

麹菌酸性プロテアーゼの転写をコントロールする転写因子の同定とその結合 DNA 配列の決定

山形 洋平

東京農工大学大学院 農学研究院

研究の目的

黄麹菌は、多量かつ多種類のプロテアーゼを生産することが知られている。しかし、この生産がどのようにコントロールされているかは、明らかにされていない。その為、麹や麹菌の培養物から調製するプロテアーゼ剤には、様々なプロテアーゼが混在することとなり、麹菌の生産するプロテアーゼを産業的に用いて特異的な分解を行わせることは非常に難しい。この困難さは、プロテアーゼの発現制御が環境中に存在する窒素源、細胞内の窒素代謝と密接な関係があると考えられており、代謝経路への入り口が 20 種のアミノ酸やこれらが形成する短鎖ペプチドや無機窒素塩類など多岐にわたるためであろうと考えられている。これまでに、我々は環境中に存在する窒素源によってプロテアーゼの転写が変化することを見出している¹⁾。そこで、この中でも麹菌のプロテアーゼ群の中でも特に産業的に重要である酸性プロテアーゼの制御機構を解析し、効率的に発現を制御する仕組みを開発することを目的としている。

方法

1) *A. oryzae pepO* 遺伝子転写促進因子の探索とその結合配列の同定

PepO は、*A. oryzae* の生産する最もメジャーな酸性プロテアーゼである。*A. oryzae pepO* 遺伝子の上流 2,024 bp、1,473 bp、1,400 bp、1,300 bp、1,200 bp、1,100 bp、1,000 bp、500 bp の各配列を *amyB* 遺伝子に連結し、*A. oryzae* -アミラーゼ遺伝子三重破壊株(*A. oryzae amyABC*)に導入した。PepO 発現培地で上記形質転換体を培養し、培養上清中のレポーターとなる α -amylase 活性を測定した。その結果、*pepO* 遺伝子の上流 -1,300 bp ~ -1,100 bp 領域に転写活性化因子の結合領域が存在することが明らかとなった。そこで、更にこの領域の正の転写調節因子の結合領域を明らかにするため、ゲルシフトアッセイを行った。PepO 発現誘導培地で培養した *A. oryzae* から核抽出画分を調製し、これと上記推定結合領域の 50 bp ~ 20 bp の DNA 配列をプローブ DNA として反応させ、転写促進因子の結合位置を推定した。さらに、推定結合領域 DNA 配列中の連続する 3 塩基を他の塩基に置換したプローブを用いて転写調節因子が結合するために必要なコア配列の決定を試みた。

2) *A. oryzae prtR* 破壊株の解析

PrtR は *Aspergillus niger* や *A. fumigatus* など包括的にタンパク質分解酵素遺伝子の転写を正に調節していることが報告されている。このホモログ遺伝子が *A. oryzae* にも存在していることから、この遺伝子を破壊し、酸性プロテアーゼに対する影響を検討することとした。*A. oryzae* NS4 株を宿主として *ptrA* 遺伝子を導入することで *prtR* 遺伝子を破壊した。得られた破壊株をピリチアミン, Glu, Met を含む培地並びに窒素源としてカゼインを含む培地で培養し、その培養上清中の酸性プロテアーゼ活性の測定と *pepO* の半定量 PCR を行った。

3) 各アミノ酸を単一窒素源とした際の酸性プロテアーゼの発現制御

2) の結果と我々の以前の研究結果から、アミノ酸によって酸性プロテアーゼの発現が変動することが推定された。そこで、硝酸ナトリウムを唯一の窒素源とした合成培地で培養し、その後培養によって得られた菌体を 20 種のアミノ酸それぞれを単一の窒素源とした合成培地に移植した。その後、4 時間における酸性プロテアーゼの転写量を定量 rt-PCR によって測定した。

結果

1) *A. oryzae pepO* 遺伝子転写促進因子の探索とその結合配列の同定

-アミラーゼを用いたプロモーターアッセイの結果、*pepO* 遺伝子の上流 -1300 bp ~ -1,100 bp 領域に転写活性化因子の結合領域が存在することが明らかとなった。ゲルシフトアッセイの結果、この中に存在する 22 bp 中に転写促進因子の結合モチーフが存在することが明らかとなった。この配列に結合すると推測される転写因子が 2 種類推測された。しかし、これらの転写因子の結合モチーフ配列中の連続する 3 塩基の塩基置換を行っても DNA タンパク質の相互作用に影響を及ぼさないことから、推定される 2 種の転写因子以外の未知の因子が結合しているのではないかと考えられた。

2) *A. oryzae prtR* 破壊株の作製と解析

prtR 株の 36 時間の培養ではカゼインを基質とした際の酸性プロテアーゼの活性の大幅な低下が見られた。一方、転写解析の結果から *pepO* の転写が殆ど見られなくなることも明らかとなった。一方、48 時間では、*pepO* の転写は殆ど見られないものの *prtR* 株の酸性プロテアーゼ活性が大幅に上昇していた。この変化は特に Glu の存在下で顕著であった。このことから、*prtR* により *pepO* の転写は減少するが、*pepO* に代わって発現する酸性プロテアーゼが存在することが考えられた。また、このプロテアーゼ活性が、Glu 添加により大きく上昇することが示されたが、本破壊株では、常に、Glu, Met,

亜硝酸ナトリウムなどを添加しなくてはならず ,また ,この上昇が Glu や Met の添加によるものか *prtR* の破壊によるものかの検討が困難であることが考えられたため ,新たに RIB40 を宿主とした *prtR* 株の作製を行い ,その破壊株を取得するに至った。

3) 各アミノ酸を単一窒素源とした際のプロテアーゼの発現制御

麹菌を硝酸ナトリウムの培地から各アミノ酸を含む培地に移植した 4 時間後の *pepO* の転写は , Gln , Phe , Val , Leu , Ile , Met , His , Lys などでは転写が上昇し , Glu , Asp , Arg などでは , 転写が抑制されることが示された。

結論

麹菌の酸性プロテアーゼである *pepO* は , その上流約 1,000 bp 付近に 22 bp 以下の塩基配列からなる正の転写調節因子の結合部位が存在することが明らかとなった。この配列中には既知の転写因子結合モチーフが存在したが , これら以外の因子が結合しているのではないかと推定しており , 現在これを探査している。また , 包括的転写促進因子である *prtR* は , 麹菌においても 最もメジャーな酸性プロテアーゼである *pepO* の転写を正に促進していることが示唆された。今後は新たに取得した *prtR* 破壊株を用いて詳細を解析していく。また , 複数のアミノ酸が *pepO* の転写を制御していることも明らかになった。これらの結果はいずれも深く関連していると考えており , 今後は , これらの関連を検討して *PepO* を含む酸性プロテアーゼ群の生産制御機構を明らかにしていく。

文献

- 1) Maeda H, Sakai D, Kobayashi T, Morita H, Okamoto A, Takeuchi M, Kusumoto K-I, Amano H, Ishida H, Yamagata Y (2016) Three extracellular dipeptidyl peptidases found in *Aspergillus oryzae* show varying substrate specificities., *Appl Microbiol Biotechnol*, **100**: 4947-4958.