

氏 名	荒 川 弦 矢		
学位 (専攻分野の名称)	博 士 (醸造学)		
学位記番号	甲 第 783 号		
学位授与の日付	令和 2 年 3 月 20 日		
学位論文題目	麹菌 <i>Aspergillus oryzae</i> における新規二次代謝制御因子 KpeA の機能解析		
論文審査委員	主査	准 教 授・博士 (農学)	徳 岡 昌 文
		教 授・博士 (農学)	柏 木 豊
		教 授・博士 (生物産業学)	穂 坂 賢
		博士 (工学)	楠 本 憲 一*

論文内容の要旨

麹菌 *Aspergillus oryzae* は日本の伝統的醸造物の製造に用いられ、長年にわたり醸造物の成分として食されてきたことから、その菌体及び生産物は人に対して安全であると経験的に認知されている。一方で、麹菌の近縁種の *A. flavus* は二次代謝産物としてアフラトキシンなどの猛毒を生産する。そのため、食経験だけではなく、遺伝子レベルで麹菌の安全性を確認することは、醸造産業の維持と発展の基盤となることは疑う余地はない。さらに、麹菌は、チロシナーゼ阻害活性作用をもつコウジ酸や、キレート作用を持つデフェリフェリクリシン、抗生物質であるペニシリンなどの、マイコトキシンとは異なる二次代謝産物を生産することから、二次代謝産物に関する研究は広く有用物質の生産や清酒品質の向上などに関連する。

かつては困難であった遺伝子レベルの研究であるが、現在はゲノム情報が明らかとなり、さらに遺伝子工学的手法も整備されたことから、*A. oryzae* においても二次代謝産物の生産能に関する遺伝学的研究が精力的に行われている。特に生合成酵素については研究の進展が著しく、コウジ酸やペニシリン、シクロピアゾン酸などの二次代謝産物について、合成酵素の遺伝子クラスターが同定されている。一方で、二次代謝産物の生産制御については、モデル糸状菌での研究から、DNA メチル化に関わるとされる *LaeA* や分生子形成の鍵因子である *BrlA*、光応答に関わる *LreA*、形態形成に関わる *VeA* など数多くの制御因子が明らかにされているものの、未だその全貌の理解には程遠く、二次代謝の制御因子のさらなる探索が多くのグループで取り組まれている。

糸状菌においてこれまで見出されている二次代謝の制御因子の多くは、突然変異株の作出を端緒として遺伝学的な解析により同定されたものであった。しかし、近年では大腸菌や酵母などのモデル微生物では、人為的に遺伝子組換えにより造成されたライブラリーからのスクリーニングが一般的となっている。糸状菌においても *Neurospora crassa* において遺伝

子破壊株ライブラリーを活用したスクリーニング実験の報告を皮切りに、*A. oryzae*においても生研センターのプロジェクトにおいて転写制御因子遺伝子破壊株ライブラリーが構築され、これを活用した研究から、糖質資化系や環境応答に関わる新規制御因子が同定されている。

これら背景を踏まえ、本研究では、麴菌を含む糸状菌の二次代謝の制御系の解明を目指し、*A. oryzae*の転写制御因子遺伝子破壊株ライブラリーから新規二次代謝制御因子をスクリーニングし、その機能解析を行った。

1. コウジ酸生産を指標とした転写制御因子遺伝子破壊株ライブラリーのスクリーニング

初めに、*A. oryzae*の代表的な二次代謝産物であり、検出培地により簡易的に生産量を評価できるコウジ酸について、その生産制御因子を*A. oryzae*の転写制御因子遺伝子破壊株ライブラリーから探索した。コウジ酸生産に関わると予想された因子の中には、光応答の制御因子 LreA や carbon catabolite repression の制御因子 CreB, 分生子形成の抑制因子 NsdD が含まれたものの、これらはすでに二次代謝との関わりが示唆されていた。しかし、Gene ID が AO090003001186 の遺伝子は、これまでに*A. oryzae*を含むすべての生物において全く特徴付けされていない因子でありながら、その破壊株はコウジ酸生産が顕著に増加したことから極めて興味深いと考えた。そこで本因子を *kpeA*(kojic acid production enhancement A)と名付け、さらなる機能解析を行った。

