

ゲノムから見る麴菌転写因子群の構成

小林 哲夫

糸状菌は植物性バイオマスの分解能力がきわめて高く、自然環境での物質循環に大きく貢献している。分解能力が高い理由は、多種多様な基質の分解・代謝に関わる酵素を生産するためであり、また、この多様な酵素生産性のため、糸状菌は古来より醸造用微生物として用いられるとともに、現在では、有用酵素の分離源として産業上重要な位置を占めている。

糸状菌が多種の基質に対する分解・代謝酵素遺伝子を持つことは、最近明らかとなりつつある各種糸状菌のゲノム配列からも明らかである。たとえば glycosyl hydrolase 遺伝子をとっても、すでにゲノム配列が報告された *Neurospora crassa* で約 100 種が予測されている。¹⁾興味深いことに、我が国において酒、醤油、味噌の生産に利用されてきた麴菌 *Aspergillus oryzae* では、ペクチン分解酵素群を代表例としてさらに多くの glycosyl hydrolase が予測されており、プロテアーゼの数も *N. crassa* と比較して著しく多い(投稿中)。主としてアミラーゼ生産菌として知られてきた *A. oryzae* であるが、ゲノム情報から見た応用面での潜在能力は非常に高いといえる。しかし、この潜在能力を引き出すためには、眠っている遺伝子を発現させなければならない。なぜならば、推定アミノ酸配列のみで酵素の有用性を判断することは現時点ではほぼ不可能だからである。

特定基質の分解・代謝酵素をコードする遺伝子群は、ある一定の環境条件が満たされたときに発現する。その基質が存在することは最低条件であるが、他に炭素源であればグルコース、窒素源であればアンモニアのような容易に代謝される基質が存在しないことも条件となることが多い。また、酵素の種類によっては pH、温度などさまざまな物理、化学的条件も大きく生産に影響する。このような条件特異的遺伝子発現を制御するのが転写因子である。したがって、転写因子の理解はゲノムで眠っている有用酵素遺伝子の応用のために非常に重要である。

糸状菌の転写因子

転写因子には生命活動に必須なものから、特定代謝系を制御するものまでさまざまなものがある。前者のような転写因子は真核生物間で広く保存されており、後者に近いほど各生物特異的となる。転写因子は、多くの場合 DNA 結

合ドメインを中心として特徴的な保存配列を持つことから、これによりさまざまなファミリーに分類されている。糸状菌において最大のファミリーを構成する転写因子は真菌類特異的な Zn(II)₂Cys₆ 型転写因子であり、*N. crassa* に 77 種、*A. oryzae* にはなんと 187 種も存在する。第二のファミリーは C₂H₂ 型転写因子であり、*N. crassa* で 43 種、*A. oryzae* では 64 種に及ぶ。現在までの研究例では、特定基質の分解・代謝に関わる有用酵素遺伝子の条件特異的発現は、ほとんどの場合この 2 種の転写因子群に支配されている。数は 10 以下と少ないが GATA ファクター、bZIP ファクター、helix-loop-helix (HLH) タンパク質なども糸状菌に存在し、中には有用酵素遺伝子の転写を制御している例も知られている。他にも糸状菌が持つ転写因子は存在するが、本稿では *A. oryzae* ゲノム上に存在する上記転写因子遺伝子について現状の知見を述べる。なお、誌面の都合上、文献を十分に引用できないことをお詫びしておく。

