式会社)の protocols における dNTPs を PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche)の PCR DIG labeling mix に変更し, RIB40 株のゲノムを鋳型とした PCR により作製した。本実験で使用したプライマーと PCR 条件は Table1 に示した。

kpeA 相補用プラスミドの作製

kpeA の ORF および近傍領域を含むゲノム領域を RIB40 株のゲノム DNA を鋳型とした PCR で増幅した。In-Fusion クローニングキットを使用して, PCR フラグメントを直線化 pUC19 ベクターに挿入し, プラスミド pkpeA を作製した。pUC19 の線状化は PCR により行った。*kpeA* の開始コドンから+1790 (GGA)と+ 1793 (CTT), +1796 (CTT) のコドンを, それぞれ同義語コドン GGT, TTG および TTG に置換し, pkpeAed を作製した。コドンの置換は PCR およびセルフライゲーションにより行った。本実験で使用したプライマーと PCR 条件は Table5 に示した。

kpeA 相補株の作製

pkpeAed を鋳型とした PCR から形質転換用の PCR フラグメントを取得した。形質転換は上記の方法で行い, 宿主として *kpeA* 破壊株を使用し, 選択培地としてウリジンと 5-フルオロオロチン酸(5FOA)を添加した CD 軟寒天培地(30 g Glucose, 46.5 g NaCl, 3.0 g NaNO₃, 1.0 g K₂HPO₄,

0.5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g KCl, 0.01 g $\text{FeSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 3.7 g uridine, 1.0 g 5-FOA, 7 g Agar, per L)

を使用した。形質転換体のコドン置換はゲノム PCR により増幅された PCR フラグメントのシーク

エンス解析により確認した。本実験で使用したプライマーと PCR 条件は Table5 に示した。

Table 5 Primers used in generation of OE and *kpeA*⁺ strains.

primers	sequences (5'-3')	experiments	conditions ^a
<i>kpeA</i> _F2	CGAGGTGAAACACAGTACATCCA	Amplification of <i>kpeA</i> insert and PCR for confirmation of <i>kpeA</i> ⁺ strain	94 °C for 2 min, followed by 30 cycles of 98 °C for 10 s and 68 °C for 240 s
<i>kpeA</i> _R2	GCCACTTCGTCTCGACAGAAAT	Amplification of <i>kpeA</i> insert and TF fragment for <i>kpeA</i> _{Aur} <i>kpeA</i> ⁺ confirmation	94 °C for 2 min, followed by 30 cycles of 98 °C for 10 s and 68 °C for 240 s
pUC19_inv_ <i>kpeA</i> _F1	CGAGACGAAGTGGCTAAAGTGTAAAGCCCTGGGGTGCC	Linearization of pUC19 for generation <i>kpeA</i>	94 °C for 2 min, followed by 30 cycles of 98 °C for 10 s, 63 °C for 30 s and 68 °C for 60 s
pUC19_inv_ <i>kpeA</i> _R1	ACGTGTTTCACCTCGCCAAACTTAAATCGCCCTGCAGCAC	Linearization of pUC19 for generation <i>kpeA</i>	94 °C for 2 min, followed by 30 cycles of 98 °C for 10 s, 63 °C for 30 s and 68 °C for 60 s
<i>pkeD</i> [†]	ATGGTTTGTGGGAAAGGTTGATGTAGAGGGTTC	Linearization of pUC19 for generation <i>pkeA</i> Δ <i>cd</i>	94 °C for 2 min, followed by 30 cycles of 98 °C for 10 s and 68 °C for 660 s
<i>pkeD</i> [‡]	TTCCCAAAAACCAATCTTCTCCGCCAGG	Linearization of pUC19 for generation <i>pkeA</i> Δ <i>cd</i>	94 °C for 2 min, followed by 30 cycles of 98 °C for 10 s and 68 °C for 660 s
<i>dkTF</i>	GTACGAGTATGGTCAGCGGG	Amplification of TF fragment for <i>kpeA</i> ⁺	94 °C for 2 min, followed by 30 cycles of 98 °C for 10 s, 63 °C for 30 s and 68 °C for 240 s
<i>dkTFR</i>	TCCGGGACTTCAAATGCCCTC	Amplification of TF fragment for <i>kpeA</i> ⁺	94 °C for 2 min, followed by 30 cycles of 98 °C for 10 s, 63 °C for 30 s and 68 °C for 240 s
<i>kdsq1</i>	ACGAAATGACGAGGTGAAAC	Sequence analysis for TF confirmation of <i>kpeA</i> ⁺	94 °C for 2 min, followed by 30 cycles of 98 °C for 10 s and 68 °C for 600 s
<i>glsA</i> _{inv}	CCCACTAGGGCTACTTGAGAGAACAAAC	Linearization of pNGAG1 for generation pNK	94 °C for 2 min, followed by 30 cycles of 98 °C for 10 s and 68 °C for 600 s
pNGAG1_inv_fw	CAACAAGAAATCAGCAGTTTTAGAA	Linearization of pNGAG1 for generation pNK	94 °C for 2 min, followed by 30 cycles of 98 °C for 10 s and 68 °C for 600 s
pNK_int_fw	GTAGCCCTAGGTGGGAGCGCGAATTTTGAICTATCATCTT	Amplification of pNK insert	94 °C for 2 min, followed by 30 cycles of 98 °C for 10 s and 68 °C for 210 s
pNK_int_rv	GCTGATTTCTTGTTCGCTGGCTCTGTTCTCAAATAATGATAG	Amplification of pNK insert	94 °C for 2 min, followed by 30 cycles of 98 °C for 10 s and 68 °C for 210 s
pNK_pyrG_inv_fw	TTCTGAGGTGCAGTTATGTCAAATGTGATATTTCCAAACG	Linearization of pNK for generation pNPK	94 °C for 2 min, followed by 30 cycles of 98 °C for 10 s, 50 °C for 30 s and 68 °C for 900 s
pNK_pyrG_inv_rv	TAGCAATAAGCCCAACCGTGTCAATTGACTATGTACCAAGG	Linearization of pNK for generation pNPK	94 °C for 2 min, followed by 30 cycles of 98 °C for 10 s, 50 °C for 30 s and 68 °C for 900 s
<i>pyrG</i> _{lib} _insert_fw	TTGGGCTTATTCGTATGTCCCTG	Amplification of pNPK and <i>kpeA</i> <i>pyrG</i> fragment	94 °C for 2 min, followed by 30 cycles of 98 °C for 10 s, 60 °C for 30 s and 68 °C for 60 s
<i>pyrG</i> _{lib} _insert_rv	AACTGCACCTCAGAAGAAAAGGATG	Amplification of pNPK and <i>kpeA</i> <i>pyrG</i> fragment	94 °C for 2 min, followed by 30 cycles of 98 °C for 10 s, 60 °C for 30 s and 68 °C for 60 s
<i>Pref1</i> _fw	GGAGGGCAACAACAGATCTTA	Amplification of pNPK <i>ief1</i> promoter fragment	94 °C for 2 min, followed by 30 cycles of 98 °C for 10 s, 55 °C for 30 s and 68 °C for 60 s
<i>Pref1</i> _rv	TTTGAAGGTGGTCCGAACCTTG	Amplification of pNPK <i>ief1</i> promoter fragment	94 °C for 2 min, followed by 30 cycles of 98 °C for 10 s, 55 °C for 30 s and 68 °C for 60 s
pNPK_PT_inv_fw	CGCACCACTTCAAATAATGTCAAATGTGCGATAATTTCCAAAGG	Linearization of pNPK for generation pNPTK	94 °C for 2 min, followed by 30 cycles of 98 °C for 10 s, 55 °C for 30 s and 68 °C for 1080 s
pNPK_PT_inv_rv	TGTTGTTGCCCTCCAACTGCACCTCAGAACGAAAAGGATG	Linearization of pNPK for generation pNPTK	94 °C for 2 min, followed by 30 cycles of 98 °C for 10 s, 55 °C for 30 s and 68 °C for 1080 s
OE_TF_fw	TCATTCGGGAAAGTGCCCAAGTGA	Amplification of TF fragment for OE strain	94 °C for 2 min, followed by 30 cycles of 98 °C for 10 s and 68 °C for 240 s
OE_TF_rv	AAGCTTAGCCGGTTTCCACCTCG	Amplification of TF fragment for OE strain	94 °C for 2 min, followed by 30 cycles of 98 °C for 10 s and 68 °C for 240 s
OE_ch_fw	ACCCATCAGTATTCGCTGGCC	PCR for confirmation of OE strain	94 °C for 2 min, followed by 30 cycles of 98 °C for 10 s, 60 °C for 30 s and 68 °C for 300 s
OE_ch_rv	GCCCAATGCAGTCGAAACTTCG	PCR for confirmation of OE strain	94 °C for 2 min, followed by 30 cycles of 98 °C for 10 s, 60 °C for 30 s and 68 °C for 300 s
<i>kpeA</i> _{northern} _fw	AACCCACCTTCAGTACTCTCATGA	Generation DIG probe of <i>kpeA</i> for Northern analysis	94 °C for 2 min, followed by 30 cycles of 98 °C for 10 s, 60 °C for 30 s and 72 °C for 150 s
<i>kpeA</i> _{northern} _rv	TCGAAAAGTGGCGTTTCCATCGA	Generation DIG probe of <i>kpeA</i> for Northern analysis	94 °C for 2 min, followed by 30 cycles of 98 °C for 10 s, 60 °C for 30 s and 72 °C for 150 s

^a Conditions for sequence analysis were not described.

結果

kpeA 高発現株として、遺伝子発現が非常に強く、transcriptional elongation factor をコードする遺伝子 *tefl* のプロモーター下で *kpeA* を発現する株の作製を試みた。*kpeA* のプロモーターを *Ptefl* に置換した配列と *pyrG* を含む DNA 断片を E-F1 *pyrG* 株に導入し、相同組み換えによる形質転換を行って候補株を取得した。形質転換体候補株のゲノムを鋳型として、導入した DNA 断片の外から増幅するプライマーを用いた PCR により、目的位置に導入されたことを確認した (Fig. 7A)。さらに、KA 生産培地で 10 日間液体表面培養した菌体から抽出した total RNA を試料としてノーザン解析を行い、*kpeA* が高発現していることを確認した (Fig. 7B)。

kpeA 破壊株の相補株を作製するためには、選択マーカーの都合から $\Delta kpeA::pyrG$ 箇所から *pyrG* を脱落させるコンストラクションで形質転換を行う必要があった。しかし、*A. oryzae* RIB40 株の *kpeA* 配列をそのまま導入しては *kpeA* 破壊株の親株である E-F1 株と同じ遺伝子型になり区別ができない。そこで、*kpeA* の ORF 内の一部を同義コドンに置換した配列を $\Delta kpeA::pyrG$ 箇所に相同組み換えによって導入することで、E-F1 株と区別可能な *kpeA* 相補株の作製を試みた。*kpeA* の ORF 内の一部を同義コドンに置換した配列を含む DNA 断片を *kpeA* 破壊株の $\Delta kpeA::pyrG$ 箇所に導入し、形質転換体の選別は *pyrG* 欠失による 5FOA 耐性により行った。形質転換体候補株のゲノムを鋳型として、導入した DNA 断片の外から増幅する PCR により、DNA 断片が目的位置に導入されたことを確認した (Fig. 8A)。また、同義コドンに置換した箇所をシー

クエンス解析し、目的のコドン配列に置換されていることを確認した(Fig. 8B)。これにより *kpeA* 破壊株に *kpeA* が相補されたことを確認した。

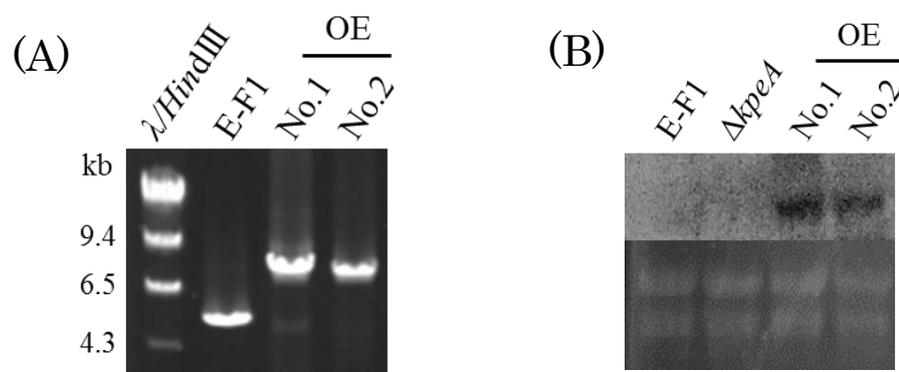
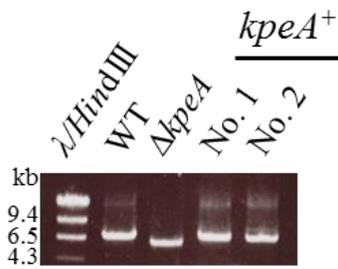


Fig. 7 Confirmation of transformation and overexpression of *kpeA* in OE strain.

(A) PCR for confirmation of transformation in candidate strains of OE strain. PCR-amplified fragments were generated with primers (Table5). *kpeA* overexpressing strains No. 1 and 2, which were candidate transformants independently isolated, were confirmed to harbor introduced fragment at AO090003001186 (*kpeA*) loci. (B) Northern blot analysis of *kpeA* in the E-F1, $\Delta kpeA$, and OE strains cultured in KA medium for 10 days. DIG probe of approximately 3.0 kb specific to *kpeA* was used. In Northern blot analysis, ribosomal RNAs were visualized in the gel by ethidium bromide staining.

(A)



(B)

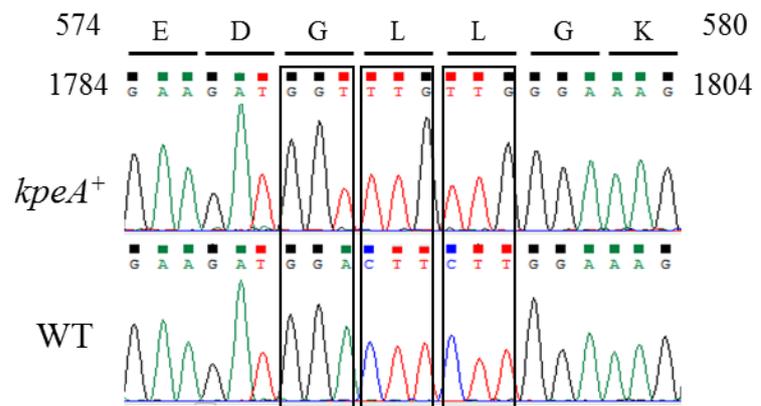


Fig. 8 PCR and sequence analysis for confirmation of *kpeA*⁺ transformant.

(A) PCR for confirmation of transformation in candidate strains of *kpeA*⁺ strain. *kpeA*⁺ strains no. 1 and 2, which were candidate transformants independently isolated, were confirmed to harbor induced fragment at AO090003001186 (*kpeA*) loci. (B) Sequence of the codon substituted region in *kpeA*⁺ strain. Phonogram of the sequence of codon substituted regions in the E-F1 and *kpeA*⁺ strains were aligned. Original nucleotides in E-F1 strain and substituted nucleotides in *kpeA*⁺ strain are surrounded by a box.

第2節 分生子形成への影響

第1項 顕微鏡観察

目的

近縁種において *LaeA* や *VeA*, *BrlA* などの一部の二次代謝制御因子は分生子形成や有性生殖の制御にも関わることが報告されており(Adams et al., 1988; Lind et al., 2018; Mooney and Yager, 1990; Kato et al., 2003), *KpeA* も分生子形成に関わることが予想された。分生子形成の制御因子の破壊株は分生子数の増加や減少, 気中菌糸の異常伸長などの形質を示す。本実験では *kpeA* が分生子形成に関わる, *Malts* 寒天培地で平板培養した *kpeA* 破壊株及び高発現株の分生子形成について調べた。

方法

kpeA 破壊株及び高発現株, E-F1 株, 相補株の分生子 1×10^3 conidia を *Malts* 寒天プレートに点接種し, 30 °C で6日間培養した後, 実体顕微鏡(SZM-ILLD; Olympus Corporation)を使用して観察した。分生子の数を数えるために, 各株の分生子 1×10^4 conidia を *Malts* 寒天プレート上に播種し, 30 °C で7日間培養し, 経時的に分生子の数を測定した。各株の vesicle のサイズを測定するために, 各株のコロニーを Tween saline (0.025% Tween 80, 0.8% NaCl) で処理して, 分生子をファイライドから分離した。その後, 顕微鏡(CX22LED; Olympus Corporation)と Moticam1080 (Shimadzu Corporation)を使用して各株の vesicle サイズを測定した。vesicle の直

径の平均及び標準偏差値は 30 以上のサンプルから算出した。各株の分生子頭数も、プレート上のランダムに選択した 5 点においてカウントし、その平均及び標準偏差を算出した。

結果

Malts 寒天培地における *kpeA* 破壊株及び高発現株, E-F1 株, 相補株のジャイアントコロニーを作製し、各株の形態を比較した。*kpeA* 高発現株及び相補株, E-F1 株のコロニーの見た目に極端な差はなかったが、*kpeA* 破壊株は気中菌糸が長く、着生した分生子が少なかった(Fig. 9A)。各株の分生子を Malts 寒天培地に播種し、培養 2~7 日目の分生子数を計測したところ、培養 2 日目の *kpeA* 破壊株の分生子数は E-F1 株と相補株よりも少なく、培養 7 日目でも E-F1 株と相補株の 1/2 量程度であった(Fig. 9B)。一方で、*kpeA* 高発現株は培養 2 日目の時点で E-F1 株よりも分生子数が多く、培養 7 日目では E-F1 株の 1.5 倍の分生子数であった (Fig. 9B)。また、同様の培養方法で頂のうの数を計測したところ、培養 2 日目の時点で *kpeA* 破壊株の頂のうは E-F1 株と相補株より少なく、培養 7 日目に E-F1 株と相補株が 1 mm² に平均 7.7 個と 7.1 個の頂のうを形成したが、*kpeA* 破壊株は 5.4 個と少なかった(Fig. 9C)。一方で OE 株は、全ての培養期間で頂のうの数が E-F1 株より多く、培養 7 日目には平均 9.2 個の頂のうを形成した(Fig. 9C)。次に頂のうの大きさを測定したところ、培養 2 日目の時点で *kpeA* 破壊株の頂のうは E-F1 株と相補株より小さく、培養 7 日目に E-F1 株と相補株がそれぞれ平均 32.6 μm と 31.8 μm の頂のうを形成し

たが, *kpeA* 破壊株は 25.3 μm と小さかった。OE 株の頂のうは培養 2 日目では E-F1 株と同程度の大きさであるが, 培養 7 日目には 42.0 μm と大きい頂のうを形成した(Fig. 10)。

これらの結果から *kpeA* が分生子形成に関わることが示され, *kpeA* 破壊株の分生子数の減少は小さい頂のうの形成と, 頂のう数の減少が直接的な原因であると考えられた。一方で, *kpeA* 高発現株は分生子数が増加し, その原因が大きな頂のうの形成と頂のう数の増加だと考えられたため, *kpeA* は頂のう数と大きさを制御すると考えられる。また, 相補株と E-F1 株の形態に大きな差が見られなかったことから, *kpeA* 破壊株の形質は *kpeA* の破壊によって引き起こされたことが示された。以上のことから, KpeA は二次代謝のみならず, 分生子形成の制御にも関わり, 分生子形成を促進する機能を有することが示された。

考察

brlA の転写活性化因子 FluG, FlbA, FlbB, FlbC, FlbD の遺伝子破壊株は気中菌糸が長くなり, 分生子数が減少する(Ogawa et al., 2010)。その原因は *brlA* の遺伝子発現量の減少だとされるため(Ogawa et al., 2010), 気中菌糸が長く, 分生子数が減少した *kpeA* 破壊株も *brlA* の遺伝子発現量が減少していると考えられる。

StuA や MedA などの一部の分生子形成の制御因子は, 正常な分生子頭の形成に関わることが報告されている(Adams et al., 1998)。しかし, 頂のうの大きさに関わる制御因子は報告がなく, 分生子形成関連遺伝子破壊株の頂のうの大きさや *brlA* 遺伝子発現量と頂のうの大きさの相関

に興味を持たれる結果であった。*kpeA* 破壊株が小さい頂のうを形成したことから(Fig.10), *abaA* や *wetA*, *stuA*, *medA* のように正常な分生子頭の形成に関わることが予想されたが(Adams et al., 1998; Ogawa et al., 2010), 光学顕微鏡では分生子頭の構造を詳細に観察するのは困難であるため、電子顕微鏡などの分離能の高い顕微鏡による観察が必要だと考えられた。

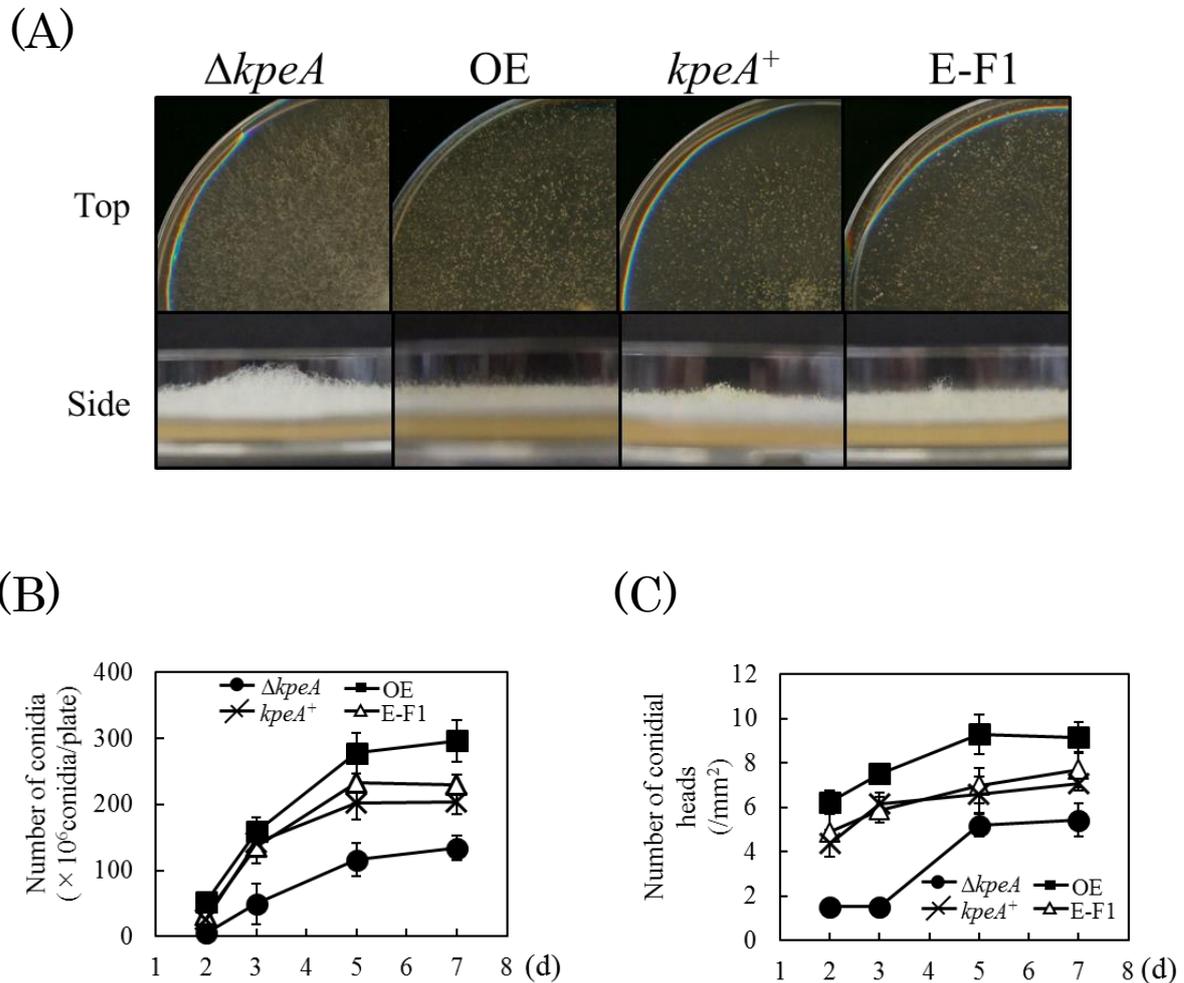
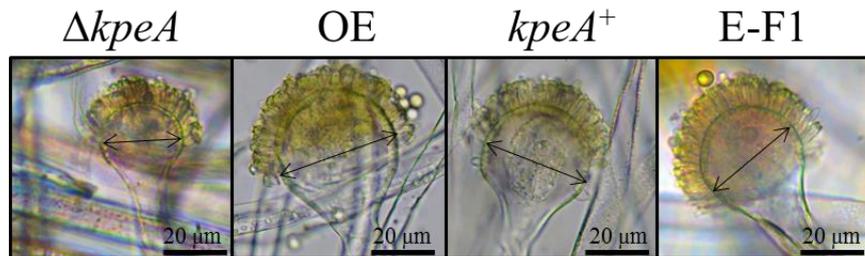


Fig. 9 Effect of disruption and overexpression of the *kpeA* gene on conidiation.

