

糸状菌 CCAAT 配列結合複合体を中核とした転写制御機構の解析

加藤 雅士

(名古屋大学大学院 生命農学研究科 / 現所属：名城大学 農学部)

研究の目的

CCAAT-box は真核生物の典型的なプロモーターエレメントのひとつである。CCAAT-box に結合する因子は酵母からヒトまでに存在し、それぞれ Hap 複合体および NF-Y (あるいは CBF) と呼ばれている。我々は麹菌 (*Aspergillus oryzae*) およびその近縁種の *A. nidulans* より CCAAT 結合因子を生化学的手法で同定 (Hap 複合体と命名)、本因子が様々な遺伝子の発現を上昇させる広域転写促進因子であることを明らかにしてきた^{1, 2)}。

さらに我々は、yeast-two-hybrid 法の変法を用いて、Hap 複合体と相互作用し転写活性化能を有する因子として HapX を同定し、その機能の解明を目指し研究を進めてきた³⁾。HapX は全長 475 アミノ酸からなり、N 末側に coiled-coil structure と bZip 型の転写因子に共通する basic domain を持ち、C 末側には生物間で保存された cystein を含む cystein-rich domains が存在している。最近、我々の研究グループ、Haas らのグループ、ドイツの A. A. Brakhage らのグループの共同研究により、HapX は鉄に応答して転写を制御される因子であることが示された⁴⁾。すなわち、HapX は分子内に鉄を含有する酵素群 aconitase (*acoA*), catalase B (*catB*), cytochrome *c* (*cycA*), homoaconitase (*lysF*) の転写抑制因子として働くことが明らかとなった。鉄のホメオスタシスを保つのは非常に重要なことである。鉄はエネルギー産生の代謝経路などにおいて重要なコファクターとして働くが、過剰な鉄が存在するとその反応性の高さからラジカルが生成され細胞の損傷が引き起こされる。*A. nidulans* では鉄欠乏時に iron-dependent pathways が抑制され、逆に過剰に鉄が存在する時には鉄の体内への取り込みが抑制されることによりホメオスタシスが維持されている。HapX はこの鉄利用の制御系や、鉄をコファクターとして含む酵素遺伝子の制御に関わる非常に大事な転写因子であり、HapX による転写制御機構を解明することは重要なことであるといえる。また、得られた知見は、麹菌の分子育種を通じて、醸造・発酵産業への利用など、応用研究への波及効果も少なくないと考えられる。

本研究では、糸状菌 CCAAT 結合因子 (HapB/C/E) と HapX による転写調節機構を分子レベルで理解するために、HapB/C/E と HapX の相互作用および HapB/C/E-HapX 複合体と標的遺伝子プロモーターとの相互作用を明らかにすることを目的とした。HapX は我々が初めて発見した新規の転写因子であるが、bZip 型の DNA 結合モチーフを持ち、オルソログが真菌類に広く存在することが、これまでの解析から分かっている。DNA への結合実験はこれまでどの生物種でも行われておらず、認識配列も不明であるので、本研究が初めての知見になると考えられた。

方法

in vitro における HapX と DNA との相互作用の解析: HapX の推定 DNA 結合領域 (bZip basic domain および coiled-coil 構造) を含む 1- 200 アミノ酸残基に続いて His-tag を連

結させたリコンビナントタンパク質を大腸菌で発現させ、Ni-NTA agarose レジンを用いて精製した。また、N末端とC末端を欠失した短い HapB (HapB core : 236-289 アミノ酸残基) に GST を連結させたリコンビナントタンパク質を大腸菌で発現させ、グルタチオンセファロースレジンを用いて精製した。さらに、GST-HapC、MalE-HapE を大腸菌で共発現させ、アミロースレジンを用いてリコンビナント HapC/E を精製した。精製したリコンビナントタンパク質を SDS-PAGE によって確認し、それぞれピークが見られた溶出画分を用いて複合体を再構成した後、ゲルモビリティシフトアッセイ (EMSA) および DNase I フットプリント解析に用いた。

cycA-lacZ 融合遺伝子を用いた *in vivo* 解析 : *cycA-lacZ* 融合遺伝子を作成し、*A. nidulans* 野性株および *hapXΔ* 株に導入後、β-ガラクトシダーゼ活性を測定した。推定 HapX 結合部位および CCAAT 配列に変異を導入したプロモーターについても同様の解析を行った。

