3S-Ca03 *Aspergillus nidulans*の低酸素応答と代謝調節のオミックス解析

○高谷 直樹
(筑波大院・生命環境)
takaya.naoki.ge@u.tsukuba.ac.jp

*Aspergillus*属は古くから清酒や醤油などの発酵・醸造産業に使用されてきた糸状菌であるとともに、クエン酸などのさまざまな有用物質や酵素の工業生産にも利用されている。一方、*Aspergillus*属は、菌類のモデル生物として重要な *A. nidulans* を含む。本研究では、特に培養の通気条件に注目し、*A. nidulans* と麹菌 *A. oryzae* の遺伝子発現が低酸素条件下でどのように変化するかをトランスクリプトームの手法を用いて網羅的に解析した。得られた研究成果は、培養の通気条件が重要とされる食品・工業生産の効率化に役立つと期待される。

A. nidulans の低酸素条件下における遺伝子発現応答を DNA マイクロアレイを用いて網羅的に解析した (1)。*A. nidulans* は低酸素条件下で、解糖系、TCA サイクルおよび TCA サイクルのバイパス経路である gamma-aminobutyrate (GABA) シヤントを構成する遺伝子の発現を上昇させた。本菌は、低酸素条件下では、エタノール発酵および乳酸発酵によって NADH を再酸化し、GABA シヤントにより NADH の過剰な蓄積を回避していると考えられる。また、低酸素条件下では、主要な電子受容体である酸素が不足によって細胞内の NAD⁺:NADH の比が上昇する。この条件下では、NAD⁺ 依存型のヒストンデアセチラーゼである Sirtuin の活性が低下することによって、通常は発現抑制されている二次代謝系 (ステリグマトシスチンやペニシリン) の生合成が脱抑制されることも明らかとなった (2)。一方で、低酸素条件下では、RNA polymerase II (Pol II) や Pol II 依存型の転写の開始に関わる遺伝子の発現が低下するとともに、細胞内の全 mRNA 含量が低下したことから、*A. nidulans* は低酸素に反応して Pol II に依存した転写を抑制していることが示された。同様の手法を用いて、*A. oryzae* の低酸素環境への遺伝子発現応答を解析した。その結果、*A. nidulans* と同様、極めて多く (全遺伝子の 50%) の遺伝子の発現が低酸素条件下で変化することが示された (3)。これらの遺伝子と上述の *A. nidulans* の低酸素応答遺伝子の推定アミノ酸配列を比較し、2 種間での双方向ベストヒット (BBH)、片方向ベストヒット (EH)、ヒットなし (NSG) に分類した。BBH と EH のクラスタリング解析の結果、両菌種ともに、低酸素条件下においてアルコール発酵および TCA サイクルの GABA シヤントを構成する酵素遺伝子の発現を誘導しており、これらの菌が低酸素に反応して共通の代謝制御を行うことが示された。一方、*A. oryzae* では、*A. nidulans* とは異なり、低酸素条件下でグリオキシル酸回路が活性化されることが明らかとなった。また、*A. oryzae* の低酸素応答遺伝子の NSG には二次代謝および酸化窒素代謝に関わるものが多く含まれていた。以上の結果から、両菌種は、低酸素環境に反応して、種間で保存された代謝変換に加えて、種特異的な遺伝子発現応答を行うことが示された。

- 1) Masuo, S., et al., Mol. Genet. Genomics. 284, 415-424 (2010)
- 2) Shimizu, M., et al., Mol. Cell. Biol. 32, 3743-3755 (2012)
- 3) Terabayashi, Y. et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 93, 305-317 (2012)

Omics Analysis of *Aspergillus nidulans* Revealed Metabolic Shift under Hypoxia

○Naoki Takaya
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words transcriptome, fermentation, filamentous fungi, metabolic response