Zn(II)₂Cys₆ 型転写因子

このファミリーに属する転写因子は、N 末端に Zn(II)₂Cys₆ 型の DNA 結合モチーフを持つことを特徴とする。多くの場合 2 量体としてプロモーターに存在する CGG の逆位繰返し配列 (CGGN_xCCG, CCGN_xCGG)、または順位繰返し配列 (CGGN_xCGG, CCGN_xCCG) を認識して結合する。²⁾ 真菌類特異的な転写因子であり、植物や動物には存在しない。ゲノム上で予測される遺伝子数は、*Saccharomyces cerevisiae* で 53 種、*N. crassa* で 77 種、*A. oryzae* では 187 種に及ぶ。³⁾ 現在まで機能解析された例は存在数と比較するときわめて少ないが、環境の炭素源や窒素源への応答に関与するものが主であることから、代謝経路特異的転写因子と言える。たとえば、先駆的研究から本タイプ転写因子の代表とされる *S. cerevisiae* の Gal4p はガラクトース資化系の遺伝子群を制御し、Put3p はプロリン資化系、Leu3p はロイシン資化系の遺伝子群を制御する。環境に存在する栄養源に対応し、適切な資化系、生合成系遺伝子群の転写を活性化する転写因子であろう。糸状菌では産業用酵素として重要なアミラーゼ、セルラーゼ、キシラーゼ遺伝子などが本タイプ転

著者紹介 名古屋大学大学院生命農学研究科生物機構・機能科学専攻(教授) 〒464-8601 名古屋市千種区不老町
TEL. 052-789-4085 FAX. 052-789-4087 E-mail: koba@agr.nagoya-u.ac.jp

写因子の制御下にあり、これら以外の多糖分解酵素遺伝子も本タイプ転写因子により制御されていると考えられる。したがって、 $\text{Zn(II)}_2\text{Cys}_6$ 型転写因子は糸状菌有用酵素遺伝子の発現制御に関与する応用上きわめて重要な転写因子であると言える。冒頭で述べたが、*N. crassa* と比べて、*A. oryzae* が持つ glycosyl hydrolase、プロテアーゼ遺伝子の数は多い。この事実と本タイプ転写因子の数が多くことはよく相関しており、*A. oryzae* は *N. crassa* と比較して、より幅広い栄養条件に合わせて適切な酵素群を生産する能力を持つと考えられる。*Aspergillus nidulans* もほぼ同数の本タイプ転写因子を持つため、数の多さは *Aspergillus* 属共通の特性であろう。興味深いことは、この両者の *Aspergillus* を比較すると3割近くの因子がそれぞれの種に特異的であることである。これらが、それぞれの種に特異的な遺伝子発現を制御しているかどうかについては今後の検討課題であろう。

187種に及ぶ $\text{Zn(II)}_2\text{Cys}_6$ 型転写因子のうち、*A. oryzae* からクローン化された因子は AmyR, AoXlnR, AflR, AmdR, FacB, Otam, MalR の7種に過ぎない。AmyR はデンプン分解系、AoXlnR はキシラン、セルロース分解系の遺伝子発現を制御する。AflR はアフラトキシン合成に関与する *Aspergillus flavus* AflR, ステリグマトシチン合成に関与する *A. nidulans* AflR のオルソログであるが、周知の通り *A. oryzae* はアフラトキシンを生産しない。AmdR はアセトアミドの資化、FacB は酢酸資化、Otam は窒素源の利用、MalR はマルトース資化に関与する。

他の因子については、他生物の解析結果から機能予測するしかないが、実はこの点に問題がある。*A. oryzae* と *A. nidulans* の比較で述べたように、各生物に特異的な本タイプ転写因子の数が多く、また、機能のわかっている因子の数が少ないことの二点が主要な理由である。たとえば、BLASTによる相同性検索で、E-value が 1.0×10^{-30} 以下で既知因子とヒットするのは39遺伝子に過ぎない。これより大きいE-valueでは、単にDNA結合ドメインのみの相同性になってしまい、あまり意味をなさない。 1.0×10^{-30} 以下でも同一機能と思えるものは少なく、筆者の指標では自信を持って機能推定できるのは12遺伝子のみである。これらは、それぞれキニン酸代謝、プロリン代謝、尿酸資化、アルコール資化、アルギニン代謝、メタノール資化に関与する QutA, PrnA, UaY, AlcR, ARCA, Mut3p, クチナーゼ生産に関与する cutinase transcription factor α , β , 何らかの糖質の資化に関わる SugR, 薬剤耐性に関与する Rdrp1, sexual development