結果

1. HapX と Hap 複合体の相互作用の解析 : HapB/C/E と HapX の混合液をゲルモビリティシフトアッセイ (EMSA) に供すると、HapB/C/E のみを供したときに見られるシフトバンドよりも移動度の小さなシフトバンドが検出された。(図1)。HapX のみを EMSA に供すると、シフトバンドは見られなかった。したがって、HapX は単独では DNA に結合することはできず、HapB/C/E 複合体依存で DNA に結合することが示唆された。Hap 複合体が結合し、HapX 制御下ないと考えられる *taaG2* プロモーターを用いた EMSA では、Hap 複体のシフトバンドは見られるものの、HapX を含むと考えられるシフトバンドは検出されなかった (図1)。このことから、HapX は DNA に結合したすべての Hap 複合体と相互作用するのではなく、プロモーター依存的に相互作用することが示された。

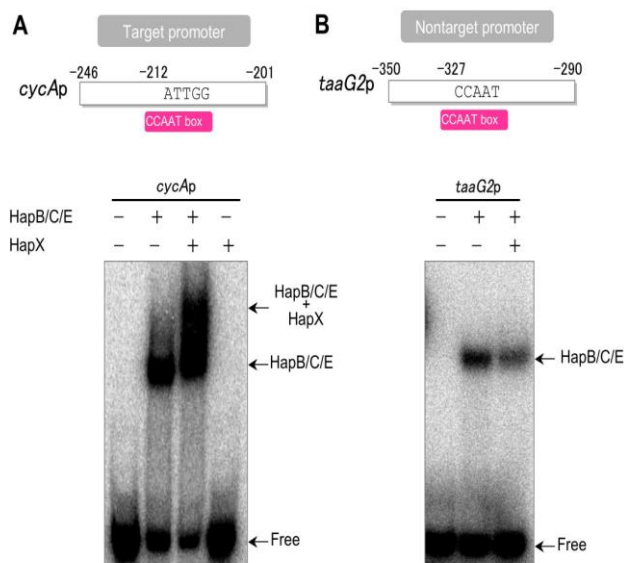


図1. プロモーターの違いによる HapX の結合への影響 :

(A) HapX 制御下にあると考えられる *cycA* プロモーターを用いたゲルモビリティシフトアッセイ。

(B) Hap 複合体制御下にあり、HapX 制御下ないと考えられるアミラーゼプロモーターを用いたゲルモビリティシフトアッセイ。

2. HapX/HapB/HapC/HapE 複合体を用いた DNase I フットプリント解析: HapX が相互作用する領域をより詳しく調べるため、*cycA* プロモーター配列を用いた DNase I フットプリント解析を行った(図2)。HapB/C/E のみを用いたときは CCAAT box を含む約 25 bp が DNase I から保護された。HapB/C/E/X200 を用いたときは、HapB/C/E のみを用いたときよりも保護される領域が約 10 bp 広がった。このことから、HapX も直接 DNA に結合している可能性が示唆された。

3. HapX 結合に必要な配列の同定: bZip 型の転写因子 AP-1 は、二量体を形成し 5'-TGAGTCA-3' という配列に結合することが知られている。*cycA* プロモーター配列を用いたフットプリント解析において HapB/C/E 複合体および HapX によって保護された領域には、AP-1 結合配列に似た 5'-TGAATCA-3' という配列が存在する。また、HapX 制御下にあると考えられる *cycA* プロモーター、*acoA* プロモーター、*catB* プロモーター、*lysF* プロモーター、*sreA* プロモーターの配列を比較したところ、5つすべてのプロモーターの CCAAT box 近傍に 5'-ATCA-3' (5'-TGAT-3') という配列が存在していた。この配列に HapX が結合すると予想し、この配列および周辺に変異を導入したプローブを作成してゲルモビリティシフトアッセイ解析を行った(図3)。その結果、予想通り ATCA (TGAT) 配列が HapX の結合に必要であることが示された。ATCA 近傍に変異を導入したときに HapX の結合がわずかに弱くなったことから、HapX の結合には ATCA 配列の周辺も幾分かの影響を与えることが示唆された。

