

# 麹菌の新規トランスポソンの構造および機能解析と 効率的挿入変異法への利用

五味 勝也

(東北大学大学院農学研究科 生物産業創成科学専攻)

麹菌 (*Aspergillus oryzae*) はわが国の酒類や醤油・味噌などの醸造食品産業にとってきわめて重要な微生物である。しかし、麹菌には有性生活環が存在しないため、学術および産業用に重要な変異株における変異遺伝子などを従来の遺伝学的手法から特定することが困難である。したがって、遺伝子工学的に変異遺伝子を同定できる方法の開発が必要とされる。そのための有用な技術としてトランスポゾン・タギング法があり、本研究ではトランスポゾン・タギング法に利用可能な可動転移因子を麹菌から単離して、その構造と機能解析を目的として研究を実施した。

## 麹菌からの DNA トランスポソンの単離と構造解析

私たちが参加して実施した麹菌 EST 解析データ中に、*Aspergillus niger* の可動性転移因子 *Ant1* に相同性の高いクローンを見出した。この EST クローンをプローブに用い、*A. oryzae* RIB40 の遺伝子ライブラリーをスクリーニングして、2 個のポジティブクローンを取得した。得られたクローンの塩基配列を決定したところ、ORF が 981 bp で 326 個のアミノ酸をコードする遺伝子を含んでおり、このアミノ酸配列は *Ant1* 内に存在するトランスポゼースに 70% という高い相同性を示した。また、この推定タンパク質は IS630-Tc1 スーパーファミリーのトランスポゼースに共通する D35E モチーフを有していた。遺伝子が EST クローンとして見出されたことから、この遺伝子は転写され機能していることが予想されたので、*tnpA* (*A. oryzae* のトランスポゼース) と命名した。一般的に、トランスポゼース遺伝子はトランスポソンの内部に存在することが知られているが、*tnpA* は典型的な TIR (terminal inverted repeat) をもつ IS 配列内にはなく、IS 配列に相当するものは *tnpA* の約 1 kb 下流に存在していた。この IS 配列は約 1.9 kb で、*Ant1* の TIR と 72-82% の相同性を示す 39 bp の不完全型の TIR をもつ。IS 内にトランスポゼース遺伝子をもたないカビのトランスポソンは 0.1-0.4 kb と小さなものは見出されているが、1 kb 以上の大きさの IS でトランスポゼース遺伝子が外部にあるものとしては初めての例である。この IS 配列が実際にトランスポゾン活性をもつかは不明であるが、*Aot1* (*A. oryzae* transposon) と名付けた。*A. oryzae* RIB40 のサザン解析の結果、染色体上に *tnpA*、*Aot1* とともに 3 コピー存在しており、そのうちの 2 コピーは -アミラーゼ遺伝子 (*amyB*, *amyC*) の直ぐ下流に存在していた。*tnpA* の発現をノーザン解析により調べたところ、小麦フスマ抽出液培地での発現量が大きかった。

*Aot1* が転移活性を有するか否かを調べるために、*Aot1* 配列を *niaD* 遺伝子のイント

ロン領域に挿入した DNA 断片を作製し、これを用いて *A. oryzae* の *niaD* 遺伝子の相同組換えによる置換破壊株を造成した。得られた *niaD* 欠損変異株を硝酸塩を含む最小培地で培養することにより、復帰変異株として生育してくる株を取得した。現在これらの復帰株の *niaD* 遺伝子の解析を行い、*Aot1* の転移活性について調べているところである。