を制御する PRO1, RosA のオルソログである。

機能予測を妨げるもう一つの要因がある。これは、相同性の高いパラログの存在である。たとえば、キシナーゼ、セルラーゼの転写に関与する AoXlnR にはきわめて相同性の高いパラログ (1.0×10^{-144}) が存在する。同様に、UaY では2種、Rdr1p では4種のパラログが存在する。これらが重複した機能を持つならば大きな問題ではないのだが、*A. nidulans* の XlnR パラログはガラクトース代謝を制御する因子であることが最近明らかにされた (XXIII Fungal Genetics Conference, 2005)。したがって、全体にわたって高い相同性が観察されても、同一機能と同定することにはまだ危険が伴うのである。さらに、3種存在する酵母の Gal4p ホモログはガラクトース代謝に関与しないのかという疑問も生じる。本因子の研究が最も進んでいるのは酵母であるが、そのデータを参考にするのは意外と問題がありそうである。結局のところ、現状では *A. oryzae* の本タイプ因子187種のうち約1割、19種の機能が既知、あるいは推定可能であるに過ぎない。

C2H2型転写因子

C2H2型転写因子のDNA結合モチーフは保存された Cysteine と Histidine 2 残基ずつからなる Zinc finger である。本タイプ転写因子は原核、真核いずれの生物にも存在し、*N. crassa* では上記 $\text{Zn(II)}_2\text{Cys}_6$ 型転写因子に続き二番目に大きい family を構成している。¹⁾ $\text{Zn(II)}_2\text{Cys}_6$ 型転写因子と比較すると、糸状菌 C2H2型転写因子は多数の遺伝子の制御に関与しており、したがって、生存にとってより重要な因子であると言える。*A. oryzae* のゲノム上にはこのタイプの転写因子遺伝子が64種存在し、*N. crassa* の43と比べ非常に多い。³⁾ 他の *Aspergillus*, たとえば *A. nidulans*, *Aspergillus fumigatus* ではそれぞれ69種、64種であることから、C2H2型転写因子が多数存在することも *Aspergillus* の特徴であろう。

A. oryzae では、既知の C2H2型転写因子は CreA, PacC, BrlA の3種に過ぎず、機能解析も充分とは言えない。しかし、これら因子の機能は *A. nidulans* で詳しく解析されている。CreA は炭素源抑制に関わる因子である。炭素源抑制とは、グルコースなどの易代謝性の炭素源による、難代謝性炭素源の利用に関わる遺伝子群の転写抑制を指す。炭素源抑制の実験にグルコースが多用されるため誤解されがちであるが、グルコース特異的な現象ではなく、代謝経路がまったく異なるキシロースも CreA 依存の転写抑制を引き起こす。本転写因子はさまざまな有用酵素

生産の抑制に関わることから、応用上は不都合な因子である。しかし、*creA* 遺伝子のノックアウト株は生育がきわめて悪く、残念ながら現状では実用的とは言えない。

PacCはpHホメオスタシスに関与する因子である。本因子は外界のアルカリ pH に応答して、アルカリ環境下に特徴的な遺伝子の誘導、酸性環境下に特徴的な遺伝子の抑制を引き起こす。アルカリ側に至適 pH を持つプロテアーゼ、キシラナーゼ、フォスファターゼなどの生産にも関与しており、応用上重要な因子である。

CreA, PacC 以外で有用酵素生産に関わる可能性がある C2H2 型転写因子としては、AmdA, AmdX, AceI が知られており、これらのオルソログが *A. oryzae* に存在する。これらの因子が制御する遺伝子の範囲は現在不明であるが、*A. nidulans* の AmdA, AmdX はアセトアミダーゼ遺伝子の転写制御に関与し、*Trichoderma reesei* の AceI はセルラーゼ遺伝子の転写を抑制する。現在、*A. oryzae* に存在する機能既知因子のオルソログは、上述以外に BrlA と FlbC があり、*brlA* 遺伝子は *A. oryzae* から単離されている。いずれも、分生子形成を制御する因子である。