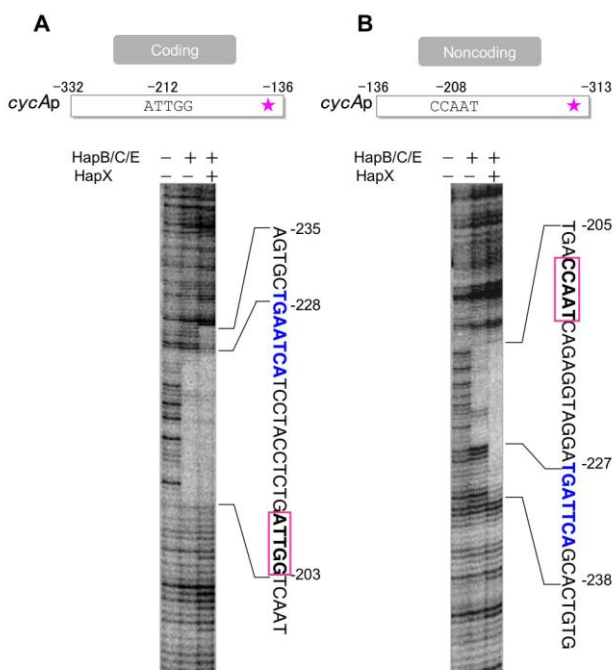


図2. HapB/C/E 複合体および HapXを用いた DNase I フットプリント解析による、*cycA* プロモーターへの HapX 結合領域の同定:
(A) *cycA* プロモーターの coding 鎖を RI で標識して行った DNase I フットプリント解析。(B) *cycA* プロモーターの noncoding 鎖を RI で標識して行った DNase I フットプリント解析。

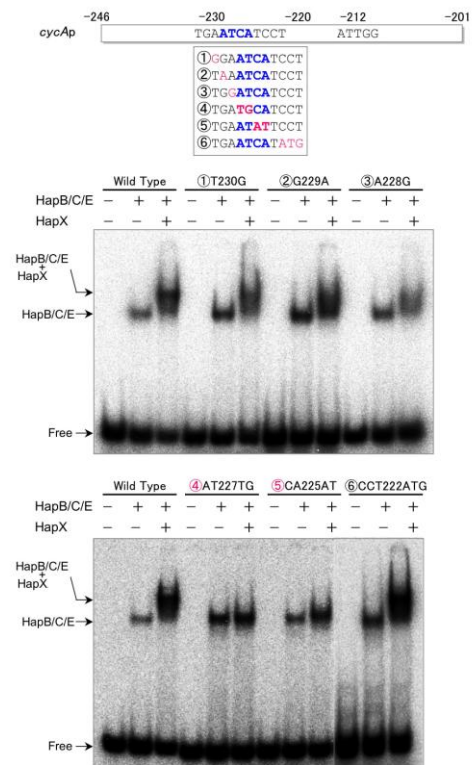


図3. HapB/C/E 複合体および HapX200を用いたゲルモビリティシフトアッセイによる、*cycA*プロモーターにおける HapX 結合配列の同定

4. β -ガラクトシダーゼをレポーターとした *cycA* プロモーターの解析: *in vivo* での HapX の結合を確認するため、*cycA* プロモーターに *lacZ* を連結させたプラスミドを構築し、*A. nidulans* BPU 株 (*hapX*⁺) および *hapX* Δ 株に導入した (図 4)。*cycA* プロモーターは、wild type および HapX 結合配列に変異を導入したもの、CCAAT box に変異を導入したものをを用いた。最少培地で 24 時間培養後、菌体を回収・破碎し、タンパク質を抽出した。得られたタンパク質抽出液を用いて β -ガラクトシダーゼアッセイを行ったところ、*cycA* プロモーター (wild type) /*hapX*⁺ では、-Fe のとき、+Fe のときの 1/2 以下にまで活性が低下していた。この活性の低下は、HapX 結合配列 (ATCA) に変異を入れたとき (*atcaM*) および CCAAT box に変異を入れたとき (*attggM*) には少し回復した。また、*hapX* Δ 株を用いたときには、すべてのプロモーターにおいて -Fe 時の活性の大幅な低下は見られなかった。これらのことから、鉄欠乏時、*cycA* は HapX によって抑制されていることが示され、この HapX による抑制は HapX 結合配列 ATCA および CCAAT box を介して起こることが示唆された。