(A) Phenotypes of $\Delta kpeA$, OE, $kpeA^+$, and E-F1 strains. Panels show giant colonies of *A. oryzae* strains cultured at 30 °C for seven days on malt agar medium. (B) The number of conidia of the *A. oryzae* strains cultured on malt plate for 2–7 days. Number of conidia are presented as the means \pm S.D. (n=3). P value for comparison between $\Delta kpeA$ and E-F1 strain was lower than 0.01 at all time points. P value for comparison between OE and E-F1 strain was lower than 0.05 at 2 and 7 days. (C) Number of conidial heads of the *A. oryzae* strains cultured on malt agar medium at 30 °C for 2–7 days. Conidial heads were counted at five randomly selected points on a fungal colony. Values are presented as the means \pm S.D. (n= 5). P value for comparison between $\Delta kpeA$ and E-F1 strain was lower than 0.01 at all time points. P value for comparison between OE and E-F1 strain was lower than 0.05 at all time points.

(A)



(B)

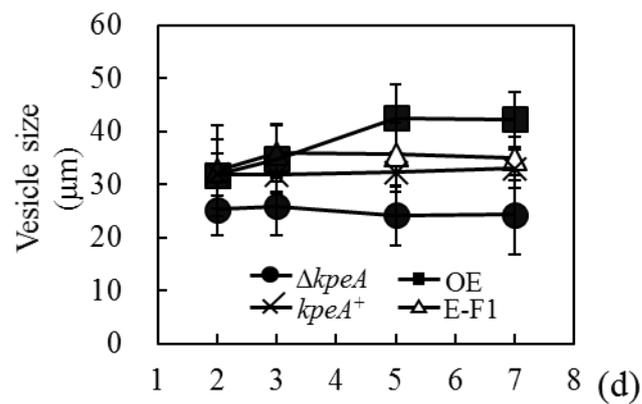


Fig. 10 Effect of disruption and overexpression of the *kpeA* gene of vesicle formation.

(A) Panels showed the vesicles of *A. oryzae* strains after treatment with Tween saline to deprive the conidia. *A. oryzae* strains were uniformly spread and cultured 30 °C for seven days on malt agar medium. (B) Vesicle size of *A. oryzae* strains cultured on malt plate for 2–7 days. Values of vesicle size were presented as the mean \pm S.D. ($n > 30$). P value for comparison between $\Delta kpeA$ and E-F1 strain was lower than 0.001 at all time points. P value for comparison between OE and E-F1 strain was lower than 0.001 at 5 and 7 days. P value for comparison between $kpeA^+$ and E-F1 strain was lower than 0.05 at 3 and 7 days.

第2項 走査型電子顕微鏡観察

目的

*A. oryzae*を平板培養すると基底菌糸から気中菌糸が伸長し、気中菌糸がある程度伸長するとその先端に頂のう、フィアライド、分生子を形成する。この内の頂のう及びフィアライド、分生子を合わせて分生子頭と呼ぶ。分生子形成に関わる制御因子の中には、*AbaA* や *WetA*, *StuA*, *MedA* のように遺伝子を破壊すると不完全な分生子頭を形成する制御因子がある(Adams et al., 1998; Ogawa et al., 2010)。例えば, *abaA* を破壊すると通常では数珠状に連なって形成される分生子がソロバン状(abacus)に繋がって形成される(Adams et al., 1998; Ogawa et al., 2010)。また, *medA* を破壊するとフィアライドの先に形成された分生子が発芽し、頂のうから菌糸が伸びたメデューサ(medusa)の様な分生子頭を形成する(Adams et al., 1998)。

前節で *kpeA* 破壊株の頂のうが小さいことが観察され, *kpeA* が正常な分生子頭の形成や頂のうの成熟に必要な遺伝子であることが予想された。そこで, 光学顕微鏡よりさらに分解能が高い電子顕微鏡による観察を行い, *kpeA* 破壊株が上記の遺伝子破壊株の様に不完全な分生子頭を形成していないか調べた。

方法

A. oryzae の培養

E-F1 株と *kpeA* 破壊株の分生子 1×10^4 conidia を Malts 寒天培地の全面に接種し、30 °C で 6 日間培養し、その菌体を試料とした。

電子顕微鏡観察用試料作製

E-F1 株と *kpeA* 破壊株の菌体を寒天培地ごとカッターで 5 mm 角に切り抜き、マイティーバイアル(株式会社マルエム)に入れ、前固定、洗浄、後固定、脱水を行った。前固定として 2%グルタルアルデヒド溶液に 3.5 時間浸し、その後 10 mMリン酸バッファーに 15 分浸して洗浄し、後固定として 2 %四酸化オスミウム溶液に 5.5 時間浸した。さらに、50%エタノールに 15 分浸けた後、70%エタノールに浸けて一晩 4 °C で静置し、80%、90%、95%、100%エタノールに 15 分ずつ浸けて脱水を行った。100%エタノールは2回繰り返した。その後、t-ブチルアルコールに30分浸す工程を 2 回行い、電子顕微鏡室において急冷固化し、凍結真空乾燥装置による凍結乾燥を行った。その後、イオン Sputter により菌体表面を白金パラジウムによりコーティングし、電子顕微鏡観察用試料とした。

走査電子顕微鏡観察

E-F1 株と *kpeA* 破壊株の電子顕微鏡観察用試料を走査型電子顕微鏡 S-4000(株式会社 日立ハイテクノロジーズ)により観察した。

結果及び考察

kpeA 破壊株と E-F1 株の分生子頭を走査型電子顕微鏡で観察したところ, E-F1 株と *kpeA* 破壊株ともに連鎖した分生子やフィアライドに異常はなく, 正常な分生子頭を形成した(Fig. 11)。このことから *kpeA* の破壊は小さい頂のうの形成を引き起こすが, *stuA* 破壊株のフィアライドの消失や, *abaA* や *medA* 破壊株の分生子の形態異常は引き起こさないことが明らかになった(Adams et al., 1998)。

ΔkpeA

E-F1

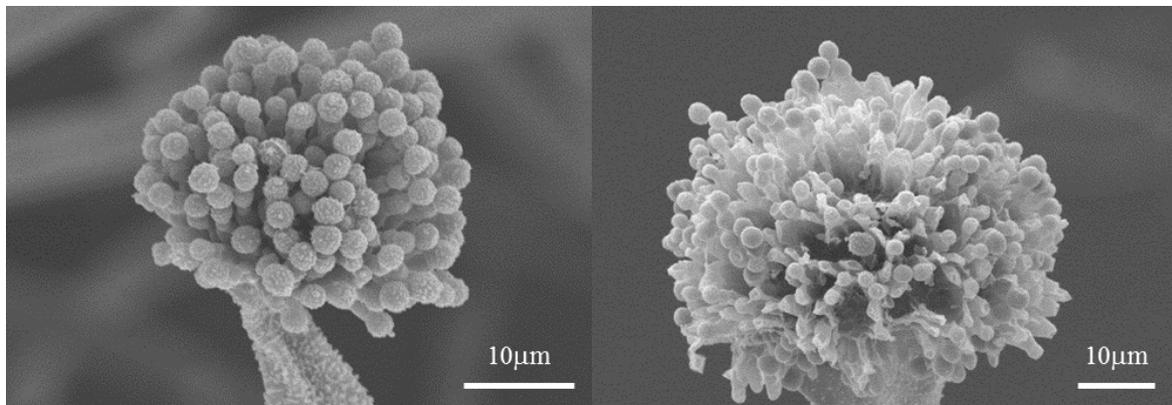


Fig. 11 Electron microscopy of $\Delta kpeA$ and E-F1 strain. Panels showed vesicles of *A. oryzae* strains cultured 30 °C for six days on malt agar medium.

第3節 分生子形成関連遺伝子の発現解析

目的

分生子形成は *brlA* の遺伝子発現がトリガーとなって始まる(Adams et al., 1998; Krijgsheld et al., 2013)。そのため, *brlA* の遺伝子発現の制御は盛んに研究され, 現在では複数の転写活性化因子と抑制因子が直接プロモーターに結合して, 複雑に制御することが明らかにされている(Garzia et al., 2009; Known et al., 2010; Lee et al., 2016; Ahmad et al., 2013)。また, *brlA* の下流の制御因子 *AbaA* と *WetA* が *VosA* を介して *brlA* をフィードバック抑制することも報告されており(Tao et al., 2011), *brlA* の遺伝子発現制御が分生子形成の制御において非常に重要なことが分かっている。*brlA* の転写活性化因子の遺伝子破壊株では, *brlA* の遺伝子発現量の減少を原因とした分生子数の減少や異常な菌糸伸長が観察される(Ogawa et al., 2010)。前節で *kpeA* 破壊株が長い気中菌糸を形成し, 分生子数が減少したことから, *brlA* の転写活性化因子の破壊株と同様に *kpeA* 破壊株の *brlA* 発現量が減少していると予想した。そこで, 本実験では *kpeA* 破壊株及び高発現株の *brlA* とその下流の制御因子遺伝子 *abaA*, *wetA* の遺伝子発現量について調べた。

方法

total RNA の抽出と qRT-PCR

kpeA 破壊株及び高発現株, E-F1 株, 相補株の分生子 1×10^5 conidia を YPD 液体培地(5 g yeast extract, 10 g polypeptone, 10 g glucose, 3.7 g uridine per L)に接種し, 前培養として 30 °C の恒温器において 180 rpm で 24 時間振とう培養した。増殖した菌体を回収し, Amersham HybondTM-N⁺ membrane を敷いた Malts 寒天培地上に接種し, 30 °C で 48 時間培養した。培養 12 時間ごとに各株の total RNA を抽出した。total RNA の抽出と逆転写は第 2 章 1 節と同様に行い, 合成した cDNA を鋳型として qRT-PCR を行った。qRT-PCR には KAPA SYBR FAST qPCR kit (KAPA Biosystems)と DNA Engine® cyclor PTC-200 (BioRad)を使用した。qRT-PCR のリファレンス遺伝子として *tef1* を使用し, ターゲット遺伝子として *brlA* 及び *abaA*, *wetA*, *kpeA* の遺伝子発現量を測定し, 遺伝子発現は $2^{-\Delta C_t}$ 法で算出した。qRT-PCR で使用したプライマー及び PCR 条件は Table6 に示した。

Table 6 Primers used in qRT-PCR for *kpeA*, *briA*, *abaA*, and *wetA*.

primers	sequences (5'-3')	experiments	conditions
TMtef1FW	AGCCCATGTGTGGAGTCTT	qRT-PCR for <i>tef1</i>	95 °C for 5 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 5 s and 66.6 °C for 30 s
TMtef1RV	AACCGACTTGATAACTCCGACG	qRT-PCR for <i>tef1</i>	95 °C for 5 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 5 s and 66.6 °C for 30 s
qrtkpeA_fw	GCGCCAACTAAACGATAAGTTATGA	qRT-PCR for <i>kpeA</i>	95 °C for 5 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 5 s and 66.6 °C for 30 s
qrtkpeA_rv	TGCCGGCATAATCTCATAGTTTCATA	qRT-PCR for <i>kpeA</i>	95 °C for 5 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 5 s and 66.6 °C for 30 s
TMbriA-FW	TATGCCCGACTTCTGTCCG	qRT-PCR for <i>briA</i>	95 °C for 5 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 5 s and 66.6 °C for 30 s
TMbriA-RV	ATGGGAGGCTGTGTGTTCCA	qRT-PCR for <i>briA</i>	95 °C for 5 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 5 s and 66.6 °C for 30 s
abaA-TF	CCATCCAGGTCGAGTGCTTC	qRT-PCR for <i>abaA</i>	95 °C for 5 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 5 s and 66.6 °C for 30 s
abaA-TR	AGGCATTGGGTGAGTTGGGACC	qRT-PCR for <i>abaA</i>	95 °C for 5 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 5 s and 66.6 °C for 30 s
TMwetA-FW	CACAGTGGCGGAAGGATTTC	qRT-PCR for <i>wetA</i>	95 °C for 5 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 5 s and 66.6 °C for 30 s
TMwetA-RV	AACAGCAGAGGGATGAACGG	qRT-PCR for <i>wetA</i>	95 °C for 5 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 5 s and 66.6 °C for 30 s

結果

寒天培地で生育させた *kpeA* 破壊株及び高発現株, E-F1 株, 相補株の *kpeA* 発現と分生子形成の制御の中心的な遺伝子(*brlA*, *abaA*, *wetA*)の発現を調べた。前培養として各株を YPD 液体培地で振とう培養し, 増殖したペレット状の菌体を寒天培地上に接種して本培養した。寒天培地に接種後 24 時間で E-F1 株に分生子形成が観察されたため, qRT-PCR による遺伝子発現解析は寒天培地上への移動後 12, 24, 36, 48 時間に行った。*kpeA* は E-F1 株と相補株の培養 12 時間後に最大の発現を示し, それ以降は徐々に減少した(Fig. 12)。*kpeA* 高発現株は常に E-F1 株と相補株よりも *kpeA* が高発現しており, *kprA* 破壊株では *kpeA* の発現が検出されなかった(Fig. 12)。*brlA* の発現は *kpeA* 高発現株及び E-F1 株, 相補株において培養 24 時間後に最大を示し, それ以降一定の発現を示したが, *kpeA* 破壊株の *brlA* の発現は培養 36 時間まで弱く, 培養 48 時間後に E-F1 株や相補株と同程度の発現を示した(Fig. 12)。*kpeA* 破壊株の *brlA* 発現が顕著に遅れたことから, KpeA が *brlA* の遺伝子発現に関わることを示された。さらに, E-F1 株と相補株の *abaA* と *wetA* は培養 24~36 時間において発現が顕著に増加したが, *kpeA* 破壊株の *abaA* と *wetA* は発現が増加しなかった(Fig. 12)。*BrlA* は *abaA* と *wetA* の転写活性化因子であるため, *kpeA* 破壊株の *brlA* 発現が遅れたことが原因で *abaA* と *wetA* の発現が減少したと考えられる。一方で, *kpeA* 高発現株は E-F1 株や相補株に比べて *kpeA* の発現が 2 倍以上に増加しているにもかかわらず, *brlA* や *abaA*, *wetA* の発現に顕著な差はなかった(Fig. 12)。

考察

平板培養時に *kpeA* 破壊株が示した分生子数の減少や頂のうの減少、小さい頂のうの形成といった形質は、*brlA* の遺伝子発現の遅れと *abaA* 及び *wetA* の遺伝子発現量の減少が原因だと考えられた。*brlA* の転写活性化因子である FluG や FlbA, FlbB, FlbC, FlbD, FlbE の遺伝子破壊株は気中菌糸が長く、分生子数が減少する(Ogawa et al., 2010)。*kpeA* の破壊株も気中菌糸が長く、分生子数が減少し、*brlA* の発現量が減少することから、FluG や Flbs のように KpeA は *brlA* の転写活性化因子であると考えられた。しかし、KpeA が *brlA* のプロモーターに直接結合して制御するか、上記の *brlA* の転写活性化因子などを介して間接的に *brlA* を制御するかは分からず、今後ゲルシフトアッセイや ChIP 解析による DNA-protein 相互作用を検討する必要がある。

転写因子には複合体を形成して機能するものやタンパク修飾により活性を得るものがある。例えば、FlbB と FlbD, FlbE は複合体を形成して *brlA* の発現を制御しており、各制御因子を単独で破壊すると気中菌糸が長くなり、分生子数が減少するが(Garzia et al., 2009; Krijgsheld et al., 2013)、一方で *flbE* 単独の高発現では分生子形成に影響を与えないことが報告されている(Garzia et al., 2009)。KpeA の高発現が *brlA* の遺伝子発現に無影響だったのは、FlbE のように KpeA が複合体として機能する可能性やタンパク修飾を受ける可能性を示唆している。また、タンパク質のリン酸化は Ser/Thr リッチな領域をリン酸化することでタンパク質を活性化する(Hernandez-Ortiz and Espeso, 2013; Hirst et al., 1999)。KpeA の Zn(II)₂-Cys₆ モチーフのアミノ酸

配列上流には Ser リッチな領域があり, KpeA のリン酸化に関わる可能性があるため, 今後, 欠失解析等による KpeA のタンパク質修飾について検討する必要がある。

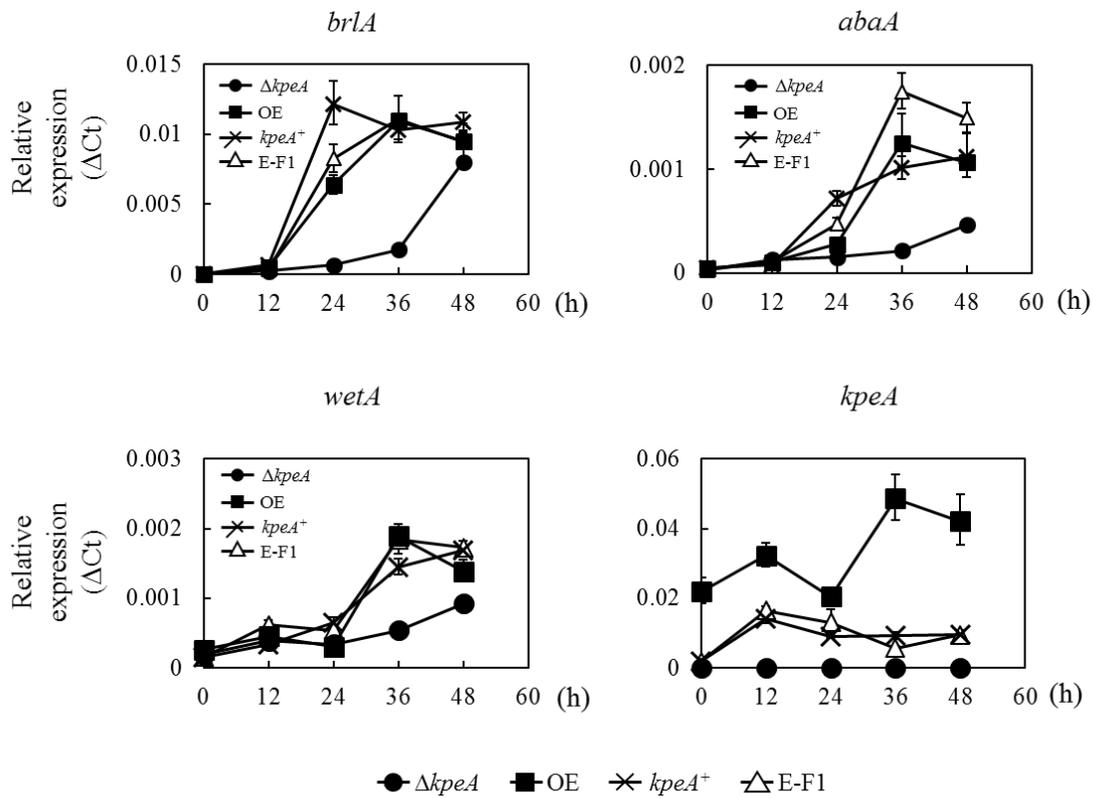


Fig. 12 qRT-PCR analyzes of central development pathway genes and *kpeA* in $\Delta kpeA$, OE, *kpeA*⁺, and E-F1 strains.

A. oryzae strains were cultured at 30 °C for 24 h in YPD liquid medium. After cultivation, *A. oryzae* strains were transferred onto malt agar medium and cultured at 30 °C for 48 h. Total RNAs were extracted after the time intervals indicated. *tef1* was used as the reference gene. Relative expression was calculated by the Δ Ct method. Values are presented as the means \pm S.D. (n=3). Primers and PCR conditions are described in Table6. P value for comparison between $\Delta kpeA$ and E-F1 strain was lower than 0.05 in *brlA*, 24–36 h; *abaA*, 24–48 h; *wetA*, 12–48 h; *kpeA*, 0–48 h. P value for comparison between OE and E-F1 strain was lower than 0.05 in *abaA*, 24–48 h; *wetA*, 0–48 h; *kpeA*, 0–48 h. P value for comparison between *kpeA*⁺ and E-F1 strain was lower than 0.05 in; *brlA*, 12–36 h; *abaA*, 24–36 h; *wetA*, 12 and 36 h.

