

糸状菌のミラーゼ遺伝子群の転写活性化機構
に関する分子生物学的研究

谷 豊 著

報告番号 甲第 4951 号

①

糸状菌アミラーゼ遺伝子群の転写活性化機構
に関する分子生物学的研究

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

遺伝子制御学

谷 修治

目次

略語	
序論	1
第一章 タカアミラーゼ A 遺伝子の発現誘導に関わるシスエレメント SRE の同定と新規 DNA 結合タンパク質 SREB の結合特性	
1. 緒言	7
2. 材料及び実験方法	9
3. 結果	19
4. 考察	23
図表	25
第二章 アミラーゼ遺伝子群転写活性化因子 <i>amyR</i> の機能解析	
第一節 アミラーゼ遺伝子群転写活性化因子 <i>amyR</i> 遺伝子の取得と解析	
1. 緒言	31
2. 材料及び実験方法	33
3. 結果と考察	38
図表	42
第二節 <i>rAmyR</i> の結合特性	
1. 緒言	46
2. 材料及び実験方法	48
3. 結果	53
4. 考察	58
図表	61
第三節 <i>AmyR</i> の機能ドメインの解析	
1. 緒言	68
2. 材料及び実験方法	70
3. 結果	78
4. 考察	83
図表	87
第三章 総合考察と今後の展望	95
参考文献	99
要約	108
謝辞	

報文目錄

報文

1. A novel nuclear factor, SREB, binds to a *cis*-acting element, SRE, required for inducible expression of the *Aspergillus oryzae* Taka-amylase A gene in *A. nidulans*.
2. Characterization of the *amyR* gene encoding a transcriptional activator for the amylase genes in *Aspergillus nidulans*.
3. *In vivo* and *in vitro* analyses of the AmyR binding site of the *Aspergillus nidulans agdA* promoter; requirement of the CGG direct repeat for induction and high affinity binding of AmyR.

参考論文目錄

参考論文

1. Purification and characterization of β -1,3-xylanase from a marine bacterium, *Vibrio* sp. XY-214.

略語

bp	base pair
cDNA	complementary DNA
DTT	dithiothreitol
EDTA	Ethylene diamine tetraacetate
Hepes	N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid
paba	<i>p</i> -Aminobenzoic acid
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
Pipes	Piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid)
PCR	polymerase chain reaction
PMSF	Phenylmethanesulfonyl fluoride
RT-PCR	reverse transcription PCR
SDS	sodium dodecyl sulfte
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane

序論

1945年、George Wells Beadle と Edward Lawrie Tatum らが赤パンカビ *Neurospora crassa* の突然変異株を用いた研究から、一遺伝子一酵素説を提唱した。Guido Pontecorbo らのグループにより *aspergilli* の遺伝学的解析が精力的に行われ始めたのもこの頃である。遺伝学を応用できる生物としてオールドバイオテクノロジーの世界でカビは重宝されてきた。1970年代の大腸菌を中心とした遺伝子操作技術の開発、それに引き続いた分子生物学の爆発的な発展の中で、カビは遺伝子操作の困難な生物として位置付けられ、分子生物学的研究の対象としては阻害されてきた感がある。しかし、現在では決して遺伝子操作が難しい生物ではなくなった。形質転換系の開発・自己複製能を有すベクターの開発等が行われ(22)、カビを宿主とした様々な有用酵素の大量生産を工業的に行う事が可能になり、学術分野では遺伝子発現機構、形態形成、分化等様々な生命現象に関する分子生物学的研究が盛んに行われている(9, 32, 62, 66, 84, 95)。以下に、近年明らかとなった真菌類における糖質関連酵素遺伝子の発現制御機構に関して概説する。

aspergilli は、多糖・単糖・二糖・ヘキソース・ペントース・アルコール・ポリオール・芳香族化合物・脂肪酸など様々な炭素化合物を単一炭素源として資化できる糸状菌である。多岐にわたる同化・異化経路が内在するだけでなく、固体・液体培地で単一の炭素源及び窒素源、金属塩と好気的な条件が整うだけで培養することができ、変異株も容易に取得できたことから、炭素源の代謝経路を解析するには好適な微生物となった。特に *Aspergillus nidulans* は分生子が単核であるという特徴を有しており、遺伝学的・生化学的・分子生物学的解析を行う上で非常に優れたモデル生物である。

自然界において、*aspergilli* は貯蔵多糖であるデンプンや植物細胞壁の構成多糖であるセルロース、ヘミセルロースやペクチンなどが多い環境に生息している。多くの糸状菌は土壌由来であることから容易に想像できる。これら炭素源を効果的に資化するには、多糖分解酵素の分泌量や特異的な資化経路に関わる遺伝子

群の発現誘導、解糖系遺伝子群の発現調節などの環境適応が必要である。分解酵素の分泌に至る遺伝子発現制御の第一段階は、低レベルで構成的に発現している分解酵素が基質を分解し、シグナル伝達物質を遊離させる事であるとされている(8)。伝達物質が細胞内に取り込まれ、直接或いは更に変換されて真の誘導物質となり、各々の酵素遺伝子の発現を誘導する。aspergilliにおいて伝達物質として機能することが示されている物質は分解産物であるオリゴ糖か生体内で生成される中間代謝産物である。A. tubigenis においてエンド型キシラナーゼをコードしている xynA は D-xylose で誘導される(12)。A. terreus においてはヘテロ二糖の D-glucose- β -1,2-D-xylose がセルロースとキシロース加水分解酵素の両方の発現を誘導する。ホモ二糖の D-glucose- β -1,2-D-glucose は選択的にセルラーゼを発現誘導する(29)。アミラーゼ遺伝子群の発現誘導における真の誘導物質に関する研究は当研究室で現在行われている。A. nidulans において、デンプンの分解産物である種々のホモ二糖に関してアミラーゼ遺伝子発現誘導能が解析された。デンプンから α -amylase, α -glucosidase, glucoamylase により分解・生成される主な二糖はマルトースである。マルトースを単一炭素源とした場合にもアミラーゼ遺伝子発現誘導はみられるが、最も低濃度で誘導物質として機能した二糖はイソマルトースであった。A. nidulans の生体内にはマルトースからイソマルトースを合成する酵素が検出され、それを精製後、諸性質を解析した。この酵素がマルトース、コージビオース等の二糖からイソマルトースへの変換を担う事が明らかとなった(39)。現在この酵素遺伝子を単離している段階であり、今後遺伝子破壊株を作製し、デンプンの種々の分解産物からイソマルトースへの変換がアミラーゼ遺伝子群の発現誘導における第一段階であるかどうか明らかにされる日も近い。

しかし、糖質分解酵素の誘導伝達物質は同時に発現を抑える抑制物質にもなる。マルトースは分解されるとグルコース二分子を生成し、カタボライトリプレッションを引き起こす。カタボライトリプレッションを誘引する物質としてはグルコースが最も有名でその抑制機構に関して詳細に研究がなされてきた(20, 40)。他にもキシロース、シュークロース、酢酸、フルクトースが抑制を引き起こす物質

として知られている(41)。*A. nidulans* でのグルコース抑制は転写抑制因子 CreA に担われている(15, 16)。そのホモログは *A. niger*, *A. oryzae*, *T. reesei* からクローン化されている(18, 77)。CreA はアミノ末端に *S. cerevisiae* の MIG1 と極めて類似した Cys₂His₂ 型の二つの zinc finger を持つ DNA 結合タンパク質であり、プロモーター上の SYGGRG 配列に結合して転写を抑制する。近年、*A. niger* のキシラナーゼ分解酵素遺伝子群において、キシロースが高濃度に存在する場合にも CreA に依存してそれらの発現を抑制することが明らかとなった。 α -グルクロニダーゼ A、フェルロイルエステラーゼ A などの極端な例では、1 mM キシロースでは誘導が観察されるが、5 mM では抑制されて mRNA 量は検出限界以下になった。しかし、*creA* 変異株においてはキシロースが高濃度に存在しても抑制されないことから、これらの遺伝子発現誘導は、誘導物質自体或いは誘導物質と抑制物質の濃度に依存して競争的に制御が行われているものとされている(14)。

各物質の濃度を感知するレセプターやシグナル伝達に関わる因子は明らかとされていないが、最終的に DNA に結合する抑制因子と転写活性化因子の機能発現を制御する事で遺伝子発現が制御されている。この例として、*S. cerevisiae* のマルトース資化に関わる遺伝子群の発現制御が挙げられる。マルトースパーミターゼ (Malx1)、マルターゼ (Malx2)、レギュレーター (Malx3) をコードする三種の遺伝子から構成される 13 kbp のクラスターは、五箇所の遺伝子座に位置(locus 1, 2, 3, 4, 6)している。各遺伝子はおのこの DNA 配列レベルで相同性が高く、機能的にも相補しうる。その中で、MAL6 locus のクラスター遺伝子をモデルに研究が進んでおり、その制御機構に関して概説する。

1.5 kbp のスペースを介して逆向きに位置する *mal61* (マルトースパーミターゼ)-*mal62* (マルターゼ) 両遺伝子の発現は、グルコース抑制に関わる MIG1 (CreA の *S. cerevisiae* における相同因子) と正の制御因子である MAL63 (Cys₂Zn(II) タイプの zinc finger motif を有す) により行われる。両因子の DNA 結合配列は隣接して存在しており、それぞれの因子がそれぞれの認識配列に結合する場合に競合する。この競合の結果、MAL61・MAL62 の発現が調節されている。しかし、ただ単に二種の因子の DNA との複合体形成における競合により制御されているわけではない。MIG1 はグルコース存在下でのみシスエレメントに結合してグル

コース抑制を伝達し、グルコース抑制に関与しない炭素源では、認識配列に結合していないことが報告された(91)。この制御は、MIG1 の局在をタンパク質のリン酸化を調節することにより行われている。構成的に発現している MIG1 はグルコース存在下でのみ数分で核移行し、グルコースを除くと直ちに核から排除される(13)。

一方でグルコース抑制は、抑制因子(*A. nidulans* CreA, *S. cerevisiae* MIG1)によって伝達されるだけではない事が近年明らかにされた。以前から、マルトース資化遺伝子群のグルコース抑制は、*mig1* 破壊株においてもグルコース抑制が完全に解除されないことから、MIG1 とは独立したグルコース抑制機構も存在する事が指摘されていた(31)。部分欠失 MAL63 を用いた機能ドメイン解析より、転写活性化因子である MAL63 自体に抑制機構が備わっていることが明らかとなった。N 末端のアミノ酸を 1 として、1~100 に DNA への結合に必要なドメインがあり、60~283 に転写活性化ドメイン、251~299 に negative regulatory domain、300~470 にマルトースに応答して転写活性化の阻害を取り除くドメインがある事が報告された(30)。また、Higgins らは 343~375 に MAL63 の constitutive mutant で見られるアミノ酸置換がクラスターを形成していることから、この領域を negative regulatory domain であると主張している。より詳細に、343~375 に部位特異的変異を導入し、maltase 活性に与える影響を解析することで、Leu343Phe の置換が構成的発現やグルコース非感受性の上昇を引き起こすことを見いだした(27)。また、MAL63 には GAL4 における GAL80 のような MAL63 specific negative regulatory factor は存在しないと考えられている。マルトースに応答した MAL63 の制御メカニズムとしては、非誘導、或いは抑制条件下では、negative regulatory domain が転写活性化ドメインを masking する事で、転写が起きない。そこに誘導物質からのシグナルが伝達され、コンフォメーション変化を起こして転写活性化ドメインの masking がはずれることで、基本転写因子との相互作用等が可能になるというモデルが予測されている(30) (27)。

MAL63 の転写活性化に関しては近年研究が進んでいるものの、その DNA 認識機構に関しては僅かな知見しか得られていない。

MAL63 の DNA 結合 motif は、酵母の転写因子 GAL4, PUT3, PPR1 と同様の Cys₆Zn(II) zinc finger 構造である(60)。GAL4, PUT3, PPR1 それぞれの DNA 認識配列は CGGN₁₁, N₁₀, N₆CCG で、両側のパリンδροーム配列とそのスペースを認識して結合する。ホモダイマーを形成する因子にとって、パリンδροーム配列間のスペースは、因子の特異的結合に非常に重要である。核内レセプターの場合、スペースが 1 塩基異なると異なる因子が結合する(58)。GAL4, PUT3, PPR1 の結合配列の特異的認識にはジンクフィンガードメインだけでなく、その C 末端側 19 残基のリンカードメインと称されるドメインで行われることが、キメラ蛋白質を用いたゲルシフトアッセイにより明らかになった(64)。MAL63 の認識配列は、非常に高濃度の MAL63 を用いた場合に結合が確認された三カ所の結合配列を比較した結果、5'-c/gGCN₉c/aGC/g-3' であると提唱されている(76)。CGG triplet 配列が三種の結合配列で完全には保存されていなかった。MAL63 はモノマーを水溶液中で形成しており、アミノ酸の一次構造比較からもダイマー形成部位の存在は示唆されなかったことから、DNA 結合モチーフは GAL4 ファミリーに属すものの、DNA 認識機構は異なると考えられている。また、近年 Cys₆Zn(II) zinc finger domain を有し二量体を形成する *A. nidulans* NirA, 或いは FacB が、CGG triplet の繰り返し配列ではなく非対称な配列を認識する事が報告された(78, 86)。Cys₆Zn(II)ドメイン内のアミノ酸は全ての因子において保存性が大きいものの、DNA の認識・結合の機構は一様ではないようである。

本研究では、タカアミラーゼ A 遺伝子(*taaG2*)の発現誘導に必須なシスエレメントを特定し、*A. nidulans* アミラーゼ遺伝子群の転写活性化因子, AmyR の結合特性と機能ドメイン解析を行った。

taaG2 発現誘導に関わるシスエレメントを大まかに決め、その領域に結合する核タンパク質をスクリーニングし、結合配列を決定することで、発現誘導に必須なシスエレメントの同定を目指した。検出された DNA 結合タンパク質の認識配列は転写開始点の上流-204 ~ -189 と-182 ~ -168 の二カ所であった。各結合領域とその周辺領域に部位特異的変異を導入し、アミラーゼ誘導生産能を解析した結果、上流側の領域のみが発現誘導に必須なシスエレメントであることが明らか

となった。

また、*A. nidulans* からアミラーゼ遺伝子群の発現誘導に関わる転写活性化因子をコードする遺伝子 *amyR* をクローニングし、その機能解析を行った。AmyR は、*A. nidulans* のアミラーゼ遺伝子群の発現誘導を制御しており、その発現は CreA に依存してグルコースにより抑制を受けることが明らかとなった。

AmyR を大腸菌を宿主として発現し、*in vitro* において結合特性を解析した。Cys₆Zn(II) zinc finger 構造を有す AmyR は、単独の CGG triplet を認識して結合するものの、CGG triplet が近接して順向きに位置する CGGN₈CGG 配列に対してより大きい結合親和性を有していることが明らかとなった。

in vivo における欠失 AmyR の機能解析から、AmyR の N 末端から 411 アミノ酸には転写活性化ドメインが位置し、それより C 末端側には誘導物質に応答するドメインと、転写活性化を阻害するドメインが含まれることを明らかとした。また、遺伝学的解析に用いられていた *malA* が、*amyR* と同一の遺伝子であることを証明し、その変異点を同定することで AmyR の機能発現に必須なアミノ酸を特定したのでここに報告する。

本論

第一章

タカアミラーゼ A 遺伝子の発現誘導に関わるシスエレメント SRE の同定と 新規 DNA 結合タンパク質 SREB の結合特性

1-1. 緒言

麹菌 *Aspergillus oryzae* におけるタカアミラーゼ A (TAA) の生産はデンプン・マルトースの存在下で誘導的に興り、その発現レベルは非常に高い特徴を有している。更に TAA 生産は、*taaG2* の由来株である JCM02239 株ではグルコースにより抑制されるが、*A. oryzae* においても他の株ではグルコースによる制御機構に差異が存在することが報告されており(44, 94)、同種間でもアミラーゼ遺伝子の発現制御機構に関して完全に保存されていない可能性が示唆されている。一方、近縁種である *A. nidulans* に *taaG2* を導入した場合、炭素源に応答した誘導・抑制の発現様式が JCM02239 と同様であることが明らかとされた(59, 87)。

A. nidulans 内在のアミラーゼ遺伝子の発現制御機構は明らかにされてはいないものの、*A. oryzae* と *A. nidulans* には共通の制御機構が存在すると考え、遺伝学的・分子生物学的解析に優れている *A. nidulans* を宿主としてアミラーゼ遺伝子発現誘導機構を解析することとした(36-38, 59)。

これまでに二つの制御因子、AnCP と CreA が *A. nidulans* における *taaG2* 発現に関与していることが明らかにされている。AnCP は酵母 *S. cerevisiae* の HAP 複合体のホモログである。この因子は、*taaG2* の転写開始点の上流約 300 bp に位置する CCAAT 配列に特異的に結合し、転写レベルの上昇を引き起こす(36, 37, 59)。しかしながら CCAAT 配列を欠損した場合にも *taaG2* は誘導的に発現することから、AnCP は *taaG2* の炭素源に応答した発現誘導には関与していない事が明らかとされている(36)。

CreA はカーボンカタボライトリプレッションに関わる負の制御因子である(20)。

組み換え体 CreA タンパク質が *taaG2* プロモーター上 -150 ~ -145 bp と -95 ~ -90 bp に位置する二カ所に特異的に結合する事から、*taaG2* は CreA 関与でグルコース抑制を受けていることが示唆された(38)。

一方、*taaG2* の発現誘導機構に関しては極僅かな知見しか得られていない。

A. oryzae RIB40 において、 α -amylase (*amyB*; JCM02239 株 *taaG2* の相同遺伝子), α -glucosidase (*agdA*), と glucoamylase (*glaA*) の三種のアミラーゼ遺伝子はマルトースにより誘導的に発現される(55)。この三種のアミラーゼ遺伝子のプロモーター領域は region I, II, IIIa/b と呼ばれる保存配列を有しており、region IIIa が *A. oryzae* における *agdA* の発現誘導と(57) *A. nidulans* における *amyB* の発現誘導(35)に関与していることが明らかとなっている。しかしながら、この領域に特異的に結合するトランスファクターの検出には至っていない。

本章では、より詳細に *taaG2* 発現誘導に関わるシスエレメントを同定するとともに、*taaG2* プロモーター上の -204 ~ -189 及び -182 ~ -168 の配列に特異的に結合する因子を検出し、その結合特性に関して解析したので報告する。

1-2. 実験材料及び方法

【菌株】

A. nidulans G191 (*pyrG89 pabaA1; fwA1 uaY9*)

A. nidulans G2-4; pA::*taaG2* により *A. nidulans* G191 株を形質転換して得られた株

Escherichia coli HB101 (pE)

XL1 blue (pA,pD,pTaaG2)

JM-83

【プラスミド】

pDJB-1; *A. nidulans* G191 株の形質転換用ベクター(ウリジン要求性を相補する *Neurospora crassa* 由来の *pyr4* (orotidine 5'-phosphate decarboxylase)を pBR325 に連結したプラスミド)

pTG-1; *A. nidulans* G191 株の形質転換用ベクター

ウリジン要求性を相補する *Neurospora crassa* 由来の *pyr4* の末端を平滑化し、pUC18 の *Ssp I* サイトに連結したプラスミド。更に、multi-cloning site の *HindIII* サイトが *Bgl II* サイトに改変されている。

pTaaG2; タカアミラーゼ A 遺伝子(*taaG2*)の全鎖長を pUC118 の *EcoR I* site に挿入したプラスミド

pA,pD,pE; *taaG2* 5'非翻訳領域を 5'側より順次欠損させた改変遺伝子を pDJB-1 の *Xba I-EcoR I* site に挿入したプラスミド

pTAP; pA より *taaG2* 5'非翻訳領域と構造遺伝子の一部を含む *Xba I-Sal I* 断片を取得し、これを *Xba I-Sal I* で切断した pUC119 に連結したプラスミド

【プラスミド DNA の調製】

プラスミドの調製は Birnboim と Doly の方法に従った(4)。

【電気泳動】

DNAの電気泳動には、0.7%、1.2% agarose (LO3 TAKARA) gel, 0.7%、1.2% agarose (FMC Bio Products SEAKEM GTG) gel を用い、Sharp らの方法(73)に従って行った。

【遺伝子操作用酵素】

各種制限酵素や修飾酵素は、市販品 (TOYOBO, 宝酒造) を用い、添付の説明書に従った。

【DNA塩基配列の決定】

DNA塩基配列の決定は、Sanger らの方法(71)に従った。

【*E. coli*の形質転換】

*E. coli*の形質転換は Hanahan の方法に従って行った(25)。

【5'側からの欠損遺伝子の作製】

pTAP を *Kpn* I と *Xba* I で消化し、exonuclease III を 30 °C で 5 分から 10 分作用させた。mungbean nuclease を 37 °C, 30 分作用させ 1 本鎖部分を除き、T4 DNA polymerase で平滑化した。*Sal* I で消化後、5% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、適当な長さの DNA 断片を取得した。pUC119 の *Sal* I-*Sma* I サイトにクローニングし、目的の長さに合致するものを選択した後、それらを *Eco*RI-*Sal* I で消化し *taaG2* のプロモーターを含む DNA 断片を得た。pTaaG2 を *Sal* I-*Xba* I 消化して得られた 2.4 kb 断片(*taaG2* の *Sal* I より下流を含む断片)と連結し、pTG-1 の *Eco*RI-*Xba* I サイトにクローニングした。

【培地】 (68)

Complete medium (pH6.5)

Malt extract	2g	
Bact pepton	0.1g	
Glucose	2g	/ 100ml

Minimal medium (pH6.5)

NaNO ₃	0.425 g	
KCl	0.26 g	
KH ₂ PO ₄	0.76 g	
trace element (金属イオン) *	0.75 ml	
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.26 g	
Starch or Glucose	5 g	
Agar	7 g	/ 500 ml

天然培地 (pH6.5)

Polypepton	1g	
KH ₂ PO ₄	0.5g	
NaNO ₃	0.1g	
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.05g	/ 100 ml

炭素源は適宜添加した。

プロトプラスト再生培地 (pH6.5)

NaNO ₃	0.6 g	
KCl	0.052 g	
KH ₂ PO ₄	0.152 g	
trace element (金属イオン) ×667	0.15 ml	
MgSO ₄ · 7H ₂ O	5.2 m g	
Glucose	7g	/ 100 ml

ただし、必要に応じて、以下の栄養源を加えた。

Arginin	0.526 g/l
Biotin	10 mg/l
塩酸ピリドキシン	2.5mg/l

Uridine	1.0g/l
Paba	2 mg/l

上記培地に適宜孢子懸たく液を添加し、30 °C 或いは 37 °C で好氣的に各時間培養した。

【*A. nidulans* G191 の形質転換】

Complete medium で 30 °C、約 12h 培養後、菌体を荒いナイロンフィルターでろ過後、菌糸を回収し、プロトプラスト調製液 [10 mM NaH₂PO₄ (pH5.8), 20 mM CaCl₂, 800 mM NaCl, 0.75 mg/ml Novozyme 234] 40ml のはいたスミロンチューブに菌糸を加えた。30 °C、約 1~1.5 時間 60 rpm の条件で振盪した。顕微鏡でプロトプラストができたことを確認後、荒いナイロンフィルターと細かいナイロンフィルターでろ過することにより夾雑物を取り除いた。ろ液を室温、250×G で 5 分間遠心分離した。上清を除去し、沈殿に 0.8 M NaCl を約 20 ml 加え懸濁し、250×G で 5 分間遠心分離した。沈殿をもう一度 0.8M NaCl で洗浄後、0.8M NaCl, 50mM CaCl₂ で 1 回洗浄した。沈殿を再び約 500 μl の 0.8M NaCl, 50 mM CaCl₂ に懸濁し、プロトプラスト溶液とした。血球計を用いてプロトプラスト溶液の濃度を換算し、約 10⁸ 個/ml のプロトプラスト溶液 200 μl に対して、DNA を 2~20 μg 導入した。DNA の導入はポリエチレングリコール法(3) に従った。ただし、ポリエチレングリコール法において、塩濃度を 0.6 M KCl から 0.8M NaCl に変更して行った。

【形質転換株のアミラーゼ活性測定】

形質転換体を天然培地を用いて 37 °C、36 時間培養した。非誘導条件下では終濃度 2% となるようにグリセロールを添加し、誘導条件下では終濃度 2% starch / 2% glycerol となるように炭素源を添加した。培養上清を遠心分離により回収し、酵素液とした。高い酵素活性を有する培養上清を希釈する場合は、適宜酵素希釈液(20mM CH₃COONa (pH5.9), 10mM CaCl₂) を用いた。基質である 1% Soluble

Starch 125 μ l と酵素液 10 μ l を 37 °C で適当な時間反応させた。250 μ l の Somogyi-Nelson 銅試薬(ナカライテスク社製)を加え、100 °C で 15 分間ボイルし、急冷後、250 μ l の発色試薬 (ナカライテスク社製) を加えた。蒸留水 615 μ l 加え攪拌後、560 nm の吸光度を測定した。銅試薬 250 μ l 添加後、酵素液を加えたものを盲検とした。1 分間に 1 μ mole のグルコースに相当する還元末端を生成する酵素量を 1 unit (1U)とした。

【精製核画分の調製】

A. nidulans G2-4 の胞子を 10^6 個/ml となるように天然培地 500 ml に接種し 37 °C で振とう培養した。24 時間後、誘導条件ではマルトースを終濃度 1% となるように加え、非誘導条件ではグリセロールを終濃度 1% になるように加えた。引き続き 4 時間 37 °C で振とう培養した。吸引ろ過により集菌し液体窒素中で菌体を急速凍結後、微細になるまで粉碎した。粉碎した菌体 60g に対し 300 ml の A buffer; (25%(v/v) glycerol, 10m MPipes- KOH(pH7.0), 10m M MgCl₂, 10m M β -mercaptoethanol, 0.5% (w/v) Triton-X100)を加えた。懸濁液を Polytron にて 60 秒間ホモジネート後、1000rpm, 10 分遠心分離し上清を Miracloth でろ過した。この上清を 5000rpm で 10 分間遠心分離し、沈殿を得た。沈殿を Triton-X100 を含まない A buffer で 2 度洗浄した。Triton-X100 を含まない A buffer に懸濁した沈殿を 40% Percoll に重層し 3500rpm, 30 分遠心分離した。沈殿を Triton-X100 を含まない A buffer に懸濁しもう一度 40%Percoll に重層し、3000rpm, 30 分遠心分離した。沈殿を Triton-X100 を含まない A buffer で 2 度洗浄したものを精製核画分とした。

【核抽出物の調製】

精製核画分に少量の滅菌水を加え懸濁し、1/5 volume の x5 Nuclear Extraction Buffer (75m M HEPES- KOH(pH7.9), 5m M MgCl₂, 0.5m M EDTA, 1m M DTT, 0.5m M PMSF, 10 μ g/ml Antipain, Leupeptin, Chymostatin, Pepstatin, 10% (v/v) glycerol) を加えた。水中で穏やかに攪拌しながら 1/6 volume の 3M KCl

を一滴ずつ加え、30 分間攪拌を続けた。次いでこの懸濁液を 38000rpm, 1 時間遠心分離し、上清を得た。その上清を、11 の透析 buffer (15m M HEPES-KOH (pH7.9), 100m M KCl, 1m M EDTA, 0.5m M PMSF, 2m M DTT, 10 μ g / ml Antipain, Leupeptin, Chymostatin, Pepstatin, 15% (v/v) glycerol) に対し、4°C で 2 時間透析した。不溶化したタンパク質を除くためエッペンチューブに回収し、15000 rpm, 20 min 遠心した。上清をウルトラフリー R-MC (ミリポア社製) に移し、5000 \times g で約 2 時間、容積にして約 10 倍まで濃縮した液を核抽出液とした。

【タンパク質量の定量】

BIO-RAD PROTEIN ASSAY (Bio-Rad Laboratories) を使用した。スタンダードには牛イムノグロブリンを用いた。

【プローブ DNA および competitor DNA の調製】

ゲルシフトアッセイに用いるプローブは以下の様に調製した。6P は、*taaG2* の転写開始点の上流-231~-132 を、pUC18 の *Sma*I-*Pst*I サイトにクローニングしたプラスミドを *Eco*R I と *Hind* III で消化して得られる 131 bp の DNA 断片とした。6D は、*taaG2* の転写開始点の上流-231~-190 を、pUC18 の *Sma*I サイトにクローニングしたプラスミドを *Eco*R I と *Hind* III で消化して得られる 99 bp の DNA 断片とした。DP は、*taaG2* の転写開始点の上流-189~-132 を、pUC18 の *Sma*I-*Pst*I サイトにクローニングしたプラスミドを *Eco*R I と *Hind* III で消化して得られる 89 bp の DNA 断片とした。

使用に当たっては、いずれも 37°C、10 分間、T7 DNA polymerase による反応で α -³²P-dCTP を *Hind* III 末端に取り込ませることで標識した。

【グルコアミラーゼ、 α -グルコシダーゼ 5'非翻訳領域のクローニング】

○用いたプライマー

gla-1 5'GGAATTCACGGGCGAAATCA

gla-2 5'GATGCATCTTGCTTCGACTT

agd-1 5'GGAATTCATTCCTGGACCAA

agd-2 5'AATGCATGTCGTGGTCCGCC

A. oryzae RIB40 のグルコアミラーゼ遺伝子(*glaA*)、 α -グルコシダーゼ遺伝子(*agdA*)の 5'非翻訳領域の配列の一部をその配列としたプライマー(それぞれのために *gla-1*, *gla-2* と *agd-1* と *agd-2*)を用い、*A. oryzae* JCM02239 の染色体を鋳型として、PCR を行った。得られた断片を pUC119 の *EcoR* I-*Pst* I サイトにクローニングし、塩基配列を決定した。

【ゲルシフトアッセイ】

Binding buffer (25mM HEPES-KOH (pH7.9), 60mM KCl, 5mM MgCl₂, 1mM DTT, 1mM EDTA, 0.1mM PMSF, 5 μ g / ml Antipain, Leupeptin, Chymostatin, Pepstatin, 10% (v/v) glycerol), Poly dI-dC (Pharmacia), probe (5000 cpm / lane, 約 0.2ng) を混合し、核抽出物を加え 4 °C で 5 分インキュベートした。但し、Poly dI-dC は核抽出物の総タンパク質量の半量加えた。