A. oryzae の C2H2 型転写因子では、以上に記述した 7 種についてのみ、程度の差はあれ機能推定可能である。その他の 57 種に及ぶ因子の機能についてはまったく未解明である。

GATA ファクター

GATA ファクターは GATA をコアとする (A/T)GATA (A/G) 配列に結合する転写因子で、真核生物にのみ存在する。*N. crassa*, *A. nidulans*, *A. oryzae* の GATA ファクターの数はいずれも 6 種と保存されている。*A. oryzae* では 4 種は *A. nidulans* の因子のオルソログであり、それぞれ、アンモニア抑制に関わる AreA, AreA 機能欠損変異のサプレッサーとして同定された AreB, シデロフォア合成と鉄イオンの取り込みを制御する SreA, 子嚢胞子形成を制御する NsdD にあたる。残りの 2 種は *N. crassa* の光応答に関わる WC-1, *Fusarium solani* のクチナーゼ誘導に関与する PBP のホモログである。後者については *N. crassa* WC-2 と高い相同性を示す。

AreA はアンモニウム抑制の中心的役割を果たす転写活性化因子であり、炭素源抑制に関与する CreA と対をなすものである。前者が抑制因子であるのに対し、後者は活性化因子であることに注意されたい。AreA は容易に利用できるアンモニアやグルタミンなどの窒素源が存在しないときに転写活性型となる。硝酸イオンのような場合を除き、多くの窒素源はタンパク質などの有機物とし

て存在する。プロテアーゼには AreA の制御下にあるものがよく知られており、したがって本因子も応用上重要な因子である。興味深いのは NsdD の存在である。*A. oryzae* では sexual cycle が確認されておらず、当然子嚢胞子は形成しない。*A. oryzae* の NsdD が活性を持つのか、どのような現象に関与するかは今後の課題であろう。

その他の転写因子

A. oryzae は 10 種の helix-loop-helix (HLH) タンパク質を有しているが、現在までに解析された例はない。*A. nidulans* では PenR2, DevR の 2 種が解析されており、前者はペニシリン合成に、後者は分生子形成に関わっている。b-ZIP ファクターは 9 種存在している。*A. oryzae* では HapX のみが知られているが、これは広域転写因子 Hap 複合体と相互作用する因子として取得された。*A. nidulans* ではイオウ代謝に関わる METR が同定されている。

転写因子に関するポストゲノム研究の現状

以上、*A. oryzae* の転写因子の構成を概述したが、機能が既知および予測可能のものは、あわせて約 1 割に過ぎない。*A. oryzae* 転写因子に関する網羅的なトランスクリプトーム解析は、糸状菌の転写制御ネットワークの一体解明のための学術的基盤のみならず、産業微生物 *A. oryzae* の高度有効利用のための応用的基盤を確立するものである。ヨーロッパにおける *A. niger* を用いた大規模なトランスクリプトーム解析を考慮に入れると、迅速に転写因子研究を推進すべきであろう。我が国では地域新生コンソーシアム研究開発事業のプロジェクト「麴菌ゲノム情報による新醗酵プロセス開発技術の確立」で、網羅的なトランスクリプトーム解析がなされていると聞いているが、現在のところ結果はまだ公開されていない。今後の転写因子解析の方向性に関わる重要なデータであるので、早期の公開が望まれるところである。*Aspergillus* 属糸状菌は、古来より日本人の食生活を支えてきた。我が国を代表する産業微生物であり、その基礎・応用研究で後塵を拝するわけにはいかない。

文 献

- 1) Borkovich, K. A. et al.: *Microbiol. Mol. Biol. Sci. Rev.*, **68**, 1 (2004).
- 2) Todd, R. B. and Andrianopoulos, A.: *Fungal. Genet. Biol.*, **21**, 388 (1997).
- 3) Kobayashi, T. et al.: *Applied Mycology and Biotechnology*, Vol. 5 and 6, Elsevier Science, in press.