第4章 *kpeA* 遺伝子破壊及び高発現による二次代謝産物生産への影響

緒言

二次代謝の制御因子には複数の代謝を制御する広域制御因子が存在し, *LaeA* や *BrlA* が含まれる(Bok and Keller, 2004; Lind et al., 2018)。*LaeA* はヒストン H3 の 9 番目の Lys 残基をメチル化することでエピジェネティックな制御を行い, アフラトキシンやロバスタチン, KA など複数の二次代謝産物の生産を制御する(Reyes-Dominguez et al., 2010; Bok and Keller, 2004; Oda et al., 2011)。また, *A. oryzae* の *laeA* 破壊株は *brlA* 破壊株のように気中菌糸の異常伸長と分生子数の減少を示し, 分生子形成の制御にも関わる。*BrlA* は分生子形成の制御の中心的な役割を担う DNA 結合型の制御因子であるが(Krijgsheld et al., 2013), 近年の研究から *A. fumigatus* において *LaeA* の制御下で複数の二次代謝を制御することが示されている(Lind et al., 2018)。これまでの研究から *LaeA* や *BrlA* の他にも *CclA* や *HdaA*, *VeA* などの制御因子が見出され(Palmer et al., 2013; Lee et al., 2009; Kato et al., 2003), 光や温度, 栄養源などの環境シグナルへの応答や他の代謝の制御系との関わりが研究されているが(Krijgsheld et al., 2013), 未だ全貌が解明されたとは言えない。

本研究では, 第1章で *A. oryzae* の転写因子遺伝子破壊株ライブラリーに対するスクリーニングを行い, KA 生産に関わる新規制御因子 *KpeA* を見出した。また, 第3章で *KpeA* が二次代謝の他に分生子形成を制御することが明らかになり, *KpeA* も *BrlA* や *LaeA* と同様に複数の二次代謝を制御することが予想された。

本章では *kpeA* と二次代謝の関連を明らかにすることを目的として, KA の他に *A. oryzae* が生産することが知られているペニシリン(PN)とシクロピアゾン酸 (CPA)の生産制御への関与について調べた。

第1節 コウジ酸生産への影響

第1項 コウジ酸生産量の定量及び関連遺伝子の発現解析

目的

第1章のスクリーニング実験で *kpeA* 遺伝子破壊株の KA 生産量が増加したが、その生産量は培地呈色による定性的な評価であり、正確な生産量は不明であった。本実験では、まず始めに HPLC による KA 生産量の定量を試みた。次に、KpeA が転写レベルで KA 生産を制御すると考え、KA の推定生合成酵素遺伝子 *kojA*(Terabayashi et al., 2010)とその制御因子遺伝子 *kojR*(Marui et al., 2011)の遺伝子発現量を qRT-PCR によって調べた。

方法

kpeA 破壊株と高発現株、E-F1 株、相補株の分生子 1×10^6 conidia をウリジンを添加した KA 生産培地(100 g glucose, 1 g yeast extract, 1 g K_2HPO_4 , 0.5 g KCl, 0.5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 3.7 g, uridine per L)に接種し、30 °C で5~25日間液体表面培養した。各株の培養液は孔径 0.45 μm のフィルター Millex® LH0.45 μm (Merck Millipore)に通し不溶物を除去したものを HPLC 解析の試料とし、検出上限を超えた試料は milliQ 水で 10-50 倍希釈し再度 HPLC による定量を行った。HPLC は高速液体クロマトグラフ Prominence (Shimadzu Corporation)を使用し、HPLC の分析条件は、20 mmol/L リン酸二水素カリウム溶液-メタノール(95:5)を移動相として流速 1 ml/min のアイソクラティック条件で行い、カラムは CAPCELL PAK C18 MG S5 カラム 4.6 mm×250 mm(資生

堂)を使用し、カラム温度は室温、インジェクションボリュームは 5 μ l で行った。検出は UV270 nm における吸光度を測定した。定量は検量線を作製して行い、標品として KA(東京化成工業)を MilliQ 水に溶解させた KA 溶液を用いた。また、各株の菌体は回収後、乾燥菌体重量を測定した。測定は、回収した菌体を事前に重量を計測したミラクロースとアルミホイルに包み 55 °C で 3 日間乾燥させて、その重量を測定し、ミラクロース及びアルミホイルの重量を差し引いた数値を乾燥菌体重量とした。

KA 生産量は HPLC により培養液中の KA 濃度(ppm)を測定し、培養液 40 ml 中の KA 量(mg)を求め、その KA 量を乾燥菌体重量で割ることで菌体量当たりの KA 生産量(mg/mg)として算出した。

kojA 及び *kojR*, *kpeA* の qRT-PCR 解析

培養は上記の KA 生産量の定量と同様に行い、total RNA の抽出及び逆転写は第 2 章第 1 節と同様に行った。また、qRT-PCR は第 3 章第 3 節と同様に行い、*kojA* 及び *kojR* のプライマーと PCR 条件は Table7 に示した。

Table 7 Primers used in qRT-PCR for *kojA*, *kojR*, and *kpeA*

primers	sequences (5'-3')	experiments	conditions
TMref1FW	AGCCCATGTGTGGAGTCTT	qRT-PCR for <i>tef1</i>	95 °C for 5 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 5 s and 66.6 °C for 30 s
TMref1RV	AACCGACTTGATAAAGTCCGACG	qRT-PCR for <i>tef1</i>	95 °C for 5 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 5 s and 66.6 °C for 30 s
qrr0136-F	CCGAACTAGTCGTCCACCCAT	qRT-PCR for <i>kojA</i>	95 °C for 5 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 5 s and 64 °C for 30 s
qrr0136-R	ACATCCCCTGAATGCCCTCATC	qRT-PCR for <i>kojA</i>	95 °C for 5 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 5 s and 64 °C for 30 s
qrr0137-F	CCGCAGACGTTAGCGTAAAT	qRT-PCR for <i>kojR</i>	95 °C for 5 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 5 s and 64 °C for 30 s
qrr0137-R	GCGATCGGCCATATTCATAC	qRT-PCR for <i>kojR</i>	95 °C for 5 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 5 s and 64 °C for 30 s
qrrkpeA_fw	GCGCCAACTAAACGATAAGTTATGA	qRT-PCR for <i>kpeA</i>	95 °C for 5 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 5 s and 66.6 °C for 30 s
qrrkpeA_rv	TGCCGGCATATCTCATAGTTTCATA	qRT-PCR for <i>kpeA</i>	95 °C for 5 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 5 s and 66.6 °C for 30 s

結果

kpeA 破壊株及び高発現株, E-F1 株, 相補株を KA 生産培地で液体表面培養し, 5~25 日目まで経時的に KA 生産量を定量した。E-F1 株と相補株, *kpeA* 高発現株は培養 5 日目に 0.1 mg/mg 程度の KA を生産し, 培養 25 日目には 1 mg/mg 生産した。*kpeA* 破壊株は培養 5 日目に 0.6 mg/mg 生産し, 培養 25 日目には 6 mg/mg と, E-F1 株や相補株の 6 倍の KA を生産した (Fig. 13A)。この結果から, KpeA は KA 生産を抑制することが示された。また, *kpeA* 破壊株の KA 生産量の増加の原因が生育速度や菌体量にあると考え, 各培養日数の乾燥菌体重量を計測したが, 全ての培養日数で各株の乾燥菌体重量に明らかな差はなく, これらが KA 生産量増加の原因ではないことが分かった (Fig. 13B)。

次に, 培養 5 日目と 15 日目における KA の推定生合成酵素遺伝子 *kojA* (Terabayashi et al., 2010) とその制御因子遺伝子 *kojR* (Marui et al., 2011) の遺伝子発現を調べたところ, *kpeA* 破壊株の *kojA* と *kojR* の遺伝子発現量が顕著に増加し, 特に培養 15 日目の *kojA* の遺伝子発現量が E-F1 株の 3.2 倍, *kojR* の遺伝子発現量が 3.4 倍に増加した (Fig. 14)。一方で, *kpeA* 高発現株の *kojA* と *kojR* の遺伝子発現量は, KA 生産量と同様に E-F1 株や相補株と同程度であった (Fig. 14)。これらの結果から *kpeA* の高発現は KA 生産に影響を与えないことが明らかになり, *kpeA* が KA 生産の負の制御に関わることが明らかになった。また, *kpeA* の遺伝子発現は E-F1 株と相補株が同程度の発現を示し, *kpeA* 高発現株は E-F1 株と相補株の 2 倍以上の *kpeA* 発現を示したが, *kpeA* 破壊株では発現していなかった (Fig. 14)。

考察

これまでに KA 生産に関わる制御因子として *LaeA* や *HstD* が報告されているが(Oda et al., 2011; Kawauchi et al., 2013), KA 生産の制御機構は未だに不明な点が多い。*kpeA* 破壊株の KA 生産が増加し(Fig. 13), *kojA* と *kojR* の発現量も増加したため(Fig. 14), *KpeA* が KA 生産を抑制することが示された。そして, その制御はクラスター特異的な制御因子である *kojR* の発現を抑制することで, *kojA* の遺伝子発現と KA 生産を抑制すると考えられるが, *KpeA* が *kojR* を直接制御するか, *LaeA* や *HstD* を介して制御するかは不明である。また, 第 3 章において *KpeA* が *BrlA* の発現制御を介して分生子形成に関わることが示され, 近縁種である *A. nidulans* の *BrlA* が複数の二次代謝を制御することが報告されていることから(Lind et al., 2018), *KpeA* の KA 生産の制御が *BrlA* を介した制御である可能性が考えられた。しかし, これまでに分生子形成に関わる制御因子と KA 生産の関与は報告されておらず, *brlA* と KA 生産の関与を調べる必要があった。そこで, 次項では, *kpeA* と *brlA*, *laeA* との関与について調べた。

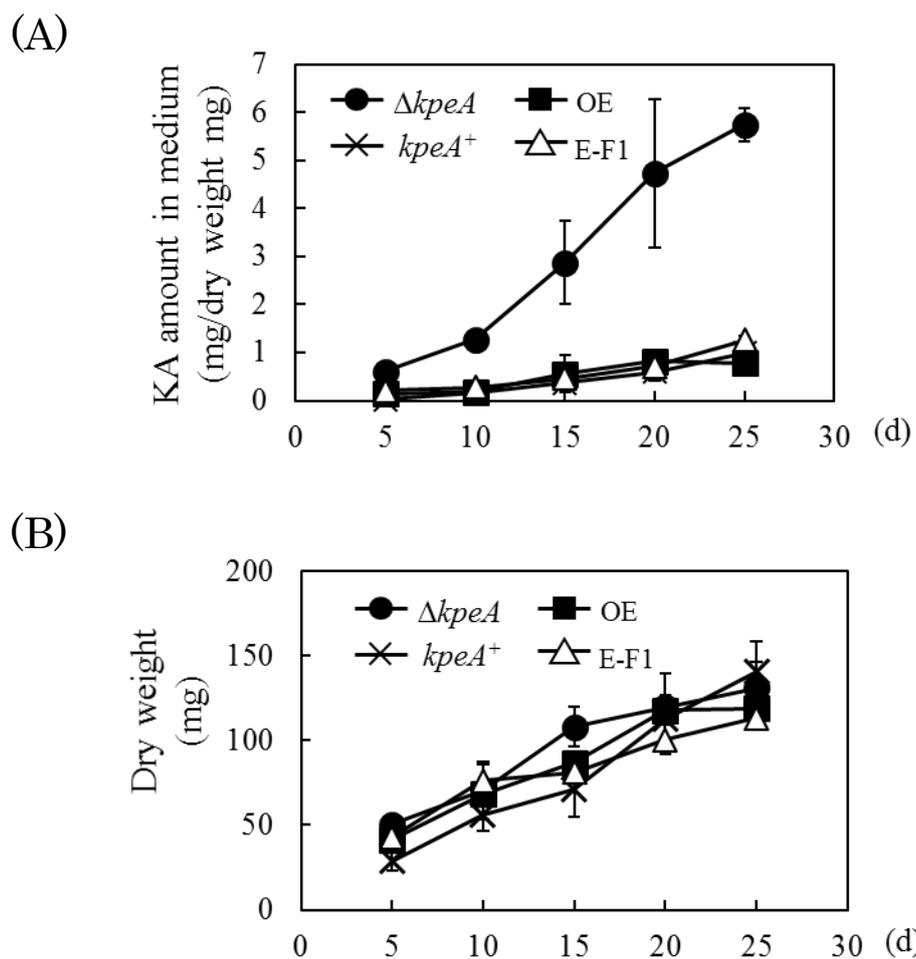


Fig. 13 Effect of disruption and overexpression of *kpeA* on KA production. (A) Time course of KA production and (B) growth of the $\Delta kpeA$, OE, $kpeA^+$, and E-F1 strains. *A. oryzae* strains were statically cultured in KA liquid medium at 30 °C for 5–25 days. KA was quantified by HPLC. Values are presented as the means \pm S.D. ($n > 3$) from independent experiments. P value for comparison between $\Delta kpeA$ and E-F1 strain was lower than 0.001 in KA production. P value for comparison between mutants and E-F1 strain was higher than 0.05 in growth of strains.

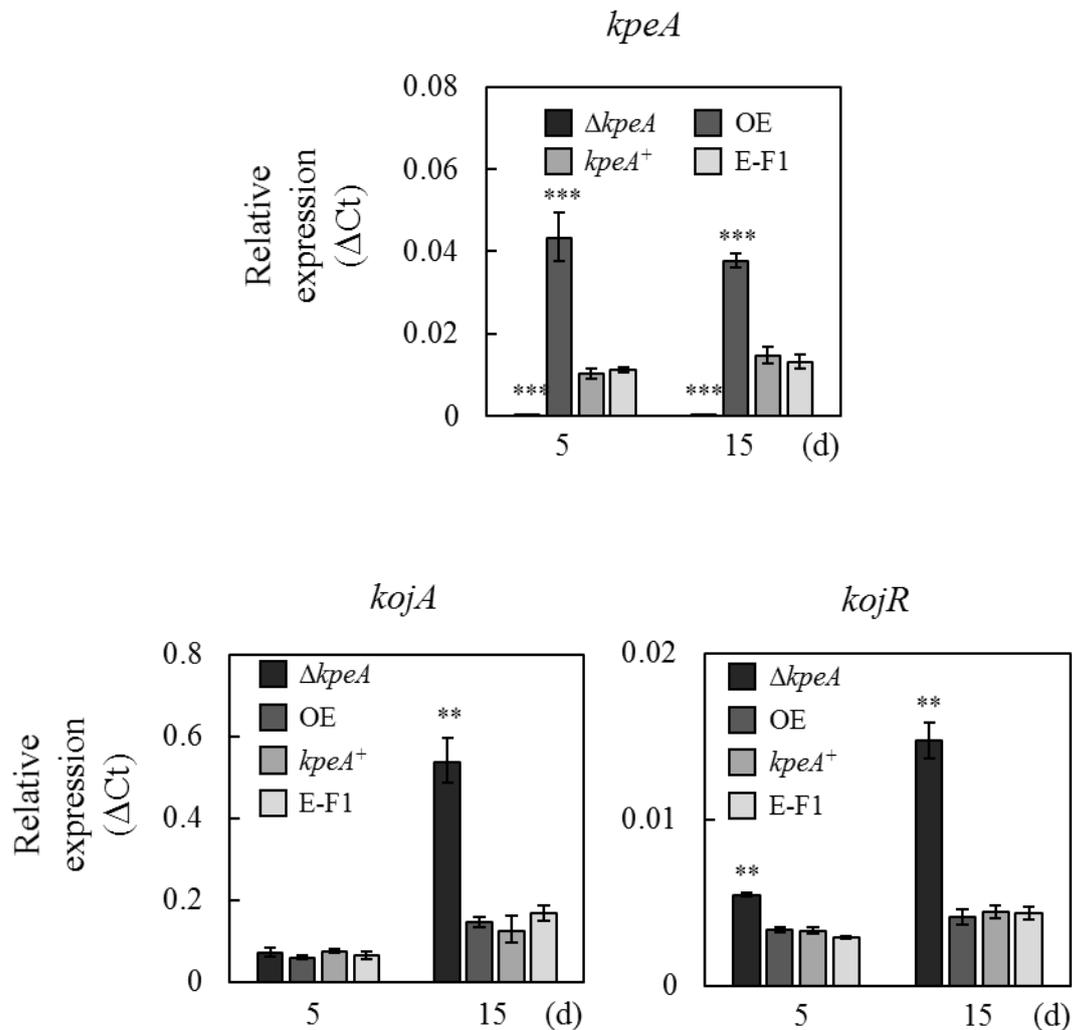


Fig. 14 qRT-PCR analyzes of *kojA*, *kojR*, and *kpeA* in $\Delta kpeA$, OE, *kpeA*⁺ and E-F1 strains. Values are presented as the means \pm S.D. (n=3). Asterisks indicate statistically significant differences between wild-type and mutants (**, P < 0.01; ***, P < 0.001). *A. oryzae* strains were statically cultured in KA liquid medium at 30 °C for 5–15 days, and total RNAs were extracted from each strain. *tef1* was used as a reference gene. Relative expression was calculated by the Δ Ct method. Primers and PCR conditions are shown in Table7.

第 2 項 *brlA* 及び *laeA* との関与

目的

前項で *KpeA* が KA 生産を転写レベルで制御することが示され、その制御に *LaeA* または *BrlA* が関与することが予想された。*BrlA* を含め分生子形成関連の制御因子が KA 生産に関与することは報告されていないが、*LaeA* は KA 生産を制御する(Oda et al., 2011)。本実験では、*brlA* と KA 生産の関与について調べるために、*brlA* 破壊株の KA 生産量の定量と分生子形成関連遺伝子破壊株のスクリーニング結果を見直した。また、*kpeA* と *laeA* の関係を調べるため、*kpeA* 破壊株における *laeA* 発現量と *laeA* 破壊株における *kpeA* 発現量を調べた。

方法

スクリーニング結果の見直し

第 1 章のスクリーニング実験で分生子形成の制御因子 *FlbB* 及び *FlbD*, *NsdD* の遺伝子破壊株の培地呈色を E-F1 株と比較して、遺伝子破壊による KA 生産への影響を調べた。

brlA 破壊株の KA 生産

brlA 破壊株の KA 生産量を前項と同様の方法で定量した。尚、培養日数は 10 日とした。

laeA 破壊株の *kpeA* 発現量及び *kpeA* 破壊株の *laeA* 発現量の定量

laeA 破壊株及び *kpeA* 破壊株を前項と同様の方法で培養し, total RNA 抽出及び逆転写を行い, それぞれの遺伝子発現について qRT-PCR による解析を行った。qRT-PCR 解析に使用したプライマーと PCR 条件は Table8 に示した。

Table 8 Primers used in qRT-PCR for *kojA*, *kojR*, and *kpeA*

primers	sequences (5'-3')	experiments	conditions
TMrefIFW	AGCCCATGTGTGGAGTCTT	qRT-PCR for <i>tef1</i>	95 °C for 5 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 5 s and 66.6 °C for 30 s
TMrefIRV	AACCGACTTGATAACTCCGACG	qRT-PCR for <i>tef1</i>	95 °C for 5 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 5 s and 66.6 °C for 30 s
AolaeA_qRT_fw	TGATACAAATCCGAGATCTGCAGG	qRT-PCR for <i>laeA</i>	95 °C for 30 s, followed by 40 cycles of 95 °C for 5 s and 63 °C for 40 s
AolaeA_qRT_rv	CGACTCAAATACTCTCCGAGACGAG	qRT-PCR for <i>laeA</i>	95 °C for 30 s, followed by 40 cycles of 95 °C for 5 s and 63 °C for 40 s
qrtlkpeA_fw	GCGCCAACTAAACGATAAGTTATGA	qRT-PCR for <i>kpeA</i>	95 °C for 5 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 5 s and 66.6 °C for 30 s
qrtlkpeA_rv	TGCCGGCATATCTCATAGTTTCATA	qRT-PCR for <i>kpeA</i>	95 °C for 5 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 5 s and 66.6 °C for 30 s

結果

分生子形成の制御因子が KA 生産に関与するかを調べるため, BrlA の制御因子 FlbB と FlbD, NsdD の遺伝子破壊株の KA 生産量を第 1 章のスクリーニングの結果から調べたところ, *brlA* の転写活性化因子である FlbB と FlbD の遺伝子破壊株の KA 生産量が増加し(Fig. 15A), *brlA* の強力なリプレッサーである NsdD の遺伝子破壊株の KA 生産量が減少していた(Fig. 2)。これらの結果から, *brlA* の制御因子を破壊すると KA 生産が変化することが分かった。さらに, KA 生産培地において液体表面培養した *brlA* 破壊株の KA 生産量を計測した結果, *kpeA* 破壊株以上に KA 生産量が増加した(Fig. 15B)。以上のことから, *brlA* が KA 生産を強力に抑制することが示され, KpeA は分生子形成と同様に KA 生産も *brlA* を介して制御することが示唆された。

次に, LaeA と KpeA の関与を調べるため, *laeA* 破壊株における KpeA の遺伝子発現と, *kpeA* 破壊株における LaeA の遺伝子発現を調べた。KA 生産培地で液体表面培養した *kpeA* 破壊株の *laeA* 発現量は E-F1 株と同程度であった(Fig. 16)。このことから KpeA は *laeA* の発現制御を介さずに KA 生産を制御していることが示された。さらに, *laeA* 破壊株における *kpeA* 発現量も E-F1 株と同程度であったことから(Fig. 16), *kpeA* と *laeA* は互いの制御に関わらないことが明らかになった。

以上の結果から, *kpeA* は *laeA* とは関わらず, *brlA* の発現制御を介して KA を制御することが示された。

考察

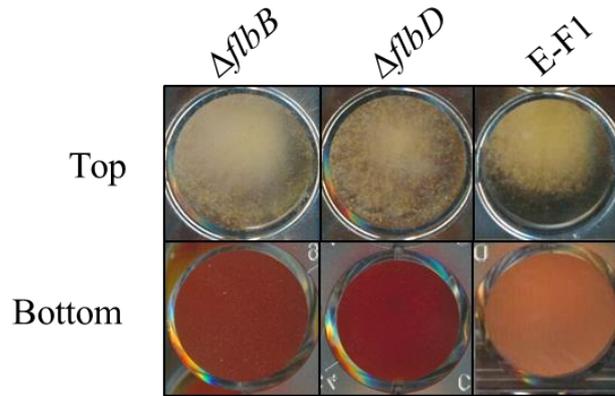
現在, KA 生産に関わる制御因子として *LaeA* と *HstD*, *MsnA* が報告されており(Oda et al., 2011; Kawauchi et al., 2013; Chang et al., 2011), その中でも *LaeA* は二次代謝制御の中心的な役割を担う(Brakhage, 2013)。*laeA* 破壊株は KA を生産しないことが報告されており(Oda et al., 2011), *KpeA* が *laeA* を介して KA を制御するならば, *KpeA* は *laeA* の遺伝子発現を促進すると予測されたが, 本実験の結果から *kpeA* 破壊株の *laeA* 発現量は E-F1 株と同程度であることがわかり, *KpeA* は *LaeA* による二次代謝の制御に関わらないことが示された。

BrlA は分生子形成の鍵因子としてよく研究されているが, 近年の研究から *A. fumigatus* において gliotoxin や fumigaclavine, endocrocin など一部の二次代謝産物の生産制御に関わることが報告されている(Lind et al., 2018)。本実験で *brlA* 破壊株を KA 生産培地で液体表面培養し, KA 生産量を定量したところ, 顕著に増加していたことから, *BrlA* は *A. oryzae* においても二次代謝を制御することが示された。また, *brlA* 破壊株が *kpeA* 破壊株以上の KA 生産量を示したことから(Fig. 15B), *KpeA* より強く KA 生産を抑制していると考えられた。

flbB や *flbD* を破壊すると *brlA* の遺伝子発現量が減少し(Ogawa et al., 2010), *nsdD* を破壊すると *brlA* の遺伝子発現が増加することが報告されている(Lee et al., 2016)。本実験の結果から *flbB*, *flbD* の遺伝子破壊株の KA 生産が増加し(Fig. 15), *nsdD* 破壊株の KA 生産が減少したことから(Fig. 2), 各遺伝子破壊株の KA 生産と *brlA* の遺伝子発現量は逆相関することが予想され, 分生子形成関連の制御因子が *brlA* の発現制御を介して KA 生産を制御することが示唆された。

これらの結果は *kpeA* 破壊株の KA 生産の増加が *BrlA* の遺伝子発現の減少に起因することを支持する結果であり, *KpeA* が *BrlA* の遺伝子発現の制御を介して, 間接的に KA 生産を制御することが予想された。

(A)



(B)

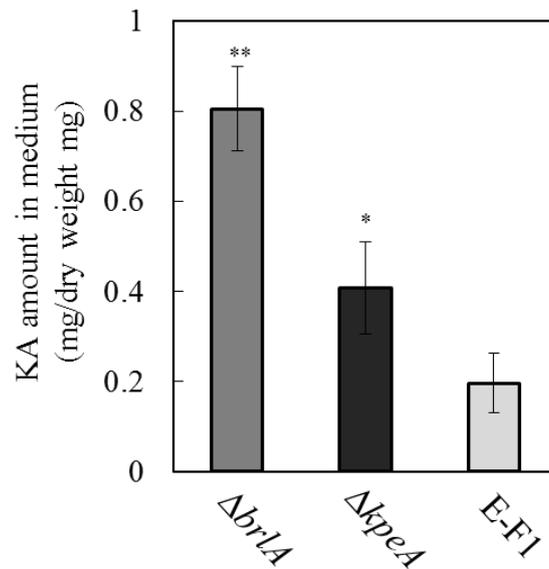


Fig. 15 KA production of disruption strain of *brlA* and its upstream regulator genes. (A) KA production of disruption mutants of *brlA* upstream regulator in screening experiment. (B) KA production of $\Delta brlA$ strain in KA medium. *A. oryzae* strains were statically cultured in KA liquid medium without uridine supplementation at 30 °C for 10 days. KA was quantified by HPLC. Values are presented as the means \pm S.D. (n=3) from independent experiments. Asterisks indicate statistically significant differences between wild-type and mutants (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$).