2. *in silico* 解析

第 1 章のスクリーニング実験より見出された新規二次代謝制御因子 KpeA について、ゲノム情報の確認を含め、転写領域とアミノ酸配列の推定を行った。転写領域を決定するために*A. oryzae* RIB40 株の total RNA から逆転写して合成した cDNA について 5'-RACE 解析及び 3'-RACE 解析を行い、*kpeA* は 4 つのエキソンから構成される 2,461 bp の ORF をもち、5'UTR と 3'UTR はそれぞれ 251 bp 及び 721 bp であることを明らかにした。興味深いことに、5'UTR 内には終止コドンと共有する 3 つの upstream ORF(uORF)が予測された。uORF は転写制御因子の UTR に比較的多く存在し、転写後制御に関わるとされることから、KpeA の機能との関連に興味をもたれる。確定した塩基配列をもとにアミノ酸配列を予測した結果、KpeA は 761 アミノ酸残基からなる質量 85.5 kDa のタンパク質であると推定された。予想アミノ酸配列をクエリとして高次構造を予測したところ、KpeA には真菌の典型的な DNA 結合モチーフである Zn(II)₂-Cys₆モチーフが保存されており、DNA 結合型の制御因子であると予測された。しかし、典型的な Zn(II)₂-Cys₆型制御因子の DNA 結合モチーフは N 末端近傍領域に存在するのに対し、KpeA ではアミノ酸配列の中央付近に存在した。そこで*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について調

べたところ、97%の制御因子が N 末端近傍領域にモチーフを持ち、配列中央に持つ遺伝子は *kpeA* を含めて 4 つのみであった。また、 $Zn(II)_2$ -Cys₆型制御因子によく保存されているモチーフである Middle homology region は予測されなかった。さらに、KpeA と他の $Zn(II)_2$ -Cys₆型制御因子の系統解析を行ったところ、KpeA と AlcR が他の $Zn(II)_2$ -Cys₆型制御因子とは異なるクレードに分類され、系統解析からも KpeA が他の $Zn(II)_2$ -Cys₆型制御因子と異なる特徴的な構造であることが予測された。以上のことから、KpeA は *A. oryzae* の制御因子の中で最も多い $Zn(II)_2$ -Cys₆型制御因子であったが、DNA 結合モチーフの位置が極めて特徴的なタンパク質であることが明らかになった。

3. 形態形成への影響

第 3 章では二次代謝と協調的な制御を受けることが知られている分生子形成と KpeA の関連について調べた。Malts 寒天培地に *kpeA* 破壊株及び高発現株、相補株、対照株(遺伝型をそろえた親株)の分生子を播種し、形成したコロニーの分生子数を比較したところ、相補株と対照株が 2×10^8 conidia/plate の分生子を形成したのに対し、*kpeA* 破壊株の分生子数は対照株の 1/2 程度に減少し、高発現株は 1.5 倍に増加した。また、*kpeA* 破壊株は頂のうが少なく、小さい頂のうを形成したが、*kpeA* 高発現株は頂のうが多く、大きい頂のうを形成したため、KpeA が頂のうの成熟に関わり、その結果として、*kpeA* 破壊株や高発現株の着生する分生子数が変化すると考えられた。さらに、分生子形成の中心的な制御因子である BrlA と AbaA, WetA の遺伝子発現を調べたところ、*kpeA* 破壊株において BrlA の遺伝子発現の遅れに起因すると考えられる AbaA と WetA の遺伝子発現の低下が観察された。これら結果から、*kpeA* 破壊株の分生子数の減少の根本的な原因は BrlA と AbaA, WetA の遺伝子発現の変動にあると考えられた。

BrlA の上流には複数の転写活性化因子が同定されており、KpeA とそれら既知の制御因子との関係は不明であるため、今後、ゲルシフトアッセイや ChIP 解析などによる DNA-protein の相互作用の解析が必要である。

4. 二次代謝制御の解析

第 4 章では KpeA によるコウジ酸生産制御について定量的な解析を行い、BrlA との関連から制御メカニズムを調べたほか、コウジ酸以外の二次代謝産物の生産制御への関与について調べた。

第 1 章における寒天培地での定性的なスクリーニング実験により *kpeA* 破壊株のコウジ酸生産の増加が観察された。さらに液体表面培養におけるコウジ酸生産を HPLC により定量したところ、対照株と相補株、高発現株が培養 25 日目に菌体 1 mg 当たり 1 mg のコウジ酸を培地中に蓄積したのに対して *kpeA* 破壊株は 6 mg のコウジ酸を蓄積した。この培養条

件において *kpeA* 破壊株のコウジ酸の推定生合成酵素遺伝子 *kojA* と制御因子遺伝子 *kojR* の発現は対照株の 3 倍以上であった。この結果から、KpeA は制御因子 KojR の転写レベルの抑制を介して、コウジ酸生産を負に制御することが明らかとなった。