4% ポリアクリルアミドゲルを TAE (40mM Tris-acetate (pH8.0), 1mM EDTA) buffer で作製し、10 分 150V(定電圧)でプレランした。上記混合物をアプライし約 1.5 時間 130 V(定電圧)で電気泳動した。ろ紙にゲルを展着しゲルドライヤーで乾燥後、BAS2000II (富士写真フィルム)で解析した。

【DNase I フットプリント法】

主に Galas と Schmitz の方法に従った(21)。タンパク質と DNA プローブの結合反応は gel shift assay での反応条件に基づき、約 10 倍のスケールで行った。この反応液に終濃度が 5 mM となるように CaCl₂ を加えた後、DNase I dilution buffer (10 mM MgCl₂, 5 mM CaCl₂) で希釈した DNase I を 0.01 μ g 加えた。この溶液を 25 °C, 1.5 分インキュベートし、その後、直ちに氷中で DNase I の反応を抑制した。4%ポリアクリルアミドゲル/TAE buffer で 80 分間(10 V/cm, r.t.)電気泳動した。このゲルを乾燥させずラップでくるみ Fuji Imaging Plate type BAS-III に 0.5 時間感光し、BAS 2000II システムにより解析した。シフトバンド及びフリープローブの検出された部分を切り出し、電気溶出により DNA 断片を

回収した。エタノール沈澱、乾燥後、sequencing loading buffer (98% formamide (deionized), 10 mM EDTA (pH8.0) 0.1% bromophenolblue, 0.1% xylencyanol FF)に 5000 cpm/ μ l となるように溶解した。この溶液を 6%尿素ポリアクリルアミドシークエンスゲルに 1 レーン当たり 5 μ l 供し、電気泳動(50 V/cm, r.t.)した。泳動したゲルを 3MM 濾紙に貼り付け、ゲルを乾燥後、Fuji Imaging Plate type BAS-III に 20 時間感光し、BAS 2000 II システムにより解析した。

【部位特異的変異の導入】

○用いたプライマー

SRE1F 5'ACGGGCAGCGAGATGCATCACACCCTCCAG
 SRE1R 5'CTGGAGGGTGTGATGCATCTCBCTGCCCGT
 SRE2F 5'CCAACACCCTCAATGCATCCTAGGGGCGGA
 SRE2R 5'TCCGCCCCTAGGATGCATTGAGGGTGTGG
 SRE3F 5'GTGACTAGGGGAATGCATGTAAAGGGATTA
 SRE3R 5'TAATCCCTTTACATGCATTCCCCTAGTCAC
 ISRE3RF 5'AAGGGATTATGCATACCTCAACCACAAATC
 ISRE3RR 5'TGTGGTTGAGGTATGCATAATCCCTTTAAA
 +5BPF 5'ATTTAAAGGGAGATCTTTAATTTCCACTA
 +5BPR 5'TGGAAATTAAAGATCTCCCTTTAAATTTCC
 SRE11 5'AGATGCATCTAGAAAGACAGAGTGACTAGGGG
 SRE21 5'CAATGCATCAGCGGGGCGGAAA
 SRE22 5'CAATGCATCCTATTTTCGGAAATTTAAA
 SRE23 5'CAATGCATCCTAGGGGATTCAATTTAAAGG
 SRE24 5'CAATGCATCCTAGGGGCGGACCGGTAAAGGGATT
 SRE25 5'CAATGCATCCTAGGGGCGGAAATTGCCCGGGATTAATT

pTAP を鋳型として用い SRE1F と M13RV プライマー、SRE1R と M13M4 プライマーの組み合わせで PCR により部分的に重なった DNA 断片を取得した。これらの部分的に重なった DNA 断片を混合し、95 °C で 5 分変性させた。30 分かけて 37 °C まで温度を下げ、VentDNAPolymerase 添加後 74 °C で 3 分反応させ

た。M13M4、M13RV のプライマーを加え、PCR により 2 つの DNA 断片間でミ
スアニールし伸長反応を起こした DNA 断片を増幅させた。これで SRE1 に変異
を導入した *taaG2* の 5'側領域の DNA 断片を得たことになる。SRE2、SRE3、ISRE3
に変異を導入した *taaG2* の 5'側領域の DNA 断片もそれぞれ SRE2F、SRE2R、
SRE3F、SRE3R、ISRE3F、ISRE3R や塩基の挿入には +5BPF、+5BPR を用い同
様の方法で取得した。SRE 11,21,22,23, 24, 25 領域への変異の挿入は、SRE2R
とそれぞれのプライマーを用いて上記と同様にして行った。

部位特異的変異を導入した DNA 断片を *EcoR* I と *Sal* I で消化し、pTaaG2 を
Sal I と *Xba* I で消化することで得られる 2440bp の DNA 断片(*TaaG2* の *Sal* I サ
イトより下流)と *Sal* I サイトで連結した。これを pTG1 の *EcoR* I-*Xba* I サイト
に挿入することで 5'非翻訳領域に部位特異的変異を導入した *taaG2* の発現プラス
ミドを作製した。

【レポーター遺伝子を用いた解析】

デンプンによる誘導発現能を持たないキシラナーゼ遺伝子(*xynFI*)プロモーター
領域と *taaG2* 構造遺伝子との融合遺伝子を用いて、SREB 結合領域を含む合成ヌ
クレオチドの誘導発現能を解析した。下記のオリゴヌクレオチドを合成し、亜ニ
ーリング後、*xyn* プロモーター領域の *Bam* H I サイトに挿入した。

合成オリゴヌクレオチド

5'-GATCCTAGGGGCGGAAATTTAAAGGGATTAATTTCCACTCAA-3' (-205~-168)

5'-GATCTTTGAGTGGAAATTAATCCCTTTAAATTTCCGCCCCTA-3' (-168~-205)

taaG2 DNA 断片を含む *xynFI* プロモーター領域の *EcoR* I-*Sal* I 消化断片を
pTG1-*TaaG2* に挿入した。得られたプラスミドを用いて *A. nidulans* G191 株を
形質転換した。

【各 *taaG2* プロモーター領域変異株からの染色体の調製】

各形質転換株を天然培地 100 ml で 37 °C, 30 時間培養した。吸引ろ過により集
菌し、液体窒素中で粉碎した。7 ml の isolation buffer (150mM EDTA pH8.0,
50mM Tris-HCl pH8.0, 1% sarkosyl, 300µg / ml proteinase K) に懸濁しよく攪

拌した。2000 x g で5 分間遠心分離した上清に RNaseA(10mg/ml)を 5 μ l 加え 37 °C で 20 分インキュベートした。トリス buffer (10mM, pH7.5)で飽和したフェノール 7 ml で抽出し、さらに水層をフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール (25:24:1) で抽出した。クロロホルム：イソアミルアルコール (24:1) でもう一度抽出した水層に 0.5ml の酢酸ナトリウム (3M, pH7.5)、9ml の特級エタノールを加え、氷上で 10 分放置した。8000 x g で 20 分間遠心分離して得た沈殿を 1.6ml の水に溶解した。20% polyethylene glycol 6000(2.5M NaCl 含む)1.1ml を加え、氷上で 1 時間放置した。8000 x g で 20 分間遠心分離して得られた沈殿を 70%エタノールで洗浄した。沈殿を TE buffer(10mM Tris-HCl pH8.0, 1mMEDTA)400 μ l に溶解した。

【サザンブロッティング解析】

サザンブロッティング解析の方法は、主に(70) に従って行った。

取得した染色体を *EcoRI* - *XbaI* で完全消化し、0.7%アガロースゲルに供して分離した。プローブには *taaG2* を *EcoRI* - *SalI* 消化して得られる 755 bp の DNA 断片を RI 標識した物を用いた。

1-3. 結果

【*taaG2* プロモーター領域に結合する新規な核内因子の検出】

以前の解析より、5'側より転写開始点の上流-203 までの欠失により *taaG2* 発現量が激減し、デンプンによる遺伝子発現誘導能が消失することが明らかとされている(59)。また、-232 までの欠損は *taaG2* 発現誘導能には影響を及ぼさないことも明らかとなった (Fig.1)。これは、シスエレメントが-231~-203 の領域或いは-203 を含む領域に存在することを示唆している。*taaG2* プロモーター欠損解析において *taaG2* の発現量及び誘導発現に影響の見られた領域に着目し、この領域付近に結合する DNA 結合タンパク質の検出を試みた。

デンプンに応答した遺伝子発現誘導に関わる核タンパク質を検出するにあたり、誘導(デンプン)・非誘導(グリセロール)両条件下で培養した菌体より調製した核抽出液と 6P 断片(-231~-130)を用いてゲルシフトアッセイを行った。両条件下で 6P 断片に特異的に結合する DNA 結合タンパク質が検出された。観察されたシフトバンドはほぼ同一の移動度を示した(Fig. 2A, lanes 2 and 5)。シフトバンドの強度は、プローブ断片の 200 倍のラベルされていない 6P 断片をコンペティターとして加えた場合に減少したが(lanes 4 and 7)、*taaG2* のプロモーター領域を含まない DNA 断片をコンペティターとして 200 倍量加えた場合には何ら影響を及ぼさなかった(lanes 3 and 6)。これらの結果は誘導・非誘導両条件下で、*taaG2* プロモーター領域の 92 bp 内に特異的に結合する核タンパク質が存在することを示している。

glucoamylaseA (*glaA*)と α -*glucosidaseA* (*agdA*)もまた *A. oryzae* においてデンプン・マルトースにより発現誘導される。6P 断片をプローブ、*glaA*, *agdA* のプロモーター領域を含む断片をコンペティターとして競合実験を行った。*glaA*, *agdA* 断片を反応に添加した場合にのみ、シフトバンドの減少が観察され、*taaG2* プロモーター領域に結合する因子と同一のものが各プロモーター領域に結合する事が示された(Fig. 2B, lanes 4, 5, 8 and 9)。

【検出された核タンパク質の結合領域の特定】

Fig.2 で検出された核タンパク質の結合領域をより正確に特定するために DNase I フットプリンティングアッセイを行った。誘導・非誘導両条件下で検出された核タンパク質は同一の DNA 配列を認識して結合していることが明らかとなった(Fig. 3)。DNase I からの保護領域は二カ所存在し、コーディング鎖; 5'-TAGGGGCGGAAATTTA-3' (-204 ~ -189) と 5'-TAATTTTC-3' (-181 ~ -175)、ノンコーディング鎖; 3'-CCGCCTTTAAAT-5' (-200 ~ -189) と 3'-AATTAAAGGTGACTT-5' (-182 ~ -168) であった。この二カ所に共通して見いだされる配列は 5'-GGAAATT-3' (下流側は逆位) である。これら結合配列が *taaG2* 発現誘導に関わる可能性が考えられたことから、上流側結合領域を SRE (starch responsive element), 下流側結合領域を (inverted SRE) とした。

【SRE と ISRE を含む領域がデンプンによる発現誘導能を有す】

xynFI プロモーター領域と *taaG2* の翻訳開始点(ATG)以下を含む構造遺伝子を連結し、*xynFI::taaG2* 融合遺伝子を構築した。この融合遺伝子を導入した *A. nidulans* はキシラン存在下でアミラーゼ遺伝子の発現を誘導する(Fig. 4)。デンプンに応答したアミラーゼ遺伝子の発現誘導に SRE と ISRE を含む領域のみで十分であるか検討するために、SRE と ISRE (-205 ~ -168) の両領域を含む 38 bp の DNA 断片を *xynFI::taaG2* のプロモーター内の *Bam* H I サイトに挿入した。この構築されたプラスミドを用いて *A. nidulans* を形質転換した。三種の独立した形質転換体でデンプンに応答した発現誘導が観察された。一方、グリセロールを単一炭素源とした場合のアミラーゼ発現量は、デンプンを炭素源とした場合の約四分の一程度で、キシランを炭素源とした場合には更に低いレベルであった(Fig. 5)。これらの結果は、挿入した SRE と ISRE を含む 38 bp 内にデンプンに応答して遺伝子の発現を誘導するエレメントが存在することを顕著に示している。しかしながら、キシランを単一炭素源とした場合のアミラーゼ発現量の低下の理由は明らかにされていない。

【SRE と ISRE 及びその周辺領域への部位特異的変異の導入】

更にデンプンに応答した遺伝子発現誘導ニカか必須なシスエレメントを特定するために、SRE と ISRE 及びその周辺領域に部位特異的変異を導入した。*taaG2* 構造遺伝子とそれぞれの改変プロモーター配列を有す pTGSREM プラスミドを *A. nidulans* に導入した。得られた形質転換体におけるアミラーゼ遺伝子発現誘導能が、アミラーゼ活性を指標に比較された。SRE 5'-CGGAAATT-3' (ニカ所の結合領域に共通して存在した配列を含む) を改変したプラスミドを導入した pTGSREM3 株では、デンプン存在下においても極僅かなアミラーゼ活性しか検出されなかった(Fig. 5)。一方、ISRE の 5'-AATTCCT-3' に変異を導入したプラスミドを有す pTGSREM4 株は、オリジナルのプロモーターを有す WT 株と同等のアミラーゼ発現誘導能を有していた。これらの結果は、ISRE はアミラーゼ遺伝子発現誘導には関与しておらず、SRE のみが関与していることを強く示している。

より詳細にデンプンに応答した発現誘導に関わるシスエレメントを特定するために、SRE の 5'-GGAAATT-3' とその周辺領域に変異を導入した(Fig. 5)。pTGSREM2 のプロモーター領域への変異の導入は、デンプンによる発現誘導には影響を与えなかった。そこで、2 の領域から更に 3 bp 或いは 4 bp ずつ下流に変異の導入部位をずらした pTGSREM 21 ~ 25 を構築し、*A. nidulans* に導入した。pTGSREM 21 ~ 25 を有す形質転換体全てにおいてアミラーゼ生産量の低下が観察されたが、pTGSREM 25 だけが、デンプンに応答した遺伝子発現誘導能を保持していた。SRE とその上流を含む -205 ~ -187 の領域が *taaG2* 遺伝子発現誘導に関わっていることが明らかとなった。これらの結果と上述したゲルシフトアッセイ及び DNase I フットプリンティングアッセイの結果を合わせ、以後、SRE に結合した核タンパク質を SREB (SRE binding protein) と称す。

【SREB は ISRE にも結合する】

SRE と ISRE は 10 bp のスペースを介して共通配列 5'-GGAAATT-3' (下流側は逆位) を有している。第一に SREB がダイマー或いは複合体を形成して各結合領域に同時に結合すると想定した。しかしながら、部位特異的変位の導入によるシ

スエレメント解析より、SRE のみが遺伝子発現誘導に必要なシスエレメントであることが明らかとなった。SREB がそれぞれの領域を独立して認識するか他の因子が ISRE に結合している可能性が考えられる。

この可能性に関して検証するために、供する核タンパク質濃度を段階的に変化しゲルシフトアッセイを行った。Fig. 6A にあるように核タンパク質を低濃度で反応系に供した場合、二本のシフトバンドが検出された。これは、SRE と ISRE 各領域に二つの因子 (同一或いは二種の異なる因子) が結合していることを示している。そこで、6D (SRE のみを含む DNA 断片; -231 ~ -190) と DP (ISRE のみを含む DNA 断片; -189 ~ -130) をプローブに用いてゲルシフトアッセイを行った。シフトバンドはそれぞれ一本しか観察されず、各領域に結合する因子を別々に検出することに成功した (Fig. 6B)。更に、DP 断片をプローブとした場合に観察されたシフトバンドは、RI 標識していない 6D 断片を反応系に添加した場合にのみ特異的に減少した (Fig. 6C)。これらの結果は、SREB が SRE と ISRE の両サイトに結合する事を示唆している。しかしながら、6D 断片をプローブに用いた場合に比べて DP 断片をプローブに用いた場合には、より大量の核タンパク質を供しないとシフトバンドは観察されなかった。つまり、SREB は ISRE と比べ SRE に対してより強い親和性を有していることが示唆された。

1-4. 考察

taaG2 は、*A. oryzae* 同様に *A. nidulans* においてもデンプンに応答して誘導的に発現する(59)。これは *taaG2* 発現制御に関して、同様の制御機構が内在すると考えられる。今回の解析を通して、*taaG2* 発現誘導に必須なシスエレメント SRE の特異的に結合する新規な核タンパク質 SREB が *A. nidulans* の核抽出液より検出された。SRE 配列の改変が *taaG2* の発現誘導能の消失を引き起こしたことから、SREB が *taaG2* 発現誘導に関わるの正の活性化因子であり、*A. oryzae* における SREB のホモログ因子が種々のアミラーゼ遺伝子の発現誘導を制御していると推測される。

A. oryzae RIB40 *amyB* 遺伝子は、*A. oryzae* JCM02239 *taaG2* 遺伝子との相同遺伝子である。二種のアミラーゼ遺伝子プロモーター領域の配列を比較した結果、*amyB* プロモーター上の-308 での一塩基置換と-490 付近での二塩基置換しか違いはない。RIB40 のアミラーゼ遺伝子群、*amyB*, *glaA*, と *agdA* の三種のプロモーター領域には、保存性の高い Region IIIa 配列が共通して存在する。この Region IIIa 配列は *A. oryzae* における *agdA* 遺伝子発現誘導(57) 及び *A. nidulans* における *amyB* 遺伝子発現誘導に関与していることが明らかとなっている(35)。*agdA* プロモーター領域の Region IIIa 配列直後に、多コピー連結した Region IIIa 配列を導入した結果、 α -グルコシダーゼは過剰発現を引き起こし、一方で TAA とグルコアミラーゼの発現量は激減した。共通の正の制御因子が *amyB*, *glaA*, と *agdA* の発現を制御している事が示唆された(56)。*taaG2* の SRE と *amyB* の Region IIIa は重複していることと、*A. oryzae glaA* と *agdA* のプロモーター領域にも SREB が特異的に結合したことから、*A. oryzae* の SREB のホモログがこれらアミラーゼ遺伝子群の発現誘導に関与しているものと推測される。SRE と Region IIIa 配列を比較した結果、保存されていた配列は 5'-CGGNNATT-3'であった。この 5'-CGGNNATT-3'配列は、アミラーゼ遺伝子群の発現誘導に関与する共通配列であると推測される。しかしながら、誘導・非誘導両条件下で培養した菌体の核タンパク質中に同等の DNA 結合活性を有した SREB が検出されていることから、SREB の SRE への結合だけでは遺伝子の発現誘導には不十分

であるように思われる。SREB と他の因子、または SREB 自体の修飾によって *taaG2* の発現が誘導されると考察される。

taaG2 プロモーター上には SREB 結合領域が二カ所存在する。これらの配列には共通して 5'-GGAAATT-3'配列が含まれている。しかしながら、ISRE 領域の改変は *taaG2* 発現誘導には何ら影響を及ぼさなかった。SRE と ISRE の向きは逆方向であるが、Region IIIa を用いた解析から発現誘導に SRE と ISRE の向きは影響しないことが明らかとなった(35)。ISRE に変異を導入するときに改変した八塩基は 5'-TGGAAATT-3'であり、最初の一塩基目の T が共通配列 5'-CGGNNATT-3'とは異なる。SREB はこの C から T への一塩基置換により結合親和性が減少し(Fig. 6B)、このために ISRE が *in vivo* において発現誘導に関わるシスエレメントとして機能しなかったと推測される。

Saccharomyces cerevisiae において、マルトース資化に関わる遺伝子群 (マルトースパーミエース、 α -グルコシダーゼ)は正の制御因子である MAL63 に発現を制御されている(45, 60, 76)。MAL63 の認識配列は、非常に高濃度の MAL63 を用いた場合に結合が確認された三カ所の結合配列を比較した結果、5'-c/gGCN₃c/aGC/g-3' であると提唱されている(76)。この結合配列は、*taaG2*/*amyB*, *glaA*, *agdA* の SRE 周辺のプロモーター領域には見いだされなかった。しかしながら、MAL63 が最も高い親和性を有していた結合配列の中心部に 5'-CGGA AATT-3'配列が含まれていたことは特筆すべき事である。*A. nidulans*, *A. oryzae*, *S. cerevisiae* がアミラーゼ遺伝子群に関して同様の発現誘導機構を備えていても不思議ではない。更なる SRE と SREB の解析が、*taaG2* だけでなく真菌類におけるデンプン分解酵素遺伝子群の発現制御の分子機構の解明に繋がると考える。

-307
 T a g a a g c a g c a a a g c g a a a c a g c c c a a g a a a a a g g t c g g c c
 D
 c g t c g g c c t t t t t c t g c a a c g c t g a t c a c g g g c a g c G a t c c a
 -214 -202 -231
 a c c a a c a c c c t C c a g a g t g a c t a G g g g c g g a a t t t a a a g g
 7 E 6
 g a t t a a t t t c c a c t c a a c c a c a a a t c a c a g t c g t c c c c g g t
 -133
 a t t g t c c t g c a g a a t g c
 Pst I

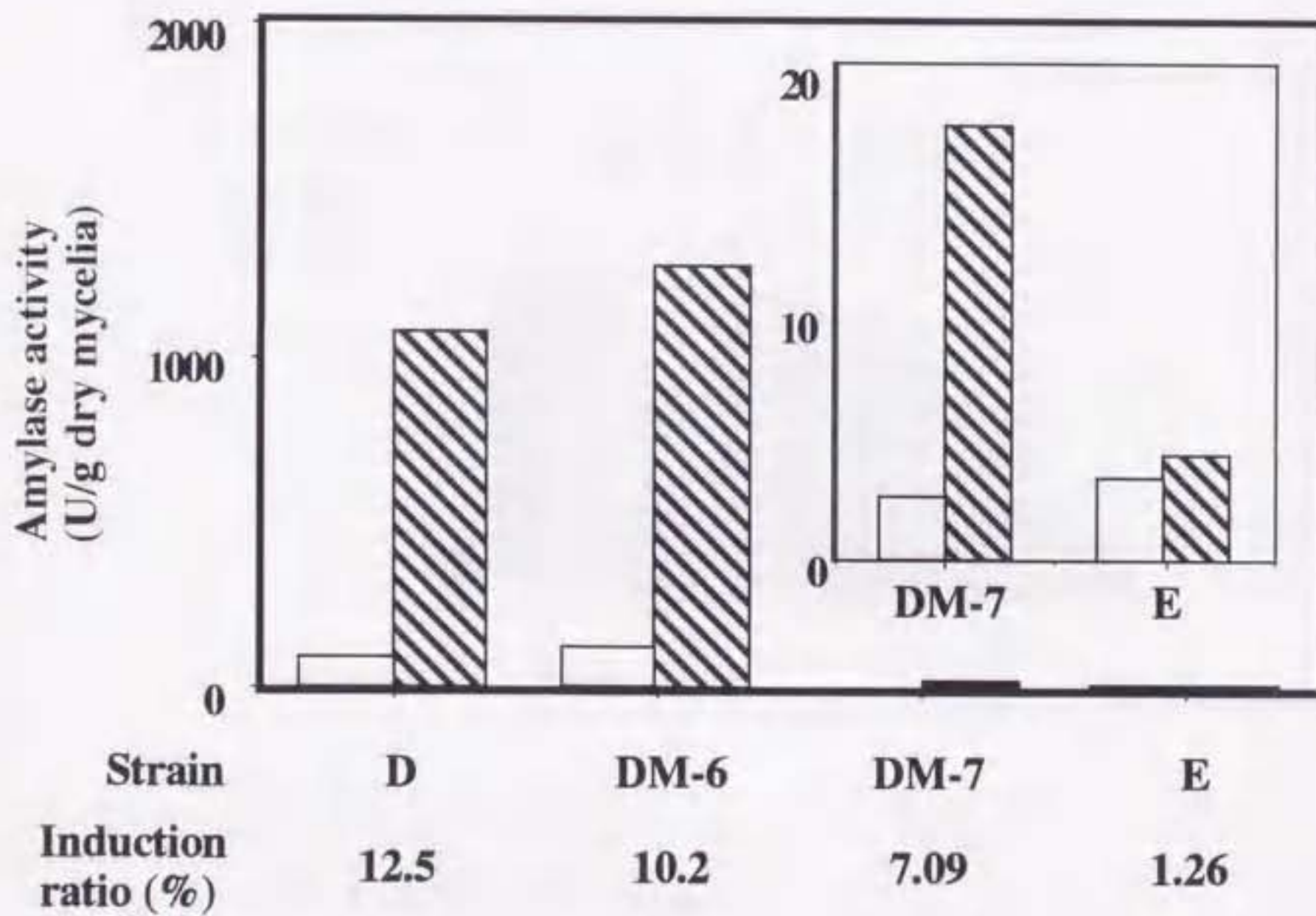


Fig. 1 *taaG2* プロモーター上の D~E 間の機能解析。

各改変遺伝子の5'末端を大文字で記した。■;誘導条件下 (2%Starch, 2%Glycerol)でのアミラーゼ活性値。□;非誘導条件下 (2%Glycerol)でのアミラーゼ活性値。誘導率は、誘導条件下(U)/非誘導条件下(U)の値を表す。

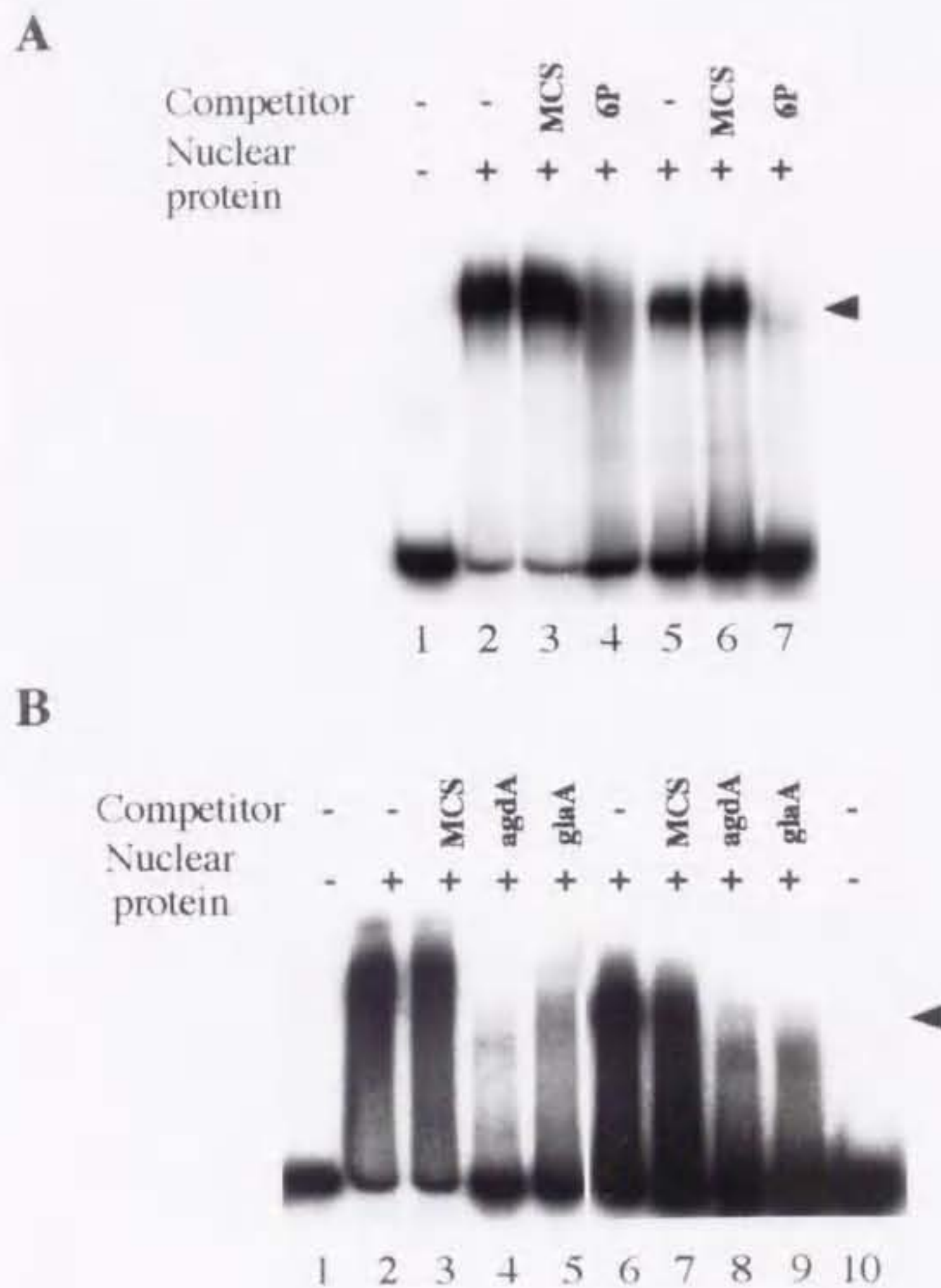


Fig. 2A, B Gel mobility shift assays.