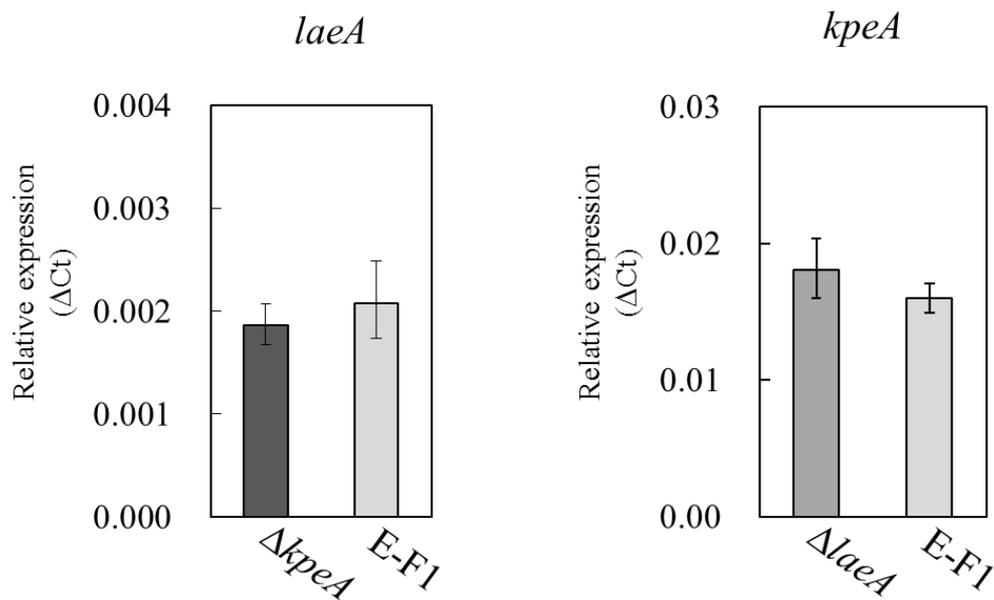


Fig. 16 Expression analysis of *kpeA* and *laeA* in each gene disruption strain
 (A) Expression of *laeA* in the $\Delta kpeA$ and E-F1 strains. The $\Delta kpeA$ and E-F1 strains were statically cultured in KA liquid medium at 30 °C for 10 days, and total RNA was extracted from each strain. *tefl* was used as the reference gene. Relative expression was calculated by the ΔC_t method. Values are presented as means \pm S.D. (n=3). (B) Expression of *kpeA* in the $\Delta laeA$, and E-F1 strains. Values are presented as means \pm S.D. (n=3). The $\Delta laeA$ and E-F1 strains were statically cultured in KA liquid medium at 30 °C for 10 days, and total RNA was extracted from each strain. *tefl* was used as the reference gene. Relative expression was calculated by the ΔC_t method.

第2節 ペニシリン生産への影響

目的

前節で *KpeA* が *BrlA* を介して KA 生産を制御していることが示唆されたが, KA 以外の二次代謝への関与は不明であった。そこで, *A. oryzae* が生産することが報告されており(Marui et al., 2010), 抗菌試験により簡易的に生産量の比較ができる PN について, その生産量と生合成遺伝子の発現を調べた。

方法

抗菌試験

kpeA 破壊株と E-F1 株の分生子 1×10^6 conidia を 3% Tryptic Soy Broth(TSB, Becton, Dickinson and Company)液体培地に接種し, 30 °C で液体表面培養した。培養 4~6 日目の培養液を回収し, 第3章 第1節と同じ滅菌フィルターに通すことで滅菌処理したものを抗菌試験の試料とした。*Geobacillus stearothermophilus* NBRC100862 を 3%TSB 液体培地に 1 白金耳接種し, 55 °C, 120 rpm で一晩振とう培養した。次に新たな 3%TSB 培地に一晩培養した *G. stearothermophilus* を 1 ml 接種し, OD600 が 0.5 になるまで 55 °C, 180 rpm で振とう培養した。OD600 が 0.5 になった TSB 液体培地を 3%TSB 寒天培地(30 g TSB, 30 g Agar per L)と等量混合し, 混合した培地 50 ml を角型シャーレ(栄研化学株式会社)に展開して抗菌試験用培地とした。抗菌試験用培地にオートクレーブ滅菌した抗生物質検定用ペーパーディスク

(ADVANTEC)を置き, *A. oryzae* の培養液から作製した試料 40 μ l を染み込ませ, 55 $^{\circ}$ C で一晚 *G. stearothermophilus* を培養した。

qRT-PCR 解析

3%TSB 液体培地で 4~6 日間液体表面培養した E-F1 株と *kpeA* 破壊株の菌体から, 第 2 章第 1 節と同様の方法で total RNA の抽出と逆転写を行った。また, qRT-PCR は第 3 章第 3 節と同様に行い, ターゲット遺伝子である *acvA* 及び *ipnA*, *aatA* のプライマーと PCR 条件は Table9 に示した。

Table 9 Primers used in qRT-PCR for *acvA*, *ipnA*, *aatA*, and *kpeA*

primers	sequences (5'-3')	experiments	conditions
TMiefIFW	AGCCCATGTGTGGAGTCTT	qRT-PCR for <i>tefI</i>	95 °C for 5 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 5 s and 66.6 °C for 30 s
TMiefIRV	AACCGACTTGATAACTCCGACG	qRT-PCR for <i>tefI</i>	95 °C for 5 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 5 s and 66.6 °C for 30 s
qrt_acvAfw	GGAGCCTTGAGGACAGTGAG	qRT-PCR for <i>acvA</i>	95 °C for 5 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 5 s and 66.6 °C for 30 s
qrt_acvArv	GGATGAGGTTTCTTGGCTTG	qRT-PCR for <i>acvA</i>	95 °C for 5 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 5 s and 66.6 °C for 30 s
qrt544-F	TTTGTCAAATTTGGGCTTTGAC	qRT-PCR for <i>ipnA</i>	95 °C for 5 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 5 s and 66.6 °C for 30 s
qrt544-R	AGATACtGGCCGTAGGAGACTG	qRT-PCR for <i>ipnA</i>	95 °C for 5 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 5 s and 66.6 °C for 30 s
qrt545-F	CTGGGAGGATGAGACAACTATC	qRT-PCR for <i>aatA</i>	95 °C for 5 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 5 s and 66.6 °C for 30 s
qrt545-R	GCGTGATCGTACATAATGTTGAA	qRT-PCR for <i>aatA</i>	95 °C for 5 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 5 s and 66.6 °C for 30 s
qrtkpeA_fw	GCGCCAACTAAACGATAAGTTATGA	qRT-PCR for <i>kpeA</i>	95 °C for 5 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 5 s and 66.6 °C for 30 s
qrtkpeA_rv	TGCCGGCATACTCATAAGTTTCATA	qRT-PCR for <i>kpeA</i>	95 °C for 5 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 5 s and 66.6 °C for 30 s

結果

kpeA 破壊株と E-F1 株を TSB 液体培地で液体表面培養し, *G. stearothermophilus* をテストバクテリアとした抗菌試験により培養液中の PN 量を比較した。その結果, E-F1 株に比べて培養 4~6 日の *kpeA* 破壊株の PN 生産量が少なかった(Fig. 17A)。さらに, 各株の PN 生合成酵素遺伝子 *acvA*, *ipnA*, *aatA* (Brakhage et al., 2004)の遺伝子発現量を測定したところ, 全ての培養日数で *kpeA* 破壊株の 3 遺伝子の遺伝子発現量が有意に減少していた(Fig. 17B)。この結果から, KpeA は PN 生産を転写レベルで活性化することが明らかになった。前節で KA 生産を転写レベルで制御することが明らかになっていることから, KpeA は複数の二次代謝の制御に関わることが示された。

考察

FadA は G-protein mediated pathway に所属する分生子形成の活性化因子であるが, 複数の二次代謝の制御にも関わり, PN については生合成酵素遺伝子の基底発現を抑制する (Krijgsheld et al., 2013; Hicks et al., 1997)。KpeA と FadA は分生子形成の正の制御因子であり, 共に遺伝子破壊により *brlA* の遺伝子発現が減少するにも関わらず, PN 生産の制御は反対であるため, 全ての分生子形成の制御因子が BrlA を介して PN を制御するのではないことが予想された。現在糸状菌における PN 生産の制御因子としての LaeA や VeA, PacC, HAP 複合体, FadA が報告されており(Bok and Keller, 2004; Kato et al., 2003; Keller et al., 1997; Brakhage et

al., 2004; Hicks et al., 1997), これらの制御因子と K_{peA} の制御関係を明らかにすることで PN 生産の制御機構の解明に近づけると考えられる。

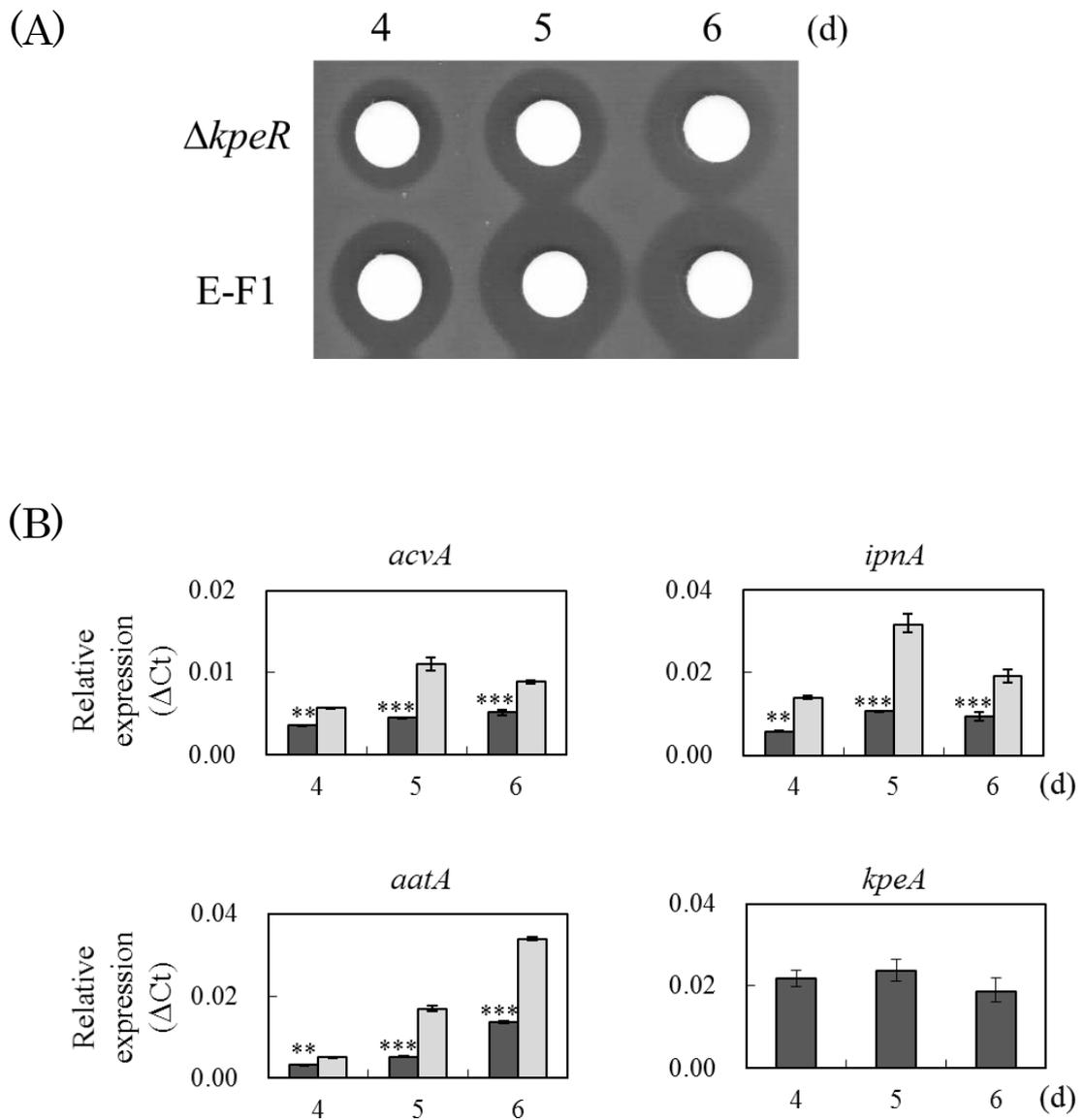


Fig. 17 Effect of *kpeA* disruption on PN production

(A) PN bioassay of the *ΔkpeA* and E-F1 strains. The *ΔkpeA* and E-F1 strains were statically cultured in TSB liquid medium at 30 °C for 4-6 days, and 40 μl of culture medium was used as the sample for PN bioassay. (B) qRT-PCR analysis of PN biosynthetic genes in the *ΔkpeA* and E-F1 strains. *tef1* was used as the reference gene. Values are presented as means ± S.D. (n=3).

第3節 シクロピアゾン酸生産への影響

目的

本章の第1節と第2節の結果から、KpeAがKA生産とPN生産の制御に関わることが示され、KpeAが複数の二次代謝を制御することが明らかになった。KAとPNの他に、*A. oryzae*が生産する二次代謝産物として小胞体Ca²⁺-ATPaseの阻害作用を有するシクロピアゾン酸(CPA)が知られている(Tokuoka et al., 2008; Kato et al., 2011)。本実験ではKpeAとCPA生産の関与を調べることを目的として、CPA生産株である*A. oryzae* NBRC4177株を親株として*kpeA*破壊株を作製し、CPA生産量を測定した。

方法

CPA生産麹菌における*kpeA*破壊株(AKTF422株)の作製

CPA生産株である*A. oryzae* NBRC4177株から造成された*A. oryzae* AKp4177株($\Delta ku70::ptrA^+$, $\Delta pyrG$)(Tokuoka et al., 2008)を宿主として*kpeA*破壊株を作製した。形質転換の方法は第3章第1節と同様に行い、宿主に導入したDNAフラグメントはライブラリー株の*kpeA*破壊株からゲノムPCRにより増幅した $\Delta kpeA::pyrG$ 配列を使用した。目的の遺伝子座へのDNAフラグメントの導入はPCRによって確認した。本実験で使用したプライマーとPCR条件はTable10に示した。

CPA 生産量の検討

Czapek yeast (autolysate) extract (CYA, 30 g sucrose; 5 g yeast extract; 1 g KH_2PO_4 ; 3 g NaNO_3 ; 0.5 g KCl; 0.5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ per L)液体培地に上記の方法で作製した CPA 生産株の *kpeA* 破壊株と遺伝子的なバックグラウンドを揃えた対照株 AK4177 株($\Delta ku70::ptrA^+$) (Tokuoka et al., 2008)の分生子 1×10^5 conidia を接種し, 30 °C で 7 日間静置培養した。サンプル調製と HPLC による分析は徳岡らの方法に従って行った(Tokuoka et al., 2015)。また, 乾燥菌体重量の測定は第 4 章第 1 節と同様に行った。

Table 10 Primers used in generation of $\Delta kpeA$ strain in CPA-producing *A. oryzae* strain

primers	sequences (5'-3')	experiments	conditions
BRTF422CL	ATGGGACTTGTGAGGAAGAAA	Amplification of TF fragment for AKTF422	94 °C for 2 min, followed by 30 cycles of 98 °C for 10 s, 58 °C for 30 s and 68 °C for 210 s
BRTF422CR	CGACGTATCACACAGTCTCTC	Amplification of TF fragment for AKTF422	94 °C for 2 min, followed by 30 cycles of 98 °C for 10 s, 58 °C for 30 s and 68 °C for 210 s
pyrG_inside_fw	TCAAAAGCAGGCAAAAAGCCAGGC	PCR for confirmation of AKTF422	94 °C for 2 min, followed by 30 cycles of 98 °C for 10 s, 60 °C for 30 s and 68 °C for 150 s
TFfrag_out_rv	GTCCAAGACTCGACGGCTTGTCTGA	PCR for confirmation of AKTF422	94 °C for 2 min, followed by 30 cycles of 98 °C for 10 s, 60 °C for 30 s and 68 °C for 150 s

結果及び考察

kpeA と CPA 生産の関与を調べるため、CPA 生産菌である *A. oryzae* NBRC4177 株を宿主として *kpeA* 破壊株(AKTF422 株)を作製した。形質転換の確認は PCR で行い、ゲノム上の目的位置に DNA 断片が導入されていることを確認した(Fig. 18)。対照株である AK4177 株と AKTF422 株を CYA 液体培地で表面培養し、培養 7 日目の CPA 生産量を比較したところ、AKTF422 株の CPA 生産量が AK4177 株の 1/3 以下に減少していた(Fig. 19)。この結果から、KpeA は CPA 生産に関わることが示され、KpeA が CPA と KA, PN の 3 つの二次代謝産物の生産制御に関わることが明らかになった。

CPA 生産の制御に関わる制御因子は *A. flavus* において LaeA と VeA が報告されているが(Kale et al., 2008 ;Duran et al., 2007)、本章第 1 節の結果から KpeA と LaeA が相互に関与しないことが示されているため、CPA 生産の制御においても KpeA と LaeA は関与しないと考えられる。また、LaeA と複合体を形成する VeA も関わる可能性は低いと考えられる。一方で、当研の徳岡は BrlA が CPA 生産に関わり、*brlA* を破壊すると CPA 生産量が顕著に減少することを明らかにしている(unpublished data)。このことから、KpeA は KA 生産の制御と同様に CPA 生産も BrlA を介して制御すると考えられた。

Aspergillus 属が生産するマイコトキシンは農作物の汚染や病原性に関わることから(Keller et al., 2005)、その制御機構の解明は重要視されており、*A. nidulans* や *A. fumigatus*, *A. flavus* にお

ける *kpeA* のホモログ遺伝子を機能解析することで, *Aspergillus* 属の二次代謝制御機構の解明に繋がると考えられた。

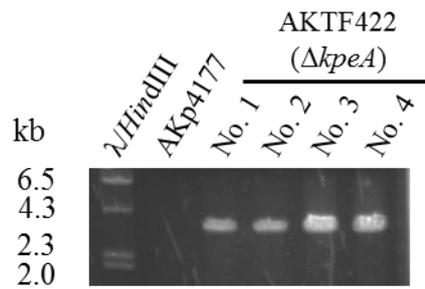


Fig. 18 PCR for confirmation of gene disruption in candidate strains of *kpeA* disruption strain. PCR-amplified fragments were generated with primers (Table10). AKTF422 No.1-4 strains were confirmed to harbor disruption at AO090003001186 (*kpeA*) loci.

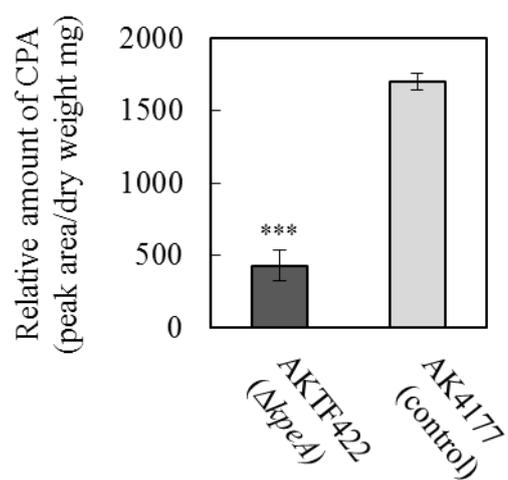


Fig. 19 CPA production by the AKTF422 ($\Delta kpeA$) and AK4177 (control strain). Strains were statically cultured in CYA liquid medium for seven days. CPA detection was performed by HPLC. Values are presented as the means \pm S.D. (n=3). Asterisks indicate statistically significant differences between wild-type and mutants (***, $P < 0.001$).

第 5 章 KpeA の Zn(II)₂-Cys₆ モチーフの解析

緒言

典型的な Zn(II)₂-Cys₆ 型制御因子には N 末端から順に Zn(II)₂-Cys₆ モチーフ, リンカー領域, 二量体化ドメイン, Middle homology region (MHR) と複数のモチーフが並び (Schjerling and Holmberg, 1996), ほとんどの Zn(II)₂-Cys₆ 型制御因子がこの構造である。第 2 章で KpeA の DNA 結合モチーフがアミノ酸配列の中央に存在し, 二量体化ドメインと考えられる coiled-coil がモチーフの上流に予測され, 一方で MHR は予測されなかったことから, 典型的な制御因子とは構造が異なることが予想された。*A. oryzae* の Zn(II)₂-Cys₆ 型制御因子 186 個の DNA 結合モチーフの位置を調べたところ, 97% の制御因子がモチーフを N 末端近傍に持つが, 配列中央に持つのは KpeA を含めて 4 個だけであったことから, このような構造が特徴的であることが分かる。KpeA と同様に DNA 結合モチーフをアミノ酸配列の中央に持つ 3 個の制御因子について, 他の *Aspergillus* 属のホモログ遺伝子を調べたところ, Gene ID AO090038000379 の遺伝子は *A. nidulans* の SonC のホモログ遺伝子であった (Lerson et al., 2014)。SonC は特徴づけられた制御因子であるが, アミノ酸配列中央に存在する DNA 結合モチーフの解析はされておらず, 機能を保持しているかは不明であった。KpeA と SonC を含めたこれらの制御因子の構造は非常に珍しいことから, Zn(II)₂-Cys₆ モチーフに似た配列が偶然存在するだけで機能しないことが懸念された。そこで本章では KpeA の Zn(II)₂-Cys₆ モチーフ内全ての Cys 残基を Ala 残基に置換した変異株を作製し, その形質からモチーフが機能を有するかを確認した。

目的

KpeA の Zn(II)₂-Cys₆ モチーフが機能するかを確認するため、モチーフ内の全ての Cys 残基を Ala 残基に置換した変異株を作製し、その形質を評価することを目的とした。

方法

Ala 置換株(*kpeA*_{Ala})の作製

RIB40 株のゲノム DNA を鋳型とした PCR から *kpeA* の ORF を含む DNA 断片を取得し、線状化した pUC19 に In-Fusion クローニングキット(Takara Bio)により挿入して、プラスミド *pkpeA* を作製した。*pkpeA* を鋳型に PCR を行い、線状化した *pkpeA* にゲノム PCR により増幅した *pyrG* を挿入し、プラスミド *pPkpeA* を作製した。*kpeA* の Zn(II)₂-Cys₆ モチーフ内の Cys 残基をコードするコドン(TGT または TGC)を Ala 残基のコドン(GCT)に置換した配列を含む 335 bp の DNA 断片を Integrated DNA Technologies 株式会社に委託して作製し、PCR により線状化した *pPkpeA* に挿入し、プラスミド *pPKC6A* を作製した。*pPKC6A* を鋳型とした PCR により Ala 置換した *kpeA* と *pyrG* の配列を含む DNA 断片を取得し、E-F1 *pyrG* 株に形質転換を行った。形質転換は第 3 章第 1 節と同様に行い、形質転換体の確認はシーケンス解析によって行った。本実験で使用したプライマーと PCR 条件は Table 11 に示した。

形質の確認

kpeA_{Ala} 株の形質として平板培養での形態と分生子数, KA 生産量を観察した。平板培養は Malt 寒天培地で行い, 培養方法と分生子数の計測は第 3 章第 2 節と同様の方法で行った。KA 生産量は KA 検出培地で評価し, 培養は第 1 章と同様の方法で行った。

Table 11 Primers used in generation of *kpeA*_{Ala} strain

primers	sequences (5'-3')	experiments	conditions ^a
pkpeA_F2	CGAGGTGAAACACGTAGCATCCA	Amplification of pkpeA insert and TF fragment for KpeA _{Ala}	94 °C for 2 min, followed by 30 cycles of 98 °C for 10 s and 68 °C for 240 s
pkpeA_R2	GGCCACTTCGTCTCGACAGAAAT	Amplification of pkpeA insert and TF fragment for KpeA _{Ala}	94 °C for 2 min, followed by 30 cycles of 98 °C for 10 s and 68 °C for 240 s
pUC19_inv_pkpeA_F1	CGAGACGAAATGGCCCTAAAGTGTAAGCCCTGGGGTGGC	Linearization of pUC19 for generation pkpeA	94 °C for 2 min, followed by 30 cycles of 98 °C for 10 s, 63 °C for 30 s and 68 °C for 60 s
pUC19_inv_pkpeA_R1	ACGTGTTTCA CCTCGCCA ACTTAATCGCCTTGCAGCAC	Linearization of pUC19 for generation pkpeA	94 °C for 2 min, followed by 30 cycles of 98 °C for 10 s, 63 °C for 30 s and 68 °C for 60 s
kpeA_inv_pyrG_F1	TTCTGAGGTGCAGTTGGCTCCGTTCTTTTACTCCCGGAAA	Linearization of pkpeA for generation pPkpeA	94 °C for 2 min, followed by 30 cycles of 98 °C for 10 s and 68 °C for 300 s
kpeA_inv_pyrG_R1	TAGCAATAGCCCAATGTTCTCGACTGGGTGATATCTGGG	Linearization of pkpeA for generation pPkpeA	94 °C for 2 min, followed by 30 cycles of 98 °C for 10 s and 68 °C for 300 s
kpeA_C6AR_inv_F2	CTGACTACGAGCGTCATATCTCTTIG	Linearization of pPkpeA for generation pPKC6AR	94 °C for 2 min, followed by 30 cycles of 98 °C for 10 s and 68 °C for 300 s
kpeA_C6AR_inv_R2	ATTTTGGCACTGCTTCCGAACCT	Linearization of pPkpeA for generation pPKC6AR	94 °C for 2 min, followed by 30 cycles of 98 °C for 10 s and 68 °C for 300 s
kpeA_868_F1	CCTGTCCCAATGAAAGAGCCTTC	Amplification of Zn(II)-Cys6 motif region in KpeA _{Ala}	94 °C for 2 min, followed by 30 cycles of 98 °C for 10 s and 68 °C for 30 s
kpeA_C6ARreplace_R1	GACGCTCGTAGTCAGCTTTCCAA	Amplification of Zn(II)-Cys6 motif region in KpeA _{Ala}	94 °C for 2 min, followed by 30 cycles of 98 °C for 10 s and 68 °C for 30 s
pKC6AR_Seq_ch_F1	GGTCACTCTCACTACCTCT	Sequence analysis for TF confirmation of KpeA _{Ala}	94 °C for 2 min, followed by 30 cycles of 98 °C for 10 s and 68 °C for 30 s

^a Conditions for sequence analysis were not described.