結論

本研究では以下のことが明らかとなった。1) HapX は HapB/C/E の存在下で標的のプロモーターと相互作用する。2) 標的遺伝子の一つチトクローム *c* 遺伝子 (*cycA*) のプロモーターにおいて ATCA 配列は HapX の認識に必須である。3) 推定 HapX 結合部位は他の *Aspergillus* 属糸状菌の *cycA* プロモーターにも高度に保存されている。4) ATCA 配列は鉄欠乏条件下での *cycA* プロモーターの転写抑制に必要である。以上の結果とこれまでの知見を総合した現時点での作業仮説を図 5 にまとめた。鉄欠乏条件下では、HapB/C/E との相互作用の助けを借りて、ATCA 配列を中心とした鉄関連遺伝子のプロモーター領域に結合し、転写の抑制を行なう。この DNA 結合に bZip 様のドメインが関与していると考えられる。鉄が十分に存在する状態では HapX と HapB/C/E の親和性が

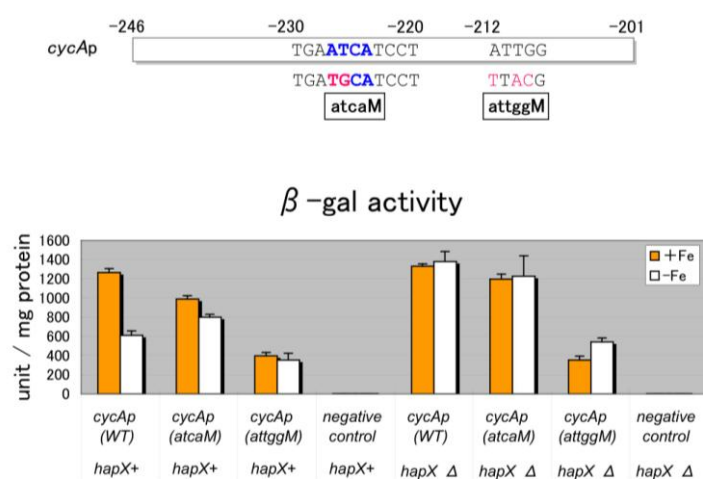


図4. β -ガラクトシダーゼをレポーターとして用いた *cycA* プロモーターにおける推定HapX結合部位およびCCAAT配列への変異導入の影響の解析。

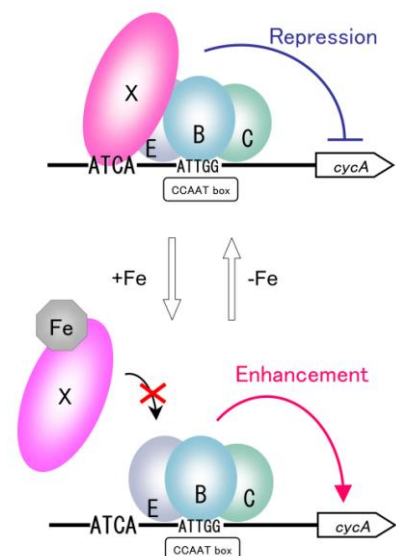


図5. HapXおよびHapB/C/E複合体による鉄関連遺伝子の転写抑制のモデル。

低下することが明らかとなっている。HapX 単独では DNA 結合できないため、鉄関連遺伝子の脱抑制が起こると考えられる。鉄の存在下での HapB/C/E との親和性の低下には、HapX の C 末端部分にあるシステインに富んだドメインが重要であると推測している。現在、この部分への鉄イオン等の直接結合の可能性を考え、新たな解析を検討している。

文献

1. Kato, M., Aoyama, A., Naruse, F., Tateyama, Y., Hayashi, K., Miyazaki, M., Papagiannopoulos, P., Davis, M.A., Hynes, M.J., Kobayashi, T., and Tsukagoshi, N. The *Aspergillus nidulans* CCAAT-binding factor AnCP/AnCF is a heteromeric protein analogous to the HAP complex of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.*, 257, 404-411 (1998).
2. Kato, M. An overview of the CCAAT-box binding factor in filamentous fungi: assembly, nuclear translocation, and transcriptional enhancement. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 69, 663-672 (2005).
3. Tanaka, A., Kato, M., Nagase, T., Kobayashi, T., and Tsukagoshi, N. Isolation of genes encoding novel transcription factors which interact with the Hap complex from *Aspergillus* species. *Biochim. Biophys. Acta*, 1576, 176-182 (2002).
4. Hortschansky, P., Eisendle, M., Al-Abdallah, Q., Schmidt, A. D., Bergmann, S., Thön, M., Kniemeyer, O., Abt, B., Seeber, B., Werner, E. R., Kato, M., Brakhage, A. A., and Haas, H. Interaction of HapX with the CCAAT-binding complex - a novel mechanism of gene regulation by iron. *EMBO J.* 26, 3157-3168 (2007).