RI 標識した 6P 断片 (-231 ~ -130) をプローブとして用いた。

A 各2 μ g の核抽出液 (lanes 2-4; glycerol, lanes 5-7; starch で培養した菌体から調製) と 6P 断片を200倍のラベルしていないDNA断片をコンペティターとして添加・非添加条件下で反応させた。MCS; pUC119由来の非特異的 DNA 断片 (lanes 3, 6)。6P; 特異的 DNA 断片 (lanes 4, 7)。

B コンペティターとして *agdA*, *glaA* 断片を用いた以外は A と同様に行った。lanes 2-5; glycerol, lanes 6-9; starch の培養菌体から調製した核抽出液を用いている。

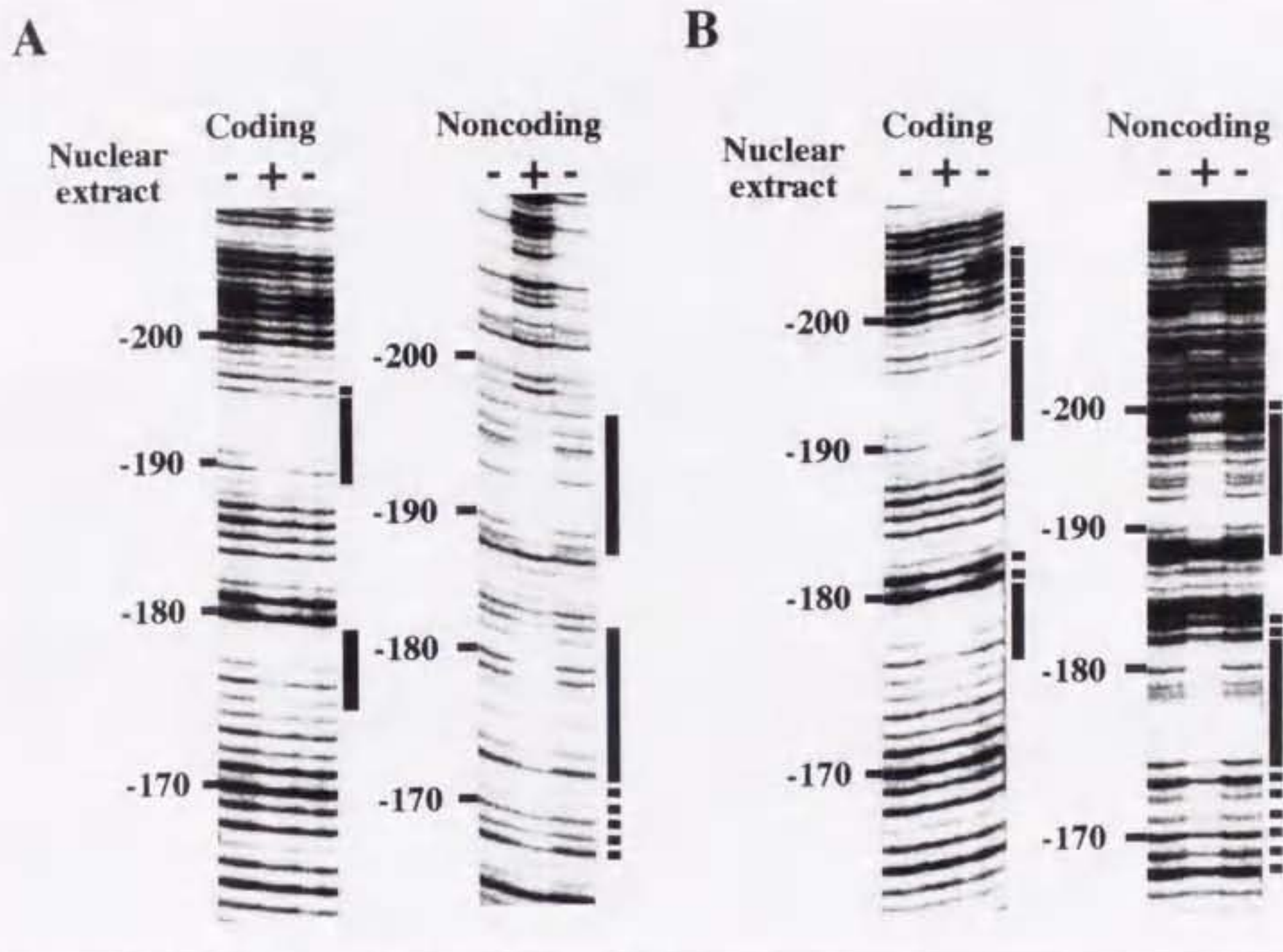


Fig. 3 A, B DNase I footprinting analysis.

プローブには 6P を用いた。誘導条件 (A) と非誘導条件 (B) で培養した菌体より調製した核抽出液の存在 (+) 非存在 (-) 条件下で 6P 断片を DNase I 消化した。左側に示した数字は転写開始点を +1 とした場合の位置を示す。塩基配列は、Maxam-Gilbert G+A 反応で決定した。明らかに DNase I 消化から保護された領域を太線で、弱い塩基を点線で示した。

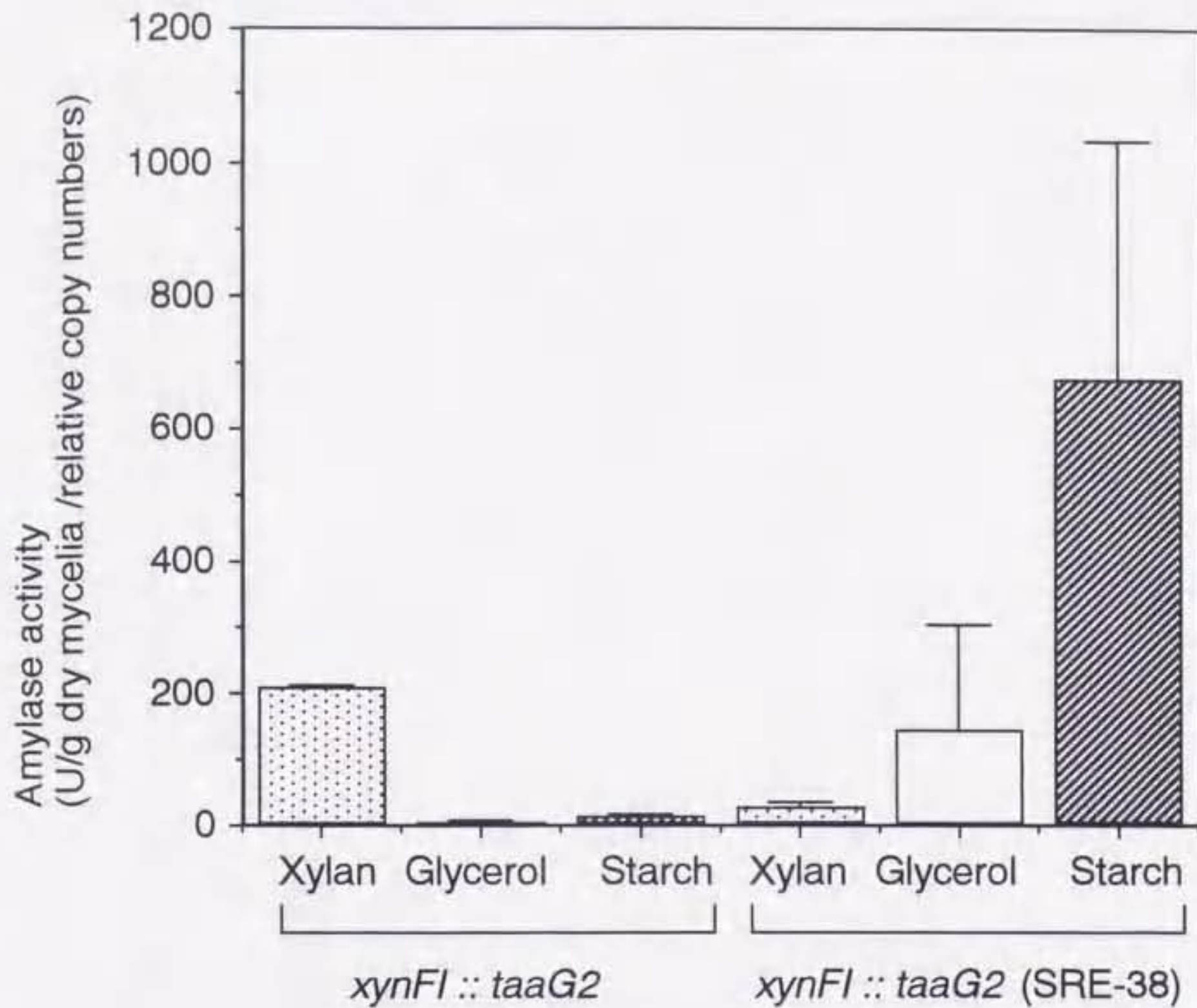


Fig. 4 SRE と ISRE を含む領域の 遺伝子誘導発現能の解析。

SRE-38 は、*taaG2* プロモーター上の -205 ~ -168 の領域を示す。5' 側、3'側にそれぞれ *BamH I*-*Bgl II* サイトを付加した SRE-38 断片を、*xynFI::taaG2* 融合遺伝子のプロモーター領域に位置する *BamH I* サイトに挿入した。このプラスミドを *xynFI::taaG2* (SRE-38) とする。

xynFI::taaG2 と *xynFI::taaG2* (SRE-38) で形質転換された株をそれぞれ 2% xylan, 2% glycerol, 2% starch を単一炭素源として 36 時間培養し、培養上清中のアミラーゼ活性を測定した。活性測定は三株の独立した形質転換体を用いて行い、測定値は導入された遺伝子のコピー数で標準化し、その平均値と標準偏差を示した。

A

-210 -200 -190 -180 -170
 CCAGAGTGACTAGGGGCGGAAATTTAAAGGGATTAAATTTCCACTCAACC
 GGTCTCACTGATCCCCGCCTTTAAATTTCCCTAATTAAAGGTGAGTTGG

2 AATGCATC.....
 3 AATGCATG
 4 ATGCATAC ..
 34 AATGCATG ATGCATAC ..
 21 AATGCATCAGC.....
 22 AATGCATCTTTT.....
 23 AATGCATC ATTC
 24 AATGCATC CCGG
 25 AATGCATC GCCC

B

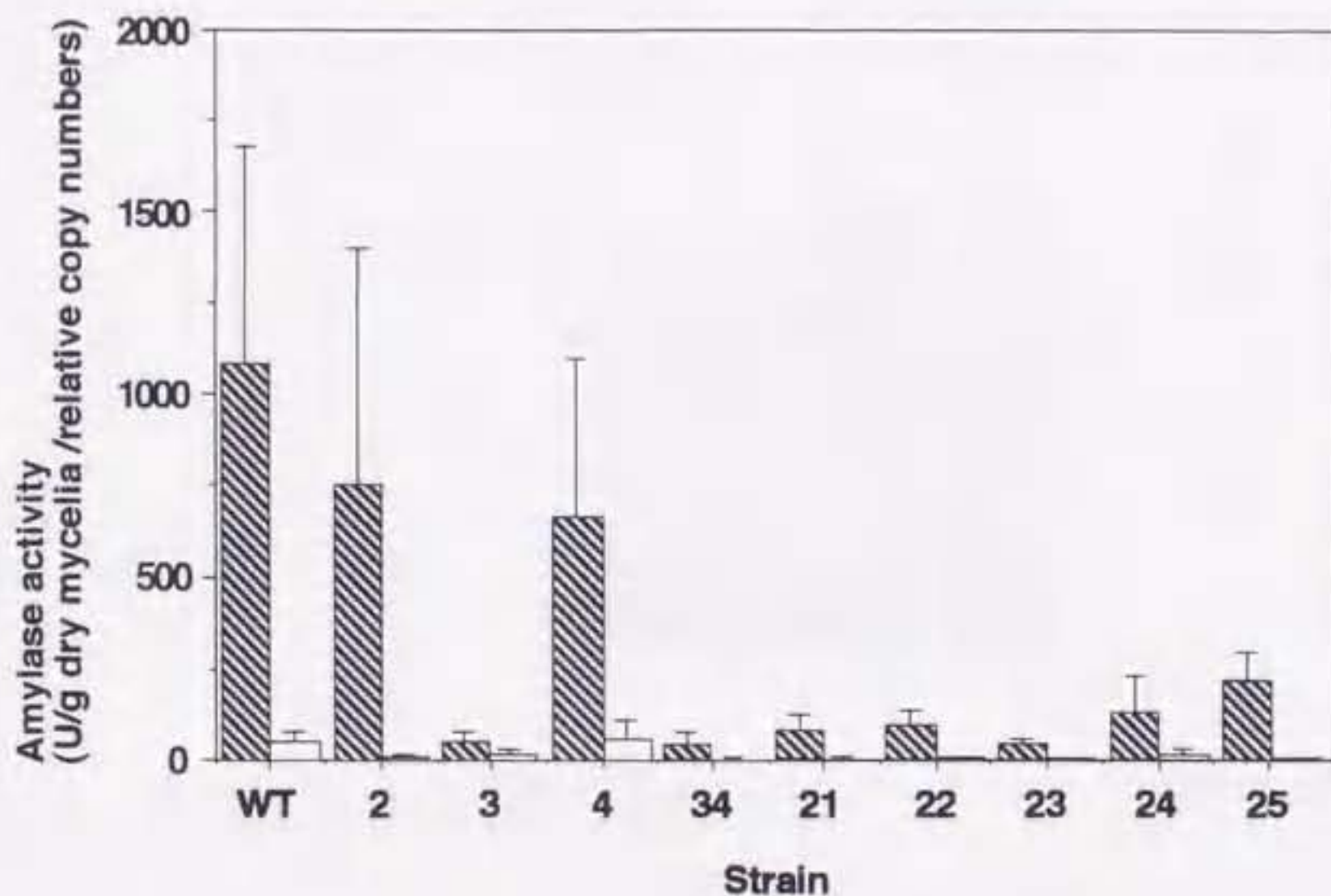


Fig. 5A, B SRE と ISRE への部位特異的変異の導入。
A -214 ~ -172 の *taaG2* プロモーター領域の配列 (top) と改変プロモーターの配列。**B** 部位特異的変異の *taaG2* 発現に及ぼす影響。■;誘導条件下 (2%Starch, 2%Glycerol) でのアミラーゼ活性。□;非誘導条件下 (2%Glycerol) でのアミラーゼ活性。活性測定は三株の独立した形質転換体を用いて行い、測定値は導入された遺伝子のコピー数で標準化し、その平均値と標準偏差を示した。

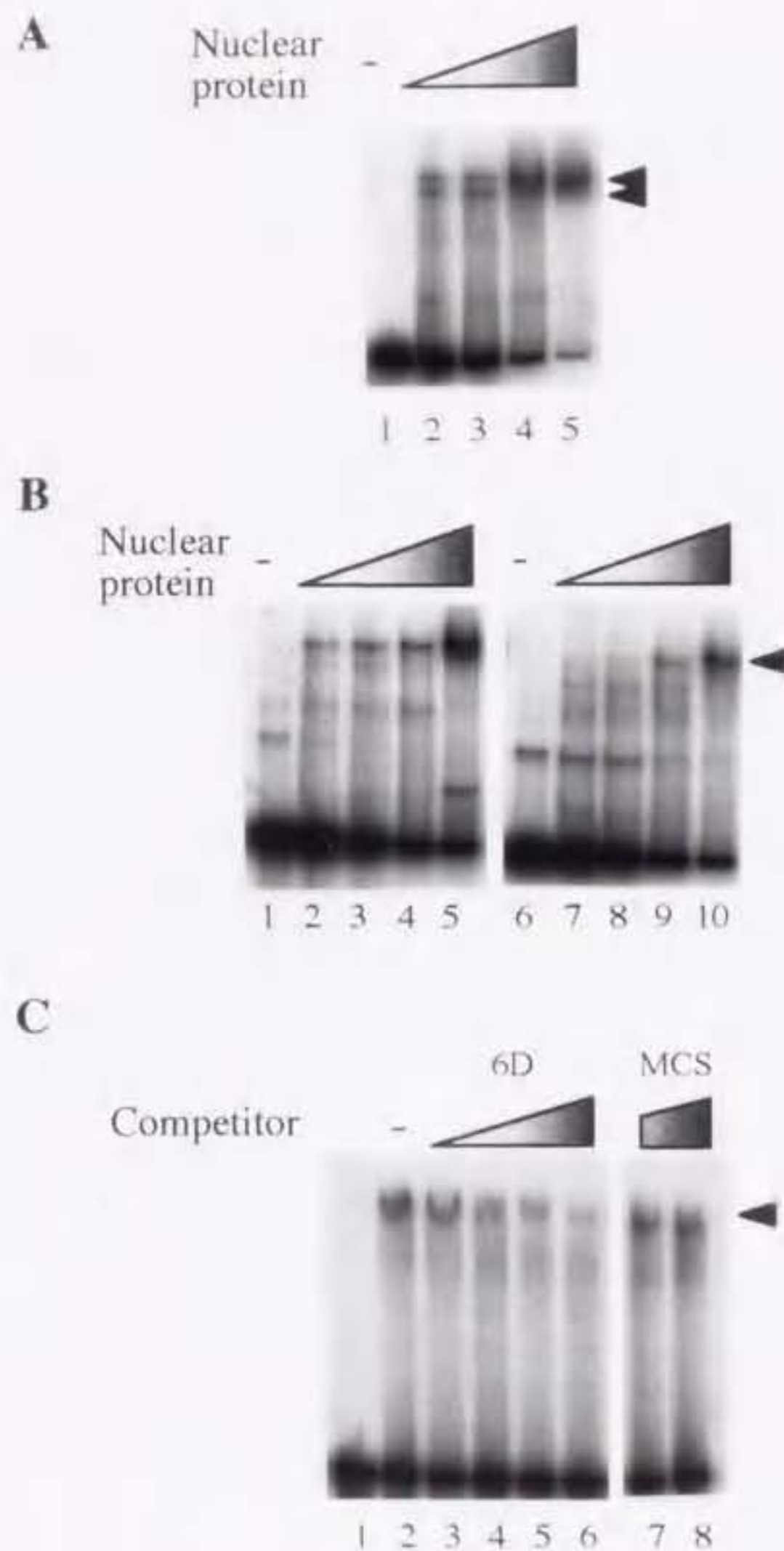


Fig. 6A-C SREB の結合特性の解析。

プローブには 6P を用いた。A 誘導条件の核抽出液を用いた。lane2; 0.35 μg , lane3; 0.7 μg , lane4; 1.5 μg , lane5; 3 μg の核抽出液を供した。タンパク質量の増加に伴い泳動が乱れるのを避けるために、タンパク質量が 1 lane 当たり 0.35 μg になるように、供する反応液量を変えて泳動した。B 6D (lane; 1~5), DP (lane; 6~10) は SRE と ISRE をそれぞれ含む。この断片を用いて A と同様にして行った。C DPプローブ (ISRE) と 1 μg の核抽出液を反応し、そこにコンペティターの濃度を段階的に変化させ、添加した。lane2; 0, lane3; モル比で 50 倍の 6D 断片 (SRE), lane4; 100 倍, lane5; 200 倍, lane6; 500 倍, lane7,8; モル比で 200, 500 倍の MCS (非特異的 DNA 断片) を添加。

第二章

アミラーゼ遺伝子群転写活性化因子 AmyR の機能解析

第一節 アミラーゼ遺伝子群転写活性化因子 amyR 遺伝子の単離と解析

2-1-1. 緒言

これまでに二つの制御因子, AnCP と CreA が *A. nidulans* における *taaG2* 発現に関与していることが明らかにされている。しかしながら CCAAT 配列を欠損した場合にも *taaG2* は誘導的に発現することから、AnCP は *taaG2* の炭素源に応答した発現誘導には関与していない事が明らかとされている(36)。

CreA はカーボンカタボライトリプレッションに関わる負の制御因子である(20)。組み換え体 CreA タンパク質が *taaG2* プロモーター上 -150 ~ -145 bp と -95 ~ -90 bp に位置する二カ所に特異的に結合する事から、*taaG2* はまた CreA 関与でグルコース抑制を受けていることが明らかとされた (38)。加えて前章で述べたように、*A. nidulans* において *taaG2* 発現誘導に必須なシスエレメント SRE に特異的に結合する新規核タンパク質 SREB が検出された (82)。SREB もまた *taaG2* 発現制御に関与していると推測される。

近年、Petersen ら(63)と五味ら(24)がそれぞれ *A. oryzae* からアミラーゼ遺伝子群の転写活性化因子である *amyR* をクローン化した。AmyR は、真菌類に多く見られる Cys₆Zn(II)タイプの DNA 結合モチーフを有していた。*A. oryzae* AmyR の DNA 結合ドメインと GST との融合タンパク質を用いた解析から、AmyR は二種類の DNA 配列を認識すると報告された。一つは CGGN₆CGG と表記される CGG triplets が 8 塩基を介して位置する配列。もう一つは、一つの CGG triplet とその直後に AAATTTAA (AT rich 配列) が位置する配列である (63)。後述の配列は SRE と同一箇所であった。

本節において、*A. nidulans* から *amyR* 染色体遺伝子と cDNA をクローニングし、その機能と発現特性を解析した。*amyR* 遺伝子破壊株を作製し、デンプン・

マルトース培地上での生育と、破壊株における *taaG2* 発現誘導能を解析した結果、*A. nidulans* においても AmyR がアミラーゼ遺伝子群の発現誘導に関与していることが明らかとなった。また *creA* 機能欠損株を用いた解析より、*amyR* の発現は CreA により負に制御されていることが明らかとなった。

2-1-2. 実験材料及び方法

【菌株】

A. nidulans G191 (*pyrG89 pabaA1; fwA1 uaY9*)

A. nidulans ABPU1 (*pyrG89 biA1; wA3; argB2; pyroA4*)

東京大学の堀之内先生と高木先生に贈与していただいた菌株。

A. nidulans MH664 (*creA204 biA1; niiA4*)

オーストラリアのメルボルン大学 Dr. Hynes から贈与していただいた菌株。

A. nidulans AT1 : *A. nidulans* ABPU1 の *argB* locus に *taaG2* が導入された株。

A. nidulans FGSC A57 (*yA2; pyroA4; m alA1*)

Escherichia coli JM109

【使用したプラスミド】

pAR2 : *Bam* H I-*Pst* I 消化した pUC119 に、*A. nidulans argB* の *Bam* H I-*Pst* I 消化断片を挿入したプラスミド

pAR2taa : pAR2 の *Eco* R I サイトに *taaG2* を挿入したプラスミド

pAR2AmyR : pAR2 *Eco* R I サイトに *amyR* を挿入したプラスミド

pAN8 : pUC119 の *Eco* R I サイトに *amyR* を含む断片を挿入したプラスミド

pAN8arg: *amyR* の内部にある約 2.1 kb の *Xho* I フラグメントを、*argB* を含む約 2.7 kb の *Bam* H I-*Pst* I フラグメントと置き換え、pUC119 へクローニングしたプラスミド

pAN8pyr: *amyR* の内部にある約 2.1 kb の *Xho* I フラグメントを、*pyr4* を含む約 2.0 kb の *Bsp* H I フラグメントと置き換え、pUC119 へクローニングしたプラスミド

pDHG25: *E. coli* と *A. nidulans* 間のシャトルベクター。

A. nidulans の約 5 kbp の *AMA1* 配列を有し、*A. nidulans* 内で自己複製能を有す(22)。選択マーカーとしてアンピシリン耐性遺伝子と *argB* 遺伝子を有す。

pAUR316 : *A. nidulans* の AbA 耐性遺伝子 *aurAR*, 自動複製配列 *A. nidulans*

AMA1 を持つプラスミド (TAKARA 社製)

pT7Blue T-vector

【*amyR* の染色体 DNA と cDNA のクローン化】

A. oryzae の染色体 DNA を鋳型として、*amyR* を含む DNA 断片を PCR により増幅した。増幅には、下記のプライマーを用いた。これらのプライマーはそれぞれ *A. oryzae amyR* の 5' end と 3' end に対応し、約 2 kbp の DNA 断片が増幅される。

5'-GGGAATTCATGCTCCATTCTCCAACCGACATTCCCTCAAC-3'

5'-CCGGATCCTCAAAACGAAATCTCCTCCCCAGCCACCACAA-3'

反応は、95 °C; 1 min. 55 °C; 1 min. 72 °C; 2 min. 30 cycles で行った。

増幅断片を pT7Blue T-vector にクローニングし、*Pst* I 消化によって得られる 560 bp の zinc finger domain を含む断片を取得した。これをサザンハイブリダイゼーション解析とコロニーハイブリダイゼーションにプローブとして用いた。

A. nidulans 染色体 DNA を *Eco*R I を用いて完全分解し、アガロースゲル電気泳動を行うことにより分画した。泳動後、ゲルを変性 buffer (0.25 N HCl), 中和 buffer (0.5 N NaOH - 1.5 M NaCl) に二回、それぞれ約 20 min 間浸して振とうすることにより、DNA を 1 本鎖に変性させた。ゲル中の DNA を Hybond-N⁺ へトランスファー後、付属の説明書に従って ECL kit を用いてサザンハイブリダイゼーションを行った。*A. nidulans amyR* は 4.0~6.0 kbp に分画された DNA 中に存在することがサザンハイブリダイゼーション解析より明らかとなった。この部分を回収して pUC119 *Eco*R I サイトにクローニングし、*E. coli* JM109 を形質転換した。コロニーハイブリダイゼーションを行い、形質転換体から *amyR* を含む陽性クローンを単離した。4.6 kbp の *amyR* を含む DNA 断片がクローン化され、この断片を有すプラスミドを pAN8 と命名した。

cDNA は、*A. nidulans* cDNA ライブラリー (Fungal Genetic Stock Center から購入) を用いたスクリーニングにより単離された。スクリーニングには、*A. nidulans amyR* の翻訳開始コドンを含む 1.4 kbp の *Xba* I 断片を RI 標識し、プローブとして用いた。取得したクローンは開始コドンを含まなかったため、

残りの 5' cDNA は reverse transcriptase (RT)-PCR を行い取得した。reverse transcriptase は M-MLV RTase (Gibco) を使用し、プライマーは下記の物を用いた。カッコ内の数字は翻訳開始点を+1 とした場合の位置を表す。

5'-GCATACCATTCCCTCTCTGCAGA-3' (269 ~ 253)

鋳型には *A. nidulans* をデンプンを単一炭素源として 24 時間培養した菌体より調製した total RNA を DNase I (RQ1 DNase, Promega) 消化後、用いた。合成された cDNA を鋳型として、上述のプライマーと下記プライマーを組み合わせ *amyR* 5' 領域を取得した。

5'-TACGTCTGCAAGGACTATAG-3' (-134 ~ -115)

変成	95 °C	1 min.
アニール	55 °C	1 min.
伸長	72 °C	1 min.
、 サイクル	30	

で行った。

【Total RNA の調製】

種々の *A. nidulans* を最少培地を用いて 24 時間、37 °C で振とう培養した。炭素源は各条件に合わせて適宜添加した。

菌体を濾過集菌し、蒸留水で菌体をよく洗浄した後液体窒素で急速に凍結させた。菌体を乳鉢を用いて細かく粉碎し、RNA 抽出に使用した。RNA の抽出は Isogen kit (Nippon Gene) を使用し、主にその方法に従った。より RNA を精製するために、クロロホルム抽出を更に二回行った。得られた RNA は 100 ~ 200 μ l の DEPC 処理水に溶解した。

【DNA 塩基配列の決定】

主に、第一章に準ずる。

検出は DNA sequencer (LI-COR model 4000) を用いた。

amyR 遺伝子塩基配列の決定は、次のように行った。pAN8 を種々の制限酵素を用いて分解し、大まかな制限酵素地図を作製した。これに基づき、使用する制

限酵素を選択した。各制限酵素による消化断片をクローニングし、少なくとも二回両方向から塩基配列を決定し、一致の見られた配列を *amyR* 遺伝子の塩基配列であると決定した。

【*A. nidulans* からの DNA 抽出法 (CTAB 法)】

天然培地に単一炭素源として 1% Glycerol を添加した培地を用いて、37 °C、約 30h 培養した。吸引濾過により回収した菌体を液体窒素で凍結し、液体窒素及び乳鉢、乳棒を用いて粉碎した。菌体 7g あたり 100 ml の割合で、65 °C で予め保温しておいた CTAB buffer (Sorbitol 2.5g, n - lauryl sarcosine 1.0g, Hexadecyl trimethyl ammonium bromide 0.8g, Sodium chloride 4.7g, EDTA · Na 0.8g, Polyvinyl polypyrrolidone 1.0 g / 100 ml) を混合し、65 °C で 1h インキュベートした。これに 100 ml のクロロホルムを加え、1 分間穏やかに上下反転することで攪拌した。室温、4,000 × G で 20 分間遠心分離した。遠心後、下層にクロロホルム、中間層に菌体、上層に DNA 溶液の水層が分離する。水層を取り出してもう一度クロロホルムを添加し、上記条件で遠心分離した。この上層に、RNase A (10 mg/ml) を 200 µl 加え、37 °C で 1h インキュベートした。次に proteinase K 1 mg を加え、更に 37 °C で 1h インキュベートした。クロロホルム 100 ml を加え、1 分間穏やかに上下攪拌をおこなった。その後室温、4,000 × G で 20 分間遠心分離した。上層に等量のイソプロパノール 50 ml を加え、穏やかに上下攪拌をおこなった後、4 °C、4,000 × G で 10 分間遠心分離した。沈殿に、70%エタノール 10ml を加えて 4 °C、4,000 × G で 10 分間遠心分離した。沈殿を風乾し、TE buffer [10mM Tris-HCl (pH8.0), 1mM EDTA (pH8.0)] 1.5ml に溶解した後、65 °C で 15 分インキュベートした。

【*A. nidulans* Δ50 株 ($\Delta amyR::argB$) の作製】

A. nidulans ABPU1 株を宿主として、pAN8arg の *EcoRI* 断片 (約 5.2kbp) を導入もしくは pAUR316 と co-transformation し、arginine 非要求性を選択マーカーとして *amyR* 遺伝子破壊株の取得を試みた。形質転換体より、デンプン培地上での生育が悪く、アルギニン非要求性であるものを選択した。これらより染

色体 DNA を抽出し、サザンハイブリダイゼーションを行うことで野生株の *amyR* が homologous recombination によって $\Delta amyR::argB$ に置き換えられたことを確認した。

【*A. nidulans* $\Delta 103$ 株 ($\Delta amyR::pyr4$) の作製】

A. nidulans AT1 株を pAN8pyr4 の *EcoR* I 断片 (約 4.7kbp) で形質転換し、*amyR* 遺伝子破壊株の取得を試みた。形質転換体の内、デンプンプレート上での生育が悪く、ウリジン非要求性であるもの形質転換体を選択した。この株より染色体 DNA を抽出し、サザンハイブリダイゼーション解析に用いた。野生株の *amyR* が homologous recombination によって $\Delta amyR::pyr4$ に置き換えられたことを確認した。

【サザンハイブリダイゼーション解析】

ECL Direct Labelling and Detection System (Amersham Pharmacia biotech) を用い、検出は添付の説明書に従った。

【アミラーゼ活性測定】

第一章に準ずる。

【遺伝子の accession numbers】

A. nidulans amyR 遺伝子の塩基配列は、DDBJ/EMBL/GenBank に登録しており、accession number は AB024615 である。*A. niger amyR*, *A. oryzae amyR*, 及び *S. cerevisiae mal63* 遺伝子の accession number はそれぞれ AF155808, AJ005258, M36637 である。

2-1-3. 結果と考察

【*amyR* 遺伝子の構造】

A. nidulans amyR 遺伝子のクローニングは、上述したように行った (2-1-2. 実験材料及び方法)。単離された 4.6-kbp の *EcoRI* 断片は、*amyR* 全長と α -グルコシダーゼ遺伝子(*agdA*)の 5'部分を含んでいた。*A. oryzae* 同様に、二種の構造遺伝子は約 1.5-kbp の中間領域を介してクラスターを形成していた(24)。

A. nidulans amyR の cDNA の単離には、*A. nidulans* cDNA ライブラリーを使用した。 $\sim 2 \times 10^5$ プラークをスクリーニングした結果、僅か一つの陽性クローンしか得られなかった。使用したライブラリーを構築した条件では、*amyR* の発現は非常に低レベルであるといえる。単離した cDNA クローンは、*A. oryzae amyR* と比較した結果翻訳開始点を含む 5'側を僅かに含んでいなかった。この領域は、新たに RT-PCR を行い取得した。染色体 DNA と cDNA との比較から、2,092 bp の *amyR* には 50 bp と 53 bp の短い二つのイントロンにより分断されていることが判明した。*A. nidulans AmyR* は、662 アミノ酸からなり、推定分子量は 72,862 Da であった。