結果及び考察

kpeA の Zn(II)₂-Cys₆ モチーフの機能を確認するため、モチーフ内の Cys 残基を Ala 残基に置換した変異株(*kpeA*_{Ala} 株)を作製し、その形質の比較を行った。*kpeA*_{Ala} 株及び *kpeA* 破壊株、E-F1 株を Malts 寒天培地に接種し、培養 4 日目の形態を比較したところ、*kpeA*_{Ala} 株は *kpeA* 破壊株と同様に気中菌糸の異常伸長と分生子数の減少が観察された。各株を Malts 寒天培地に播種し、培養 3 日目と 7 日目の分生子数を計測したところ、E-F1 株が培養 3 日目と 7 日目にそれぞれ 1.5×10^8 conidia/plate と 2.3×10^8 conidia/plate の分生子を形成したのに対し、*kpeA*_{Ala} 株は 4.9×10^7 conidia/plate と 1.6×10^8 conidia/plate の分生子を形成し、*kpeA* 破壊株と同様に *kpeA*_{Ala} 株の分生子数が減少していた。また、KA 検出培地にて平板培養し、培養 4 日目における各株の培地呈色を比較したところ、E-F1 株は呈色を示さなかったが、*kpeA*_{Ala} 株と *kpeA* 破壊株は赤色呈色を示し、生産量が増加していた。*kpeA*_{Ala} 株の平板培養時の形態と KA 生産が *kpeA* 破壊株と同様であったことから、*kpeA*_{Ala} 株が発現する KpeA タンパク質は機能していないと考えられ、Zn(II)₂-Cys₆ モチーフがタンパク質の機能に必須であることが示された。従って、KpeA は典型的な Zn(II)₂-Cys₆ 型制御因子と異なる構造をしているが、その機能にはモチーフが重要であり、KpeA が DNA 結合型の制御因子であることを示唆している。

第 2 章の考察にも書いたが、*A. oryzae* の 97% の Zn(II)₂-Cys₆ 型制御因子は典型的な構造である N 末端近傍にそのモチーフを持つが、アミノ酸配列中央にモチーフを持つ制御因子は非常に少ない。そのうちの 1 つである SonC は *A. nidulans* において特徴づけされた制御因子である

が(Lerson et al., 2014), Zn(II)₂-Cys₆ モチーフの解析はされておらず, 機能を保持しているかは不明であった。従って, 本研究はアミノ酸配列中央にモチーフを持つ Zn(II)₂-Cys₆ 型制御因子のモチーフ機能を初めて確認した報告となった。*S. cerevisiae* の Gal4p や Leu3p, *A. nidulans* の AlcR など, いくつかの Zn(II)₂-Cys₆ 型制御因子は X 線結晶構造解析によりタンパク質の構造が明らかにされているが(MacPherson et al., 2006), これらの制御因子と構造が異なることが予想される KpeA や SonC のような制御因子は DNA との結合様式も異なる可能性がある。KpeA の構造を解析することで DNA との結合様式が明らかになると考えられる。

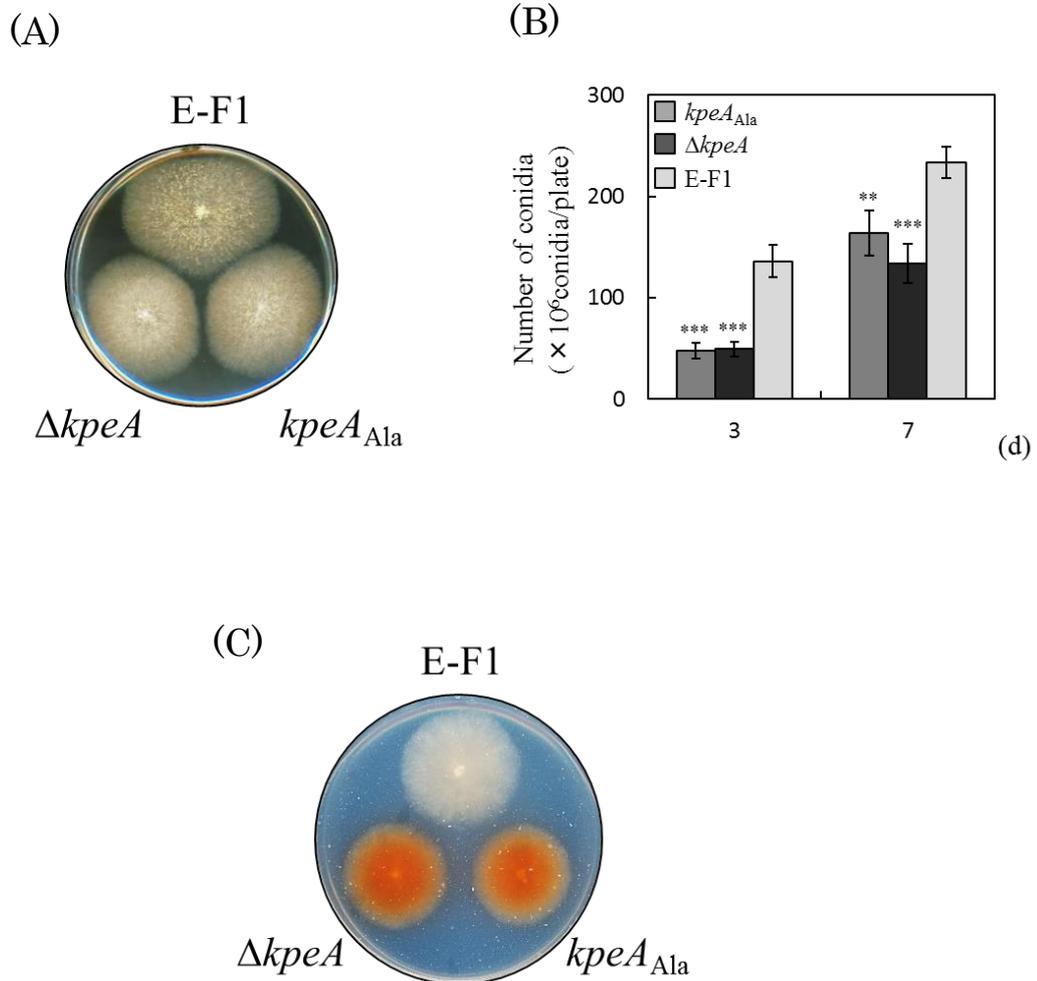


Fig. 20 Phenotype of $kpeA_{Ala}$ strain expressing the alanine-substituted mutant of $Zn(II)_2$ -Cys₆ motif. (A) Colonies of the $\Delta kpeA$, $KpeA_{Ala}$ (expressing a $KpeA$ mutant protein), and E-F1 strains on malt medium. Strains were point inoculated and cultured at 30 °C for four days. (B) Number of conidia formed by the $\Delta kpeA$, $kpeA_{Ala}$, and E-F1 strains. Conidia of each strain were spread on malt medium at 30 °C for 3 and 7 days, and harvested conidia from each strain were counted. Values are presented as the means \pm S.D. (n=3) from independent experiments. (C) KA production by the $\Delta kpeA$, $KpeA_{Ala}$, and E-F1 strains. Strains were point inoculated on KA-detection agar plate and cultured at 30 °C for four days

第6章 醸造環境における形態及び物質生産への影響

緒言

A. oryzae は日本の醸造食品の製造に利用される糸状菌であり、穀物に生育させた麴として使用される。清酒製造においては精米した米を蒸煮し放冷後、*A. oryzae* の分生子を含む種麴を撒き、数時間ごとの攪拌作業などを経て 43~48 時間程で米麴が造られる。この作業を製麴といい、一連の作業により品温は種切り時の 32 °C 程度から 42 °C 程度まで上昇するほか、乾燥が進むことが知られる(村上, 1986)。*A. oryzae* は製麴中に高温や乾燥などの、通常の培養では晒されることのないストレスに晒されることで、液体培養では生産しない酵素を生産する(Obata et al., 2004; Hata et al., 1998)。そのため、製麴のような固体培養と、平板培養や液体培養では、*A. oryzae* の代謝や酵素生産などは、大きく異なると考えられている。しかし、固体培養における *A. oryzae* についての分子レベルの研究は遅れており、先行している平板培養や液体培養での知見を、醸造現場に還元できる研究が求められている。

醸造現場で利用される *A. oryzae* には種麴製造において分生子を多量に着生することや、製麴時にデフェリフェリクリシン(DF)などの不要な二次代謝産物を生産しないことがあるため、*A. oryzae* の分生子形成と二次代謝の制御機構の解明は産業的にも重要であるが、固体培養においてはほとんど知見がない。第3章と第4章において KpeA が平板培養や液体培養で分生子形成と二次代謝を制御したため、種麴製造や製麴においても KpeA がそれらの制御に関わると考えた。本章では種麴製造と製麴における KpeA の役割を明らかにすることを目的に、*kpeA* 破

壊株と高発現株を用いて種麴製造と製麴を行い, 種麴と米麴の状貌や遺伝子発現解析を行った。

第1節 種麴への影響

目的

種麴製造において *A. oryzae* には多量の分生子を着生することが求められる。第3章において平板培養時に KpeA が分生子形成を促進することが明らかになったため、種麴製造においても KpeA が分生子形成に関わることが予想された。そこで、種麴製造における KpeA の役割を明らかにすることを目的に、*kpeA* 破壊株と高発現株を用いて種麴を製造し、その状貌の観察と *kpeA* 及び *brlA* の遺伝子発現解析を行った。

方法

種麴製造

玄米(2%精白米)を4℃で一晩水に浸漬し、2時間の水切り後、30分間蒸した。蒸米を室温まで冷まし、生米換算で30g相当量を300ml容三角フラスコに入れ、綿栓をしてオートクレーブで121℃で15分間滅菌した。その後、Potato Dextrose Agar 培地(Becton, Dickinson and Company)で30℃、7日培養した各株のコロニーの一部を寒天培地ごと5mm角に切り出し、クリーンベンチ内で上記の三角フラスコ内の玄米に接種し、35℃の恒温機で培養した。12時間、18時間及び24時間で手入れを行い、24時間以降は30℃で5日間静置した後、出麴した(Fig. 21)。種麴1g当たりの分生子数はトーマ氏血球計を用いて計数した。また、種麴の状貌は実体顕微鏡(SZM-ILLD; Olympus Corporation)を用いて観察した。

種麴における *brlA* 遺伝子発現量の解析

種麴からの total RNA の抽出は赤尾らの方法で行い(Akao et al., 2002), チオシアン酸グアニジン緩衝液として ISOGEN を使用した。逆転写及び qRT-PCR 解析は第 3 章第 3 節と同様に行い, *brlA* 及び *kpeA* のプライマーも第 3 章第 3 節と同様のものを使用した(Table6)。

種麴の小規模製造方法

原料: 玄米30 g (2%精白米)

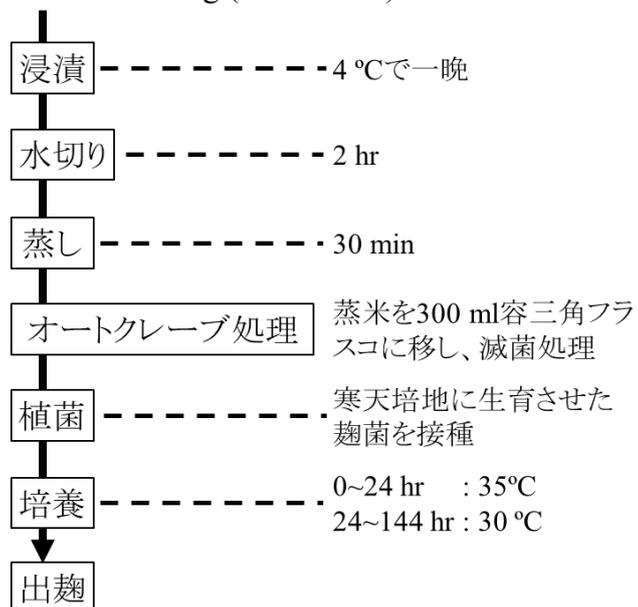


Fig. 21 Method diagram of *koji* seed making.

結果

KpeA は平板培養において分生子形成に関わることが示されているため、清酒醸造における分生子調製の工程である種麴の製造においても重要な役割を果たすと考え、その機能解析を行った。初めに、*kpeA* 破壊株、高発現株及び E-F1 株を用いて種麴を製造し、その状貌を比較した(Fig. 22A)。すべての株において種切り後 12 時間で、肉眼で確認できる菌糸が米表面に観察されたが、分生子形成については高発現株及び対照株で 48 時間後、破壊株では 72 時間後に観察された(Fig. 20A)。種切り後 144 時間後の出麴時では、すべての株で旺盛に分生子形成が観察されたが、*kpeA* 破壊株は高発現株及び E-F1 株と比較して気中菌糸が非常に長く、分生子が少なかった。分生子数を計数したところ、E-F1 株と *kpeA* 高発現株は約 3.0×10^9 conidia/g-koji と一般的な種麴(8×10^8 conidia/g-koji)以上であり、種麴として十分な量の分生子を形成したが、*kpeA* 破壊株は E-F1 株の約 1/3 量であった(Fig. 22B)。

麴菌の分生子形成は転写因子 BrlA の発現がトリガーとなることが知られており(Adams et al., 1998), 平板培養において KpeA が BrlA の発現を促進することが第 3 章で示された。そこで、種麴製造においても KpeA が平板培養と同様に *brlA* の遺伝子発現を制御しているかを調べた。種麴において分生子形成が進む 24~72 時間における *kpeA* の遺伝子発現を調べたところ、E-F1 株においては 24 時間で既に発現し、72 時間までに発現が誘導されることが確認された(Fig. 21)。*kpeA* 高発現株では *kpeA* は構成的で強いプロモーターにより発現していることから、E-F1 株の 72 時間時点よりも 2 倍ほど強い発現が維持された(Fig. 23)。次に *brlA* の遺伝子発現

を調べた結果、すべての株において、48時間で一時的に強く誘導される特徴を示し、48時間における発現強度は *kpeA* 破壊株では E-F1 株より弱く、*kpeA* 高発現株では高かった(Fig. 21)。これらの結果から、*kpeA* は平板培養と同様に *brlA* の発現促進に関わり、種麴製造では、48時間における一時的な *brlA* の高発現と、それに伴う分生子形成に関わっていることが明らかになった。

考察

Aspergillus 属糸状菌において、分生子形成は BrlA とその下流の AbaA, WetA によるシグナルカスケードにより誘導され(Adams et al., 1998)、その中で BrlA の遺伝子発現はフィードバック制御を受ける(Tao et al., 2011)。本実験でも、種切り48時間後に *kpeA* の発現に応じて *brlA* が誘導された後は、*kpeA* の発現とは関係なく72時間後に *brlA* の発現が低下したことから(Fig. 21)、KpeA が関与しないフィードバックによる発現抑制が起きたと考えられる。*brlA* による分生子形成のシグナルカスケードの初期は頂のうの成熟が進むことから、発現初期の *brlA* の発現が弱いと、頂のうが十分に形成されない、もしくは未熟となる可能性がある。そのため、BrlA の遺伝子発現が低いことが *kpeA* 破壊株において分生子数が少ない原因と考えることができる。種麴における頂のうの計数は困難であり確認はできなかったものの、平板培養において *kpeA* の破壊株は頂のうの数が少なく、サイズも小さいことが分かっており、種麴においても同様の現象が理由で分生子数が減少したと考えられる。

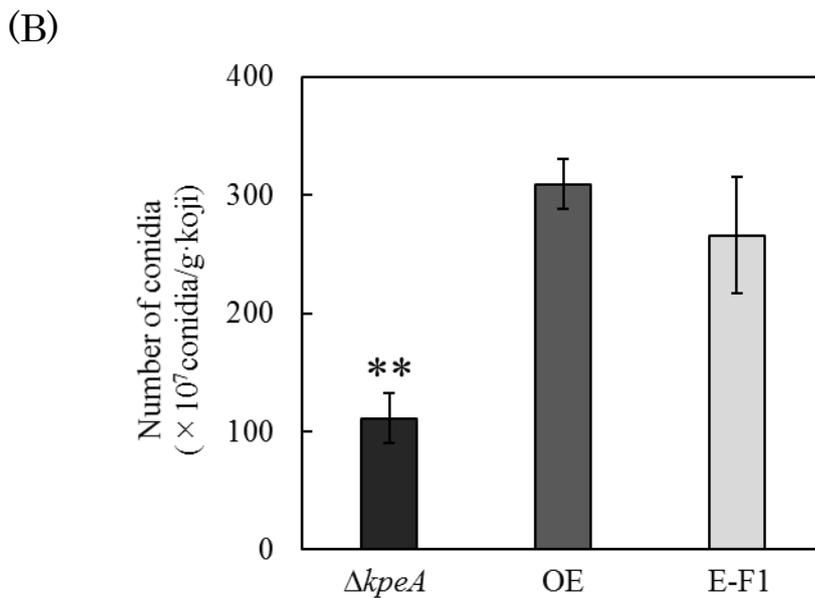
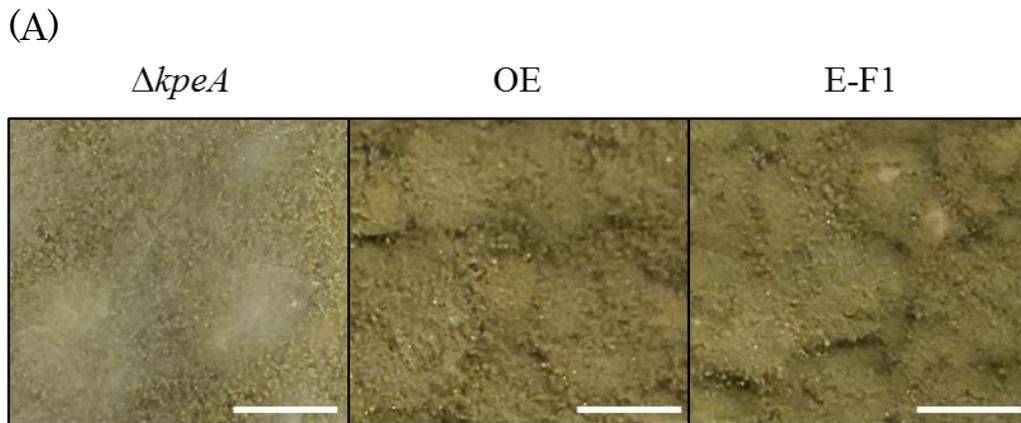


Fig. 22 Effect of disruption and overexpression of the *kpeA* gene on conidiation in seed *koji*.
 (A) Phenotypes of *ΔkpeA*, OE, and E-F1 strains cultured on brown rice for 6 days. Incubation temperature was changed from 35 °C to 30 °C at 24 hr. Scale bars showed in each panel are 1 cm.
 (B) Number of conidia formed by *A. oryzae* strains in 1 g of the seed *koji*. Values are presented as the means \pm S.D. (n=3). Asterisks indicate statistically significant differences between wild-type and mutants (**, P < 0.01).

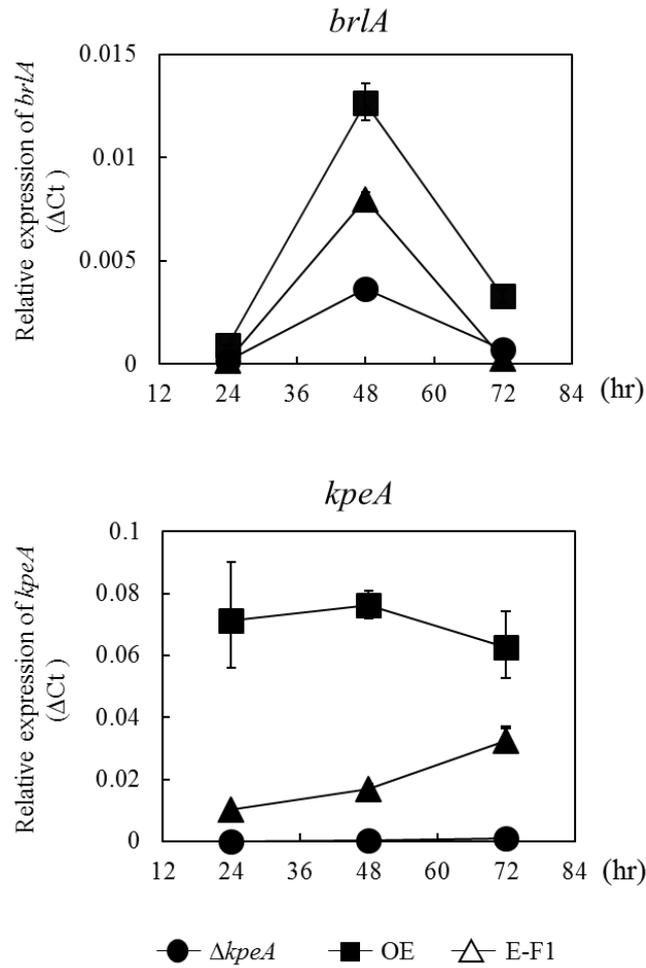


Fig. 23 qRT-PCR analyzes of *brlA*, and *kpeA* in $\Delta kpeA$, OE, and E-F1 strains during seed *koji* making.

Values are presented as the means \pm S.D. (n=3). P values for comparison between $\Delta kpeA$ and E-F1 strain strain were lower than 0.05 in; *brlA*, 48 h; *kpeA*, all time points. P value for comparison between OE and E-F1 strain was lower than 0.05 in; *brlA*, 48 h; *kpeA*, all time points. *tefl* gene was used as a reference gene. Relative expression was calculated by the ΔC_t method. Primers are shown in Table 6.