3S-Ca04 モロミックス解析を目指した麹菌総合オミックス解析

○岩下 和裕^{1,2}
(¹酒総研, ²広島大院・先端物質)
iwashitact@nrrib.go.jp

麹菌 (*Aspergillus oryzae*) など、*Aspergillus* 属のゲノムシーケンス解析への取組が始まり、おおよそ 10 年が経過としている。麹菌のゲノム解析では、当初から醸造産業への利用を目指して解析が行われてきた。しかし、いざゲノムシーケンス解析が終わってみると、麹菌全遺伝子のうち半数以上が機能未知遺伝子であり、産業利用のためにはこの広大な機能未知遺伝子の解明が重要である。一方で、醸造産物は、その製品の中に多種多様な代謝物を含んでおり、価値はその多種多様な代謝物の中にある。よって、醸造産業はメタボローム解析の重要性が高く、ゲノムやプロテオーム解析に、メタボローム解析も加えろろみをも丸ごと解析する「モロミックス解析」が必要である。今回、我々が行ってきた麹菌の総合オミックス解析への取組とその現状を紹介したい。

(I) 麹菌の系統解析と醸造上の性質、清酒成分との関連

一般に醸造産業では、麹菌は複数の菌株が混ざった「種もやし」として供給されるため、各醸造メーカーでは麹菌株について意識することが少ない。系統解析が少なくゲノムの系統も不明な点が多かった。そこで、ゲノムアレイを利用して、麹菌株の系統解析を行ったところ 13 系統に分類され、各系統と麹菌の使用用途との関連が示された。そこで、54 株の麹菌株を使用して実験室レベルで製麹、小仕込みを行って発酵経過の解析及び製成酒の一般分析と香气成分、UPLC-QTOF MS によるメタボローム解析を行ったところ、製成酒の代謝物組成と麹菌のゲノム系統には密接な関連が見いだされた。以上の事から、製品のコンセプトに合わせて麹菌を選抜する手掛も得られた。実際に、本知見を利用して、復興清酒「オール岩手」で使用される種もやし「黎明平泉」の開発に協力した。

(II) オミックス解析を利用した米麹タンパク質 (RKP) 遺伝子の解析

麹菌のゲノム中には数千の機能未知遺伝子が含まれており、これらの遺伝子の機能は麹菌株の性質と関連していると考えられる。そこで、まず我々は米麹のプロテオーム解析を行った。大吟醸麹と普通麹の主要な米麹タンパク質 (Rice Koji protein) をコードする 159 RKP 遺伝子を同定し、86 個の RKP 遺伝子について破壊株を作成した。これらの破壊株を持ち、製麹と小仕込みを行ったところ、米麹作成時にグロースに異常が見られる株等多数見出されたが、これらの株を除いて、一般分析上で対象株との差が見られた物は少なかった。そこで、メタボローム解析を行ったところ、対象株との差が見られる破壊株が多く見出された。プロテオーム解析とメタボローム解析を組み合わせることで、新たに麹菌遺伝子と清酒中の代謝産物との関連が見出された。

(III) 糸状菌類で広く保存された機能未知遺伝子 (CFF 遺伝子) の解析

麹菌の機能未知遺伝子の中でも、糸状菌広く保存されている遺伝子については糸状菌に共通した形質と大きく関わっていると思われる。そこで、糸状菌で広く保存されている機能未知遺伝子で、かつ米麹のトランスクリプトーム解析で高発現している遺伝子について CFF 遺伝子と命名し、130 遺伝子について遺伝子破壊株の作成を行った。これらの CFF 遺伝子破壊株について、プレートや液体培養での増殖、様々な薬剤についての耐性試験等を行ったところ、糸状菌固有の分化や形態形成、ジェノトキシンや細胞壁合成阻害剤の耐性に関わる新規の遺伝子が多く見出された。

【おわりに】

以上の通り、ゲノムやポストゲノム解析の知見とメタボローム解析との知見を合わせることで、これまでに知られていない遺伝子の機能が次々に明らかとなっている。これらの解析の結果は酒類総合研究所の麹菌総合ゲノムデータベースにて順次公開されている。

The way of Moromics; Malt-omics analysis of *Aspergillus oryzae* for the innovation of sake making

○Kazuhiro Iwashita^{1,2}
(¹NRIB, ²Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)

Key words genomics, proteomics, metabolomics, *Aspergillus oryzae*