【*amyR* 遺伝子破壊株の特性】

A. nidulans における *amyR* 遺伝子破壊株 ($\Delta amyR50$) は、*amyR* の -824 ~ +1280 までを *argB* と置換することにより得られた。遺伝子破壊株は、グルコースとグリセロールを単一炭素源とした最少培地では生育が良い。しかし、単一炭素源としてデンプンとマルトースを用いた場合には、極端に孢子形成能が低下するとともに菌糸の密度が小さい diffuse colonies を形成した(Fig. 7A)。同様の生育の低下は、イソマルトースを単一炭素源とした場合にも観察されたが、セロビオース、フルクトース、ガラクトース、ラクトース、マンニトール、マンノース、ソルビトール、スクロース、トレハロース、及びキシロースを用いた場合には観察されなかった。これらの結果は、*amyR* 遺伝子破壊株は、デンプン・マルトースを分解する α -アミラーゼや α -グルコシダーゼなどの糖質分解酵素が十分に生産されなかったためであると推測される。

A. nidulans はアミラーゼ生産量が非常に低く、アミラーゼの活性と mRNA の発現量を定量的に比較することは困難である。そこで *taaG2* を導入した *A. nidulans* AT1 株とその *amyR* 遺伝子破壊株($\Delta 103$)とを用いて *amyR* の機能解析を行った。*taaG2* は *A. nidulans* においてもデンプンにตอบสนองして高発現することが明らかにされており、*A. nidulans* でのアミラーゼ遺伝子の発現制御機構を解析する上で、非常に優れたモデル遺伝子となる。 $\Delta amyR103$ 株は、デンプン・マルトース培地上で $\Delta 50$ 株のように defused colonies を形成する (Fig. 7A)。AT1 株は 2% デンプン培地で 7.5 / ml の α -アミラーゼ活性を有すが、 $\Delta amyR103$ 株の α -アミラーゼ活性は検出限界以下であった。ノーザンブロットング解析においても *taaG2* の発現は $\Delta amyR103$ 株では観察されなかった。すなわち、*taaG2* の発現には *amyR* が必須であることが示された (Fig. 7B)。

【*amyR* 遺伝子の発現制御】

A. nidulans において *amyR* の発現が炭素源にตอบสนองして制御されているのかどうかを解析するために、*amyR* 遺伝子をプローブに用いてノーザンブロットング解析を行った。Total RNA は、種々の炭素源を用いて培養した菌体より調製した (Fig. 8A)。*amyR* mRNA 量はデンプンを単一炭素源とした場合に最も多く、マルトース、グルコース、グリセロールの順に減少した。*amyR* は炭素源にตอบสนองして発現制御を受けていることが明らかとなった。*A. nidulans amyR* 遺伝子プロモーター領域(-400 ~ -100)には五つの CreA 結合モチーフが存在する。*amyR* の炭素源による抑制が CreA によって伝達されるのかどうかを解析するために、*creA204* 変異株と *creA*⁺株における *amyR* mRNA 量の比較を行った (Fig. 8B)。*creA204* 変異株では、*amyR* mRNA 量はグルコース・マルトース・デンプンそれぞれにおいてほぼ同等であり、*creA*⁺株の *amyR* mRNA 量と比較するとグルコース・マルトースにおいて明らかに増大している。*amyR* は CreA 依存的にカーボンカタボライト抑制を受けることが明らかとなった。グリセロールを単一炭素源とした場合の *amyR* mRNA 量は、*creA204* 変異株においても他の炭素源における発現量と比較すると依然として低い。確証は無いが、*amyR* の発現は明らかとされていない CreA とは別経路の機構によってグリセロールによって発現を抑

制されている可能性がある。

【*amyR* プロモーター領域の構造】

amyR 遺伝子発現制御に関わる推定のシスエレメントを特定するために、*amyR* プロモーター領域に存在する既知のシスエレメントを検索した (Fig. 9)。上述の CreA 結合配列の他に、AmyR 結合配列(CGGN₈CGG)が-240 に位置していた。一方、*A. oryzae amyR* プロモーターには AmyR 結合配列は存在しなかった。*A. oryzae amyR* は、炭素源に依存せず構成的に発現している結果とも一致する (24)。

A. nidulans, *A. oryzae amyR* プロモーター領域を比較した結果、それぞれの-670 と-750 に 5'-CCTCGGCTTCCCGA の相同性の高い領域が存在していた。この配列は、*S. cerevisiae* において糖質分解酵素の高発現に関わる因子 GCR1 の認識配列に類似性が見いだされた(2)。

【AmyR と他の真菌類の転写活性化因子との比較】

A. nidulans AmyR の全アミノ酸と *A. oryzae*, *A. niger* の AmyR それぞれのアミノ酸を比較すると、相同性はそれぞれ 72 %と 75 %であった。特に N 末端に存在する Cys₆Zn(II)モチーフドメインでは、*A. nidulans* の 16 ~ 42 残基に当たる領域で 100 %のアミノ酸が保存されていた。これら三種の AmyR は、全て同一の DNA 配列を認識して結合すると考えられる。またこのドメインは、真菌類の 79 の Cys₆Zn(II)ファミリーに属する転写因子のコンセンサス配列とほぼ一致し (72)、Cys₆Zn(II)ファミリー一般に言われる DNA 認識機構が適応できる可能性がある。Petersen らは (1999) GST に AmyR の 1 ~ 131 a.a.までを融合したタンパク質を用いて AmyR が CGGN₈CGG と CGGAAATTTAA の二種の配列に結合する事を報告している(63)。後者の配列は、*taaG2* の発現誘導に必須な SRE 配列を含んでいた。

TBLASTN を使って GenBank データベース内の AmyR 類似タンパク質を検索した結果、28%の相同性を有す *A. parasiticus sugR* 遺伝子産物(96)、27%の相同性を有す *Candida albicans CASUC1* 遺伝子産物(41)、と 21%の相同性を有す

S. cerevisiae MAL63p が AmyR と相同性が高いことが明らかとなった。これらの内、マルトース資化遺伝子群の発現誘導を司る転写活性化因子 *S. cerevisiae* MAL63p が最も解析が最も進んでいる(10)。三種の *Aspergillus* 属の AmyR と Mal63p の一次構造を CLUSTAL W (83) を使って比較したところ、相同性の高い五カ所が特定された。13 ~ 54; DNA binding domain, 152 ~ 214; MH1 domain (MAL63p homology domain 1), 234 ~ 375; MH2, 419 ~ 496; MH3, と 516 ~ 542; MH4 (Fig. 10)。

MAL63p の部分欠失解析より、四カ所の機能ドメインが提唱されている(30)。特異的な DNA への結合に必須な DNA binding domain (1 ~ 100 残基), 転写活性化ドメイン (60 ~ 283 残基), 転写活性化機能を阻害するドメイン (251 ~ 299), マルトースに応答して転写活性化の阻害を解除するドメイン (299 ~ C 末端領域) である。この結果を MAL63p と AmyR とのアライメントの結果に対応すると、MH1 ~ MH2 は AmyR 機能のコアドメイン、MH2 の C 末端側は転写活性化の機能発現を阻害するドメイン、MH3 と MH4 はマルトースに応答するドメインとして機能する可能性が考えられる。

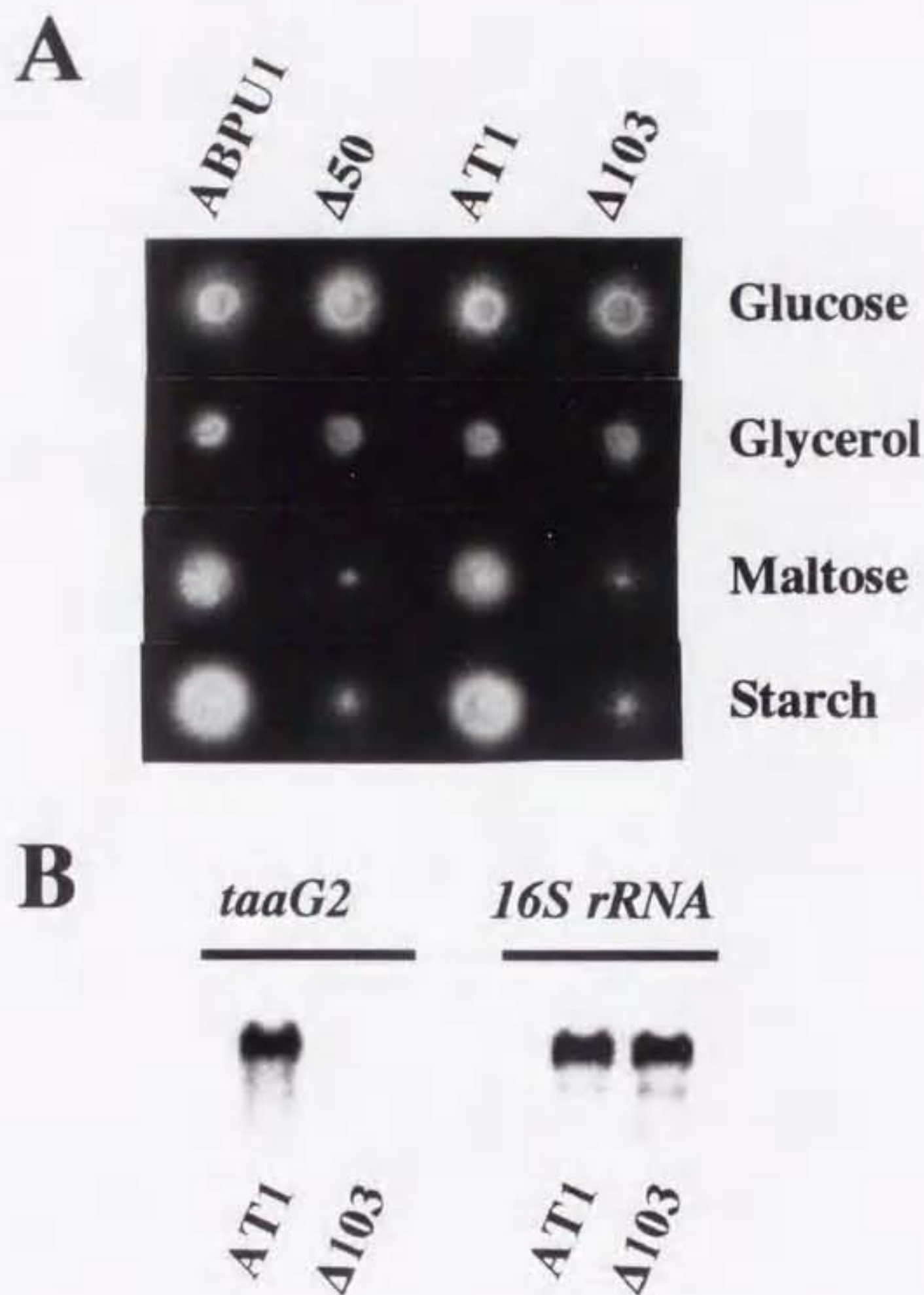


Fig. 7 炭素源資化能 (A) と *taaG2* の発現 (B) に与える *amyR* 遺伝子破壊の影響。

A 単一炭素源として 2% glucose, 2% glycerol, 2% maltose, 2% starch を用いた培地上での *amyR*⁺ (ABPU1, AT1) と $\Delta amyR$ ($\Delta 50$, $\Delta 103$) の生育の比較。AT1 と $\Delta 103$ 株は *A. oryzae taaG2* を有している。**B** *taaG2* 発現の解析。2% starch/2% glycerol を炭素源とした最少培地で 24時間, 37°C で培養した AT1 と $\Delta 103$ 株より total RNA を調製した。total RNA (5 μ g) を用いてノーザンブロットィング解析を行った。検出には ³²P ラベルした *amyR* フラグメントと 16S rRNA 断片を用いた。

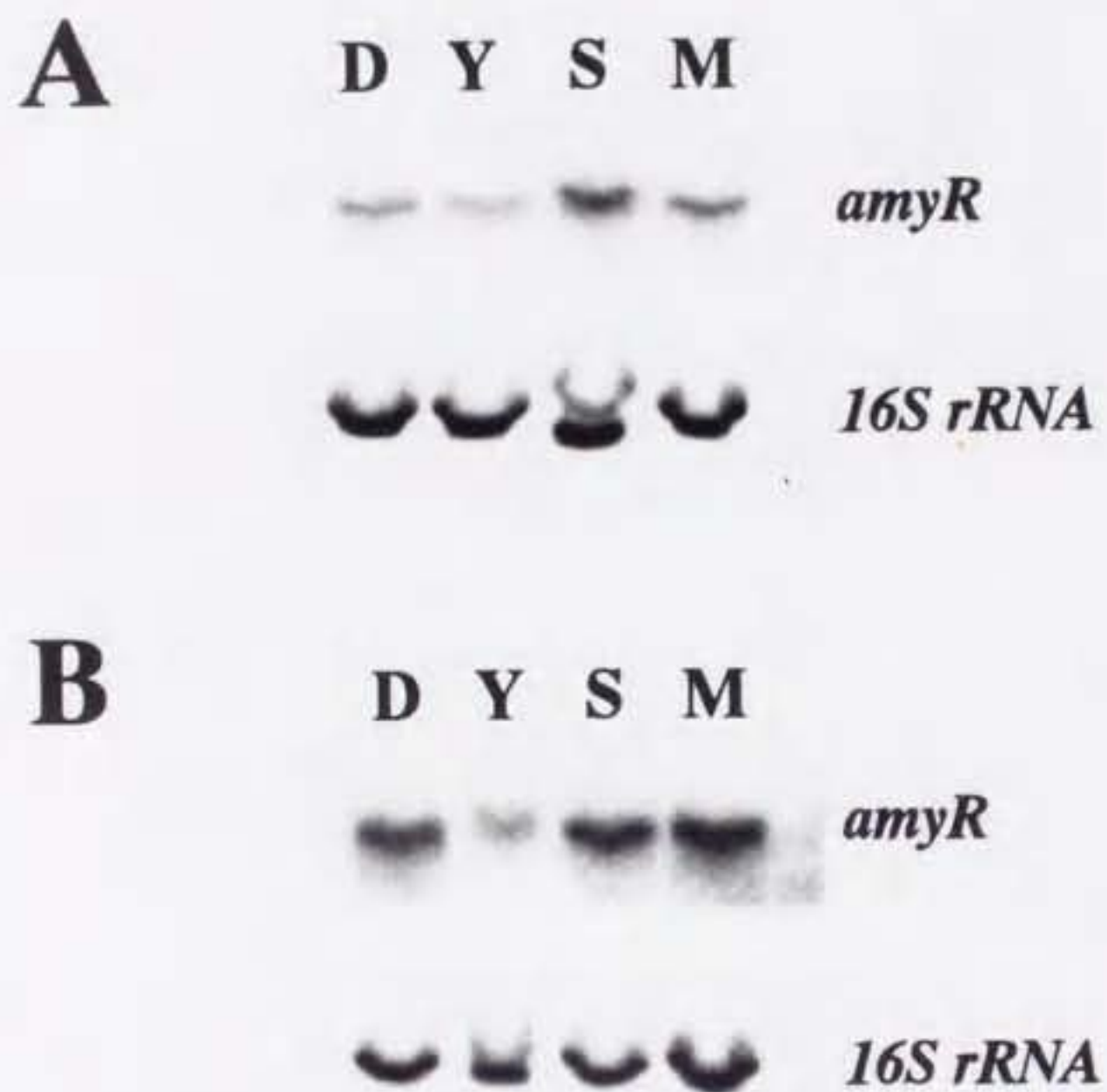


Fig. 8A, B *A. nidulans amyR* 発現特性の解析。

total RNA は D; 2% glucose, Y; 2% glycerol, M; 2% Maltose, S; 2% starch, を単一炭素源とした最少培地で37 °C, 24時間培養した ABPU1 (*creA*⁺; **A**), MH664 (*creA204*; **B**)より調製した。total RNA (5 μg) を用いてノーザンブロットィング解析を行った。検出には ³²P ラベルした*amyR* フラグメントと16S rRNA 断片を用いた。

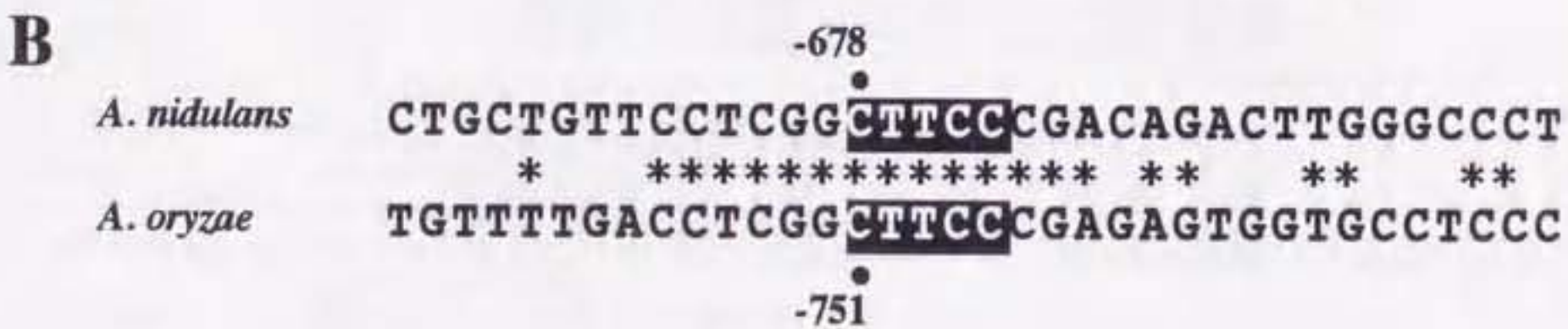
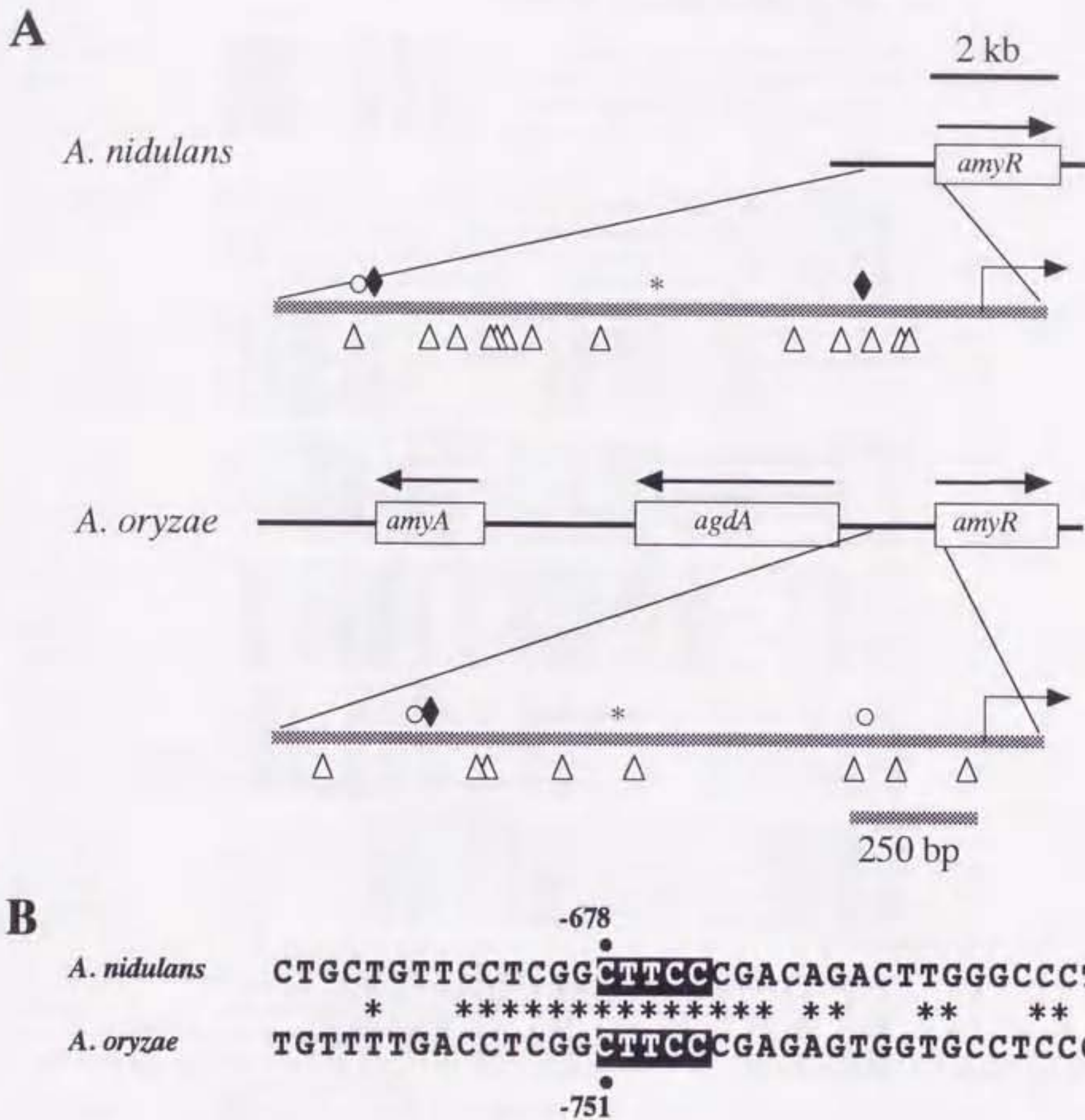


Fig. 9A, B *A. nidulans* と *A. oryzae amyR* プロモーター領域の図解。

A それぞれ推定の◆; AmyR 結合配列, △; CreA 結合配列, *; GCR1 結合配列, ○; AnCP 結合配列を示す。**B** 数字は転写開始点を+1とした場合の位置を示す。保存されていた塩基にアスタリスクを記した。白抜きの文字は、GCR1 認識配列のコア配列を示す。

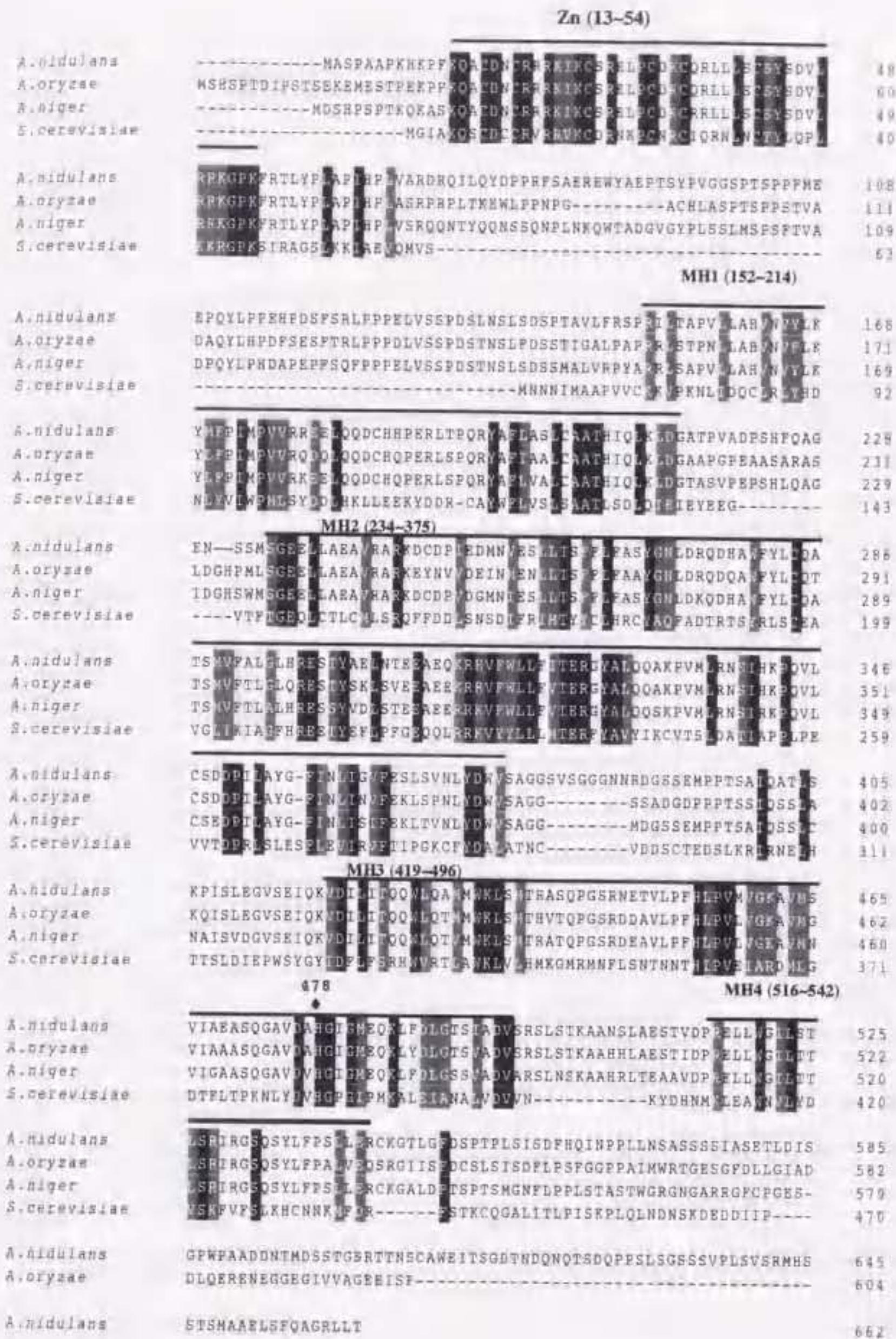


Fig. 10 AmyRs と MAL63 のアミノ酸配列のアライメント。
 CLASTAL W プログラムを使って四種の転写活性化因子をアライメントした。Identities と Similarities は BOX-SHADE 3.21 (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html) によって示した。黒塗り; Identities, 灰色; Similarities。相同性の高かった領域をバーで示した。478のダイヤモンドは *malA1* 変位を示す(第二章第三節)。

第二節 rAmyR の結合特性の解析

2-2-1. 緒言

糸状菌は、 α -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、 α -グルコシダーゼなどの多様なアミロース分解酵素を産生する。特に *A. oryzae*, *A. niger* に代表される *aspergilli* は、これらの酵素を高生産する微生物として知られ、種々のアミロース分解酵素が単離されている(6, 26, 55, 80, 87, 93)。

一般的にアミロース分解酵素の生産は、デンプンやその分解産物であるマルトースなどの炭素源により発現が誘導される。アミロース分解酵素遺伝子のプロモーター領域には、ほぼ共通して Region IIIa と称される領域が存在する(55)。この領域は、*A. oryzae* α -グルコシダーゼ遺伝子(*agdA*)、 α -アミラーゼ遺伝子(*amyB*) の発現誘導に関与している(35, 57)

前節でも述べたように、*amyR* 遺伝子はアミロース分解酵素遺伝子群の転写活性化因子である(24, 63)。*A. oryzae* AmyR は 604 アミノ酸からなり、N 末端には Cys₆Zn(II) タイプのジンクフィンガーモチーフを有している。この DNA 結合領域は、二種類の結合配列を認識すると報告されている。一つは 8 塩基のスペースを介して CGG triplet が位置する CGGN₈CGG 配列。他方は、単独の CGG triplet 配列とその直後に AAATTTAA が位置する配列である(63)。これらの配列は Region IIIa 領域に含まれ、後者の配列は *taaG2* の発現誘導に必須な SRE と一致する(82)。

単独の CGG triplet 配列は *taaG2* プロモーター領域で十分に機能していることから、CGGN₈CGG 配列の両方の CGG triplet 配列が遺伝子の発現誘導に必要であるのかどうか疑問である。

この点を明らかにすることを目的として、前節でクローニングした *agdA* プロモーター領域に存在する CGGN₈CGG 配列に変異を導入し、*A. nidulans* における発現誘導能を解析した。CGG triplet の両方或いは片側ずつに変異を導入した結果、どちらか片方の CGG triplet 配列が存在すれば僅かながらの遺伝子発現能を有すものの、誘導的高発現には両方の CGG triplet が必須であることが明らか

となった。*in vitro* での各改変 DNA 断片に対する AmyR 結合特性を解析した結果、両方の CGG triplet が存在するときに相乗的に AmyR が結合したことから、AmyR の高親和性結合にも同様に両方の CGG triplet が必須であることが明らかとなった。

また、*taaG2* プロモーター上の AmyR 結合配列を解析した結果、CGGN₈AGG 配列を認識して結合していることが明らかとなった。下流の AGG 配列も弱いながらも上流側の CGG triplet への AmyR の結合を補助しており、*in vitro* での AmyR の DNA への結合は、CGGN₈C/AGG に結合した二分子の AmyR 間の相互作用により安定化されると推測される。

2-2-2. 実験材料及び方法

【*agdA* プロモーター領域の AmyR 結合配列への変異の導入】

AmyR 結合配列は、*agdA* プロモーター領域において転写開始点の上流-396 ~ -383 に位置し、その配列は 5'-CGGTCTTTTGTTCGG-3'である。この領域に部位特異的に変異を導入するに当たり、リコンビナント PCR 法 (28) を用いた。プライマーは下記のものを用いた。

<i>agdFBp</i>	CGGGATCCTCGACTATAACAGCTTC (-426 ~ -407)
<i>agdRIIp</i>	GAAGATCTGGTGGAGGCACTGCAAAATG (-347 ~ -366)
<i>agd5ΔFp</i>	TATAGGCTATTGCTTTTGTTCGGAGATATGA (-404 ~ -375)
<i>agd5ΔRp</i>	TCATATCTCCGACAAAAGCAATAGCCTATA (-375 ~ -404)
<i>agd3ΔFp</i>	CGGTCTTTTGTATTAGATATGACCAATCAG (-396 ~ -367)
<i>agd3ΔRp</i>	TGGTCATATCTAATACAAAAGACCGAGCCT (-372 ~ -401)
<i>agd53ΔFp</i>	GCTATTGCTTTTGTATTAGATATGACCAAT (-397 ~ -370)
<i>agd53ΔRp</i>	AATACAAAAGCAATAGCCTATAACGAAGC (-386 ~ -411)

一度目の PCR には以下の組み合わせでプライマーを使用した。

5'-CGG triplet の改変; *agdFBp* と *agd5ΔRp*, *agdRIIp* と *agd5ΔFp*

3'-CGG triplet の改変; *agdFBp* と *agd3ΔRp*, *agdRIIp* と *agd3ΔFp*

両サイドの CGG triplet の改変; *agdFBp* と *agd53ΔRp*, *agdRIIp* と *agd53ΔFp*

鋳型には *amyR* 遺伝子と *agdA* 遺伝子の 5'部分を有す pAN8 (81)を用いた。上述のプライマーの組み合わせによって増幅された産物は精製後、それぞれを混ぜ合わせて二度目の PCR の鋳型とした。この時用いたプライマーは、*agdFBp* と *agdRIIp* である。

反応条件	変性	95 °C	1 min.
	アニール	55 °C	1 min.