第2節 米麴への影響

第1項 米麴の観察と酵素活性

目的

前項において *KpeA* が種麴製造において発現していることが確認され、分生子形成を制御することが示されたことから、製麴においても機能していると考えられた。また、近年の研究から *brlA* の転写活性化因子 *FlbC* が固体培養での酵素生産に関わることが示され(Tanaka et al., 2016), *FlbC* と同様に *brlA* の転写活性化因子である *KpeA* も固体培養での酵素生産に関わることが考えられた。

そこで、本実験では *kpeA* 破壊株と高発現株を用いて製麴し、各株の米麴の状貌と各種酵素活性について調べた。

方法

製麴

恒温恒湿機エンピロス KCL-2000W (東京理化器機株式会社)を用いて小規模製麴を行った。精米歩合 70%の一般米を室温で3時間浸漬し、2時間の水切り後、25分間蒸した。生米換算で 50 gの蒸米に約 4.0×10^7 個の分生子になるように種麴を加えてよく攪拌して種切りとし、恒温恒湿機に入れた。製麴工程中の温度及び湿度経過は Fig. 25 の通りとした。手入れは種切り後 12 時間に切り返し、18 時間に盛、24 時間に仲仕事、36 時間に仕舞仕事を行い、46 時間で出麴し

た(Fig. 24)。また、出麴した米麴の一部を 35 °C で 72 時間まで培養した。米麴の状貌は前節と同様の方法で観察した。

米麴の酵素活性測定及び麴菌体量測定

α -アミラーゼ及び酸性プロテアーゼの活性測定は国税庁所定分析法に従って行った(日本醸造協会, 1993)。グルコアミラーゼ及び α -グルコシダーゼの活性測定は糖化力分別定量キット(キッコーマンバイオケミファ株式会社)を用いて行った。米麴中の麴菌菌体量の測定は藤井らの方法により測定した(藤井ら, 1992)。

小規模製麹方法

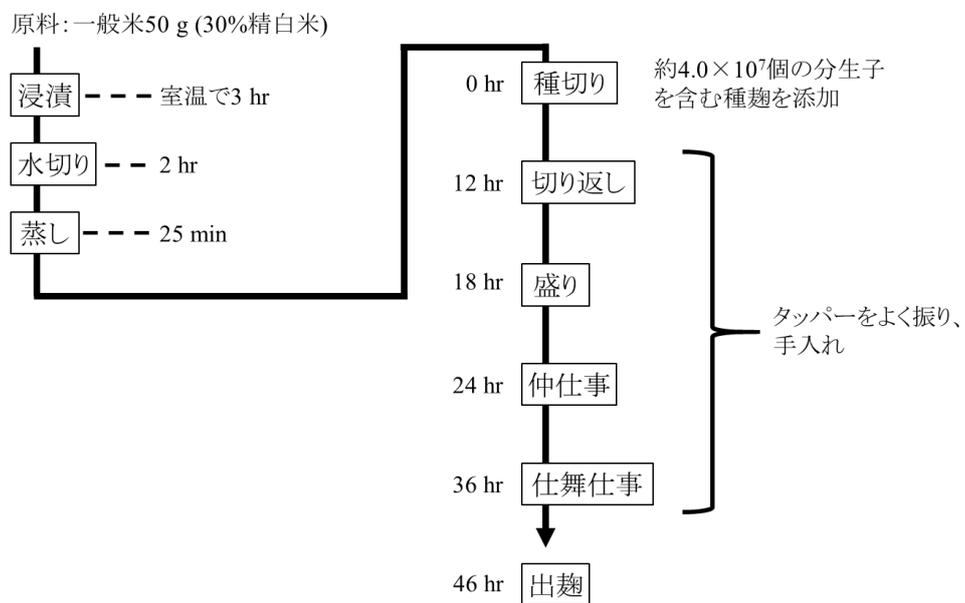


Fig. 24 Method diagram of *koji* making.

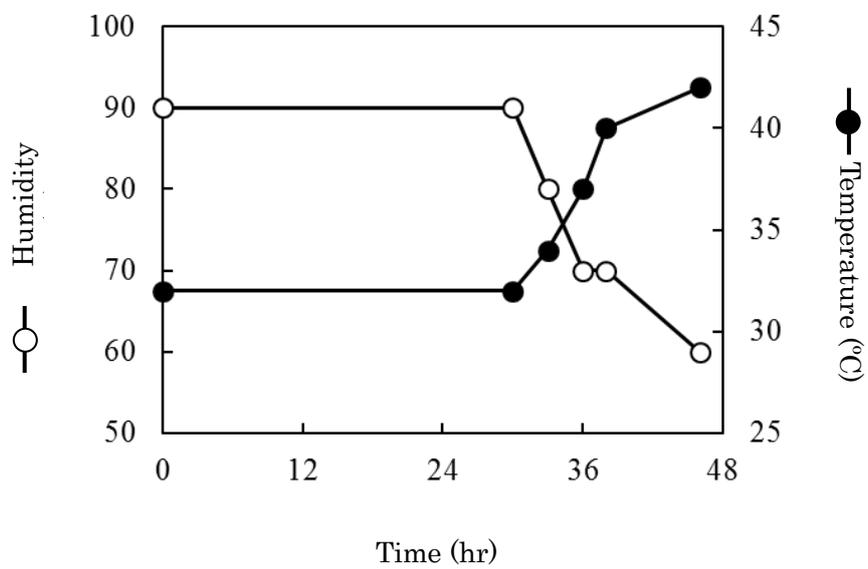


Fig. 25 Time course of humidity and temperature during *koji* making. Humidity and temperature were regulated by environmental chamber KCL-2000W (Tokyo Rikakikai Co, LTD).

結果及び考察

製麴における *KpeA* の役割を明らかにするために、種切り後 46 時間を出麴した米麴と、分生子形成させることを目的に出麴後に 35 °C で 72 時間まで培養した米麴において、分生子形成への影響を調べた。E-F1 株では種切り後 72 時間において黄緑色の分生子を形成したのに対して、*kpeA* 高発現株では種切り後 46 時間後の時点で既に分生子を形成していた(Fig. 26)。一方、*kpeA* 破壊株では、72 時間後においても分生子が形成されなかった(Fig. 26)。以上より *kpeA* は製麴工程においても分生子形成を促進する機能を有していることが確認された。また、種麴製造では観察されなかった高発現株における分生子形成の促進が観察された。これは、種麴製造が分生子形成を促進する培養環境であるのに対して、清酒醸造の製麴工程は手入れなどを頻繁に行うため、分生子形成が抑えられる培養環境であることが要因として考えられる。これら培養条件の違いに加えて、使用している米の精米歩合も異なるため、栄養条件も大きく異なる。*kpeA* 高発現の影響が異なる理由はこれらの条件の違いであろうと考えられる。

次に、*kpeA* 破壊株と高発現株の米麴の各種酵素活性について調べた。種切り後 46 時間を出麴した各株の米麴の各種酵素(α -アミラーゼ及びグルコアミラーゼ、 α -グルコシダーゼ、酸性プロテアーゼ)の酵素活性を調べたところ、破壊株のグルコアミラーゼと、高発現株のグルコアミラーゼ及び α -グルコシダーゼの活性が有意に減少した(Table12)。また、有意差はないが破壊株と高発現株の α -アミラーゼと酸性プロテアーゼの活性も減少しており、測定した全ての酵素活性が減少傾向を示した(Table12)。この結果から、*kpeA* の破壊や高発現は固体培養における酵素生産

を若干減少させることが示された。分生子形成や二次代謝の制御に関わる KpeA がなぜ酵素生産に影響するのかは興味深い。破壊株では気中菌糸が増加することで、相対的に酵素生産の場となる基底菌糸が減ったことや高発現株では二次代謝や分生子形成の活性化に伴うエネルギー消費のために酵素生産量が減少したことなどが可能性としてあげられる。また、破壊株と高発現株の酵素活性は対照株に比べ減少していたが、清酒醸造に用いる米麴として問題がない力価であった(布川ら, 1981)。

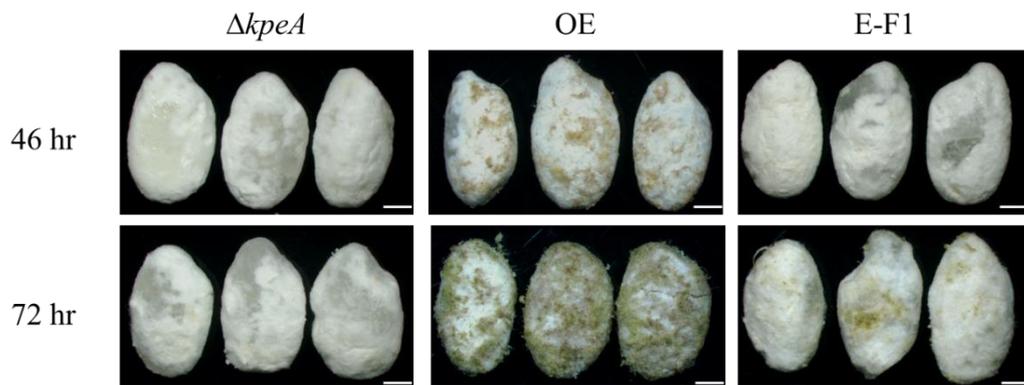


Fig. 26 Rice *koji* of $\Delta kpeA$, OE, and E-F1 strain.
The time of taking out of finished *koji* were 46 hr and 72 hr. Scale bars showed in each panel are 1 mm.

Table 12 Enzyme activities and biomasses of *koji* of $\Delta kpeA$, OE, and E-F1 strain.

	cell (mg/g <i>koji</i>)	α -amylase	glucoamylase	α -glucosidase	acidic protease
		(U/g <i>koji</i>)			
$\Delta kpeA$	2.0 (± 0.2)	1678 (± 177)	213 * (± 5)	0.14 (± 0.01)	1658 (± 61)
OE	2.0 (± 0.2)	1605 (± 85)	182 ** (± 14)	0.12 * (± 0.01)	1709 (± 170)
E-F1	2.1 (± 0.2)	1869 (± 171)	248 (± 11)	0.18 (± 0.02)	1951 (± 158)

Values in parenthesis indicated standard deviation. Asterisks indicate statistically significant differences between wild-type and mutants (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$).

第 2 項 醸造環境における二次代謝産物生産

目的

A. oryzae が生産する二次代謝産物は多数知られているが、製麴を含む固体培養における二次代謝についての知見は少ない。これまでに *A. oryzae* が固体培養で生産することが報告されている二次代謝産物はデフェリフェリクリシン(DF)と KA だけであり(Tadenuma and Sato., 1967; 寺本ら, 1953), DF は清酒着色の原因物質であるため固体培養における生産条件の検討や非生産株の育種が進められてきたが(浜地ら, 1977; 五味ら, 1987), KA は米麴中の含有量すらわかっていない。平板培養や液体培養での基礎研究から、それら二次代謝産物の生合成酵素や制御因子が同定され(Yamada et al., 2003; Terabayashi et al., 2010), 醸造現場に還元できる知見が蓄積されつつあるが、固体培養における二次代謝の制御についての知見はなく、醸造現場における培養工程である製麴での制御機構の解明が重要だと考えられる。

前節で *kpeA* が種麴製造においても分生子形成を制御することが明らかになり, *KpeA* が固体培養においても分生子形成と二次代謝を制御することが予想された。そこで、本実験では製麴における *KpeA* の二次代謝制御を確認するために *kpeA* 破壊株と高発現株の米麴の含まれる DF と KA を定量し、その生合成遺伝子の遺伝子発現量を調べた。

方法

各株の米麴 0.2 g に超純水 1 ml を加え、グラインダーで破碎することで、米麴から KA の抽出を行った。KA の定量は第 4 章第 1 節と同様に HPLC により UV(270 nm)の吸収で検出した。DF の定量は佐藤らの方法で行った(佐藤ら, 1967)。

製麴期間における KA 生合成遺伝子及び DF 生合成遺伝子の qRT-PCR 解析

米麴からの total RNA の抽出は前節と同様に行い、逆転写及び qRT-PCR 解析は第 3 章第 3 節と同様に行った。本実験に使用したプライマーと PCR 条件は Table13 に示した。

Table 13 Primers used in qRT-PCR for *kojA* and *dffA*

primers	sequences (5'-3')	experiments	conditions
TMtefIFW	AGCCCATGTGTGTGGAGTCTT	qRT-PCR for <i>tefI</i>	95 °C for 5 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 5 s and 64 °C for 30 s
TMtefIRV	AACCGACTTGATAACTCCGACG	qRT-PCR for <i>tefI</i>	95 °C for 5 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 5 s and 64 °C for 30 s
qrt0136-F	CCGAACTAGTCGTCCACCAT	qRT-PCR for <i>kojA</i>	95 °C for 5 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 5 s and 64 °C for 30 s
qrt0136-R	ACATCCCTGAATGCCCTCATC	qRT-PCR for <i>kojA</i>	95 °C for 5 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 5 s and 64 °C for 30 s
qrtdffAF	TTG CTGTTACCGATGCCCTTG	qRT-PCR for <i>dffA</i>	95 °C for 5 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 5 s and 64 °C for 30 s
qrtdffAR	AGTGCCACGC GAATTGTTTC	qRT-PCR for <i>dffA</i>	95 °C for 5 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 5 s and 64 °C for 30 s

結果

麹菌が生産する二次代謝物は多数知られているが(Rank et al., 2012), 本実験では製麹期間中の KA 及び DF の生産について, KpeA が関わるかを調べた。HPLC による定量により, E-F1 株の米麴から 27.8 mg/kg·*koji* の KA が検出された(Table14)。一方, *kpeA* 破壊株の米麴からは E-F1 株の 4.5 倍量の KA が検出されたのに対し, 高発現株の米麴では検出限界(1 ppm)以下であった(Table14)。KA の推定生合成酵素遺伝子 *kojA* の発現を qRT-PCR により調べた結果, 破壊株では対照株の 1.5 倍, 高発現株では対照株の半分程度の発現が確認された(Fig. 27)。これらの結果は第 4 章で KpeA が KA 生産を転写レベルで抑制した結果と一致し, 液体培養や平板培養と同じように, 製麹においても KpeA が KA 生産を抑制する役割を果たしていることが明らかとなった。

米麴中の DF 量については, *kpeA* 破壊株は E-F1 株より 30%程度少なく, *kpeA* 高発現株は E-F1 株と差が見られなかった(Table14)。DF の推定生合成酵素遺伝子 *dffA* の遺伝子発現を調べた結果, 生産量とは一致せず, *kpeA* 高発現株で発現量が 30%程度低く, *kpeA* 破壊株では差が検出できなかった(Fig. 27)。

考察

KpeA は KA 生産を抑制する制御因子として見出されたが, KA 以外にも CPA や PN の生産を制御する因子であることが第 4 章から示されており, 複数の二次代謝物の生産制御に関わる。

しかし、RIB40 株は CPA 非生産性株であり、また、PN は製麴条件とは異なる窒素源が豊富な培地で生産されるため米麴ではそもそも生産しない。そのため、米麴におけるこれらの二次代謝物の生産性との関連は分からなかった。米麴中の KA 量は液体培地での結果と一致し、*kpeA* 破壊株において増加した(Table 23)。KA 生産は *BrlA* により抑制されることが第 4 章第 1 節から示されており、製麴においても、*kpeA* 破壊により *brlA* 発現が低下することで KA 生産の抑制が弱まり、米麴中の KA 量が増加したと考えられる。

KA の定量は、一般的な出麴時間である種切り後 46 時間で出麴した麴を試料として行った。これまでも米麴に含まれる KA についての報告はあるが、種切り後 5 日以上引っ張った米麴や出麴後 30 °C で培養した米麴など(荏田ら, 1991; 寺本ら, 1953)、通常の米麴に含まれる KA 量は定量されておらず、長らく通常の米麴における KA 量は明らかにされていなかった。本研究の結果では 27.8 mg/kg-*koji* と測定され(Table 13)、定量値としては寺本らの 50 mg/kg-*koji* 以下という報告の範疇であり妥当と考えるが(寺本ら, 1953)、KA は菌株により生産性が大きく異なるため、平均的であるかについては結論付けられない。

DF については、米麴からの検出量と生合成遺伝子の発現量が相関せず、解釈が難しい結果となった(Table 14, Fig. 24)。DF は鉄をキレートすることで清酒着色の原因となる極めて重要な二次代謝物であるにもかかわらず、米麴における生産制御機構は未解明な点が多いことから、今後より詳細な解析が求められる。

Table14 Amount of secondary metabolites in rice *koji* of $\Delta kpeA$, OE, and E-F1 strain.

	Kojic acid	Deferriferrichrysin
	(mg/kg·koji)	
$\Delta kpeA$	124.1 * (± 74.5)	95.0 * (± 15.5)
OE	N.D	138.7 (± 16.2)
E-F1	27.8 (± 3.4)	131.6 (± 23.9)

Values in parenthesis indicated standard deviation. Asterisks indicate statistically significant differences between wild-type and mutants (*: $p < 0.05$). N.D. indicated that the compound was not detected.

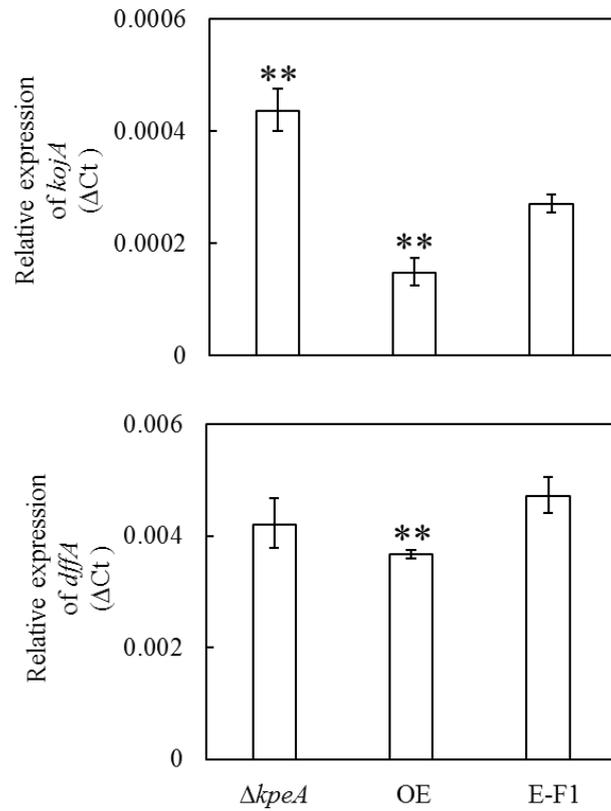


Fig. 27 qRT-PCR analyzes of *kojA*, and *dffA* in $\Delta kpeA$, OE, and E-F1 strains during rice *koji* making. Values are presented as the means \pm S.D. (n=3). Asterisks indicate statistically significant differences between control strain E-F1 and mutants (**: p<0.01). *tef1* gene was used as a reference gene. Relative expression was calculated by the Δ Ct method.

第3項 チロシナーゼ活性と褐変

目的

チロシナーゼは *A. oryzae* が生産する酵素の一種であり、チロシンを基質として数段階の酵素反応と自然酸化を経て黒色物質であるメラニンを合成する。チロシナーゼは製麴でも生産され、米麴や酒粕中のチロシンを基質としてメラニンや中間産物のドーパキノンを合成し、黒粕や米麴の褐変を引き起こす(村上ら, 1958)。近年の研究から固体培養特異的に生産されるチロシナーゼ MelB が同定され(Obata et al., 2004)、黒粕や米麴の褐変を引き起こすチロシナーゼであることが示されたが、MelB の遺伝子発現制御についての知見はない。本実験では製麴におけるチロシナーゼ生産と *KpeA* の関与を明らかにすることを目的として *kpeA* 破壊株と高発現株の米麴のチロシナーゼ活性を調べた。また、KA がチロシナーゼの阻害剤であるため、米麴の褐変と KA の関与についても調べた。

方法

麴抽出液は大場らの方法で作製した(大場ら, 1969)。すなわち、米麴 2 g に 10 ml の蒸留水を加え、室温で 1 時間静置後に 5C ろ紙(アドバンテック東洋株式会社)でろ過した。抽出液はメンブレンフィルター DISMIC:25CS(アドバンテック東洋株式会社)でろ過したのち、4 °C で静置し、2 週間後の色から褐変性を評価した。麴抽出液への KA 添加試験は対照株の麴抽出液 1 ml に

0.024 mg の KA(東京化成工業株式会社)を添加し、その褐変性を評価した。米麴のチロシナーゼ活性測定は大場らの方法で行った(大場ら, 1974)。

結果

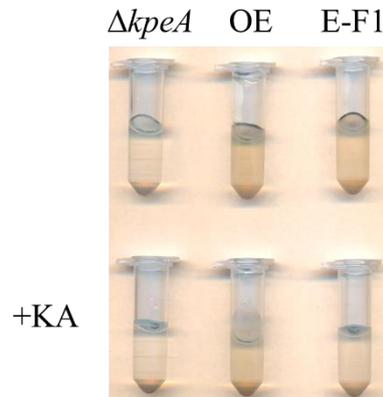
KpeA と麴の褐変性に関連があるかを調べるため、種切り後 46 時間で出麴した各株の米麴の麴抽出液の褐変を調べた。驚くべきことに、高発現株及び対照株の麴抽出液は褐変したが、破壊株の麴抽出液は褐変しなかった(Fig. 28A)。チロシナーゼ活性を調べてみると、破壊株は対照株の 2.4 倍の活性を示し、褐変性とは一致しない結果となった(Fig. 28B)。KA はチロシナーゼの阻害作用により、黒色色素であるメラニンの生成を抑制することが知られていることから(Saruno et al., 1979)、破壊株の米麴中の KA 量が多いために麴抽出液の褐変が抑制された可能性について検討した。対照株の麴抽出液に破壊株の米麴と同量の KA(0.12 mg/g koji)を添加したところ、全く褐変しなかった(Fig. 28A)。これら結果より、破壊株では米麴中に含まれる KA が褐変を抑制していることが確認された。一方、対照株において KA をチロシナーゼ活性測定の反応液に添加しても、チロシナーゼ活性はほとんど変わらなかった(Fig. 28B)。この結果から、KpeA は製麴におけるチロシナーゼ生産に関わらないことが明らかになった。

これらの結果から、麴抽出液の褐変は、測定したチロシナーゼ活性のみでは説明ができず、KA などの阻害物質の含有量によっても褐変度が変わることが考えられた。

考察

本研究により米麴に含まれる KA が米麴の褐変性に大きく影響することが示唆された。米麴の褐変は麴菌の生産するチロシナーゼが原因であることが示されており(村上ら, 1958), 特にグルコアミラーゼ高生産株は褐変性が高いなどの経験則が知られ, 注意が払われている。KA はチロシナーゼの補因子となる Cu^{2+} をキレートすることで活性を阻害すると報告されているが(Mishima et al., 1988), 本実験においてはチロシナーゼによる反応とは異なる過程に作用し, 褐変性に影響することが判明した。チロシナーゼはチロシンをドーパキノンとする反応を触媒し, それ以降は非酵素的な酸化によってメラニンが合成される。KA はメラニンの前駆物質である 5,6-dihydroxyindole と直接反応してメラニン合成を阻害することも報告されており(三嶋ら, 1994), KA による褐変の抑制については, 非酵素的な酸化過程を含めて, 作用点の再検討が必要かもしれない。また, 清酒醸造において実際に KA がどれほど褐変抑制に寄与しているかについては興味深く, 今後の注目すべき課題と考える。

(A)



(B)

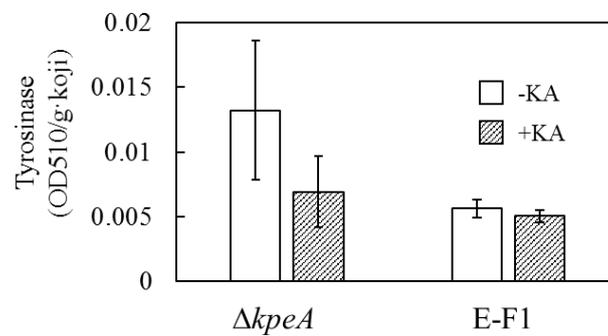


Fig. 28 The browning of rice *koji* extract and tyrosinase activities of each strain.

(A) The browning of rice *koji* extracts of $\Delta kpeA$, OE, and E-F1 strain. Samples were extracted by distilled water from rice *koji* of each strain. After incubation at 4 °C for 2 weeks, the browning of samples was evaluated. +KA indicated that samples containing kojic acid at a final concentration of 24 $\mu\text{g/ml}$. (B) Tyrosinase activities of rice *koji* of each strain. +KA indicated that kojic acid was added to reaction mixture of activity measurement of tyrosinase.