### 麹菌からのレトロトランスポソンの単離と構造解析

DNA トランスポソンと同様に、EST データ中に *Ascobolus immersus* の LINE 様 DNA 因子の逆転写酵素 (RT) 遺伝子に高い相同性を有するクローンを見出した。LINE (long interspersed nuclear element) は、LTR (long terminal repeat) をもたない可動性転移因子としてよく知られているものであり、この遺伝子が EST クローンとして見出されたことは、麹菌でもこの因子が RNA 中間体を経て転移する活性を有している可能性を示している。そこで、EST クローンをプローブとして遺伝子ライブラリーから 2 種類の異なる染色体部位にある DNA 配列を取得した。興味深いことに、一方のクローンには完全長のレトロトランスポソン様配列 *Aoret1* (*A. oryzae* retrotransposon) が含まれていたが、他方のクローンはこの *Aoret1* の約 6 kb 下流に異なる配列 *Aoret2* が存在していた。これらの配列はともに、同じ方向に転写されると考えられる 2 つの ORF を含んでいる。*Aoret1*、*Aoret2* の両方の 1 番目の ORF は、それぞれ 411、444 アミノ酸をコードしており、C 末端領域に DNA 結合に関与すると考えられるシステインリッチモチーフが認められた。このモチーフは他のレトロトランスポソンの gag 様タンパク質に共通に見出されるものである。2 番目の長い ORF は、*Aoret1*、*Aoret2* のそれぞれ 1301、1255 アミノ酸をコードしており、いずれもレトロトランスポソンの RT ドメインに相同性を示した。RT ドメインには RT 活性に重要と考えられる YXDD モチーフを含む 8 つの保存領域が認められ、YXDD モチーフとしては *Aoret1* は FIDD、*Aoret2* は FVDD となっている。ORF にコードされるタンパク質にはプロテアーゼモチーフは認められなかったが、N 末端領域にエンドヌクレアーゼに相同性のある領域が存在した。さらに、*Aoret1* では C 末端領域に RNase H に相同性のあるモチーフも見出された。

### 麹菌ならびに近縁種におけるレトロトランスポソンの分布

麹菌のいろいろな株と近縁種のカビにおけるレトロトランスポソンの分布を調べるために、サザン解析を行った。麹菌では、RIB40 をはじめとする多くの株で *Aoret1* は 1 または 2 コピーであったが、RIB143、RIB326、RIB647、RIB67 などの株は 10 コピー程度多く存在した。一方、*Aoret2* はいずれの麹菌株でも少なくとも 10 コピー以上存在していた。また、麹菌の野生種と考えられる *A. flavus* では *Aoret1*、*Aoret2* のいずれも明瞭なバンドとして検出できなかったが、*A. flavus* よりも分類学上離れている *A. sojae* ではいずれも多コピー存在していることが認められた。*A. oryzae* と *A. sojae* は醸造の現場で使用されていることから、古い時代に麹造りの場で共存

していた際に、これらのレトロトランスポゾンがお互いの菌の間で転移したのではないかと推定される。このようにレトロトランスポゾンが麹菌と近縁種との進化上の関係に新たな光を投げかけるものと考えられる。

### 麹菌におけるレトロトランスポゾンの発現解析

2 番目の ORF の一部をプローブとしてノーザン解析を行った結果、いずれのレトロトランスポゾンも約 5.5 kb の転写産物が認められた。これらの RNA の大きさは ORF2 よりも長いことから、1 番目の ORF をプローブに用いたノーザン解析を行ったところ、ほぼ同じ大きさのバンドが検出された。このことは、LINE 様の RNA 中間体として 2 つの ORF を含んだ完全長の転写産物が生成していることを示しており、タンパク質として翻訳までされているとすれば、gag 様タンパクと RT タンパクが合成されているものと考えられる。YPD 培地のような栄養リッチな培地で発現が強く認められるが、コピー数が 2 個の RIB40 と 10 コピーの RIB67 における発現量にはほとんど違いがなかったことから、多コピー株では遺伝子サイレンシングか大部分に欠陥があるのではないかと考えられる。他の生物のレトロトランスポゾンはストレス条件で活性化して転移が起きることが知られているので、42 (熱ショック条件) および CuSO<sub>4</sub> (酸化ストレス) 存在下で培養して発現を調べたところ、42 培養では発現レベルには変化は認められなかったが、CuSO<sub>4</sub> 存在下では *Aoret1* の発現量が顕著に増大していた。したがって、このような酸化ストレス条件下で培養することにより、*Aoret1* の転移活性が認められるかが次の課題である。

追記：現在進められている麹菌の全ゲノム解析の結果、新たに LINE 様レトロトランスポゾンの 1 種 (*Aoret3*) と、LTR 型のレトロトランスポゾンが 2 種類 (*AoLTR1*, *AoLTR2*) 見出されており、これらの麹菌および近縁種における分布や発現解析も実施しているところである。