伸長 72 °C 1 min.

サイクル数 30

agdFBp と agdRIIp を用いて PCR を行い、*agdA* プロモーター領域の-426 ~ -347 の 80 bp を特異的に増幅させた。この 80 bp の内、5'-CGG に変異が導入された物を $\Delta 5$ 、3'-CGG に変異が導入された物を $\Delta 3$ 、二つの CGG triplet に変異を導入した物を $\Delta 53$ とする。それぞれの断片には *Bam*H I サイトと *Bgl* II サイトが付加されており、各制限酵素で処理した断片を pBAT *Bam*H I サイトにクローニングした (Fig.)。pBAT は *A. nidulans* を形質転換する際の選択マーカーとして、*argB* 遺伝子とレポーター遺伝子として *taaG2* の全構造遺伝子とプロモーター領域の一部 (-137 ~ 2613) を pBluescript KSII (+) に含んだプラスミドである。この *taaG2* 遺伝子は発現誘導に必須なシスエレメントを含んでおらず、pBAT を導入した *A. nidulans* においても極僅かな α -amylase 活性しか検出されなかった。ワイルドタイプと改変プロモーター ($\Delta 5$, $\Delta 3$, $\Delta 53$) をクローニングした pBAT をそれぞれ pBATW, pBAT $\Delta 5$, pBAT $\Delta 3$, pBAT $\Delta 53$ とした。これらのプラスミドを *Eco*R V で消化することで *argB* 遺伝子内の一カ所のみが切断される。この直鎖状にした DNA 断片を用いて *A. nidulans* を形質転換した。*argB* locus で組み替えを起こし、導入される効率を上げるためである。

【MaIE::AmyR₁₋₄₁₁ の構築】

pMAL system (New England Biolabs) を用いて、recombinant AmyR₁₋₄₁₁ (AmyR₁₋₄₁₁) を MaIE との融合タンパク質として発現させた。宿主には *E. coli* BL21 株を用いた。AmyR₁₋₄₁₁ は全長 662 アミノ酸の内、N 末端から 411 アミノ酸に相当するグルタミン酸までを含む。AmyR₁₋₄₁₁ は現在のところ *in vivo* において転写活性化能を有す最小単位である事が明らかとなっている (unpublished results)。そこでこの AmyR₁₋₄₁₁ を用いて *in vitro* における AmyR の結合特性の解析を行うこととした。

1 ~ 411 アミノ酸に相当する cDNA を鋳型として PCR を行った。

プライマーは下記のものを用いた。

MALamp; 5'-GGGAATTCATGGCCTCACCAGCCGCTCCG

AmyXhoIp; 5'-TTAGATCTTATTACTCGAGCGAGATCGGTT

反応条件	変性	95 °C	1 min.
	アニール	55 °C	1 min.
	伸長	72 °C	1 min.
	サイクル数	30	

上記プライマーは、それぞれ *EcoR* I サイトと *Bgl* II サイトが 5' 側に付加されている。更に AmyXhoIp は 411 アミノ酸のコドンの直後にストップコドンとして TAATAA を含んでいる。PCR による増幅産物は、*EcoR* I - *Bgl* II 消化され、pMALC2 ベクターの *EcoR* I - *Bam* H I サイトに挿入された。このプラスミドを *E. coli* BL21 株に導入し、以下の実験に用いた。

【*E. coli* BL21 株における recombinant AmyR₁₋₄₁₁ の発現】

LB 培地で 37 °C、一晚振とう培養した培養液をアンピシリンを含む LB 培地で 10 倍に希釈し、本培養を行った。本培養には坂口フラスコを使用し、100 ml LB/本の系で行った。OD₆₀₀ = 0.5 となるまで 37 °C で振とう培養後、終濃度 1 mM となるように IPTG を添加し、更に二時間同条件で培養した。菌体を遠心分離により集菌し、培養液の 1/20 に相当する量の緩衝液 (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.2 M NaCl, 1 mM PMSF) に懸濁した。氷水中で 60 秒間、3 回、超音波処理 (100W, 1 秒間隔) し、10,000 × g の条件で遠心分離後、pMAL Protein Fusion and Purification System (New England Biolabs) の方法に従い MalE::AmyR₁₋₄₁₁ を得た。精製画分をグリセロールを除いた Gel shift binding buffer (25 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM KCl, 0.5 mM DTT, 2 mM zinc sulfate) に対して二回、4 °C で透析した。

【DNase I フットプリンティング】

上述の agdAWT の断片を *Bam* H I - *Bgl* II 消化し、pUC119 *Bam* H I サイトにクローニングした。向きは pUC119 *EcoR* I サイト側に agdAWT のコーディン

グ鎖の 5'側がくるよう構築した。このプラスミドを *EcoR I-Hind III* 消化し、得られた断片の *Hind III* サイトに T7 DNA polymerase を用いて(α - ^{32}P)dCTP を取り込んだ。6P 断片は、第一章で述べた物を *Bam H I-Hind III* 消化後、両サイトに T7 DNA polymerase を用いて(α - ^{32}P)dCTP を取り込んだ。その後、*Pst I* 消化し、*Bam H* サイトにのみ(α - ^{32}P)dCTP が取り込まれた断片をプローブとした。

3'片側末端ラベルした DNA 断片 (4×10^4 cpm), 0.5 ~ 15 μg の部分精製 AmyR₁₋₄₁₁, と Gel shift binding buffer (25 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM KCl, 0.5 mM DTT, 2 mM zinc sulfate, 10 % glycerol, 0.2 ng dI-dC) を混合し、4 °C, 10 分間、結合反応した。×10 の DNase I digestion buffer (0.5 M Tris-HCl pH 7.5, 0.1 M MgCl₂, 0.5 mg/ml BSA) を 1/10 量、0.1 μg DNase I (Takara) をそれぞれ添加し、25 °C, 1 分間 DNase I を作用した。DNA 断片をエタノール沈殿により回収し、Formamide loading buffer (95% (v/v) formamide (deionized), 0.09 % (w/v) bromophenol blue, 0.09 % (w/v) xylene cyanol FF) に溶解した。8 %変性アクリルアミドゲルを用い、方法は第一章に準じた。

【ゲルシフトアッセイ】

agdAWT 断片は DNase I フットプリンティングと同様に RI 標識した物を用いた。 $\Delta 5$, $\Delta 3$, $\Delta 53$ DNA 断片は pBAT $\Delta 5$, pBAT $\Delta 3$, pBAT $\Delta 53$ から *Bam H I-Sma I* 消化して得られた DNA 断片の *Bam H I* サイトに T7 DNA polymerase を用いて(α - ^{32}P)dCTP を取り込み、標識した。

taaG2WT, taaG2 $\Delta 23$ は、6P, SRE23 (第一章参照)を鋳型として以下のプライマー、*Bam F*, *Bgl R* を用いて増幅した断片を pUC119 *Bam H I* サイトにクローニング後、*EcoR I-Hind III* で切り出し、上述したように RI 標識しプローブとして用いた。taaG2 Δ AGG, taaG2CGGN₈ は、オーバーラッピング PCR を行い、taaG2 プロモーター領域の 5'-AGGG-3' (-187 -- -184)をそれぞれ 5'-CTTT-3', 5'-CGGG-3'に改変した。反応条件は第一章に準ずる。taaG2WT, taaG2 $\Delta 23$, taaG2 Δ AGG, taaG2CGGN₈ はそれぞれ、taaG2 プロモーター領域の-231--152 までを含む。

DNA 断片 (10^4 cpm), 0.1 ~ 10 μg の部分精製 AmyR₁₋₄₁₁, と Gel shift binding

buffer を混合し、4 °C, 10 分間、結合反応した。4%アクリルアミドゲル/TBE buffer を用いて CV=130, 4 °C, 2 時間、電気泳動に供し解析した。

○用いたプライマー

taa6F	5'-GGGGATCCGATCCAACCAACACCCTCCA-3' (-231~212)
BglR	5'-GGAGATCTCGACTGTGATTTG-3' (-152~-164)
taa3'ΔF	5'-GAAATTTAACTTTATTAATTTCCACTCAAC-3' (-196~-167)
taa3'ΔR	5'-TGGAAATTAATAAAGTTAAATTTCCGCCCC-3' (-173-202)
taaCGGF	5'-GGCGGAAATTTAACGGGGATTAATTTCCACT-3' (-200~-171)
taaCGGR	5'-AGTGGAAATTAATCCCGTTAAATTTCCGCC-3' (-171~-200)

【サザンブロッティング解析】

第一章に準ずる。

【塩基配列の決定】

第一章に準ずる。

【アミラーゼ活性測定】

第一章に準ずる。

2-2-3. 結果

【*agdA* 発現誘導に関わるシスエレメントの同定】

第二章第一節でも述べたように、*A. nidulans amyR* 遺伝子は α -glucosidase をコードしている *agdA* 遺伝子とクラスターを形成している。*agdA* プロモーター領域には AmyR が結合する可能性のある CGGN₅CGG が存在する。その配列は 5'-CGGTCTTTTGTCGG-3' (-396 ~ -383; 翻訳開始点を+1 とする)である。

この推定 AmyR 結合配列が *in vivo* において機能するかどうかを解析するにあたり、*taaG2* をレポーター遺伝子として用いた。*A. nidulans* は極く僅かな α -アミラーゼしか生産せず、これまでの研究からも *taaG2* がレポーター遺伝子として非常に有効であることが明らかとなっている(11, 82)。レポータープラスミド pBAT には、*taaG2* 遺伝子の *Pst* I-*Eco* R I の領域(-137 ~ 2614; 転写開始点を+1 とする)と選択マーカーとして *A. nidulans argB* 遺伝子が pBluescript KSII (+) に挿入されている(Fig. 11)。*taaG2* の *Pst* I-*Eco* R I 断片は、デンプンに応答した発現誘導に必須な SRE 配列を含んでいないため、誘導条件下でも極く僅かな α -アミラーゼしか生産しない (Table. 1)。

agdA プロモーター領域の-426 ~ -347 に位置する DNA 断片と、それぞれの CGG triplet 或いは両方の CGG triplet に変異を導入した DNA 断片 (Fig. 11)を pBAT の *Bam* H I サイトにクローニングし、得られたプラスミドを *A. nidulans* ABPU 1 株に導入した。導入されたプラスミドの locus とコピー数はサザンハイブリダイゼーション解析により同定した。*argB* locus に 1 コピー導入された株のみを選択し、以後の解析に用いた。Table. 1 に示したように、配列を改変していない *agdA*WT 断片の挿入により、デンプンに応答してタカアミラーゼ A が誘導的に高生産された。挿入された断片内にデンプンに応答して発現誘導を起こすシスエレメントが存在することが明らかとなった。一方、両側の CGG triplets を改変した場合には発現誘導能が完全に消失しており、CGGN₅CGG 配列が発現誘導に関与していることが明らかとなった。どちらか一方の CGG triplet を改変した場合には、アミラーゼ活性は顕著に低下しているものの、両側の CGG triplet を改変した場合に比べ若干活性が高かった。どちらか一方の CGG triplet とその周

辺配列が存在すれば、若干の発現誘導能を依然として有している可能性がある。

一方、約 1.5 kbp の中間領域を介し、逆方向に転写される *amyR* は炭素源に依存せず構成的に発現していることから(81)、*agdA* の-396 ~ -383 (翻訳開始点を +1 とする)に位置する CGGN₈CGG 配列は、*agdA* の発現のみを制御していると推測される。

【*E. coli* における recombinant AmyR の発現】

Petersen らは *A. oryzae* の GST::AmyR₁₋₁₃₁ 融合タンパク質が、CGG ダイレクトリピート配列 (CGGN₈CGG) を含む *A. niger amy2*, と *A. oryzae glaA* のプロモーター領域及び、単独の CGG triplet (CGGAAATTTAA) を含む *A. oryzae α-amylase (taaG2)*, と *A. niger glaA* のプロモーター領域に結合する事を明らかにしている。彼女らは DNase I 消化から保護されたプロモーター領域が CGGN₈CGG 配列の方が大きかったことから、GST::AmyR₁₋₁₃₁ が CGGN₈CGG 配列にダイマーを形成して結合し、単独の CGG triplet 配列にはモノマーとして結合すると提唱している(63)。しかしながら、GST タンパク質は二量体を形成して存在することが知られている。モノマーで存在する AlcR が、GST::AlcR₁₋₆₀ 融合タンパク質の場合には二量体を形成したように GST::AmyR₁₋₁₃₁ もまた二量体を形成している可能性がある。それ故に、AmyR の認識配列への特異的結合に二量体形成が必要であるかどうか、或いは単独の CGG triplet 配列にはモノマーとして結合するかは更に解析の必要がある。

人工的な二量体形成を避けるために *A. nidulans* AmyR₁₋₄₁₁ を MalE との融合タンパク質として発現させた。AmyR₁₋₄₁₁ はこれまでの C 末端欠失 AmyR の機能解析において、*in vivo* において転写活性を有している最小単位である事が明らかとなっていることから (第二章第三節 Fig. 19)、このコンストラクトを選択した。融合タンパク質は大腸菌を宿主として発現させ、実験方法で述べたようにアミロースレジンをを用いてアフィニティークロマトグラフィーを行い、部分精製した。精製画分を SDS-PAGE に供した結果、分子量 89,000 が主要なバンドとして検出された。より分子量の小さいマイナーバンドは融合タンパク質の分解産物であると推測される。MalE::AmyR₁₋₄₁₁ の分解を最小限に抑えるために培地へのグ

ルコースの添加や M9 最少培地を使用し、18 °C, 30 °C で培養時間も検討しながら発現を試みたが、改善は見られなかった。

【*agdA* プロモーター上の AmyR₁₋₄₁₁ 結合領域の特定】

MalE::AmyR₁₋₄₁₁ 融合タンパク質の認識配列を解析するに当たり、*agdA* プロモーター領域を用いて DNase I フットプリンティング解析を行った。プローブとして、*agdA* プロモーター上の -426 ~ -347 領域を用いた。DNase I 消化から 5'-AGGCTCGGTCTTTTGTCTGGAGATATGAC-3' のみが保護され、MalE::AmyR₁₋₄₁₁ はこの 28 bp 内の配列を認識して特異的に結合する事が明らかとなった (Fig. 12)。

【*agdA* プロモーター上の CGG triplet に対する AmyR₁₋₄₁₁ 結合特性】

ゲルシフトアッセイを行い、*agdA* プロモーター上の認識配列に対するより詳細な AmyR₁₋₄₁₁ の結合特性を解析した。*agdA*WT をプローブとして使用し、AmyR₁₋₄₁₁ の濃度を段階的に変化させた結果、移動度の大きい CI コンプレックスと移動度の小さい CII コンプレックスの二つのシフトバンドが検出された (Fig. 13A)。CI はどちらか一方の CGG triplet を認識して一分子の AmyR が結合し、CII は二つの CGG triplets を二分子の AmyR が認識して結合した結果と推測される。

そこで、MalE::AmyR₁₋₄₁₁ の特異的な DNA への結合に CGG triplet 配列がどのように関与しているのかを解析するために、Fig. 11 で示した改変 *agdA* プロモーター断片を用いてゲルシフトアッセイを行った。Fig. 13 B, C に示されたように、どちらか一方の CGG triplet 配列を改変すると単一のシフトバンドしか検出されなかった。*agdA*Δ5, *agdA*Δ3 プローブで検出されたシフトバンドの移動度は、*agdA*WT 断片をプローブとした場合に観察された移動度の大きい CI と同一であり、MalE::AmyR₁₋₄₁₁ 一分子がそれぞれの CGG triplet と相互作用していることが示唆された。更に、MalE::AmyR₁₋₄₁₁ の濃度を 1 μg まで増加させても一本のシフトバンドしか検出されなかったことから、*agdA*WT をプローブとした場合に観察された二本のシフトバンドはタンパク質間の直接的な相互作用のみでは生じず、

DNA上の二カ所に AmyR が結合する事が必要であると考えられる。両側の CGG triplet を改変した場合にはシフトバンドは検出されず、AmyR の特異的結合には、CGG triplet が必要不可欠であると結論される。

Fig. 13 A, B, C において、10 ng の MalE::AmyR₁₋₄₁₁ を用いた場合の DNA への結合量を数値化した。agdAΔ3, 及び agdAΔ5 プロンプを用いた場合には、全量の 18.5 %, 及び 3.4 % が MalE::AmyR₁₋₄₁₁ と複合体形成していた。一方で、agdAWT で観察された CII コンプレックスは、同条件下で 38.4 % のプロンプ断片が複合体を形成していた。この結果は、AmyR 二分子が agdA プロモーター領域の二つの CGG triplet を認識して結合し、タンパク質間相互作用により CII コンプレックスが安定化されていることを示唆している。

【*taaG2* プロモーター上の AmyR₁₋₄₁₁ 結合領域の特定】

DNase I フットプリンティングを行い、*taaG2* プロモーター領域における AmyR₁₋₄₁₁ の結合領域を特定した。プロンプには *taaG2* プロモーター領域を含む 6P 断片を用い、そのノンコーディング鎖に対する AmyR₁₋₄₁₁ の結合を解析した。

供する AmyR₁₋₄₁₁ 濃度を段階的に変化させ、各濃度での結合領域を特定した。AmyR₁₋₄₁₁ を 2 μg 供した場合に DNase I 消化から保護された領域は、SRE に相当する 5'-ATTTCCGCC-3' (-192 ~ -200) と、5'-ATTAATC-3' (-178 ~ -184) であった。AmyR₁₋₄₁₁ を 14 μg 供した場合には、-178 ~ -201 に相当する 24 bp が保護されていた (Fig. 14)。

【*taaG2* プロモーター領域の CGGN₃AGG 配列への変異の導入】

上述の DNase I フットプリンティング解析において明らかとなった AmyR 認識配列に変位を導入し、AmyR の結合親和性に与える影響を解析した。改変した DNA 配列を Fig. 15 に示した。

上流 CGG triplet 改変断片は第一章で述べた SRE23 を使用した。SRE2 の改変が AmyR の結合に影響を及ぼさないことは確認されている。SRE23 の CGGA 配列の改変によりシフトバンドは消失した。AGG triplet への MalE::AmyR₁₋₄₁₁ の結合親和性は極めて低い事を示唆している。AGG triplet を改変した場合にもシ

フトバンドの減少が観察された (Fig. 16)。

Fig. 16 A, C において、10 ng の MalE::AmyR₁₋₄₁₁ を用いた場合の DNA への結合量を数値化した。taaG2WT プローブで観察された CI, CII コンプレックスは、それぞれ全体の 53.9 %, 4.9 %であった。一方、taaG2ΔAGG プローブでは全体の 8.4 %であった。以上の結果は、単独の AGG triplet に対しては AmyR の結合親和性は極めて小さいものの、AmyR と DNA の安定な複合体形成には、両 triplet が必須であることを示している。

【*taaG2* プロモーター領域の CGGN₈CGG への改変】

CGGN₈AGG 配列を *agdA* 型の CGGN₈CGG 配列に改変し、AmyR 結合親和性に与える影響を解析した (Fig. 16D)。供する AmyR 量を増加させるにつれ CI コンプレックス量はほぼ一定であるのに対し、CII コンプレックスが著しく増大した。これは *agdA*WT で検出されたコンプレックス形成と同様であり、DNA 上の二カ所に結合した二分子の AmyR が協調的に結合していることを示唆している。従って、AmyR の高親和結合には CGG triplet の 1 塩基目の C が重要であり、各 CGG triplet に結合した AmyR が相互作用する事により、より安定な DNA-AmyR 複合体を形成するものと結論される。

2-2-4. 考察

AmyR の DNA 結合モチーフは、真菌類の転写活性化因子に多く見られる Cys₆Zn(II)ファミリーに属している(85)。このファミリーに属す多くの因子は二量体を形成して認識配列に結合する。多くの因子の認識配列は、CGG triplet が逆位の配列に逆向きに(inverted repeat)、或いは順向きに(direct repeat)数 bp の塩基を介して位置する配列である。例えば、*Saccharomyces cerevisiae* GALA, PPR1, PUT3 はそれぞれ inverted CGG repeat の CGGN₁₁, N₆, N₁₀CCG 配列に結合し、HAP1 は direct repeat の CGGN₆CGG 配列に結合する(69, 74, 88, 98)。しかし近年、DNA 結合モチーフはこのファミリーに属すものの、AlcR はモノマーとして認識配列に結合し、NirA や FacB は二量体を形成するが非対称な認識配列に結合することが報告され(61, 78, 86)、Cys₆Zn(II)ファミリーの DNA 認識の多様性が示唆された。

Petersen らは、*A. oryzae* AmyR の結合配列は、CGGN₈CGG と CGGAAATTTAA の二種類であると報告した(63)。*Aspergillus* に内在する多くのアミロース分解酵素遺伝子のプロモーター領域は CGGN₅CGG を有している。例外的に *A. oryzae* α-amylase の *taaG2* と *amyB* は CGGAAATTTAA を有し、*A. oryzae*, *A. nidulans* においてもこの配列が AmyR によるデンプンに応答した遺伝子発現誘導に機能していることが示されている(24, 63, 81, 82)。以上の解析結果から、AmyR は二種類の結合配列を有し、CGGAAATTTAA の場合は上流の CGG triplet 配列へモノマーとして結合して機能すると推測された。

本節では、*A. nidulans agdA* プロモーター領域の CGG direct repeat に焦点を絞り、*in vivo* での遺伝子発現誘導能と *in vitro* での AmyR 結合親和性に関する CGG triplet の役割を解析した。片側の CGG triplet にそれぞれ変位を導入した場合、*in vivo* での遺伝子発現誘導能が著しく低下し、*in vitro* でも AmyR 結合親和性が減少し、更に AmyR は、どちらか片側の CGG triplet が存在すれば結合するものの、二つの CGG triplets が存在した場合には協調的に結合する事が明らかとなった。CGG direct repeat 配列への AmyR の高親和結合が遺伝子の誘導的高発現を可能にすると推測される。

agdAWT の CGG direct repeat に対する高親和結合は(Fig. 13)、各 CGG triplet に結合した AmyR 二分子が二量体を形成することによると推測できる。一方、単独の CGG triplet しか有さないプローブを用いた場合には、過剰に AmyR を供しても、より移動度の小さいシフトバンドは検出されなかった。この事も、遊離の AmyR は二量体形成しないが、二カ所の CGG triplet に結合した AmyR 分子同士は相互作用する事ができることを示唆している。この結合特性は、AmyR 同様に CGG direct repeat (CGG_nCGG)に結合する HAP1 に非常に類似している。HAP1 は、水溶液中でモノマーとして存在し、DNA 上ではダイマーを形成する(97)。HAP1 は Cys6Zn(II)ドメインの C 末端側に coiled-coil 構造を有している。一般的に、coiled-coil 構造が GAL4, PPR1 等に代表される Cys6Zn(II)ファミリータンパク質では二量体形成を担っていると考えられている(51, 52)。しかしながら、HAP1 の coiled-coil ドメインは、DNA を介在せずにタンパク質同士で二量体形成する他の因子の coiled-coil ドメインと比べ明らかに短い(42)。興味深いことに、他の因子の coiled-coil 構造に対応する AmyR のドメインにはプロリン残基が数個存在する事から、いわゆる coiled-coil 構造は形成されないと推測される。HAP1 では DNA 上での二量体形成に、Cys6Zn(II)ドメインの疎水性アミノ酸も関与していることが報告されている(42)。AmyR の同領域にも疎水性アミノ酸が多数存在することから、DNA 上での相互作用にこれらのアミノ酸が関与している可能性がある。

AmyR は、*taaG2* プロモーター領域の SRE に相当する 5'-CGGAAATTTAA-3' だけでなく、その直後に位置する AGG triplet も認識し、CGG 及び AGG triplet の両方が存在している時に安定な DNA 複合体を形成する事が示された(Fig. 16)。しかし、AGG triplet に対する AmyR の結合親和性が CGG triplet に比べ極めて低いから、agdAWT と *taaG2*WT をプローブに用いた場合の CI, CII コンプレックス形成率が異なると推測する。

agdAWT (CGG_nCGG)をプローブとした場合、CII コンプレックス形成率は 38.4 %と大きいものの、*taaG2*WT (CGG_nAGG)の CII コンプレックス形成率は 4.9 %と非常に小さい。一方で、*taaG2*WT の CI コンプレックス形成率は 53.9 %と大きい。*A. nidulans* AlcR はモノマーとして存在し、*in vitro* で共通配列 5'-

(T/A)GCGG-3'を認識して結合するものの、*in vivo*では近接して対称に位置する AlcR 結合配列のみが遺伝子発現誘導能を示す事が報告された(53, 61)。*in vitro*において AmyR は、単独の CGG triplet に対して親和性は小さいものの結合する。また、*agdA* プロモーターを用いた *in vivo* の解析から、CGG triplet を改変した場合に比べ、どちらか片方の CGG triplet が存在した場合には、AmyR は若干の発現誘導能を残していた。この低レベルの発現が、AmyR が一分子しか結合していないことに起因するのか、或いは *in vivo* においても AmyR の結合量が減少したことに起因するのか解析する必要がある。

今後、改変 *taaG2* プロモーターを用いて *in vivo*、*in vitro* における AmyR 結合配列の機能解析を行うと共に、*in vivo* においてアミラーゼ遺伝子群の発現誘導には二分子の AmyR が必須であるのかどうかを解明する必要がある。この解析には、認識配列が単独でも、近接して位置しても結合する AlcR の DNA binding domain と AmyR の転写活性化ドメインとのキメラタンパク質を構築し、デンプンによる発現誘導能を解析することが有効であると考えられる。

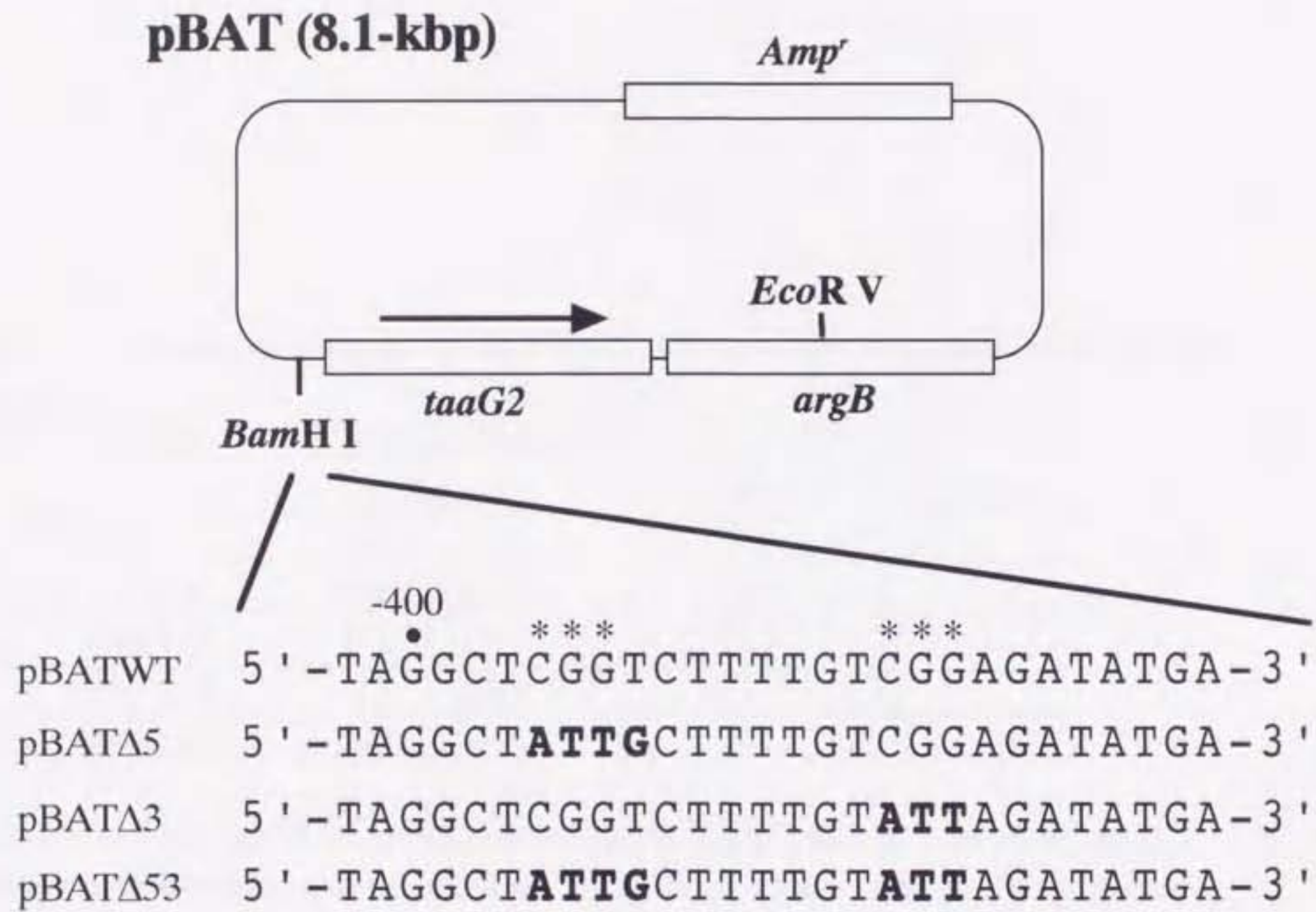


Fig. 11 レポータープラスミド **pBAT** の構造。

pBAT の構造と挿入した野生型と改変 *agdA* プロモーター配列を示す。変位を導入した配列を太文字で記した。

Table 1. Inducing activities of the wild type and mutant AmyR binding sites of the *agdA* promoter.

plasmid	amylase activity (U/g dry mycelia)			
	2% glycerol		2% starch / 2% glycerol	
pBAT	71.7	(4.3)	83.7	(1.2)
pBATW	289	(12)	1120	(69)
pBAT Δ 5	171	(29)	204	(17)
pBAT Δ 3	113	(9.0)	171	(33)
pBAT Δ 53	107	(49)	103	(18)

Plasmids carrying the wild type and mutant AmyR binding sites in front of the *taaG2* reporter were introduced into *A. nidulans*. The transformants were grown for 37 h and the α -amylase activities in the culture broth were determined. Standard deviations from 3 independent experiments are shown in parentheses.