第 3 章において KpeA は BrlA の上流因子であると予想されたことから、コウジ酸生産が BrlA の発現に影響を受けるかについて検討した。まず、BrlA 破壊株のコウジ酸生産量を定量したところ、培養 10 日目において BrlA 破壊株は *kpeA* 破壊株以上のコウジ酸生産を示した。さらに、第 1 章のスクリーニングにおいて、BrlA の転写活性化因子である FlbB と FlbD の遺伝子破壊株のコウジ酸生産量が増加し、BrlA の転写抑制因子である NsdD の遺伝子破壊株のコウジ酸生産が減少した。以上の結果は、コウジ酸生産が BrlA の制御を受けることを初めて示した結果であり、さらに KpeA によるコウジ酸生産の制御も分生子形成と同様に BrlA を介していることを示す。

二次代謝の制御因子には複数の二次代謝を制御する因子があり、*kpeA* もコウジ酸以外の二次代謝産物の生産制御に関わる可能性があった。そこでペニシリンとシクロピアゾン酸の生産への影響について調べた。*kpeA* 破壊株の培養液を試料とした抗菌試験から、*kpeA* の破壊によりペニシリン生産量が減少することが分かった。そこでペニシリン生合成遺伝子 *acvA*, *ipnA*, *aata* の発現を調べたところ、*kpeA* 破壊株において 3 遺伝子とも発現量が減少していた。シクロピアゾン酸生産への影響については、ライブラリー株の親株である RIB40 株がシクロピアゾン酸非生産株だったため、生産株である NBRC4177 株から造成された宿主を用いて *kpeA* 破壊株を作製し、その生産量を測定した。その結果、*kpeA* 破壊株のシクロピアゾン酸生産量が減少しており、ペニシリンに加えて、シクロピアゾン酸の生産制御にも KpeA が関与することが示され、KpeA が複数の二次代謝を転写レベルで制御する因子であることが明らかとなった。

5. Zn(II)₂-Cys₆ モチーフの解析

第 2 章の *in silico* 解析から KpeA がアミノ酸配列中央にモチーフを持つ特徴的な構造の Zn(II)₂-Cys₆ 型制御因子であり、*A. oryzae* の Zn(II)₂-Cys₆ 型制御因子に類似した構造の転写因子は非常に少なかった。典型的な制御因子と構造が異なることから、*kpeA* の Zn(II)₂-Cys₆ モチーフの配列が機能していないことが懸念されたため、本章では *kpeA* の Zn(II)₂-Cys₆ モチーフ内の Cys 残基を Ala 残基に置換した *kpeA*_{Ala} 株を作製し、その形質を確認することで Zn(II)₂-Cys₆ モチーフが機能しているかを検討した。*kpeA*_{Ala} 株を作製し、Malts 寒天培地上での形態を調べたところ、*kpeA* 破壊株と同様に気中菌糸が長く、分生子数が少ないことが観察された。Malts 寒天培地に各株の分生子を播種し、培養 7 日目の分生子数を計測したところ、対照株が 2.3×10^8 conidia/plate の分生子を形成したのに対し、*kpeA*_{Ala} 株は 1.6×10^8 conidia/plate と有意に減少していた。また、コウジ酸検出培地の培養 4 日目におい

て対照株は培地呈色を示さなかったが、*kpeA*_{Ala}株は既に培地呈色を示しており、コウジ酸生産量が増加していた。分生子数の減少とコウジ酸生産の増加は*kpeA*破壊株と同じ形質であることから、*kpeA*_{Ala}株が生産するKpeAは機能していないと考えられ、また、それはZn(II)₂-Cys₆モチーフのAla置換に起因すると考えられた。以上のことからKpeAのZn(II)₂-Cys₆モチーフがタンパク質の機能に重要であることが明らかになった。