総括

本研究では, *A. oryzae* の転写因子遺伝子破壊株ライブラリーを活用したスクリーニングから見出した新規二次代謝制御因子 KpeA について, 一般的な実験室での培養系及び醸造環境での培養系における機能解析を行い, 特徴付けを行った。

第 1 章では, *A. oryzae* の転写因子遺伝子破壊株ライブラリーに対し KA 生産量を指標にしたスクリーニングを行い, 分化に関わる NsdD や光応答に関わる LreA(Han et al., 2001; Lee et al., 2014; Purschwitz et al., 2008; Rugar-Herreros et al., 2011), Carbon catabolite repression に関わる CreB (Lockington and Keller, 2001), 機能未知の制御因子の 4 つの制御因子が KA 生産に関わることを見出した。NsdD と CreB の遺伝子破壊株は KA 生産が減少し, LreA と機能未知の制御因子の遺伝子破壊株は KA 生産が増加した。NsdD や LreA, CreB が KA 生産に関わることは新規の知見であったものの, 特徴づけされた制御因子であったため, 本研究では機能未知の制御因子について注目することにした。また, この制御因子遺伝子は破壊により KA 生産の増加を引き起こすことから *kpeA*(kojic acid production enhancement A)と名付けた。

第 2 章では *kpeA* の転写領域の解析からアミノ酸配列を決定し, それをクエリとした *in silico* 解析を行った。KpeA は, 通常では N 末端側に存在する Zn(II)₂-Cys₆ モチーフがアミノ酸配列の中央に存在し, 複合体形成に関わる二量体化ドメインや標的遺伝子の転写活性に関わる Middle homology region が予測されない, 特徴的な構造をしていた。Zn(II)₂-Cys₆ モチーフの位置について *A. oryzae* の Zn(II)₂-Cys₆ 型制御因子 186 個を調べたところ, アミノ酸配列中央に持つ制御

因子は KpeA を含めて 4 つのみと非常に少なく、非常に珍しい構造であった。また、KpeA は *Aspergillus* 属を含む *Eurotiomycetes* や *Dothideomycetes*, *Leotiomycetes*, *Sordariomycetes* といった *Pezizomycotina* の一部の綱に保存されていたことから、一部の糸状菌に特有の制御因子であることが推察された。

第 3 章では *kpeA* 破壊株を宿主とした相補株と *kpeA* 高発現株を作製し、*kpeA* 破壊株と対照株(E-F1 株)を加えた 4 株の平板培養における形質と分生子形成関連遺伝子の発現について調べた。Malts 寒天培地において各株のジャイアントコロニーを作製したところ、*kpeA* 破壊株の菌糸が長く、分生子数が減少していることが観察された。各株の分生子数と頂のう数、頂のうの大きさを測定した結果、*kpeA* 破壊株は分生子数と頂のう数が減少し、小さい頂のうを形成した。一方で *kpeA* 高発現は分生子数と頂のう数が増加し、大きい頂のうを形成した。このことから KpeA は頂のう形成と頂のうの大きさに関わり、それが原因で *kpeA* 破壊株や高発現株で分生子数が増減したと考えられた。次に、分生子形成の中心的な制御因子 BrlA と AbaA, WetA の遺伝子発現を経時的に測定したところ(Adams et al., 1998), *kpeA* 破壊株の BrlA の遺伝子発現の増加が他の株に比べて 24 時間遅く、それが原因と考えられる AbaA と WetA の遺伝子発現の減少が明らかになった。このことから、*kpeA* 破壊株の平板培養時の形質は BrlA の遺伝子発現の遅れが根本的な原因であり、KpeA が BrlA を介して分生子形成を制御することが示された。

第 4 章では *kpeA* と二次代謝産物生産の関与について調べた。KA 生産培地で 25 日間液体表面培養した *kpeA* 破壊株は対照株の 6 倍の KA 生産を示し、培養 15 日目の *kojA* と *kojR* の

遺伝子発現がそれぞれ E-F1 株の 3.2 倍と 3.4 倍に増加した。一方で *kpeA* 高発現株は KA 生産量や *kojA*, *kojR* の遺伝子発現が E-F1 株と同程度であったことから, *kpeA* の高発現は KA 生産に影響を与えないことが示された。これらのことから, *kpeA* は KA 生産の抑制に関わることが示された。また, KpeA は PN 生産と CPA の制御にも関わり, PN 生産については転写レベルで制御していたため, KpeA が複数の二次代謝の制御に関わることが明らかになった。さらに, KpeA と *LaeA*, *BrlA* の関与について調べたところ, KpeA は *LaeA* とは関わらないが, *BrlA* を介して KA 生産を制御することが予想された。このことから, KpeA は *brlA* を介して分生子形成と二次代謝を制御することが強く示唆された。

第 2 章のモチーフ検索から KpeA が Zn(II)₂-Cys₆ モチーフをアミノ酸配列中央に持つ特徴的な構造をしていることが示されたが, *A. oryzae* の Zn(II)₂-Cys₆ 型制御因子に KpeA のような構造の制御因子は非常に少なかった。そのため, KpeA のモチーフが偶然生じた配列で機能を持たないことが懸念された。そこで, 第 5 章では KpeA のモチーフ内の Cys 残基を Ala 残基に置換した変異株 *kpeA*_{Ala} 株を作製し, その形質について調べることで, KpeA のモチーフが機能しているかを確認した。平板培養時の形態と KA 生産について調べたところ, *kpeA*_{Ala} 株が *kpeA* 破壊株と同様の形質を示した。このことから *kpeA*_{Ala} 株の生産する KpeA が機能していないことが分かり, それは置換変異に起因すると考えられたため, KpeA のモチーフは機能を有することが示された。*A. oryzae* において Zn(II)₂-Cys₆ 型モチーフをアミノ酸配列の中央に持つ制御因子は KpeA を含めて 4 つ推定されている。その中の 1 つは *A. nidulans* の *sonC* のホモログであった(Lerson et al.,

2014), アミノ酸配列中央に存在する Zn(II)₂-Cys₆ モチーフの解析はされておらず、機能を保持しているかは不明であった。従って、本研究はアミノ酸配列中央にモチーフを持つ Zn(II)₂-Cys₆ 型制御因子のモチーフ機能を初めて確認した報告となった。

A. oryzae は日本の醸造産業に欠かせない糸状菌であり、醸造現場では穀物上で生育させた麴の状態を利用される。製麴は固体培養と呼ばれる培養方法であり、実験室での一般的な培養系である液体培養や平板培養とは代謝や酵素生産が大きく異なることが考えられる。そこで、第6章では *kpeA* の固体培養における役割について解析した。*kpeA* 破壊株と高発現株を用いて種麴と米麴を作製し、その状貌の観察や遺伝子発現の解析、各種生産物の解析を行った。種麴及び米麴の製造において *KpeA* は分生子形成を促進し、種麴製造では *KpeA* が *BrlA* の転写活性化に関わっていたことから、*KpeA* は平板培養と同様に種麴製造と製麴においても分生子形成を促進することが示された。次に、各株の米麴に含まれる二次代謝産物について解析を行ったところ、DF の生産量は変わらなかったが、*kpeA* 破壊株の KA 生産量と *kojA* の遺伝子発現量が増加したことから製麴においても *KpeA* が二次代謝を転写レベルで制御することが示された。これまでの米麴中の二次代謝産物の研究では米麴に含まれる KA は痕跡程度とされており(寺本ら, 1953), どの程度含まれているかは不明であったが、本研究では HPLC による定量を行い、米麴に 27.8 mg/kg·koji の KA が含まれていることを明らかにした。また、*kpeA* 破壊株のチロシナーゼ活性は E-F1 株と同等の活性を示したが、*kpeA* 破壊株の麴抽出液が褐変せず、その原因が米麴に含まれる KA だと考えられた。KA はチロシナーゼ阻害作用を示し、メラニン合成

を阻害することが知られているが、米麴においても同様の反応が生じることは報告されていない。

米麴においても KA がチロシナーゼを阻害することで、米麴の褐変や黒粕を抑制する可能性は非常に興味深いが、実際に寄与するかは不明であるため、今後注目すべき課題と考えられた。

以上のことから、KpeA は平板培養や液体培養と言った実験室での培養環境のみでなく、醸造現場の培養環境である固体培養においても分生子形成と二次代謝を制御することが示された。

以上のことから本研究は、糸状菌の新規転写制御因子 KpeA の発見及び機能解析を行い、KpeA が BrlA の制御を介して二次代謝と分生子形成を制御する重要な因子であることを明らかにした。

Aspergillus 属における二次代謝と分生子形成の研究は *A. oryzae* の近縁種の *A. nidulans* と *A. fumigatus* において盛んに行われ、二次代謝の制御の研究から中心的な役割を担う Velvet 複合体や各種環境シグナルに応答して二次代謝を制御する因子が同定されており (Brakhage, 2014), 分生子形成では BrlA と AbaA, WetA から成る central development pathway や BrlA の上流のカスケード FluG dependent pathway, G-protein mediated pathway が同定されている (Adams et al., 1998; Krijgsheld et al., 2013)。しかし、これらの膨大な知見が蓄積した現在でも二次代謝や分生子形成の制御機構の全貌は明らかにされていない。昔から糸状菌の二次代謝産物の生産と分生子形成は密接に関わると言われていたが、現在の知見から考えるとその制御は BrlA と LaeA が要の制御因子であることが予想される。しかし、BrlA の二次代謝制御は Lind らによって報告されたトランスクリプトーム解析を主とした報告のみであり (Lind et al., 2018), 十分に

解析されているとは言い難い。今後、KpeAを含めた分生子形成関連制御因子の二次代謝制御を詳細に解析することで、これまで不明であった二次代謝と分生子形成の連動のメカニズムの解明が期待される。このメカニズムの解明は生理学的に興味深いだけでなく、*A. oryzae* においては産業利用する上で重要な意味がある。*A. oryzae* は醸造現場では穀物上に生育させる固体培養と呼ばれる実験室とは異なる培養を経て利用される。種麴製造では分生子を多量に形成することが求められるが、製麴では分生子と二次代謝産物共に生産されない方が良い。上記のメカニズムが解明されれば、2 日間程度の製麴期間では分生子と二次代謝産物を生産せず、7 日程度の種麴製造期間では多量の分生子を形成する、産業上理想的な *A. oryzae* 株の育種の方針が立つと考える。固体培養における遺伝子機能解析は一般的な実験室の培養系に比べ解析が難しいことは周知であるが、本研究のように平板培養や液体培養において二次代謝と分生子形成の制御メカニズムの解明を目指しつつ、固体培養における解析も平行して行い、醸造産業に還元できる研究を行うのが重要であろう。

要約

本研究では、まず初めに麹菌 *Aspergillus oryzae* における新規二次代謝制御因子の探索を目的としてコウジ酸の生産量を指標としたスクリーニングを行い、破壊するとコウジ酸生産が増加する遺伝子 *kpeA* を見出した。KpeA は Zn(II)₂-Cys₆ 型の制御因子であったが、通常 N 末端に存在するモチーフがアミノ酸配列の中央に存在する、ユニークな構造をしていた。また、KpeA は子囊菌類の内の糸状菌に広く保存された制御因子であったが、子囊菌類でも酵母や担子菌類、接合菌類には保存されていなかった。

KpeA は二次代謝の他に分生子形成も制御していた。*kpeA* 破壊株の分生子数と頂のう数が減少することから KpeA が分生子形成に関わることが明らかになり、さらに転写解析から KpeA が BrlA を介して分生子形成を制御することが明らかになった。

次に *kpeA* 破壊株のコウジ酸生産量の定量を行ったところ、*kpeA* 破壊株は E-F1 株の 6 倍のコウジ酸生産を示し、さらに転写解析から KpeA がコウジ酸生産を転写レベルで抑制していることが明らかになった。また、KpeA はコウジ酸だけでなく、ペニシリンやシクロピアゾン酸の生産制御にも関わることを明らかになった。

KpeA はモチーフの位置が特徴的な Zn(II)₂-Cys₆ 型制御因子であったが、KpeA のような構造の制御因子は 186 個推定されている Zn(II)₂-Cys₆ 型制御因子の内に 4 個しかなく、KpeA のモチーフが偶然生じた機能しない配列であることが懸念された。そこで、モチーフ内の Cys 残基を Ala 残基に置換した Ala 置換株を作製し、その形質を比較した。その結果、Ala 置換株は *kpeA*

破壊株と同様の表現型を示し、KpeA の Zn(II)₂-Cys₆ モチーフが機能していることが明らかになった。

醸造現場では麹菌を蒸米上で培養する。このような培養を固体培養と呼ぶが、固体培養における二次代謝や分生子形成の分子レベルの研究はされていない。そこで、液体培養や平板培養において二次代謝と分生子形成の制御に重要な役割を果たしていることが明らかになった。KpeA について解析を行った。*kpeA* 破壊株と高発現株を用いた解析から、KpeA が種麹製造及び製麹において分生子形成を促進していることが明らかになり、転写解析から KpeA が固体培養においても BrlA を介して分生子形成を制御していることが明らかになった。また、米麴に含まれるコウジ酸の正確な量は報告されていなかったが、本研究で HPLC による解析から E-F1 株の米麴に 27.8 mg/kg-*koji* のコウジ酸が含まれていることが明らかになった。*kpeA* 破壊株の米麴には E-F1 株の米麴の 4 倍以上のコウジ酸が含まれており、KpeA が製麹中にコウジ酸生産を制御していることが明らかになった。さらに、KpeA と褐変について検討した。褐変の代替指標として米麴抽出液の褐変を調べたところ、*kpeA* 破壊株の米麴抽出液が褐変しなかった。そこで、各株のチロシナーゼ活性を測定したが、*kpeA* 破壊株のチロシナーゼ活性は E-F1 株よりも高かった。*kpeA* 破壊株の米麴抽出液が褐変しなかった現象の原因が米麴に含まれるコウジ酸であると考え、E-F1 株の米麴抽出液に *kpeA* 破壊株と同濃度になるようにコウジ酸を添加したところ、E-F1 株の米麴抽出液が褐変しなかった。この結果から、米麴中のコウジ酸が褐変や黒粕を抑制することが示唆された。

参考文献

- Adams, T.H., Boylan, M.T., Timberlake, W.E., 1988. *brlA* is necessary and sufficient to direct conidiophore development in *Aspergillus nidulans*. *Cell* vol. **54**, 353-362.
- Adams, T.H., Wieser, J.K. Yu, J.H. 1998. Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* vol. **62**, 35–54.
- Ahmed, Y.L., Gerke, J., Park, H.S., Bayram, O., Neumann, P., Ni, M., Dickmanns, A., Kim, S.C., Yu, J.H., Braus, G.H., Ficner, R., 2013. The velvet family of fungal regulators contains a DNA-binding domain structurally similar to NF- κ B. *PLoS Biol.* vol. **11**, e1001750. DOI: 10.1371/journal.pbio.1001750
- Akao, T., Gomi, K., Goto, K., Okazaki, N., Akita, O., 2002. Subtractive cloning of cDNA from *Aspergillus oryzae* differentially regulated between solid-state culture and liquid (submerged) culture. *Curr. Genet.* vol. **41**, 275-281.
- Arnstein, H.R.V., Bentley, R., 1950. Kojic Acid Biosynthesis From 1-C¹⁴-glucose. *Nature* vol. **166**, 948-949.
- Baláž, Š., Uher, M., Brtko, J., Veverka, M., Bransová, J., Dobias, J., Pódová, M., Buchvald, J., 1993. Relationship between antifungal activity and hydrophobicity of kojic acid derivatives. *Folia Microbiol.* vol. **38**, 387–391.

- Bayram, O., Krappmann, S., Ni, M., Bok, J.W., Helmstaedt, K., Valerius, O., Braus-Stromeier, S., Kwon, N.J., Keller, N.P., Yu, J.H., 2008 VelB/VeA/LaeA complex coordinates light signal with fungal development and secondary metabolism. *Science* vol. **320**, 1504–1506.
- Bentley, R., 1957. Preparation and analysis of kojic acid. *Methods Enzymol.* vol. **3**, 238–241.
- Bok, J.W., Keller, N.P., 2004 LaeA, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus* spp. *Eukaryot. Cell* vol. **3**, 527–535.
- Bok, J.W., Chung, D.W., Balajee, S.A., Marr, K.A., Andes, D., Nielsen, K.F., Frisvad, J.C., Kirby, K.A., Keller, N.P., 2006. GliZ, a transcriptional regulator of gliotoxin biosynthesis, contributes to *Aspergillus fumigatus* virulence. *Infect. Immun.* vol. **74**, 6761-6768.
- Brakhage, A.A., 2013 Regulation of fungal secondary metabolism. *Nat. Rev. Microbiol.* vol. **11**, 21–32.
- Brakhage, A.A., Spröte, P., Al-Abdallah, Q., Gehreke, A., Plattner, H., Tüncher, A. 2004. Regulation of penicillin biosynthesis in filamentous fungi. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* vol. **88**, 45-90.
- Chang, P.K., Scharfenstein, L.L., Luo, M., Mahoney, N., Molyneux, R.J., Yu, J., Brown, R.L., Campbell, B.C., 2011. Loss of *msnA*, a putative stress regulatory gene, in *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus* increased production of conidia, aflatoxins and kojic acid. *Toxins (Basel)* vol. **3**, 82–104.

- Chaudhary, J., Pathak, A., Lakhawat, S., 2014. Production technology and applications of kojic acid. *Ann. Rev. Res. Biol.* vol. **4**, 3165-3196.
- Chen, J.S., Wei, C.I., Rolle, R.S., Balaban, M.O., Otwell, S.W., Marshall, M.R., 1991. Inhibitory effect of kojic acid on some plant and crustacean polyphenol oxidases. *J. Agric. Food Chem.* vol. **39**, 1396–1401.
- Chang, P.K., Ehrlich, K.C., 2013. Genome-wide analysis of the Zn(II)₂Cys₆ zinc cluster encoding gene family in *Aspergillus flavus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* vol. **97**, 4289–4300.
- Chinnici, J.L., Fu, C., Caccamise, L.M., Arnold, J.W., Free, S.J., 2014. *Neurospora crassa* female development requires the PACC and other signal transduction pathways, transcription factors, chromatin remodeling, cell-to-cell fusion, and autophagy. *ProS One* vol. **9**. DOI: 10.1371/journal.pone.0110603
- Clutterbuck, J., 1969. A mutational analysis of conidial development in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* vol. **63**, 317-327.
- Colot, H.V., Park, G., Turner, G.E., Ringelberg, C., Crew, C.M., Litvinkova, L., Weiss, R.L., Borkovich, K.A., Dunlap, J.C., 2006. A high-throughput gene knockout procedure for *Neurospora* reveals functions for multiple transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* vol. **103**, 10352–10357.

- Coradetti, S.T., Craig, J.P., Xiong, Y., Shock, T., Tian, C., Glass, N.L., 2012. Conserved and essential transcription factors for cellulase gene expression in ascomycete fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* vol. **109**, 7397–7402.
- Duran, R.M., Cary, J.W., Calvo, A.M., 2007. Production of cyclopiiazonic acid, aflatrem, and aflatoxin by *Aspergillus flavus* is regulated by *veA*, a gene necessary for sclerotial formation. *Appl. Microbiol. Biot.* vol. **73**, 1158–1168.
- Garzia, A., Etxebeste, O., Herrero-Garcia, E., Fischer, R., Espeso, E.A., Ugalde, U., 2009. *Aspergillus nidulans* FlbE is an upstream developmental activator of conidiation functionally associated with the putative transcription factor FlbB. *Mol. Microbiol.* vol. **71**, 172–184.
- Gonçalves, R.D., Cupertino, F.B., Freitas, F.Z., Luchessi, A.D., Bertolini, M.C., 2011. A genome-wide screen for *Neurospora crassa* transcription factors regulating glycogen metabolism. *Mol. Cell. Proteomics* vol. **10**. DOI: 10.1074/mcp.M111.007963
- Han, K.H., Han, K.Y., Yu, J.H., Chae, K.S., Jahng, K.Y., Han, D.M., 2001. The *nsdD* gene encodes a putative GATA-type transcription factor necessary for sexual development of *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* vol. **41**, 299–309.
- Han, S., Navarro, J., Greve, R.A., Adams, T.H. 1993. Translational repression of *brlA* expression prevents premature development in *Aspergillus*. *EMBO J.* vol. **12**, 2449–2457.

- Hata, Y., Ishida, H., Ichikawa, E., Kawato A., Suginami, K., Imayasu, S., 1998. Nucleotide sequence of an alternative glucoamylase-encoding gene (*glaB*) expressed in solid-state culture of *Aspergillus oryzae*. *Gene* vol. **207**, 127-134.
- Hernandez-Ortiz, P., Espeso, E.A., 2013. Phospho-regulation and nucleocytoplasmic trafficking of CrzA in response to calcium and alkaline-pH stress in *Aspergillus nidulans* *Mol. Microbiol.* vol. **89**, 532-551.
- Hicks, J.K., Yu, J.H., Keller, N.P., Adams, T.H., 1997. *Aspergillus* sporulation and mycotoxin production both require inactivation of the FadA G alpha protein-dependent signaling pathway. *EMBO J.* vol. **16**, 4916-4923.
- Hirst, M., Kobor, M.S., Kuriakose, N., Greenblatt, J., Sadowski, I., 1999. GAL4 is regulated by the RNA polymerase II holoenzyme-associated cyclin-dependent protein kinase SRB10/CDK8 *Mol. Cell* vol. **3**, 673-678.
- Jin, F.J., Nishida, M., Hara, S., Koyama, Y., 2011. Identification and characterization of a putative basic helix-loop-helix transcription factor involved in the early stage of conidiophore development in *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genet. Biol.* vol. **48**, 1108–1115.
- Johnstone, I.L., Hughes, S.G., Clutterbuck, A.J., 1985. Cloning an *Aspergillus nidulans* developmental gene by transformation. *EMBO J.* vol. **4**, 1307-1311.

- Kale, S.P., Milde, L., Trapp, M.K., Frisvad, J.C., Keller, N.P., Bok, J.W. 2008. Requirement of LaeA for secondary metabolism and sclerotial production in *Aspergillus flavus*. *Fungal Genet. Biol.* vol. **45**, 1422– 1429.
- Kato, N., Brooks, W., Calvo A.M. 2003. The expression of sterigmatocystin and penicillin genes in *Aspergillus nidulans* is controlled by *veA*, a gene required for sexual development. *Eukaryot. Cell* vol. **2**, 1178-1186.
- Kato, N., Tokuoka, M., Shinohara, Y., Kawatani, M., Uramoto, M., Seshime, Y., Fujii, I., Kitamoto, K., Takahashi, T., Takahashi, S., Koyama, Y., Osada, H., 2011. Genetic safeguard against mycotoxin cyclopiazonic acid production in *Aspergillus oryzae*. *Chembiochem* vol. **12**, 1376-1382.
- Kawauchi, M., Nishiura, M., Iwashita, K., 2013. Fungus-specific Sirtuin HstD coordinates secondary metabolism and development through control of LaeA. *Eukaryot. Cell* vol. **12**, 1087–1096.
- Keller, N.P., Nesbitt, C., Sarr, B., Phillips, T.D., Burow, G.B., 1997. pH regulation of sterigmatocystin and aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus* spp. *Phytopathology* vol. **87**, 643-648.
- Keller, N.P., Turner, G., Bennett, J.W., 2005. Fungal secondary metabolism – from biochemistry to genomics. *Nat. Rev. Microbiol.* vol. **3**, 937-947.