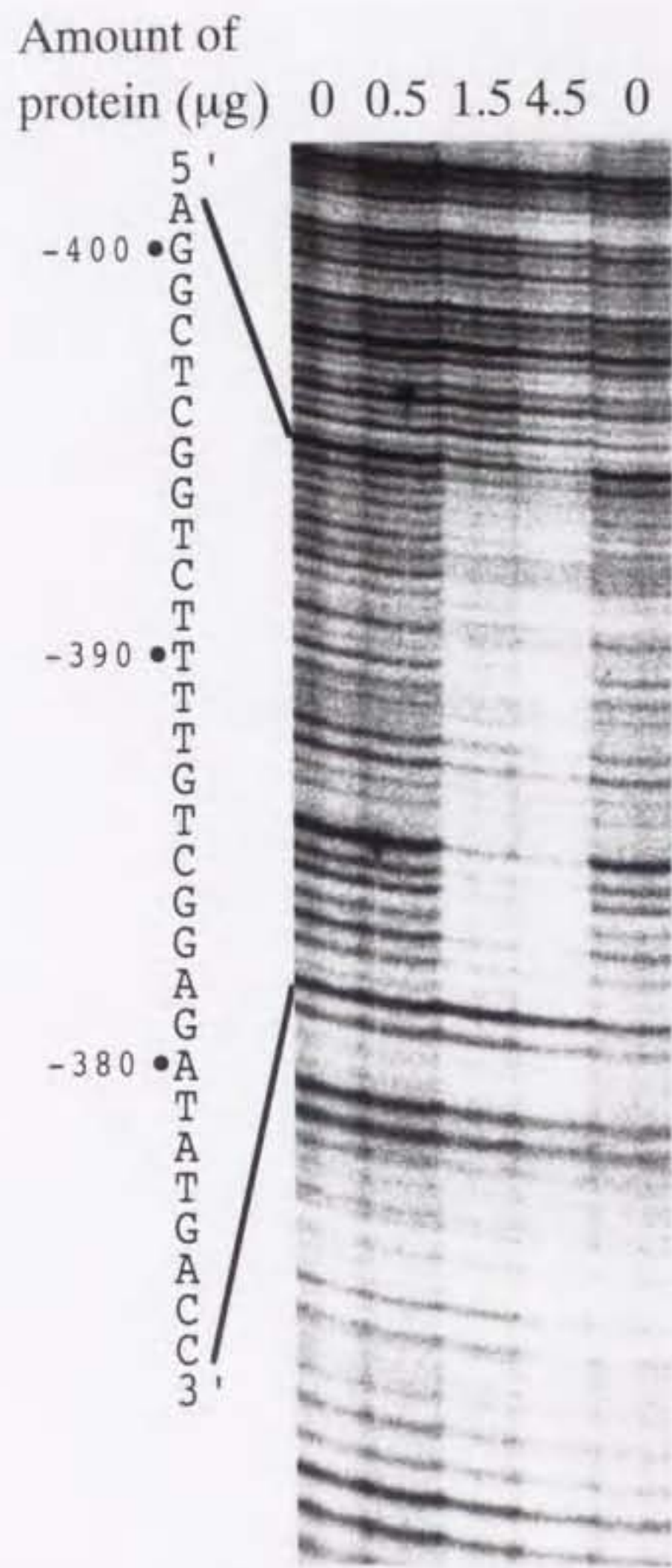


Fig. 12 DNase I footprinting analysis of *agdA* promoter.

供した部分精製 MalE::AmyR₁₋₄₁₁ の濃度は上部に記載した。結合領域を左に示し、数字は転写開始点を +1 とした場合の位置を示す。配列はコーディング鎖を示す。

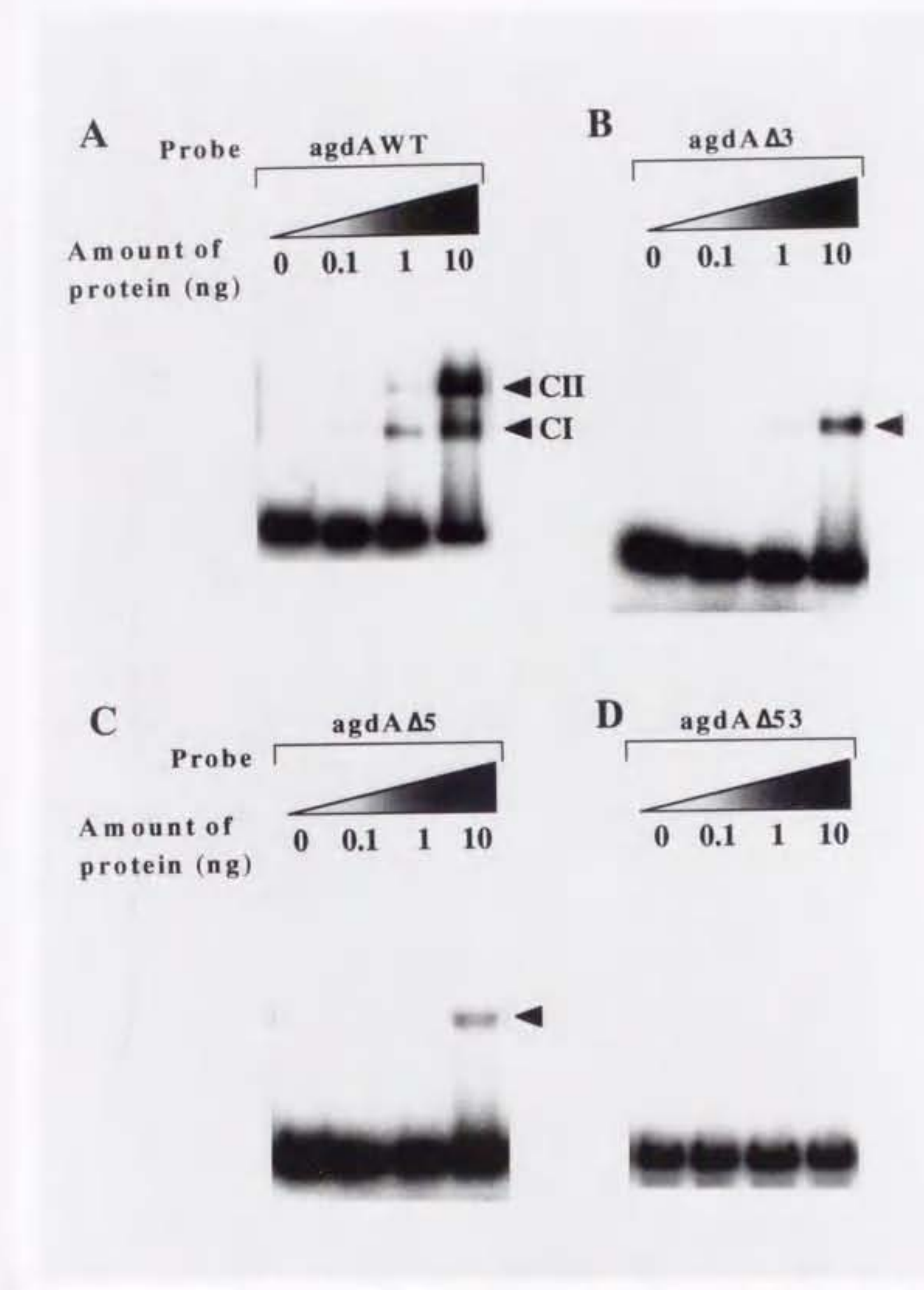


Fig. 13 Gel mobility shift assays with the wild type and mutant *agdA* promoters.

wild type *agdA* 断片 (A), 3'-CGG を改変した断片 (B), 5'-CGG を改変した断片 (C), 5', 3' 両側の CGG を改変した断片 (D) をプローブとした。各図の上部に示した濃度の MalE::AmyR₁₋₁₁₁ を供した。

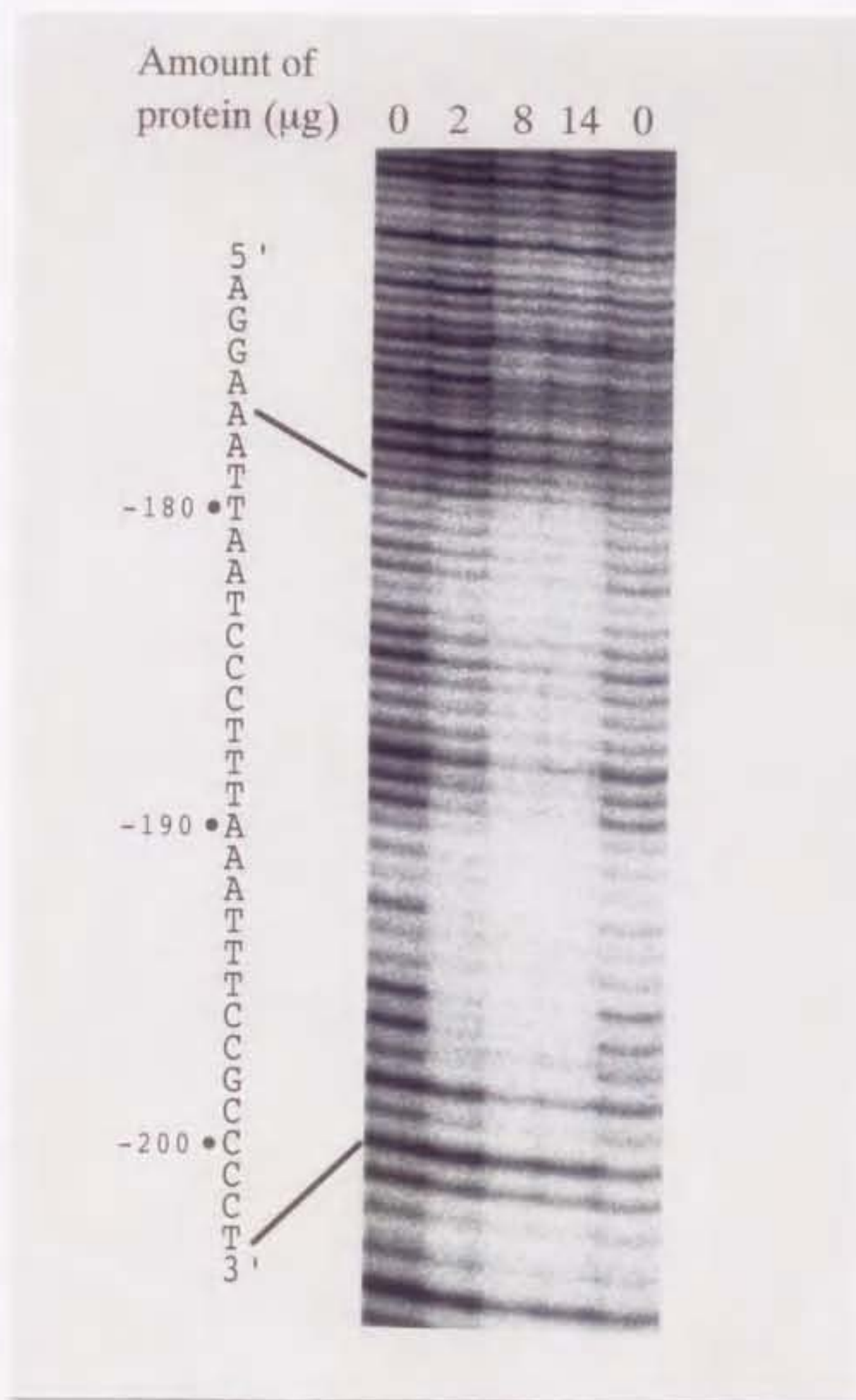


Fig. 14 DNase I footprinting analysis of *taaG2* promoter.

供した部分精製 MalE::AmyR₁₋₄₁₁ の濃度は上部に記載した。結合領域を左に示し、数字は転写開始点を +1 とした場合の位置を示す。配列はノンコーディング鎖の配列を示す。

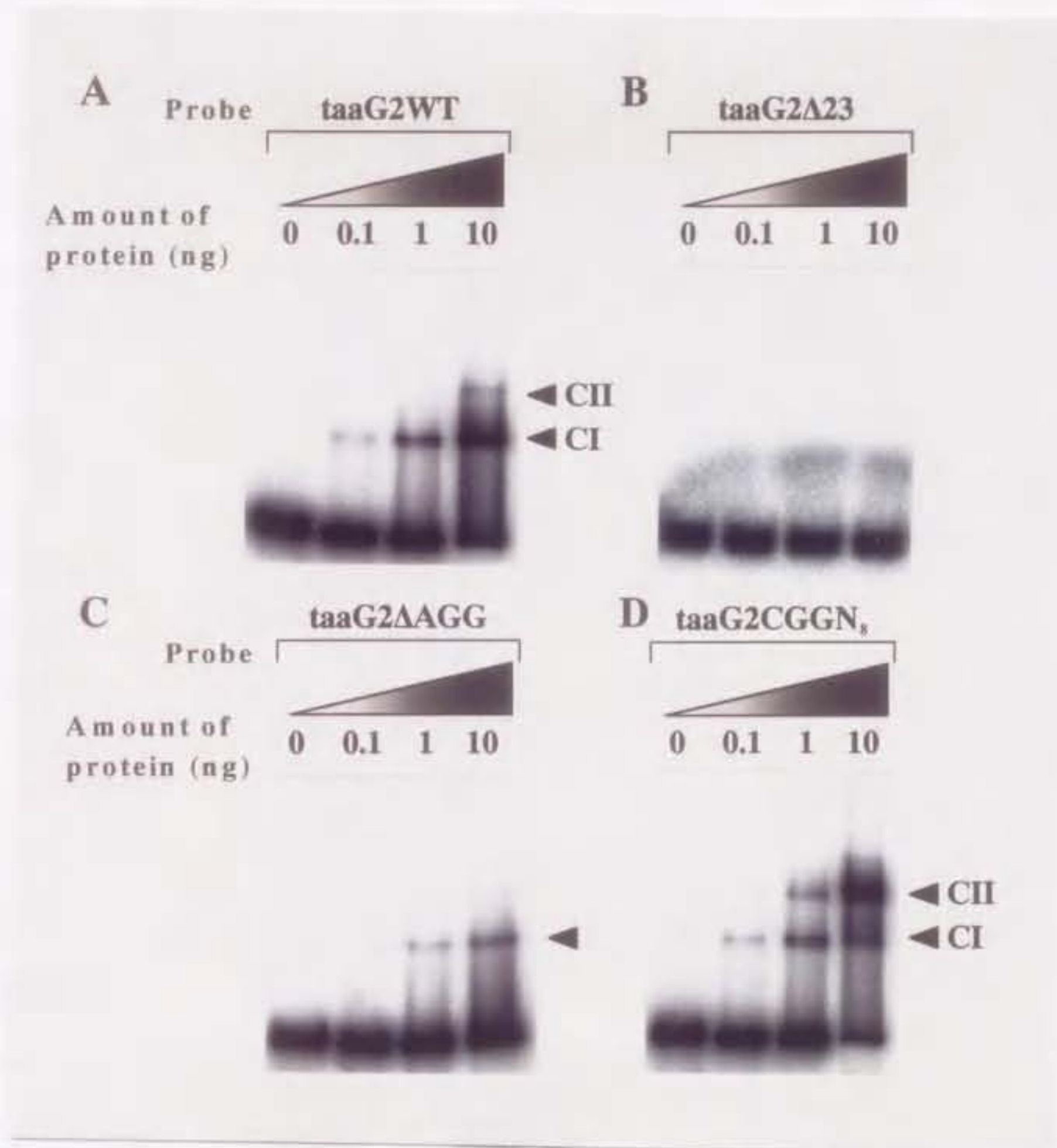


Fig. 16 Gel mobility shift assays with the wild type and mutant *taaG2* promoters.

wild type *taaG2* 断片 (A), 5'-CGG を改変した断片 (B), 3'-AGG を改変した断片 (C), 3' の AGG を CGG に改変し、CGGN₈CGG タイプにした断片 (D) をプローブとした。各図の上部に示した濃度の MalE::AmyR₁₋₄₁₁ を供した。

第三節 AmyR の機能ドメイン解析

2-3-1. 緒言

AmyR は、*aspergilli* のアミラーゼ遺伝子群の正の転写活性化因子である(24, 63, 81)。*A. nidulans* AmyR は 662 アミノ酸からなり、N 末端には Cys₆Zn(II) の DNA 結合モチーフを有す。このモチーフを有す転写活性化因子は、真菌類だけでも 80 種以上単離されている(72)。また、糖質関連酵素の転写活性化因子には、特に Cys₆Zn(II) ドメインを有す因子が多く、近年取得されたキシラナーゼ遺伝子群の転写活性化因子 XlnR もまた、このモチーフを有していた。前節では、AmyR の結合特性に関して解析を行った。本節では、*in vivo* における AmyR の機能解析と機能ドメイン解析を行ったので報告する。

AmyR の大まかな機能ドメインを特定するために、*aspergilli* の三種の AmyR と *S. cerevisiae* MAL63 とのアライメントの結果を参考にした(81)。これに基づき、C 末端欠失 AmyR を作製し、*in vivo* でのアミラーゼ遺伝子発現誘導能への影響を解析した。

A. nidulans は、遺伝学的手法を用いた研究が可能なモデル糸状菌である。これまでに数多くの栄養要求性変異株が単離され、遺伝学的マーカーとして用いられてきただけでなく、転写活性化因子の変異株も多数単離され、その機能解析に貢献してきた(7, 33)。この中で、*malA1* はマルトース資化能欠損変異のマーカー遺伝子として現在も遺伝学的解析に用いられている。*malA1* はマルトースを単一炭素源としたときに著しい生育の低下が認められ、シュークロースを単一炭素源とした際にも生育が遅れることから、当初は α -グルコシダーゼ遺伝子に変異があると考えられていた(67)。しかしその後の研究により、透過酵素に変異があると推測されてきたが、特定されてはいなかった。 $\Delta amyR$ 株はデンプン・マルトースを単一炭素源としたとき、diffused colony を形成した(81)。この表現型は *malA1* において報告されている形質と極めて近似のものである。

本節では、C 末欠損 AmyR を用いた解析から、AmyR の N 末端から 411 アミノ酸までの領域に転写活性化に必須のドメインが位置していることと、411 アミ

ノ酸から C 末端の領域に、デンプン・マルトースからのシグナルを受けるレシーバドメインと転写活性化を阻害するドメインが位置していることが明らかとなった。更に、*malA* が *amyR* と同一の遺伝子であることを明らかにし、*malA* 変異株を用いて AmyR の機能に重要なアミノ酸を特定したので報告する。

2-3-2. 実験材料及び方法

【菌株】

A. nidulans G191 (*pyrG89 pabaA1 ; fwA1 ; uaY9*)

A. nidulans ABPU1 (*pyrG89 biA1 ; wA3 ; argB2 ; pyroA4*)

A. nidulans AT1 : *A. nidulans* ABPU1 の *argB* locus に *taaG2* が導入された株。

A. nidulans FGSC A57 (*yA2;pyroA4;malA1*)

A. nidulans Δ50 (*pyrG89 biA1 ; wA3 ; ΔamyR ::argB ; pyroA4*)

A. nidulans malA11 (*biA1 creAΔ21; areA217; facA303; malA11*)

A. nidulans malA14 (*yA2; pabaA1; creAΔ4; malA14; riboB2*)

A. nidulans malA11, *A. nidulans* malA14 はオーストラリア、アデレード大学の Dr. Kelly, J. M. に贈与していただいた。

Escherichia coli JM109

【使用プラスミド】

pAR2: *Bam* H I - *Pst* I 消化した pUC119 に、*A. nidulans argB* の *Bam* H I - *Pst* I 消化断片を挿入したプラスミド

pAR2_{taa} : pAR2 の *Eco* R I サイトに *taaG2* を挿入したプラスミド

pAR2_{AmyR} : pAR2 *Eco* R I サイトに *amyR* を挿入したプラスミド

pTG1 : 第一章参照

pTGA8AMA : pTG1 の *Eco* R I サイトに *amyR* を挿入した後に、*Cla* I サイトへ pAB4-ARP1 より切り出した AMAI 内 2.8kbp の *Cla* I 断片を挿入したプラスミド

pTGTA : pTG1 の *Eco* R I サイトに *taaG2* を挿入したプラスミド

pUC119

pET15b

pAB4-ARP1 : 自動複製配列 *A. nidulans* AMA 1 及び、*A. nidulans pyrG* をもつプラスミド

pAN8 : pUC119 の *Eco* R I サイトに *amyR* を含む断片を挿入したプラスミド

pAN8arg: *amyR* の内部にある約 2.1kb の *Xho* I フラグメントを、*argB* を含む約 2.7kb の *Bam* H I-*Pst* I フラグメントに置き換え、pUC119 ヘクローニングしたプラスミド

pAN8pyr: *amyR* の内部にある約 2.1 kbp の *Xho* I フラグメントを、*pyr4* を含む約 2.0 kb の *Bsp* H I フラグメントに置き換え、pUC119 ヘクローニングしたプラスミド

pAUR316 : *A. nidulans* の AbA 耐性遺伝子 *aurAR*, 自動複製配列 *A. nidulans* AMA1 を持つプラスミド (TAKARA 社製)

【使用培地】

培地 M46 (pH6.5)	500ml
NaNO ₃	0.425 g
KCl	0.26 g
KH ₂ PO ₄	0.76 g
trace element(金属イオン)	0.75 ml
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.26 g
paba	微量
Arginine	0.263 g
Biotin	5mg
塩酸ピリドキシン	1.25mg
Uridine	0.5g
Methionine	0.25g
Tryptophan	0.25g
Starch or Glucose	5 g
Agar	7 g

他の培地は第一章に準ずる。

【*A. nidulans* の DNA 調整 (rapid method)】

天然培地 100ml (C 源 1%グルコース)で 37 °C、約 20 h 培養後の菌体を吸引濾過して集菌し、更にダスキーパータールに挟んで十分に水分を取り除いた。液体窒素中で、乳鉢と乳棒を用いて菌体を粉碎し、約 200 mg の菌体をエッペンドルフチューブへ入れ、buffer A (0.2M Tris-HCl (pH7.5), 0.5M NaCl, 0.01M EDTA, 1% SDS) を 600 μ l 加えた後に、vortex をかけ、更に 600 μ l のフェノール：クロロフォルム (1:1) 溶液を加えて攪拌後、65 °C で 30 分間インキュベートした。13,000 \times G で、3 分間遠心後、更に上清に等量のフェノールクロロフォルム (1:1) 溶液を加えて室温、13,000 \times G で 3 分間遠心した。この上清を 37 °C で 45 分間 RNase 処理した後に、等量のクロロフォルムを加えて攪拌後、室温、13,000 \times G で 3 分間遠心した。上清に等量のイソプロパノール及び、1/10 量の 3M 酢酸ナトリウム (pH8.0) を加えて、4 °C、13,000 \times G で 15 分間遠心後、70% エタノール溶液で洗浄し、風乾した。TE buffer を加えて、65 °C、3 h インキュベートすることで染色体を溶解した。

【C 末欠損 AmyR の構築】

PCR 法により、目的の位置に、ストップコドン及びその直後に *Bgl* II サイトを挿入した改変 *amyR* を持つプラスミドを 5 種類 (pAN8-Zn0, pAN8-Zn1, pAN8-Zn2, pAN8-Zn3, pAN8-Zn4) 作製した。

まず、pAN8 を template とし、ストップコドンより前とストップコドンより後ろを、それぞれ PCR で増幅した。それぞれの断片をアガロースゲルより電気溶出することで精製後、*Eco*R I 及び *Bgl* II もしくは *Bgl* II 及び *Sph* I 消化し、pET15b を用いてクローニングした。これらのプラスミドを *Bgl* II 及び *Pvu* I 消化したのちに連結することで、ストップコドンが入った約 4.6kbp の各種改変 *amyR* 全長が pET15b に挿入されたプラスミドを構築した。次に、作製したプラスミドの *amyR* の塩基配列を確認した。PCR で導入された変異を取り除くために、適当な制限酵素サイトを用いて、ストップコドンを含む断片を pAN8 内の相当断片と交換し、改変 *amyR* を持つプラスミド (pAN8-Zn0, pAN8-Zn1, pAN8-Zn2, pAN8-Zn3, pAN8-Zn4) を構築した。

(用いたプライマー)

AmyPst-1 : CAAGATCTTATTACTCTGCAGAGAATCGTG
AmyPst-2 : TAAGATCTTGCAGAGCCTACGAGCTA
AmyBam-1 : CAAGATCTTATTAATGCGAAGGATCCGCGA
AmyBam-2 : TAAGATCTTGAGAACTCATCAATGTCCG
AmyXho-1 : TTAGATCTTATTACTCGAGCGAGATCGGTT
AmyXho-2 : TAAGATCTAATCCAAAAGGTTGATATCCT
AmySal-1 : GGAGATCTTATTAGTCGACGGTTGACTCGG
AmySal-2 : TAAGATCTCCTCTGGGGTATCCTTTC
AmyNco-1 : CAAGATCTTATTACCATGGTCCAGAGATAT
AmyNco-2 : TAAGATCTTGACAATACTATGGATTCTA
M4 : GTTTTCCCAGTCACGAC
RV : CAGGAAACAGCTATGAC

(反応条件)

template DNA である pAN8 1ng/μl を 1 μl、premix.Ex.Taq (TAKARA) を 25 μl、100mM primer をそれぞれ 2 μl を混合し、合計 50 μl にして PCR を行った。(例. pAN8-Zn0 の作成用には、AmyPst-1 と M4 及び AmyPst-2 と RV の組み合わせで PCR を行った。) 変性反応を 95 °C 1 min. アニール反応を 51 °C 1min, 伸長反応を 72 °C 3min とし、25 サイクル反応させた後に、72°C 10min で更に伸長反応させた。

(改変 amyR の塩基配列決定)

Sanger らのダイデオキシリボヌクレオチド法に従い、Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit を用いて行った。

(用いたプライマー)

amy seq-promoter IRD800-TAGCTATGCTCTCGGCACCATGAG
amy seq-1 IRD800-GTCATATCGTTCGCCTTTG

amy seq-2 IRD800-CATATCCAGCTGAAACTCGACG

amy seq-3 IRD800-GACGGTCCTCCCGTTCCATC

M13reverse

M13forward

【*A. nidulans* 改変 *amyR* 株の取得】

$\Delta 50$ を宿主として、五種類の改変 *amyR* を含むプラスミド (pAN8-Zn0, pAN8-Zn1, pAN8-Zn2, pAN8-Zn3, pAN8-Zn4)より調整した *EcoRI* 断片 (4.6kb)を、pAB4-ARP1 と co-transformation した。得られた transformants を $\Delta 50Zn0$, $\Delta 50Zn1$, $\Delta 50Zn2$, $\Delta 50Zn3$, $\Delta 50Zn4$ とした。なお、ここでの選択マーカーには得られた pAB4-ARP1 に乗っている *pyrG* を用いた。ウリジンを加えた培地を用いて transformant の継代を数回繰り返すことにより、染色体外プラスミドである pAB4-ARP1 を脱落させた。

【Sexual Cross】

栄養要求性ならびに分生子色の異なる二種の親株を、M46 プレート上、1 cm 間隔で隣り合わせに植菌した。37°Cで3日培養後、コロニーが接触している境界領域を2-3 mm 角で切り取り、直径5 cm のシャーレに移植した。37°Cで1昼夜培養後、ビニールテープを用いてシャーレを密閉し、cleistothecia の形成を促した。さらに、37°Cで10-14日培養後、二種の親株の混合領域に形成された cleistothecia を柄付き針を用いて取得し、4%寒天プレート上で菌糸および胞子を除去した。この cleistothecia を0.01% Tween 80, 0.09% NaCl 溶液中で柄付き針を用いて破碎して接合孢子懸濁液を取得し、M46 プレートにプレーティングした。progeny 集合から、目的の単一コロニーを選択した。

【MA1、MA2 の取得】

FGSC A57 (Genotype: *yA2*;*pyroA4*;*malA1*, Linkage groups:IR;IVR;VIIR)
ABPU1 (Genotype : *pyrG89* *biA1* ; *wA3* ; *argB2* ; *pyroA4*, Linkage groups: IR I;II;III;IV)を親株とし、上記 Sexual Cross を行い、MA1、MA2 を取得した。

・ MA1

Genotype: biA1;argB2;pyroA4;malA1

Linkage groups: I;III;IV;VII

・ MA2

Genotype: yA2;argB2;pyroA4;malA1

Linkage groups: I;III;IV;VII

【*A. nidulans* MATA12 及び *A. nidulans* ABTA16 の取得】

A. nidulans MA1 及び *A. nidulans* ABPU1 に *EcoR* V で 1cut した pAR2TA を導入した。*EcoR* V サイトは pAR2TA のマーカー遺伝子である *argB* 中に存在する。*EcoR* V で 1cut しておくことにより、*argB* locus で homologous recombination が起こったときにのみアルギニン要求性が相補されると考えられるため、*taaG2* は *argB* locus へ、1 コピーで導入されることになる。transformants の中から、サザンハイブリダイゼーションによって *argB* locus へ 1 コピーで *taaG2* が導入されたものを選択した。

【*A. nidulans* Δ 50 と *A. nidulans* MA1 の交雑実験】

上記 sexual cross の方法に従い、 Δ 50 と MA1 由来の cleistothecia を形成させた。cleistothecia を顕微鏡下で破碎し調製した胞子懸濁液は、C 源 1%starch の M46 plate 及び、C 源 1%glucose の M46 plate に plating した。それぞれ全体で 10 万個の progeny について調べた

【*A. nidulans* MA1 の *amyR* 相補実験】

A. nidulans MA1 を pAR2AmyR で形質転換した。形質転換の方法は第一章に準ずる。

【PCR による *A. nidulans* MA2 株の *amyR* 遺伝子の増幅】

(用いたオリゴヌクレオチド)

Amy-promoter5': CCGGAATTCCACTCCAGTCTCCAGCCTT

Amy-stop3' : CTGGGTACCCGTGGTGGAGCCAGTCCAG

(PCR 反応条件)

template DNA は *A. nidulans* MA2 株のクロモソーム DNA を用いた。100ng/ μ l template DNA を 1 μ l, premix.Ex.Taq(TAKARA)を 25 μ l, 100mM primer それぞれ 2 μ l を混合し、合計 50 μ l にして PCR 反応を行った。変性反応を 95 °C 1min, アニール反応を 55 °C 1min, 伸長反応を 72 °C 3min とし、25 サイクル反応させた後に、72 °C 10min で更に伸長反応させた。