6. 醸造環境における形態形成及び物質生産への影響

種麴や米麴は穀物上に*A. oryzae*を生育させたものであり、その培養方法は固体培養と呼ばれ、実験室条件である平板培養や液体培養とは培養環境が大きく異なる。そこで第5章では、実際の醸造環境におけるKpeAの機能を調べるために、醸造現場での培養工程である、種麴製造と製麴において機能解析を行った。まず、玄米を用いて*kpeA*破壊株と高発現株、対照株の種麴を製造し、各株の種麴の状貌を観察したところ、*kpeA*破壊株の種麴は菌糸が長く、分生子が減少する特徴を示した。さらに引き込み後48 hrの*kpeA*破壊株のBrlA発現量が減少していたことから、KpeAは種麴製造においても平板培養と同様にBrlAを介して分生子形成を制御していることが強く示唆された。次に作製した種麴を用いて製麴を行い、米麴の状貌を観察したところ、対照株では種切り後72時間において黄緑色の分生子を形成したのに対して、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。一方、*kpeA*破壊株は種切り後72時間でも分生子を形成しなかったことから、KpeAは固体培養においても平板培養と同様に分生子形成を促進することが明らかになった。さらに、各株の米麴に含まれる二次代謝産物を測定したところ、デフェリフェリクリシンの含有量に差はなかったが、コウジ酸が*kpeA*破壊株で増加し、高発現株で減少していた。コウジ酸の推定生合成酵素遺伝子*kojA*の遺伝子発現も減少していたことから、KpeAが固体培養においてもコウジ酸生産を転写レベルで制御することが示された。

さらに褐変性への影響を調べるために、米麴抽出液を調製したところ、対照株と*kpeA*高発現株の麴抽出液が褐変したのに対して、*kpeA*破壊株の麴抽出液は褐変しなかった。そこで*kpeA*破壊株のチロシナーゼ活性が低下していると考え、活性測定を行ったが、*kpeA*破壊株と対照株の活性に差はなかった。*kpeA*破壊株の米麴中のコウジ酸量が多いために麴抽出液の褐変が抑制された可能性を考え、対照株の麴抽出液に*kpeA*破壊株で生産された量と同量のコウジ酸を添加したところ褐変が抑制された。これらの結果より、*kpeA*破壊株では米麴中に含まれるコウジ酸が褐変を抑制していることが強く示唆され、*kpeA*破壊株では、コウジ酸生産量が増加することで米麴の褐変が抑制された可能性が示された。米麴の各種酵素活性を測定したところ、*kpeA*破壊により、グルコアミラーゼと α -グルコシダーゼの活性が有意に低下することが示されたが、清酒製造に用いる米麴として問題がない力価であった。以上の結果より、KpeAは醸造環境である固体培養においても二次代謝と分生子形成を制御

する重要な制御因子であることが分かった。

7. 総括

本研究では *A. oryzae* 転写制御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からコウジ酸の新規制御因子として KpeA を見出した。KpeA は典型的な $Zn(II)_2\text{-Cys}_6$ 型の DNA 結合モチーフを持つが、その位置が特徴的な新規構造の制御因子であった。また、KpeA はコウジ酸だけでなく、ペニシリンとシクロピアゾン酸の生産制御にも関係することから、幅広く二次代謝に関わることが分かった。さらに二次代謝だけでなく分生子形成にも関わり、鍵因子である Br1A を転写レベルで正に制御する因子であり、頂のうの成熟に影響を及ぼす因子であった。また、遺伝子発現解析からは、二次代謝についても Br1A を介して制御する因子であることが示唆された。さらに、製麴や種麴製造においても分生子形成と二次代謝を制御する重要な因子であることが示された。本研究は、糸状菌の二次代謝産物の生産制御機構に関わる重要な新規制御因子を代謝物と形態、遺伝子発現の観点から特徴付けたることに成功し、醸造環境での機能が確認されたことを含め、基盤的かつ産業的に意義がある成果を得ることができた。

審査報告概要

本研究では、麴菌 *Aspergillus oryzae* の二次代謝系の制御理解を目的として、転写制御因子遺伝子破壊株ライブラリ 351 株に対するスクリーニングを行い、コウジ酸生産に関わる新規制御因子を同定し KpeA と命名した。また遺伝子破壊株の解析から、KpeA がコウジ酸やペニシリンなどの複数の二次代謝と、気中菌糸の伸長や分生子形成などの形態形成を重要な転写因子として知られる Br1A を介して制御する因子である可能性を示した。本研究は糸状菌の二次代謝と分生子形成との関連を理解する上でも重要な手掛かりとなる研究である。

以上より、遺伝子破壊株ライブラリ株に対するスクリーニングから、糸状菌における新規転写因子の同定とその機能解析まで一貫した研究を展開し、糸状菌研究に広く貢献する基礎的な新規因子を発見した優れた研究である。また、本研究では実際の製麴などを介した、醸造現場での KpeA の役割りの解析にも取り組んでおり、醸造における応用も期待できる点で評価できることから、審査委員一同は博士（醸造学）の学位を授与するに価値があると判断した。