- Kiyota, T., Hamada, R., Sakamoto, K., Iwashita, K., Yamada, O., Mikami, S., 2011. Aflatoxin non-productivity of *Aspergillus oryzae* caused by loss of function in the *aflJ* gene product. *J. Biosci. Bioeng.* vol. **111**, 512-517.
- Kwon, N.J., Garzia, A., Espeso, E.A., Ugalde, U., Yu J.H., 2010. FlbC is a putative nuclear C₂H₂ transcription factor regulating development in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.*, vol. **77**, 1203-1219.
- Kobayashi, T., Abe, K., Asai, K., Gomi, K., Juvvadi, P.R., Kato, M., Kitamoto, K., Takeuchi, M., Machida, M., 2007. Genomics of *Aspergillus oryzae*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* vol. **71**, 646-670.
- Kotani, T., Ichimoto, I., Tatsumi, C., Fujita, T., 1976. Bacteriostatic activities and metal chelation of kojic acid analogs. *Agric. Biol. Chem.* vol. **40**, 765-770.
- Krijgsheld, P., Bleichrodt, R., van Veluw, G.J., Wang, F., Muller, W.H., Dijksterhuis, J., Wosten, H.A.B., 2013. Development in *Aspergillus*. *Stud. Mycol.* vol. **74**, 1-29.
- Kusumoto, K., Yabe, K., Nogata, Y., Ohta, H., 1998. Transcript of a homolog of *aflR*, a regulatory gene for aflatoxin synthesis in *Aspergillus parasiticus*, was not detected in *Aspergillus oryzae* strains. *FEMS Microbiol. Lett.* vol. **169**, 303-307.

- Lee, I., Oh, J.H., Shwab, E.K., Dagenais, T.R., Andes, D., Keller, N.P., 2009 HdaA, a class 2 histone deacetylase of *Aspergillus fumigatus*, affects germination and secondary metabolite production. *Fungal. Genet. Biol.* vol. **46**, 782–790.
- Lee, M.K., Kwon, N.J., Choi, J.M., Lee, I.S., Jung, S., Yu, J.H., 2014. NsdD is a key repressor of asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* vol. **197**, 159–173.
- Lee, M.K., Kwon, N.J., Lee, I.S., Jung, S., Kim, S.C., and Yu, J.H. 2016. Negative regulation and developmental competence in *Aspergillus*. *Sci. Rep.* vol. **6**, 28874. DOI: 10.1038/srep28874
- Lee, Y.S., Park, J.H., Kim, M.H., Seo, S.H., Kim, H.J., 2006. Synthesis of tyrosinase inhibitory kojic acid derivative. *Arch. Pharm.* vol. **339**, 111–114.
- Larson, J.R., Facemyer, E.M., Shen, K.F., Ukil, L., Osmani, S.A., 2014. Insights into dynamic mitotic chromatin organization through the NIMA Kinase Suppressor SonC, a chromatin-associated protein involved in the DNA damage response. *Genetics* vol. **196**, 177–195.
- Lind, A.L., Lim, F.Y., Soukup, A.A., Keller, N.P., Rokas, A., 2018. An LaeA- and BrlA dependent cellular network governs tissue-specific secondary metabolism in the human pathogen *Aspergillus fumigatus*. *mSphere* vol. **3**. DOI: 10.1128/mSphere.00050-18
- Lockington, R.A., Kelly, J.M., 2001. Carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans* involves deubiquitination. *Mol. Microbiol.* vol. **40**, 1311–1321.

Machida, M., Asai, K., Sano, M., Tanaka, T., Kumagai, T., Terai, G., Kusumoto, K., Arima, T., Akita, O., Kashiwagi, Y., Abe, K., Gomi, K., Horiuchi, H., Kitamoto, K., Kobayashi, T., Takeuchi, M., Denning, D.W., Galagan, J.E., Nierman, W.C., Yu, J., Archer, D.B., Bennett, J.W., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E., Fedorova, N.D., Gotoh, O., Horikawa, H., Hosoyama, A., Ichinomiya, M., Igarashi, R., Iwashita, K., Juvvadi, P.R., Kato, M., Kato, Y., Kin, T., Kokubun, A., Maeda, H., Maeyama, N., Maruyama, J., Nagasaki, H., Nakajima, T., Oda, K., Okada, K., Paulsen, I., Sakamoto, K., Sawano, T., Takahashi, M., Takase, K., Terabayashi, Y., Wortman, J.R., Yamada, O., Yamagata, Y., Anazawa, H., Hata, Y., Koide, Y., Komori, T., Koyama, Y., Minetoki, T., Suharnan, S., Tanaka, A., Isono, K., Kuhara, S., Ogasawara, N., Kikuchi, H., 2005. Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature* vol. **438**, 1157–1161.

MacPherson, S., Larochelle, M., Turcotte, B., 2006. A fungal family of transcriptional regulators: the zinc cluster proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* vol. **70**, 583-604.

Marui, J., Ohashi-Kunihiro, S., Ando, T., Nishimura, M., Koike, H., Machida, M., 2010. Penicillin biosynthesis in *Aspergillus oryzae* and its overproduction by genetic engineering. *J. Biosci. Bioeng.* vol. **110**, 8-11.

Marui, J., Yamane, N., Ohashi-Kunihiro, S., Ando, T., Terabayashi, Y., Sano, M., Ohashi, S., Ohshima, E., Tachibana, K., Higa, Y., Nishimura, M., Koike, H., Machida, M., 2011. Kojic

- acid biosynthesis in *Aspergillus oryzae* is regulated by a Zn(II)₂Cys₆ transcriptional activator and induced by kojic acid at the transcriptional level. *J. Biosci. Bioeng.* vol. **112**, 40-43.
- Miller, K.Y., Wu, J., Miller, B.L., 1992. StuA is required for cell pattern formation in *Aspergillus*. *Genes Dev.* vol. **6**, 1770–1782.
- Mishima, Y., Hatta, S., Ohyama, Y., Inazu, M., 1988. Induction of melanogenesis suppression: cellular pharmacology and mode of differential action. *Pigment Cell Res.* vol. **1**, 367-374.
- Mizutani, O., Kudo, Y., Saito, A., Matsuura, T., Inoue, H., Abe, K., Gomi, K. 2008. A defect of ligD (human lig4 homolog) for nonhomologous end joining significantly improves efficiency of gene-targeting in *Aspergillus oryzae*. *Fungal. Genet. Biol.* vol. **45**, 878–889.
- Mohamad, R., Mohamed, M.S., Suhaili, N., Salleh, M.M., Ariff, A.B., 2010. Kojic acid: applications and development of fermentation process for production. *Biotechnol. Mol. Biol. Rev.* vol. **5**, 24–37.
- Mooney, J.L., Yager, L.N., 1990. Light is required for conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Genes Dev.* vol. **4**, 1473-1482.
- Nakamura, T., Maeda, Y., Tanoue, N., Makita, T., Kato, M., Kobayashi, T. 2006. Expression profile of amyolytic genes in *Aspergillus nidulans*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* vol. **70**, 2363-2370.

- Nargang, F.E., Adames, K., Rüb, C., Cheung, S., Easton, N., Nargang, C.E., Chae, M.S., 2012. Identification of genes required for alternative oxidase production in the *Neurospora crassa* gene knockout library. *G3-Genes Genom. Genet.* vol. **2**, 1345–1356.
- Nicholson, M.J., Koulman, A., Monahan, B.J., Pritchard, B.L., Payne, G.A., Scott, B., 2009. Identification of two aflatoxin biosynthesis gene loci in *Aspergillus flavus* and metabolic engineering of *Penicillium paxilli* to elucidate their function. *Appl. Environ. Microbiol.* vol. **75**, 7469-7481.
- Noh, J.M., Kwak, S.Y., Seo, H.S., Seo, J.H., Kim, B.G., Lee, Y.S., 2009. Kojic acid-amino acid conjugates as tyrosinase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* vol. **19**, 5586–5589.
- Nohynek, G.J., Kirkland, D., Marzin, D., Toutain, H., Leclerc-Ribaud, C., Jinnai, H., 2004. An assessment of the genotoxicity and human health risk of topical use of kojic acid [5-hydroxy-2-(hydroxymethyl)-4H-pyran-4-one]. *Food Chem. Toxicol.* vol. **42**, 93–105.
- Obata, H., Ishida H., Hata Y., Kawata A., Abe Y., Akao T., Akita O., Ichishima E., 2004. Cloning of a novel tyrosinase-encoding gene (*melB*) from *Aspergillus oryzae* and its overexpression in solid-state culture (Rice Koji). *J. Biosci. Bioeng.* vol. **97**, 400-405.
- Oda, K., Kobayashi, A., Ohashi, S., Sano, M. 2011. *Aspergillus oryzae laeA* regulates kojic acid synthesis genes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* vol. **75**, 1832–1834.

- Ogawa, M., Kobayashi, T., Koyama, Y., 2012. ManR, a novel Zn(II)₂-Cys₆ transcriptional activator, controls the β-mannan utilization system in *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genet Biol.* vol. **49**, 987-995.
- Ogawa, M., Tokuoka, M., Jin, F.J., Takahashi, T., Koyama, Y., 2010. Genetic analysis of conidiation regulatory pathways in koji-mold *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genet. Biol.* vol. **47**, 10–18.
- Palmer, J.M., Bok, J.W., Lee, S., Dagenais, T.R., Andes, D.R., Kontoyiannis, D.P., Keller, N.P., 2013. Loss of CclA, required for histone 3 lysine 4 methylation, decreases growth but increases secondary metabolite production in *Aspergillus fumigatus*. *PeerJ* vol. **1**, DOI: 10.7717/peerj.4
- Prade, R.A., Timberlake, W.E., 1993. The *Aspergillus nidulans brlA* regulatory locus consists of overlapping transcription units that are individually required for conidiophore development. *EMBO J.* vol. **12**, 2439–2447.
- Punt, P.J., Schuren, F.H., Lehmbeck, J., Christensen, T., Hjort, C., van den Hondel, C.A., 2008. Characterization of the *Aspergillus niger prtT*, a unique regulator of extracellular protease encoding genes. *Fungal. Genet. Biol.* vol. **45**, 1591-1599.

- Purschwitz, J., Müller, S., Kastner, C., Schöser, M., Haas, H., Espeso, E.A., Atoui, A., Calvo, A.M., Fischer, R., 2008. Functional and physical interaction of blue- and redlight sensors in *Aspergillus nidulans*. *Curr. Biol.* vol. **18**, 255–259.
- Rank, C., Klejnstrup, M.L., Petersen, L.M., Kildgaard, S., Frisvad, J.C., Gotfredsen, C.H., Larsen, T.O., 2012. Comparative chemistry of *Aspergillus oryzae* (RIB40) and *A. flavus* (NRRL 3357). *Metabolites* vol. **2**, 39-56.
- Reyes-Dominguez, Y, Bok, J.W., Berger, H., Shwab, E.K., Basheer, A., Gallmetzer, A., Scazzocchio, C., Keller, N., Strauss, J., 2010. Heterochromatic marks are associated with the repression of secondary metabolism clusters in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* vol. **76**, 1376-86.
- Ruger-Herreros, C., Rodríguez-Romero, J., Fernández-Barranco, R., Olmedo, M., Fischer, R., Corrochano, L.M., Canovas, D., 2011. Regulation of conidiation by light in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* vol. **188**, 809–822.
- Saito, K., 1907. Über die Säurebindung von *Aspergillus oryzae*. *Bot. Mag.* vol. **21**, 7–11.
- Saruno, R., Kato, F., Ineno, T., 1979. Kojic acid, a tyrosinase inhibitor from *Aspergillus albus*. *Agric. Biol. Chem.* vol. **43**, 1337–1338.
- Schjerling, P., Holmberg, S., 1996. Comparative amino acid sequence analysis of the C6 zinc cluster family of transcriptional regulators. *Nucleic Acids Res.* vol. **24**, 4599–4607.

- Seo, J.A., Guan, Y., Yu, J.H., 2006. FluG-dependent asexual development in *Aspergillus nidulans* occurs via derepression. *Genetics* vol. **172**, 1535–1544.
- Shinohara, Y., Tokuoka, M., Koyama, Y., 2011. Functional analysis of the cyclopiazonic acid biosynthesis gene cluster in *Aspergillus oryzae* RIB 40. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* vol. **75**, 2249-2252.
- Strauss, J., Reyes-Dominguez, Y., 2011. Regulation of secondary metabolism by chromatin structure and epigenetic codes. *Fungal Genet. Biol.* vol. **48**, 62–69.
- Tadenuma, M., Sato, S. 1967. Studies on the Colorants in Saké - Presence of Ferrichrysin as Iron Containing Colorant in Saké. *Agric. Biol. Chem.* vol. **31**, 1482-1489.
- Takahashi, T., Masuda, T., Koyama, Y. 2006. Enhanced gene targeting frequency in *ku70* and *ku80* disruption mutants of *Aspergillus sojae* and *Aspergillus oryzae*. *Mol. Gen. Genom.* vol. **275**, 460–470.
- Takahashi, T., Jin, F.J., Sunagawa, M., Machida, M., Koyama, Y., 2008. Generation of large chromosomal deletions in koji molds *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus sojae* via a loop-out recombination. *Appl. Environ. Microbiol.* vol. **74**, 7684–7693.
- Tanaka, M., Yoshimura, M., Ogawa, M., Koyama, Y., Shintani, T., Gomi, K., 2016. The C₂H₂-type transcription factor, FlbC, is involved in the transcriptional regulation of

- Aspergillus oryzae* glucoamylase and protease genes specifically expressed in solid state culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* vol. **100**, 5859–5868.
- Tao, L., Yu, J.H., 2011. AbaA and WetA govern distinct stages of *Aspergillus fumigatus* development. *Microbiology* vol. **157**, 313-326.
- Terabayashi, Y., Sano, M., Yamane, N., Marui, J., Tamano, K., Sagara, J., Dohmoto, M., Oda, K., Ohshima, E., Tachibana, K., Higa, Y., Ohashi, S., Koike, H., Machida, M., 2010. Identification and characterization of genes responsible for biosynthesis of kojic acid, an industrially important compound from *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genet. Biol.* vol. **47**, 953–961.
- Todd, R.B., Andrianopoulos, A. 1997. Evolution of a fungal regulatory gene family: the Zn (II)Cys6 binuclear cluster DNA binding motif. *Fungal Genet. Biol.* vol. **21**, 388–405.
- Tokuoka, M., Seshime, Y., Fujii, I., Kitamoto, K., Takahashi, T., Koyama, Y., 2008. Identification of a novel polyketide synthase-nonribosomal peptide synthetase (PKS-NRPS) gene required for the biosynthesis of cyclopiazonic acid in *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genet. Biol.* vol. **45**, 1608-1615.
- Tokuoka, M., Kukuchi, T., Shinohara, Y., Koyama, A., Iio, S., Kubota, T., Kobayashi, J., Kayama, A., Shindo, H., Sato, K., 2015. Cyclopiazonic acid biosynthesis gene cluster *cpaM* is required for speradine A biosynthesis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* vol. **79**, 2081–2085.

- Tominaga, M., Lee, Y.H., Hayashi, R., Suzuki, Y., Yamada, O., Sakamoto, K., Gotoh, K., Akita, O.,
2006. Molecular analysis of an inactive aflatoxin biosynthesis gene cluster in *Aspergillus
oryzae* RIB strains. *Appl. Environ. Microbiol.* vol. **72**, 484-490.
- Tudzynski, B., 2014. Nitrogen regulation of fungal secondary metabolism in fungi. *Front.
Microbiol.* vol. **5**. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00656
- Yabuta, T., 1924. The constitution of kojic acid: A d-pyrone derivative formed by *Aspergillus
flavus* from carbohydrates. *J. Chem. Soc.* vol. **125**, 575-587.
- Yamada, O., Na, Nan S., Akao, T., Tominaga, M., Watanabe, H., Satoh, T., Enei, H., Akita, O.,
2003. *dffA* gene from *Aspergillus oryzae* encodes L-ornithine N⁵-oxygenase and is
indispensable for deferriferrichrysin biosynthesis. *J. Biosci. Bioeng.* vol. **95**, 28-88.
- Yu, J.H., Butchko, R.A., Fernandes, M., Keller, N.P., Leonard, T.J., Adams, T.H. 1996.
Conservation of structure and function of the aflatoxin regulatory gene *aflR* from *Aspergillus
nidulans* and *A. flavus*. *Curr. Genet.* vol. **29**. 549-555.
- Wang, B., Guo, G., Wang, C., Lin, Y., Wang, X., Zhao, M., Guo, Y., He, M., Zhang, Y., Pan, L.,
2010. Survey of the transcriptome of *Aspergillus oryzae* via massively parallel mRNA
sequencing. *Nucleic Acids Res.* vol. **38**, 5075-5087.

Watters, M.K., Manzanilla, V., Howell, H., Mehreteab, A., Rose, E., Walters, N., Seitz, N., Nava, J., Kekelik, S., Knuth, L., Scivinsky, B., 2018. Cold shock as a screen for genes involved in cold acclimatization in *Neurospora crassa*. *G3-Genes Genom. Genet.* vol. **4**, 1439–1454.

大場俊輝, 村上英也, 原昌道, 横関公男, 牧野正則, 江頭勇次, 1969. 米麴の褐変に関する研究 (第1報) 褐変現象とその条件. 日本醸造協会雑誌 vol. **64**, 1074-1080.

大場俊輝, 佐藤和夫, 鹿毛政史, 原昌道, 菅間誠之助, 1974. 米麴チロシナーゼの簡易測定法と酵素産生条件の検討. 日本醸造協会雑誌 vol. **69**, 56-58.

苅田修一, 梅原康夫, 矢野善嗣, 浜地正昭, 布川弥太郎, 1991. Bio Gel P-2 カラムによる米麴中の麴酸の定量. 日本醸造協会誌 vol. **86**, 884-885.

五味勝也, 飯村穰, 原昌道, 1987. 吟醸酒用麴菌の育種. 日本醸造協会雑誌 vol. **82**, 792-797.

佐藤信, 大場皓蔵, 蓼沼誠, 1967. 清酒中の着色物質に関する研究(第5報) 清酒および米麴中の Ferrichrome 類化合物とその非含鉄化合物の迅速定量法. 日本醸造協会雑誌 vol. **62**, 875-880.

寺本四郎, 橋田度, 大塚親男, 1953. 麴酸生産菌株による清酒の試醸並びにその抗火落性に就て. 日本醸造協会雑誌 vol. **48**, 195-200.

日本醸造協会 編, 1993. 第4回改正 国税庁所定分析法注解, 日本醸造協会, pp. 211-228.

布川弥太郎, 椎木敏, 岩野君夫, 斉藤和夫, 1981. 米麴の酵素力価と清酒もろみの発酵特性.

日本醸造協会雑誌 vol. **76**, 350-353.

浜地正昭, 布宮雅昭, 渡辺醇造, 来間健次, 本馬健光, 1977. 製麴条件とデフェリフェリクリン

ンの生産に関する研究 (第1報). 日本醸造協会雑誌 vol. **72**, 880-884.

藤井史子, 尾関健二, 神田晃敬, 浜地正昭, 布川弥太郎, 1992. 市販酵素剤を利用した麴菌

体量簡易測定法. 日本醸造協会誌 vol. **87**, 757-759.

三嶋豊, 芝田孝一, 瀬戸英伸, 大山康明, 波多江慎吉, 1994. KAのメラニン生成抑制作用と各

種色素沈着症に対する治療効果. 皮膚 vol. **36**, 134-150.

村上英也, 河合美登利, 1958. 麴の着色に関する酵素学的研究 (第5報) 麴菌酸化酵素につ

いて. 日本醸造協会雑誌 vol. **53**, 88-92.

村上英也 編著, 1986. 麴学, 日本醸造協会, pp. 123-127, 217-314.

発表論文

1. Gen-ya Arakawa, Hayato Kudo, Atsushi Yanase, Yuichi Eguchi, Haruka Kodama, Masahiro Ogawa, Yasuji Koyama, Hitoshi Shindo, Masaru Hosaka, Masafumi Tokuoka (2019) A unique Zn(II)₂-Cys₆-type protein, KpeA, is involved in secondary metabolism and conidiation in *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genetics and Biology* vol. **127**, 35-44.
2. 荒川弦矢, 進藤齊, 穂坂賢, 徳岡昌文 (Inpress) 種麴製造及び製麴における麴菌 *Aspergillus oryzae* の制御因子 KpeA の機能解析. 東京農業大学農学集報.

謝辞

本研究を遂行し学位論文をまとめるに当たり、終始御懇篤な指導と御高配を賜りました、東京農業大学大学院農学研究科醸造学専攻 徳岡 昌文准教授に深く感謝致します。また、御指導御鞭撻いただきました同専攻 穂坂 賢教授並びに進藤 斉准教授に深く感謝致します。

麹菌転写因子遺伝子破壊株ライブラリーの利用を快諾して頂いた、公益財団法人野田産業科学研究所の小山 泰二所長並びに小川真弘博士に深く感謝致します。電子顕微鏡の操作方を御教授頂いた、東京農業大学国際食糧情報学部国際農業開発学科 本橋 慶一教授に深く感謝致します。種麴の製造方法を御教授頂いた、株式会社ビオック 和久 豊博士に深く感謝致します。本研究に御助力頂いた、東京農業大学 応用生物科学部 醸造科学科 酒類生産科学研究室の学生の皆さんに深く感謝致します。

最後に、博士後期課程への進学を承諾し、学生生活を全ての面で支えてくれた、両親、親族に深く感謝致します。

Summary

Aspergillus oryzae is an important microorganism in the bio- and food industries; therefore, understanding the mechanism underlying its secondary metabolism regulation is important for ensuring its safe use. Here, I screened a novel Zn(II)₂-Cys₆-type protein-encoding gene, AO090003001186, designated as *kpeA* (kojic acid production enhancement A), from an *A. oryzae* disruption mutant library of transcriptional regulators. *kpeA* is highly conserved among filamentous fungi and encodes a protein with Zn(II)₂-Cys₆ motif located in the middle of the sequence. A Cys to Ala substitution mutant of KpeA showed identical phenotype to the *kpeA* disruption strain, confirming that KpeA is novel type Zn(II)₂-Cys₆ binding protein. Colonies of the *kpeA* disruption strain ($\Delta kpeA$) had longer aerial hyphae and showed decreased conidia production. Microscopic analysis suggested that the reduced vesicle size and conidial head formation in $\Delta kpeA$ strain account for the decreased conidia production. Transcriptional levels of *brlA* and downstream *abaA* and *wetA* were decreased in $\Delta kpeA$ strain. Moreover, $\Delta kpeA$ strain produced 6-fold more kojic acid than the control strains, and the expression of *kojR* and *kojA* was increased in $\Delta kpeA$ strain. Therefore, KpeA is a novel Zn(II)₂-Cys₆-type protein likely involved in conidiation and kojic acid production at the transcriptional level.

To clarify the role of KpeA in sake brewing, I analyzed the functionality of KpeA in rice *koji* making and seed *koji* making. In seed *koji* making, the $\Delta kpeA$ strain showed longer aerial hyphae and the number of conidia was one-third that of the control strain. In accordance with conidiation, expression of *brlA* was also decreased in the $\Delta kpeA$ strain, whereas it was increased in the *kpeA* overexpression (OE) strain. These results suggested that, similar to the phenomenon that occurs in agar culture, KpeA induced conidiation via positive regulation of *brlA* expression in seed *koji* making.

Rice *koji* samples made with $\Delta kpeA$ strain, OE strain, and control strain were analyzed for conidiation, enzyme activity, and secondary metabolites. The OE strain and the control strain formed conidia after 46 and 72 h of inoculation, respectively, whereas the $\Delta kpeA$ strain did not. In contrast, activities of representative hydrolytic enzymes in rice *koji* did not differ among the strains.

Regarding secondary metabolism, I confirmed that *kpeA* is responsible for the enhanced kojic acid production via inducing the expression of *kojA*. Notably, the browning of rice *koji* extract was not observed in the $\Delta kpeA$ strain sample. I confirmed that additional dosage of kojic acid at the level of the rice *koji* of the $\Delta kpeA$ strain prevented the browning of rice *koji* extract of the control sample. As a result, *kpeA* disruption led to increased kojic acid amount in rice *koji*, which consequently prevented the browning of rice *koji*.

Taken together, I screened a novel Zn(II)₂-Cys₆ type regulator, that play an important role in secondary metabolism and conidiation in both experimental and industrial culture condition.