【PCR 産物のクローニング】

PCR より増幅された 3kb の DNA 断片を 0.7% agarose gel により電気泳動、電気溶出し回収後、プライマーの末端に設計した *EcoR* I 及び *Kpn* I で消化し、pUC119 へ挿入した。

【*m alA*1 変異株の *amyR* サブクローニング】

A. nidulans MA2 株の染色体 DNA を template とし、4 種のプライマー (Amy2-RV と AmyXho-1, 5'-EcoAmy と AmyPst-1) を用いて、*amyR* を二分して増幅した。増幅された DNA 断片を 2% agarose gel により電気泳動、電気溶出し回収後、プライマーの末端に設計した *Bgl* II と *EcoR* I で消化した後に、pUC118, pUC119 へ挿入した。

(用いたプライマー)

Amy2-RV : TAAGATCTCATGCTCCGCAACTC

5'-EcoAmy : GGGAATTCCATGGCCTCACCAGCCGCTCCG

AmyPst-1 : 本節前述。

AmyXho-1 : 本節前述。

【*m alA* 11, *m alA* 14 変異株の *amyR* 遺伝子のクローニング】

A. nidulans m alA 11, 及び *m alA* 14 変異株から染色体 DNA を抽出した。この染色体を *EcoR* I-*Hind* III で完全分解した。*amyR* は二種の制限酵素で完全分解

されると 3.7 kbp になる。*amyR* の転写開始点を+1 として、-1,320 までの 5'非翻訳領域を含む。分解された DNA を 0.7%アガロースゲルを用いたスラブ電気泳動に供し、3.0~6.0 kbp 付近のゲルを切り出し、電気溶出した。得られた断片を pUC119 *EcoR* I-*Hind* III サイトにクローニングし、塩基配列の決定に用いた。

【*malA* 1 変異株の *amyR* 塩基配列決定】

PCR 産物及び、pUC119、pUC118 へサブクローニングした断片の塩基配列を決定した。第二章第一節記述の方法と本節記述の *amyR* シークエンスプライマーを用いて行った。

【アミラーゼ活性測定】

第一章に準ずる。

2-3-3. 結果

【C末端欠損 AmyR を用いた AmyR の機能ドメイン解析】

A. nidulans AmyR の機能ドメイン解析を行うに当たり、*aspergilli* の三種の AmyR と *S. cerevisiae* MAL63p とを CLASTALW を用いてアライメントした結果を基に、C末端欠損 AmyR の構築を行った。比較した四種の転写因子間で、アミノ酸の保存性が見いだされなかった C末端領域と各相同領域 (Zn, MH1, MH2, MH3, MH4) を順次欠失し、各領域の機能を解析することを試みた。C末端欠損 AmyR を発現するに当たり、目的の位置に PCR によりストップコドンを導入し、五種類の改変 *amyR* を含むプラスミド (pAN8Zn0, pAN8Zn1, pAN8Zn2, pAN8Zn3, pAN8Zn4) を構築した。これらの改変 *amyR* を含む約 4.6 kbp の *EcoR* I 断片 5 種類を、それぞれ *pyrG* を有す pAB4-ARP1 とともに *amyR* 遺伝子破壊株である *A. nidulans* $\Delta 50$ 株へ導入し、5 種類の改変 AmyR 株 ($\Delta 50\text{Zn}0: 1\sim 85$, $\Delta 50\text{Zn}1: 1\sim 224$, $\Delta 50\text{Zn}2: 1\sim 411$, $\Delta 50\text{Zn}3: 1\sim 514$, $\Delta 50\text{Zn}4: 1\sim 588$) を取得した (Fig. 17)。 $\Delta 50$ 株の *amyR* はプロモーター領域と構造遺伝子の約半分を含む領域が *argB* と置換されているため、形質転換により *amyR* locus で相同組み換えを起こすとアルギニン要求性になったことを指標に構築断片が *amyR* locus へ導入された株を選択できる。

得られた transformants ($\Delta 50\text{Zn}0$, $\Delta 50\text{Zn}1$, $\Delta 50\text{Zn}2$, $\Delta 50\text{Zn}3$, $\Delta 50\text{Zn}4$) についてデンプン及びグルコースを単一炭素源としたときの生育を調べた。デンプンを単一炭素源とした際、 $\Delta 50\text{Zn}0$ 及び $\Delta 50\text{Zn}1$ に関しては、いずれの形質転換体も親株である $\Delta 50$ と同様の diffused colony を形成したのに対し、 $\Delta 50\text{Zn}2$, $\Delta 50\text{Zn}3$, $\Delta 50\text{Zn}4$ においては、11.7%、8.45%、8.80%の確率で WT と同様の生育を示す株が出現した (Fig. 18, 19)。取得した形質転換株のすべてについてアルギニン要求性を調べたところ、 $\Delta 50\text{Zn}2$ の形質転換株のみがアルギニン要求性を示した。これより、 $\Delta 50\text{Zn}3$, $\Delta 50\text{Zn}4$ においては *amyR* とは異なる locus へ導入されたと推測される。

$\Delta 50\text{Zn}2$, $\Delta 50\text{Zn}3$, $\Delta 50\text{Zn}4$ において WT と同様の生育を示す株の出現頻度は 10%前後にほぼ揃った。この値は、改変 *amyR* 断片が選択マーカーに用いた *pyrG*

を有する pAB4-ARP1 と共に、 $\Delta 50$ 株へ導入された形質転換効率を示している。同様に、 $\Delta 50Zn0$, $\Delta 50Zn1$ においても 10%前後で形質転換が起こったと考えられる。よって、 $\Delta 50Zn0$ 及び $\Delta 50Zn1$ に関して、デンプンを単一炭素源とする培地で全ての形質転換体が *diffused colony* を形成するという現象は、AmyR-Zn0 及び AmyR-Zn1 が転写活性化能を完全に欠失しているためであると考えられる。また、 $\Delta 50Zn2$, $\Delta 50Zn3$, $\Delta 50Zn4$ において一定の比率で相補されたことは、AmyR-Zn2, AmyR-Zn3, AmyR-Zn4 が転写活性化能を有している事に起因すると推測される。すなわち、少なくとも N 末端から MH2 ドメイン(411 アミノ酸)までをもつ改変 AmyR は転写活性化能を有していることが示唆された。

【 $\Delta 50Zn2$ のアミラーゼ誘導生産能】

デンプン・マルトースを単一炭素源としたとき、WT と同様の生育を示した $\Delta 50Zn2$, $\Delta 50Zn3$, $\Delta 50Zn4$ のうち、最も欠失部分の大きい $\Delta 50Zn2$ 株におけるアミラーゼ誘導生産能を測定し、AmyR-Zn2 の機能を解析した。アミラーゼの活性測定にはサザンハイブリダイゼーションによって pAN8Zn2 の *EcoRI* 断片が *amyR* locus に 1 コピー導入されていることを確認した複数の形質転換株を用いた。

$\Delta 50$ のアミラーゼ活性は、誘導条件、非誘導条件いずれにおいても検出感度以下であった。これに対し $\Delta 50Zn2$ は、構成的かつ高いアミラーゼ生産能を示した。誘導条件下では WT の誘導条件下に対して約 3 倍の活性上昇を示し、非誘導条件下では WT の誘導条件下に対して 2.2 倍、WT の非誘導条件下に対しては 15 倍の活性上昇を示した (Fig. 20)

$\Delta 50Zn2$ で見られる、アミラーゼ生産能の回復はデンプン培地上での生育の回復と一致しており、N 末端から MH2 ドメインまでを含む領域で転写活性化には充分であることが明らかとなった。アミラーゼの発現様式が構成的であったことから、AMYR-Zn2 が誘導条件下及び非誘導条件下で常に活性化型として存在し、機能することが明らかとなった。また $\Delta 50Zn2$ が野生株よりも高いアミラーゼ活性を有していた事より、MH3, MH4 には、誘導剤へ応答し転写活性化を抑制する機能があることが示唆された。

【*A. nidulans* MA1 株と *A. nidulans* $\Delta 50$ 株の生育の比較】

A. nidulans MA1 株は、マルトースを単一炭素源とした培地で著しい生育の低下を示す株として遺伝学的に広く用いられてきた。しかしながら、その原因遺伝子 (*malA*) は、 α -グルコシダーゼかマルトースパーミエースであると想定されてきたが、同定されていなかった。転写活性化因子に変異が導入された場合にも同様の表現型となりうることから、*malA* と *amyR* が同一であるかどうか検証した。

デンプン・マルトース・グルコースを単一炭素源とした培地で、*malA1* 変異株である *A. nidulans* MA1 株と $\Delta amyR$ である *A. nidulans* $\Delta 50$ 株の生育を比較した。MA1 はグルコース培地では非常に良い菌糸の伸長と胞子形成が観察されたが、デンプン及びマルトース培地では $\Delta 50$ 株と同様に *diffused colony* を形成した (Fig. 21)。

【*malA* 1 株のアミラーゼ誘導生産能】

malA 1 変異株である *A. nidulans* MA1 株のアミラーゼ活性を測定した。ただし、MA1 株は *taaG2* 非導入株であるので、培養上清を 10 倍濃縮したものをを用いて活性測定を行った。MA1 株のアミラーゼ活性は誘導条件及び非誘導条件で検出感度以下であった。

A. nidulans ABPU1 株及び *A. nidulans* MA1 株の *argB* locus に 1 コピーで *taaG2* を導入して得られた形質転換株、*A. nidulans* ABTA16 株と *A. nidulans* MATA12 株のアミラーゼ活性を測定した。MATA12 株のアミラーゼ活性は、誘導条件下において WT である ABTA16 株の約 1/60 に低下し、非誘導条件下でも WT の 1/3 に低下していた (Fig. 22)。これより、*malA* 1 株におけるアミラーゼ誘導生産能は欠失していることが明らかとなった。なお、ABTA16 株及び MATA12 株の *argB* locus に *taaG2* が 1 コピーで導入されていることはサザンハイブリダイゼーションによって確認した。

以上の解析より、比較した変異株の表現型が類似していたことから、*malA* 1 株に *amyR* を導入し、その形質を相補するか解析した。

【*malA* 1 株の *amyR* による相補実験】

malA 1 変異株である *A. nidulans* MA1 株に pAR2AmyR を用いて *amyR* を導入し、デンプン・マルトースを単一炭素源としたときの菌糸の伸長と胞子形成能を解析した。また、同時に $\Delta amyR$ である *A. nidulans* $\Delta 50$ にも pTGA8AMA を用いて *amyR* を導入し、形質が相補されるかどうかを解析した。デンプン・マルトース及びグルコースを単一炭素源とした培地上で、MA1, MA1+*amyR*, $\Delta 50$, $\Delta 50$ +*amyR* の生育を比較したところ、MA1+*amyR* 及び $\Delta 50$ +*amyR* は、WT と同様の表現型を示した (Fig. 23)。すなわち、MA1 は $\Delta 50$ と同様に *amyR* で相補された。これより、*malA* が *amyR* である可能性が強く示唆された。

【*A. nidulans* MA1 と *A. nidulans* $\Delta 50$ の交雑実験】

malA 1 の変異が *amyR* に起因するのかどうかを調べるために、*A. nidulans* MA1 株と *A. nidulans* $\Delta 50$ 株を接合させた。

sexual cross の方法に従い、 $\Delta 50$ (親株 A) と MA1 (親株 B) 由来の cleistothecia を形成させた。cleistothecia を破碎して調整した胞子懸濁液を、炭素源 1% デンプンの M46 plate 及び、炭素源 1% グルコースの M46 plate に植菌した。デンプン培地、グルコース培地で、それぞれ total 10 万個の progeny (cleistothecia 中に含まれる交雑によってできた子孫) について調べた。グルコース培地上の全てのコロニーは菌糸の伸長・胞子形成能共に良好であったのに対し、デンプン培地上では diffused colony を形成するものしか出現せず、WT と同様の表現系を示すものは存在しなかった。この表現型は親株である $\Delta 50$ 及び MA1 株と同一であり、progeny の中に、WT と同様の生育を示す株がなかったことから、*malA* が *amyR* である事が示された。

【*A. nidulans* MA2 株における *amyR* の塩基配列決定】

malA 1 の変異が *amyR* にあることを確かめるために、*A. nidulans* MA2 株の染色体より *amyR* を PCR によって増幅し、PCR 産物を精製したものを直接、塩基配列決定に用いた。更に、PCR 産物を pUC ベクターでクローニングした複数のクローンに関しても塩基配列を決定した。

-864 ~ 2,129 の領域の塩基配列を解読し、*A. nidulans* MA2 株の有する *amyR* は、1,483 塩基目の A が T に置換していることが明らかとなり、その結果 478 番目の His (CAT) が Leu (CTT) へ改変していたことが明らかとなった (Fig. 10, 24)。塩基配列を解読していない領域の改変が、*amyR* mRNA の発現と安定性に影響を及ぼす可能性に関して解析するために、MA1 株から total RNA を調製しノーザンブロットング解析を行った。MA1 における *amyR* mRNA 量は WT と同等で、*amyR* mRNA の発現及び安定性に影響を及ぼす変異は無いことが明らかとなった。従って、一塩基置換によって引き起こされた His478Leu の変異が、*malA1* 変異の要因であるといえる。加えてこのノーザンブロットング解析の結果は、*amyR* の発現は *amyR* 自身によっては制御されていないことを示している。*amyR* プロモーター領域には AmyR 結合配列が存在するが (Fig. 9)、rAmyR がその領域には結合しなかったことと上述の結果とを合わせると、この配列は *amyR* の発現には関与していないといえる。

【*A. nidulans malA11*, *A. nidulans malA14* における *amyR* の塩基配列決定】

A. nidulans malA11, *A. nidulans malA14* は MA1 株同様にデンプン・マルトース培地上で著しく生育の低下する株として単離された。*amyR* 遺伝子内の変位点を同定するために、各変異株から染色体を抽出し、*amyR* をクローニング後、MA1 株同様に、-864 ~ 2,129 の領域の塩基配列を解読した。*A. nidulans malA11* の有する *amyR* は 80 塩基目の C が T に置換しており、27 残基目の Ser (TCA) が Lue (TTA) へ改変していた (Fig. 24)。*A. nidulans malA14* の *amyR* は 1182 塩基目に G が挿入されており、378 残基以降のアミノ酸がフレームシフトを引き起こし、KRKRRWK 配列付加後にストップコドンが出現していた (Fig. 24)。この改変により AmyR が機能しなくなったと推測される。

2-3-4. 考察

アミラーゼ誘導発現に関わる転写活性化因子 *A. nidulans* AMYR は 662 アミノ酸からなり、Cys₆Zn(II)タイプの DNA 結合モチーフを有していた。*S. cerevisiae* においてマルトース資化に関わる遺伝子を正に制御する因子 Mal63p と AmyR とをアライメントした結果、相同性の高い 5 つの領域を割り出すことができた。{1. Zn: 13~54 (Zinc finger domain), 2. MH1: 152~214 (Mal63 Homology 1), 3. MH2: 234~375, 4. MH3: 419~496, 5. MH4: 516~542} 本研究ではこの相同領域に基づき、AmyR の機能ドメインについて解析を *in vivo* において行った。

【DNA 結合ドメイン; Cys₆Zn(II)】

malA11 変異株は、Cys₆Zn(II)ドメインに変異を有していたために、AmyR が機能を失ったと推測される。第一に *in vivo* におけるタンパク質の安定性を解析する必要があるが、現時点で推測される Cys₆Zn(II)ドメインの機能を考察する。

Ser27Leu の改変は、Cys₆Zn(II)ドメイン内の三番目の Cys の直後で起きている。Cys₆Zn(II)ドメイン内の二番目と三番目の Cys に挟まれるアミノ酸は塩基性アミノ酸に富み、認識配列との相互作用に非常に重要な役割を担うとされている。この領域でのアミノ酸置換が立体構造の変化を引き起こし、認識配列に結合できなくなったと推測する。

Cys₆Zn(II)ドメインの役割は、認識配列への特異的結合だけではない。Cys₆Zn(II)ドメインを有す因子 *S. cerevisiae* HAP1 から、Cys₆Zn(II)ドメイン内で S63R に置換した変異株が取得された。HAP1-PC7 (S63R)は、野生型の HAP1 と同等の結合特性を有していたが、*in vivo* での転写活性化能は有していなかった(48)。野生型と HAP1-PC7 (S63R)の認識配列上での立体構造解析を行った結果、その構造は大きく異なることが示された。DNA に結合するだけではなく DNA とコンプレックス形成後の立体構造が重要であり、それに Cys₆Zn(II)ドメインも関与していると推測されている。*in vitro* での AmyR-S27L の結合特性の解析が待たれる。

また、Cys₆Zn(II)ドメインが核移行シグナルとして機能することが推測される。典型的な NLS のモチーフとして、PKKKRKV のような塩基性アミノ酸クラスターからなる single basic NLS、KRPAATKKAGQAKKKK のような二つのアミノ

酸クラスターからなる bipartite basic NLS が報告されており、多様な NLS の存在が明らかとなってきた(1, 54)。Cys₆Zn(II)ドメイン内には一般に塩基性アミノ酸が多く、GAL4 でも Cys₆Zn(II)ドメインを含む 1~74 が NLS であると言われている(75)。AMYR に関しても、典型的な NLS のモチーフに当てはまる、RRRK (20~23)という塩基性アミノ酸クラスターが Cys₆Zn(II)ドメインに存在している。また、Cys₆Zn(II)ドメイン及びその直前は塩基性アミノ酸が多く存在することから、N 末に NLS の役割がある可能性が高い。AmyR の局在に関する Cys₆Zn(II)ドメインの機能も視野に入れる必要がある。

【転写活性化ドメイン】

改変 AmyR を導入した $\Delta 50\text{Zn}0\text{-}\Delta 50\text{Zn}4$ について、デンプンを単一炭素源としたときの孢子形成能を解析したところ、N 末端から MH2 以降を含む AMYR-Zn2, AMYR-Zn3, AMYR-Zn4 はいずれも転写活性化能を有していた。一方、MH2 ドメインを欠失した AMYR-Zn0 と AMYR-Zn1 は転写活性化能を欠失していた (Fig. 18, 19)。これより、AmyR の転写活性化に必須の領域は MH2 より N 末端側にあることが明らかとなった。

Hu, Z らは、Mal63p は 284 番目のアミノ酸以降の C 末端領域を欠失させても転写活性化能を有する(23)という結果に基づき、詳細な部分欠失による機能解析を行った(30)。これより Mal63p の転写活性化ドメインは 60~283 にあることが明らかとなり、この領域は AmyR の MH1 及び MH2 に相当し、本研究で得られた結果と一致した。

一般に転写活性化ドメインは negative charge を帯びた領域であり、Cys₆Zn(II)タイプの転写因子で位置が特定されているものについては C 末端付近に存在することが知られている(72)。しかし、AmyR と相同性の高い MAL63p にはこの特徴は当てはまらないとされている(30)。Hu, Z らは、MAL63p の中央部にあたる 60~283 を転写活性化ドメインとしているが、この領域はさほど negative charge を帯びた領域ではない。転写活性化ドメインとして機能する他の例として、Phe をコアとした疎水性残基の集まり、もしくはそれとあわせた酸性アミノ酸からなるドメインが、GCN4 や NF- κ B のサブユニット RelA において転写活性化ドメ

インとして機能する事が挙げられる(5, 17, 65)。この例にならうと Mal63p の 114~243 内に 6 箇所の転写活性化サブドメインがあると Hu, Zらは述べている。114~243 をアライメントの結果に当てはめると、MH1 の後半から MH2 の中央に相当する。こうしたアミノ酸配列から予測される転写活性化ドメインの位置は、MH2 よりも N 末側 (~376) が転写活性化に必須の領域である、という C 末欠損改変 AMYR の解析結果に一致する(Fig. 18, 19)。

主に機能を発揮しているのは C 末端領域であるものの、転写活性化ドメインが点在しているという例が、アセトアミド資化を制御している *A. nidulans amdR* で報告されている(92)。Gal4 も C 末端側に加えて N 末端側に転写活性化ドメインを有する事が報告されている(50)。MAL63p には C 末端に 4 つの酸性アミノ酸クラスターがあり、転写活性化ドメインとして補助的に機能している可能性がある。AMYR には酸性アミノ酸クラスターは見いだされないものの、MH3 や C 末端側が補助的な転写活性化ドメインを有す可能性がある。

【MH3~C 末端の役割】

改変 AMYR を導入した形質転換株の孢子形成能及びアミラーゼ生産能の解析より、MH3~C 末端には転写活性化に必須の領域はないことが明らかとなった。また、MH3~C 末端を欠失した AMYR-Zn² が、誘導条件下及び非誘導条件下で常に活性型として機能していることから MH3~C 末端にはシグナルに対して応答する役割があることと、WT よりも高いアミラーゼ生産能を示したことより、MH3~C 末端には転写活性化を抑制する役割があることが示唆された (Fig. 20)。

マルトース資化遺伝子群において、constitutive mutant の有する変異が Mal63p の 343~375 でクラスターをなしていることから、343~375 が Mal63p の negative regulatory domain であるとされている(23)。この領域は AmyR の MH3 内に相当する。一方、Hu, Zらは、Mal63p が 251~299 の欠失によって constitutive activator になるのに対し、欠失箇所を約 50 アミノ酸残基ずつ C 末側へずらす ($\Delta 302\sim 349$, $\Delta 352\sim 399$, $\Delta 402\sim 459$) もしくは C 末端欠失 ($\Delta 457\sim 470$) をおこなっても、constitutive activator にならずに活性化能を完全に消失することから、251~299 を negative regulatory domain, 300~470 をマル

トースに応答して negative regulatory domain の効果を取り除くドメインと主張している。しかし 251~299 は MH2 内に位置し、constitutive activator となった AMYR-Zn² は MAL63p に対応すると 318 アミノ酸までを有している。MAL63p の internal deletion により、MAL63p の転写活性化ドメインと negative regulatory domain が近接しすぎたために抑制効果を発揮しなかった可能性が推測される。立体構造も視野に入れ、AmyR の negative regulatory domain の解析を行う必要がある。

Gal4 には Gal80 という specific negative regulator が存在する。Gal4 は Gal80 と常に相互作用しており、非誘導条件下では転写活性化ドメインが Gal80 により masking されている。誘導条件下では Gal80 による masking がはずれることにより活性化型となる。Gal4 を過剰発現させると、Gal4 に対する Gal80 の量が不足するために、Gal4 は constitutive activator になる(34)。一方、Mal63p を過剰発現させても Gal4 のように constitutive activator にはならない。また、これまでに取得されている constitutive mutant がすべて activator (Malx3) に変異を有することからも、Mal63p には特異的な negative regulator は存在しないと考えられている(30)。Genetix Mac で homology search した結果及び自らの目で相同領域を探索した結果からは、AMYR 及び Mal63p には、Gal4 のもつ Gal80 との相互作用ドメインに類似の配列はみられなかった。AMYR と相同性の高い Mal63p での報告から推察すると、AMYR には特異的な negative regulator は存在しないと考えられ、negative regulatory domain が Gal80 のような機能を持つ可能性がある。

His478 は *A. nidulans*, *A. oryzae*, *A. niger* の AMYR で保存されているアミノ酸であり、*Saccharomyces cerevisiae* の MAL63p においても保存されている。また、His478 は Fig. 10 で定義した MH3 ドメインの C 末側に存在しており、その周辺における AmyR と MAL63p の相同性は高い。His478Leu という一アミノ酸置換が AmyR 機能に劇的な影響を与えたことから、MH3 内の 478 付近がデンプン・マルトースからのシグナルレシーバードメインとして機能する可能性が考えられる。

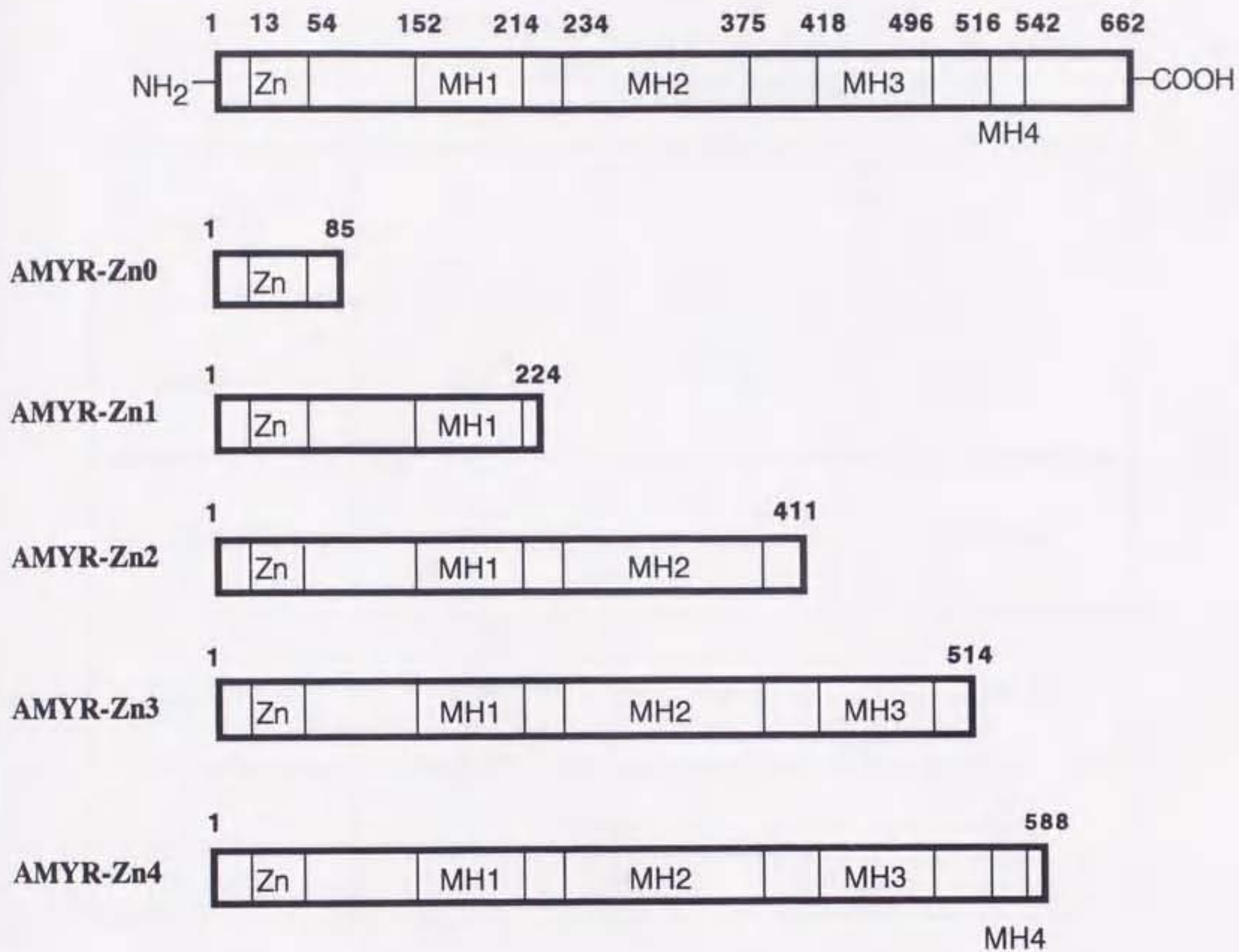


Fig. 17 改変AMYR株の概略図

各推定ドメイン (Zn: zinc finger domain, MH1: MAL63 homology 1, MH2: MAL63 homology 2, MH3: MAL63 homology 3, MH4: MAL63 homology 4) と、そのアミノ酸配列の位置及び、改変AMYRの長さを示した。

	取得形質転換株数 (株)	starch plate で胞 子形成能を有する 形質転換株数 (株)	co- transformation 効率 (%)
Δ50Zn0	1719	0	ND
Δ50Zn1	807	0	ND
Δ50Zn2	1262	148	11.7 %
Δ50Zn3	804	68	8.45 %
Δ50Zn4	534	47	8.80%

Fig. 18 改変AMYR株の胞子形成能と co-transformation 効率の比較。

Δ50にpAN8Zn0 ~ pAN8Zn4の断片を導入して得られた形質転換株の集団をそれぞれ、Δ50Zn0 ~ Δ50Zn4と示した。それぞれの集団について、得られた形質転換株の全体数、形質転換株の中でデンプンを単一炭素源としたときにWTと同様の胞子形成能を示した株数、これらより割り出したco-transformationの効率を示した。

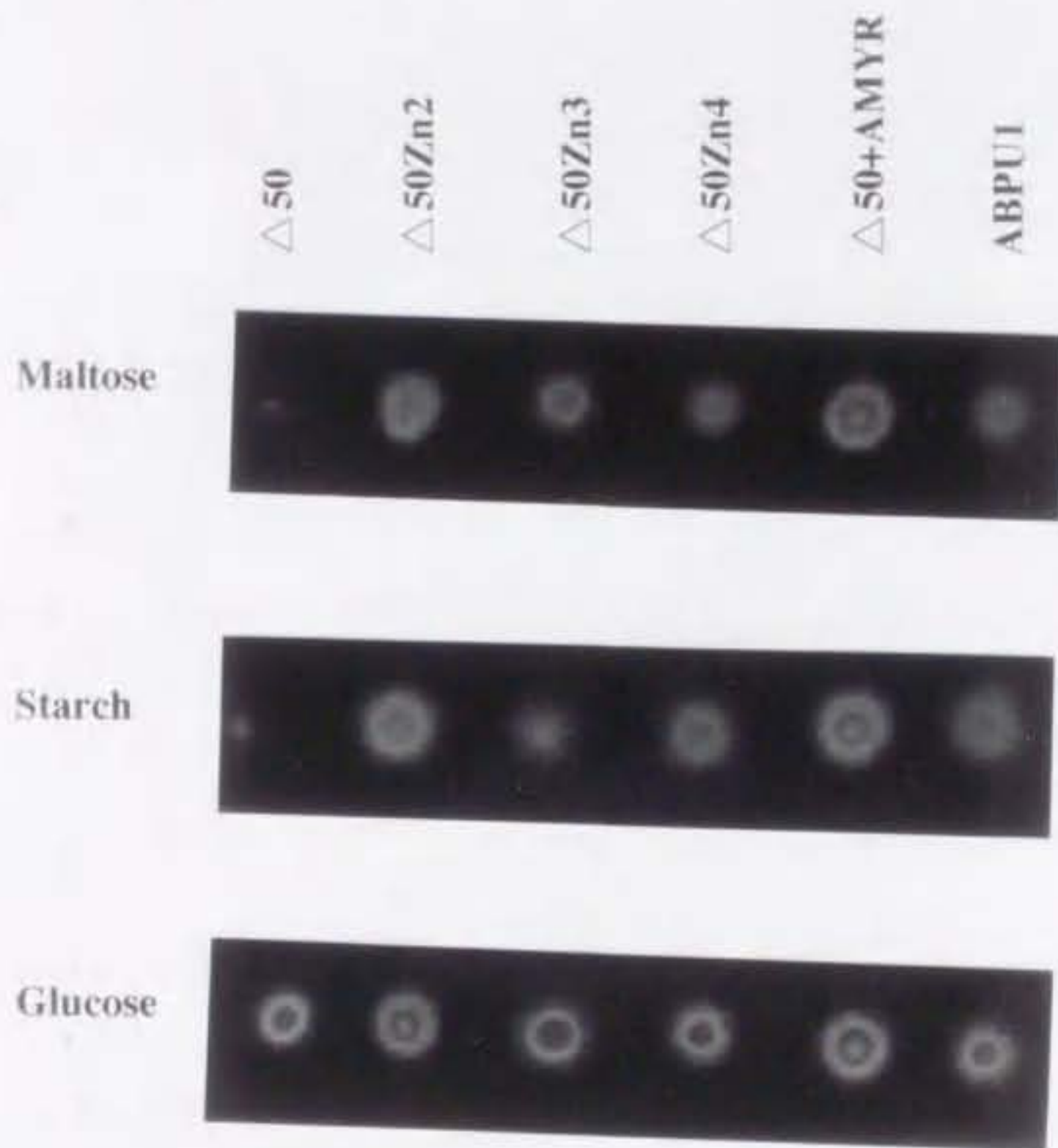


Fig. 19 種々の C 末端欠失 AmyR を用いた転写活性化ドメインの特定。

種々の C 末端欠失 AmyR は Fig. 17 に示した。amyR 破壊株である Δ50 株において、各 C 末端欠失 AmyR を発現し、2% maltose, 2% starch, 2% glucose を単一炭素源とした培地上での生育を比較した。

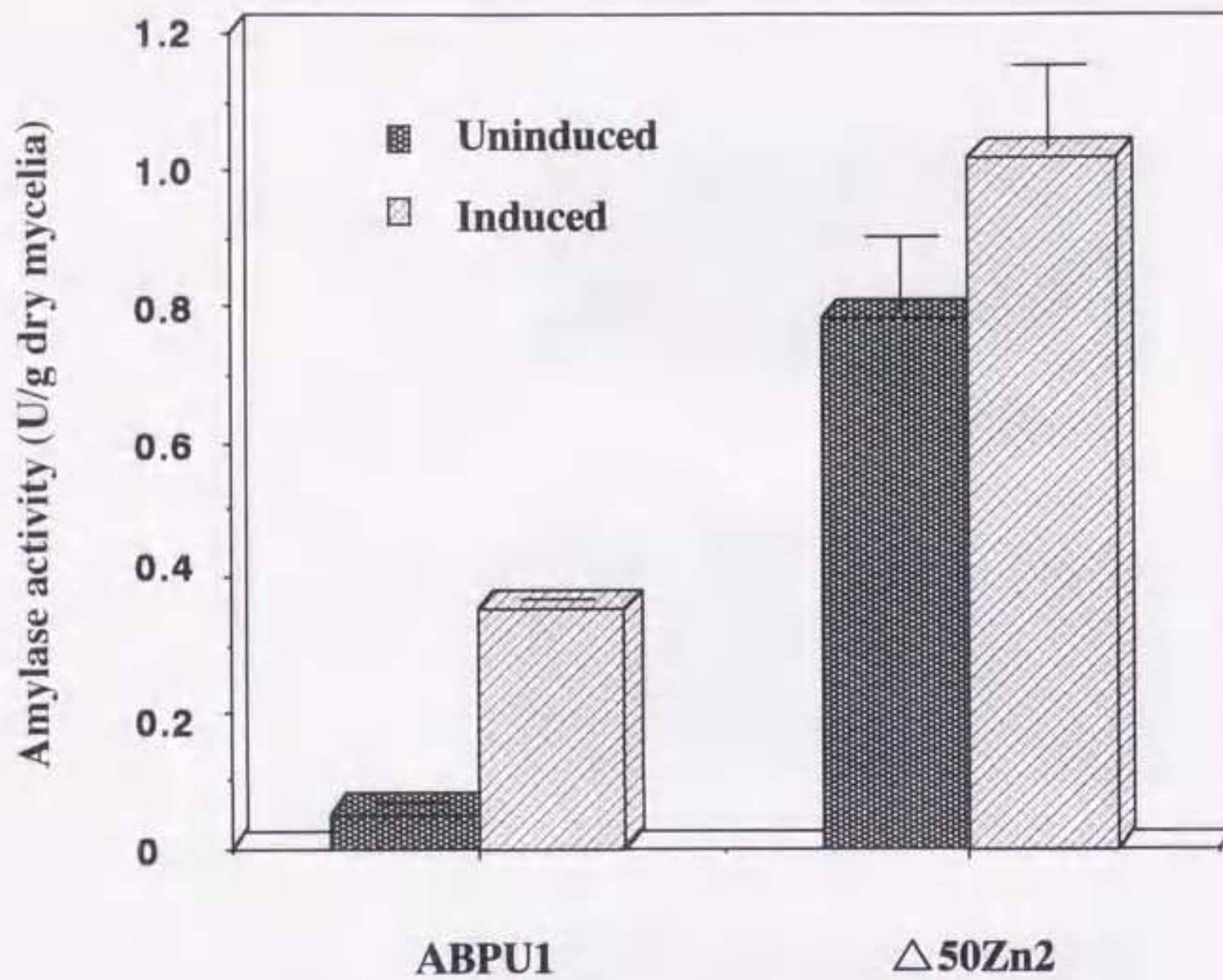


Fig. 20 Δ50Zn2 におけるアミラーゼ誘導生産能。

アミラーゼ活性の測定はsomogyi-nelson法に従って行い、1 unit (U) は、1 分間に 1 μmole のグルコースに相当する還元末端を生成する酵素量とした。誘導条件 (C源: 2% Glycerol, 2% Starch), 非誘導条件 (C源: 2% Glycerol) で 37 °C、36 時間培養した培養上清を酵素液とした。なお、改変 AMYR 株のアミラーゼ活性については、各形質転換株の平均値を示した。

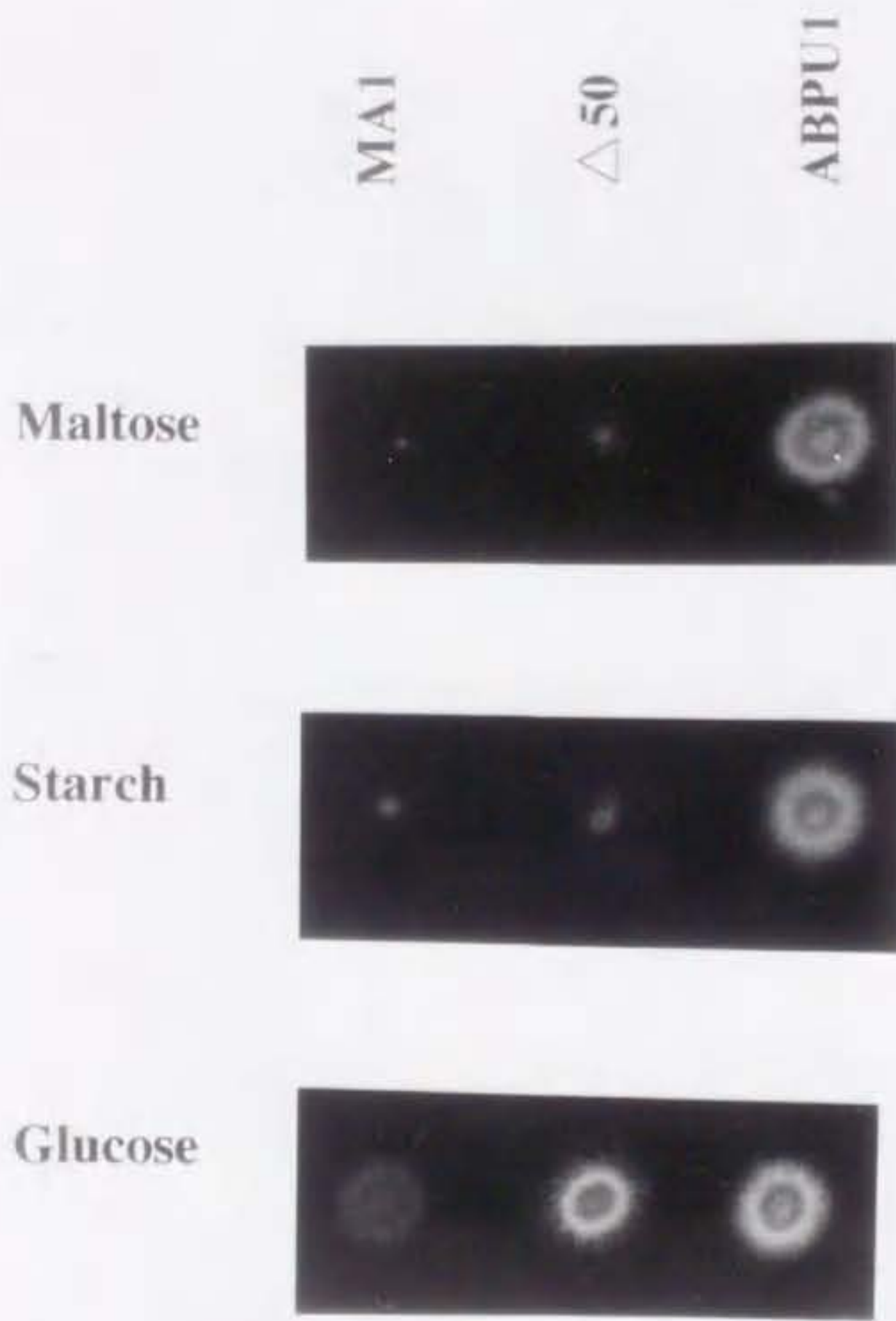


Fig. 21 MA1 (*malA1* 変異株) と $\Delta 50$ (*amyR* 遺伝子破壊株) の **maltose, starch, glucose** 培地上での生育の比較。

MA1 (*biA1*; *argB2*; *pyroA4*; *malA1*)。 $\Delta 50$; *amyR* 遺伝子破壊株 (*pyrG89 biA1*; *wA3*; *argB2*; *pyroA4*; $\Delta amyR::argB^+$)。 ABPU1; wild type strain。 各株を2% maltose, 2% starch, 2% glucose を単一炭素源として含む最少培地上で培養した。

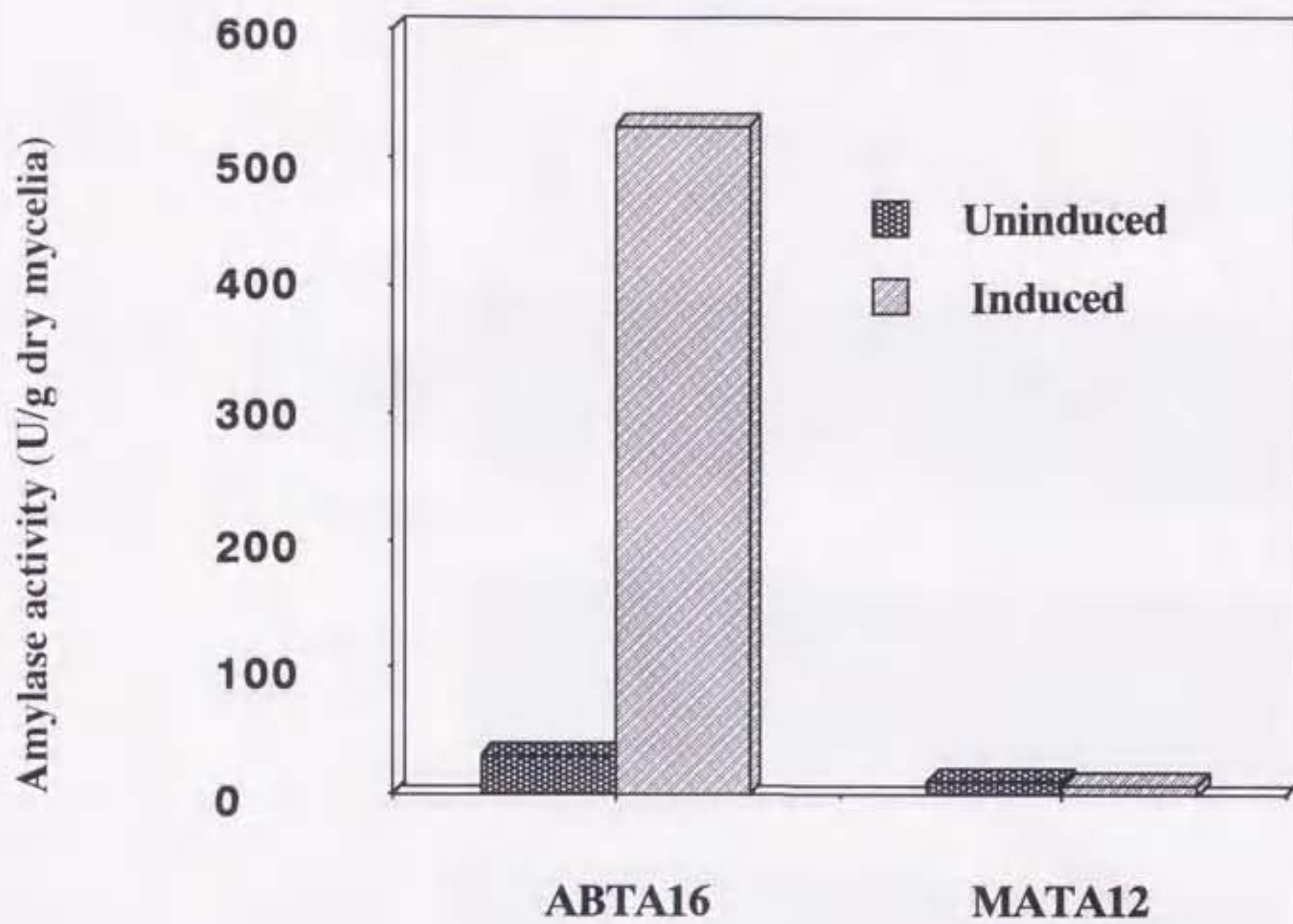


Fig. 22 *malA1* 変異株のアミラーゼ誘導能

アミラーゼ活性の測定はsomogyi-nelson 法に従って行い、1 unit (U) は、1 分間に $1 \mu\text{mol}$ のグルコースに相当する還元末端を生成する酵素量とした。誘導条件 (C源: 2% Glycerol, 2% Starch)、非誘導条件 (C源: 2% Glycerol) で 37°C 、36時間培養した培養上清を酵素液とした。ABTA: ABPU1+*TaaG2* 株、MATA: MA1+*TaaG2* 株である。

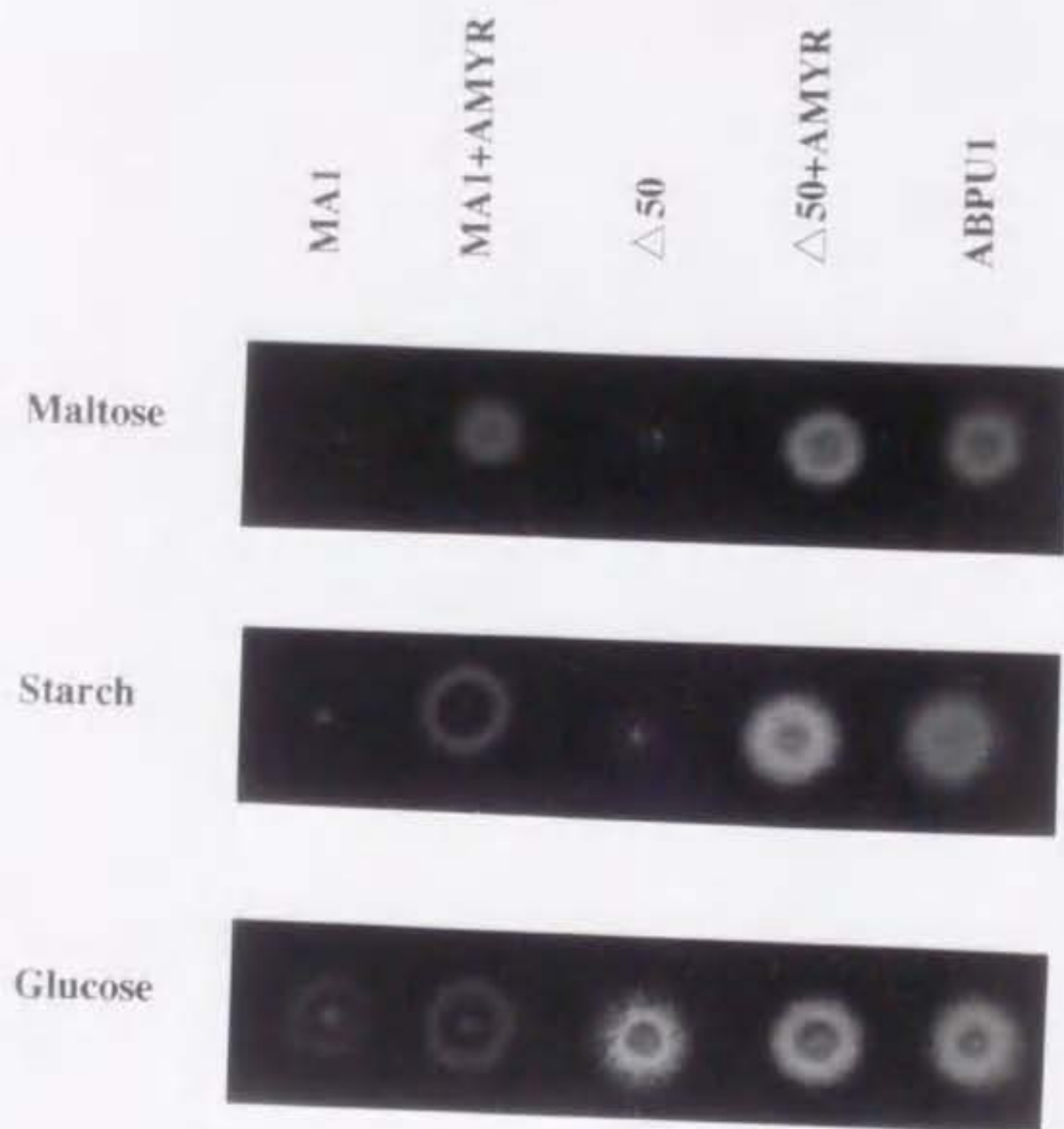


Fig. 23 MA1 (*malA1* 変異株) は *amyR* によって相補される。

MA1 (*biA1*; *argB2*; *pyroA4*; *malA1*), MA1+AMYR; MA1 を *amyR* で形質転換して得られた株。Δ50; *amyR* 遺伝子破壊株 (*pyrG89 biA1*; *wA3*; *argB2*; *pyroA4*; Δ*amyR*::*argB*⁺)。Δ50+AMYR; Δ50株に *amyR* を導入した株。ABPU1; wild type strain。各株を2% maltose, 2% starch, 2% glucose を単一炭素源として含む最少培地上で培養した。

第三章

総合考察と今後の展望

糸状菌におけるアミラーゼ遺伝子群の発現誘導機構を解明することを目的として、本研究では、アミラーゼ遺伝子発現誘導に関わるシスエレメントの同定とこの領域に特異的に結合するトランスファクターの機能解析を行った。

A. nidulans から調製した核抽出液を用いて、*taaG2* プロモーター領域に特異的に結合する因子(SREB)の検出を行い、結合配列を特定した。この特定された SREB の結合配列 5'-CGGAAATT-3'は、*taaG2* のデンプン・マルトースに応答した発現誘導に必須なシスエレメント(SRE; starch responsive element)であった。SRE に含まれる CGG triplet は、Cys₆Zn(II)タイプの DNA 結合モチーフを有す転写活性化因子の特異的結合に必須な配列である。事実、アミラーゼ遺伝子群の転写活性化因子としてクローニングされた AmyR もまた Cys₆Zn(II)ドメインを有し、CGG triplet を認識して SRE に結合していた。Cys₆Zn(II)ファミリーに属す因子の認識配列への結合には、塩基性アミノ酸に富んだ Cys₆Zn(II)ドメイン内の領域が関与すると考えられている。Cys₆Zn(II)ファミリーに属す GAL4, PPR1, PUT3 因子の X 線結晶解析・NMR 解析から、CGG triplet の認識には、Cys₆Zn(II)ドメイン内の二番目のシステインから数えて四番目のリジンが機能していることが示された(51, 52, 79, 89)。AmyR の同一箇所に相当する 23 番目のアミノ酸もリジンであったことから、CGG triplet を認識する機構は、GAL4, PPR1, PUT3 と同様であると推測される。しかし、認識配列が CGG triplet だけでは、特異的な転写活性化因子に依存した遺伝子発現制御を行うことはできない。GAL4, PPR1, PUT3 などの二量体を形成して結合する因子の特異性は、CGG triplet 周辺配列は関係ないが、二つの CGG triplet が位置する距離と方向により規定されると考えられている(47, 74)。一方、このファミリーに属すがモノマーで結合する AlcR の結合配列は 5'-PuNGCGG-AT rich-3'であり、CGG triplet だけでなくその周辺配列によっても特異性が規定されている (61)。この AlcR 認識配列は、*taaG2* プロモーター上の AmyR 結合配列 5'-GGCGGAAATTTAA-3'と同一であ

る。しかし、AlcR に制御される遺伝子がデンプン・マルトースにより誘導されることはなく、逆にアミラーゼ遺伝子群がアルコールにより発現誘導されることもない。AlcR は *in vivo* においては、認識配列が inverted repeat に近接して二つ位置するときのみ機能することが報告されている(53)。今後、第二章第二節で述べた AmyR と DNA との複合体形成と発現誘導能の関係を明らかにすることが、糸状菌における各遺伝子特異的な転写活性化機構を解明する糸口となる。

糸状菌において、*taaG2* 遺伝子発現誘導能は極めて優れている。プロモーターの遺伝子発現誘導能を規定する要因として、転写活性化因子の認識配列への結合親和性、転写活性化因子と他の転写因子との立体的な位置関係、クロマチン構造のリモデリングなどが挙げられる。この中でも、転写活性化因子と他の転写因子との立体的な位置関係について考察する。

A. nidulans 内在の *agdA* の発現は、ノーザンブロット解析で検出できない程、低レベルである。しかし Table. 1 に示したように、*agdA* プロモーター上の AmyR 結合配列をレポータープラスミドの TATA box の上流約-130 の位置に挿入すると、デンプンに応答して遺伝子を発現することが示された。本来の *agdA* プロモーター上では、AmyR 結合配列は-400 に位置しており TATA box から遠い。*A. oryzae agdA* においても、AmyR 結合配列を転写開始点の上流-550 から中間領域を欠失して-200 の位置に近付けた場合に、発現誘導能の上昇が観察されたことから(35)、基本転写因子と転写活性化因子の距離がある程度近接していることが重要であるといえる。

taaG2 の発現を司る因子として AmyR と、炭素源に関係なく転写量を増大させる AnCP がある。*taaG2* プロモーター領域において各結合配列は、転写開始点の上流約-200 と-300 に位置している。AmyR, AnCP と基本転写因子の相互作用は現在のところ確認されていない。しかし、転写活性化因子の主な機能の一つは、基本転写因子をプロモーター上にリクルートする事であると提唱されている(43, 46)。AmyR の C 末端には、GAL4 などに見られるような基本転写因子と相互作用する酸性アミノ酸のクラスターは存在しない。AmyR と基本転写因子との直接的な相互作用は無いのかもしれないが、SAGA コンプレックスのような co-factor

が相互作用を介在する可能性が挙げられる。また、AmyR 結合配列(SRE)の CGG triplet の直後には AT rich 配列(5'-AAATTTAAA-3')が位置する。*S. cerevisiae* MIG1 では、結合配列 5'-SYGGRG-3'の直後の AT rich 配列が MIG1 結合後の DNA bending に関与していると報告されている(49)。SRE に結合した AmyR が DNA bending を引き起こし、AmyR と AnCP と基本転写因子を近接させる可能性が推測される。*taaG2* プロモーターの発現誘導能が優れているのは、これらの位置関係が至適化されている可能性がある。現在、当研究室において AmyR と AnCP 結合配列が 10 bp のスペースを介して位置する *agdA* プロモーターを用いて、AmyR と AnCP との相互作用の有無に関して解析を行っている。今後、AmyR の結合親和性だけでなく、AmyR と他の転写因子との相互作用の観点からもアマラーゼ遺伝子群の発現制御機構が紐解かれ、ひいては、*taaG2* が強いプロモーター活性を有している根拠も解明されることを期待する。

amyR 変異株を用いた解析より、478 番目のヒスチジンが AmyR の機能発現に重要な役割を担っていることが示唆された。この His478 は、*Aspergillus* の三種の AmyR と *S. cerevisiae* MAL63 とをアライメントした結果から導き出された MH3 ドメインに位置する。MH3 ドメインを含む AmyR C 末端領域には、デンプン・マルトースからのシグナルを受けるレシーバードメインと、転写活性化を阻害するドメインがあると推測されている。則ち、His478 が誘導物質からのシグナル伝達に関わっている可能性、或いは *A. nidulans* PacC や *S. cerevisiae* Leu3 の様に(19, 90)、分子内相互作用により転写活性化の阻害に関わる可能性が考えられる。より詳細な AmyR の internal deletion による機能ドメイン解析を行うだけでなく、一アミノ酸置換による機能ドメイン解析や His478Leu 変異を有す株を宿主としてサブレッサー変異株を取得して、変異点を同定、分離、機能解析することでこのドメインの機能が解明され则认为。またこの解析が、His478 を含むドメインと他の分子との相互作用の有無を解明する手がかりとなる。分子内相互作用の有無は、two-hybrid 解析により示唆が得られる。*A. nidulans* が遺伝学的解析に好適であるという利点を生かして、AmyR の機能ドメインが特定されることを期待する。

バイオテクノロジーの分野において、工業的に有益な酵素を大量に生産することは日常的に行われてきた。近年、環境問題が取り沙汰される中、化石燃料の代替エネルギーとしてバイオマスの有効利用が急がれている。一部の国でサトウキビの糖からエタノールを作り、燃料として使用するプラントが実用化されており、多糖分解酵素が改めて注目されている。

本研究結果が糸状菌を用いた有用酵素生産性の向上に生かされ、酵素産業の発展、更には地球環境の浄化等、21世紀の社会の発展に貢献する事を期待する。

参考文献

1. **Anna, P., D. Christine, and S. Claudio** 2000. The analysis of the transcriptional activator PrnA reveals a tripartite nuclear localisation sequence. *Journal of Molecular Biology*. **298**:585-596.
2. **Baker, H. V.** 1991. *GCR1* of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a DNA binding protein whose binding is abolished by mutations in the CTTCC sequence motif. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **88**:9443-7.
3. **Ballance, D. J., and G. Turner** 1985. Development of a high-frequency transforming vector for *Aspergillus nidulans*. *Gene*. **36**:321-331.
4. **Birnboim, H. C., and J. Doly** 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*. **7**:1513-23.
5. **Blair, W., H. Bogerd, S. Madore, and B. Cullen** 1994. Mutational analysis of the transcription activation domain of RelA: identification of a highly synergistic minimal acidic activation module. *Mol Cell Biol*. **14**:7226-7234.
6. **Boel, E., M. T. Hansen, I. Hjort, I. Hoegh, and N. P. Fiil** 1984. Two different types of intervening sequences in the glucoamylase gene from *Aspergillus niger*. *EMBO J*. **3**:1581-1585.
7. **Caddick, M. X., H. N. Arst, Jr., L. H. Taylor, R. I. Johnson, and A. G. Brownlee** 1986. Cloning of the regulatory gene *areA* mediating nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *EMBO J*. **5**:1087-90.
8. **Carle-Urioste, J. C., J. Escobar-Vera, S. El-Gogary, F. Henrique-Silva, E. Torigoi, O. Crivellaro, A. Herrera-Estrella, and H. El-Dorry** 1997. Cellulase induction in *Trichoderma reesei* by cellulose requires its own basal expression. *The Journal of Biological Chemistry*. **272**:10169-10174.
9. **Cazelle, B., A. Pokorska, E. Hull, P. M. Green, G. Stanway, and C. Scazzocchio** 1998. Sequence, exon-intron organization, transcription and mutational analysis of *prnA*, the gene encoding the transcriptional activator of the *prn* gene cluster in *Aspergillus nidulans*. [published erratum appears in *Mol Microbiol* 1999 Feb;31(4):1283] *Mol Microbiol*. **28**:355-70.
10. **Chang, Y., R. Dubin, E. Perkins, D. Forrest, C. Michels, and R. B. Needleman** 1988. *MAL63* codes for a positive regulator of maltose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*. **14**:201-209.
11. **Chikamatsu, G., K. Shirai, M. Kato, T. Kobayashi, and N. Tsukagoshi** 1999. Structure and expression properties of the *endo-β-1,4-glucanase A* gene from the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiology Letters*. **175**:239-245.
12. **de Graaff, L. H., H. C. van den Broeck, A. J. van Ooijen, and J. Visser** 1994.

- Regulation of the xylanase-encoding *xlnA* gene of *Aspergillus tubigenensis*. Mol Microbiol. **12**:479-90.
13. **De Vit, M. J., J. A. Waddle, and M. Johnston** 1997. Regulated nuclear translocation of the Mig1 glucose repressor. Mol Biol Cell. **8**:1603-18.
 14. **de Vries, R. P., J. Visser, and L. H. de Graaff** 1999. CreA modulates the XlnR-induced expression on xylose of *Aspergillus niger* genes involved in xylan degradation. Res Microbiol. **150**:281-5.
 15. **Dowzer, C., and J. Kelly** 1989. Cloning of the *creA* gene from *Aspergillus nidulans*: a gene involved in carbon catabolite repression. Current Genetics. **15**:457-459.
 16. **Dowzer, C. E.** 1991. Analysis of the *creA* gene, a regulator of carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. Molecular and Cellular Biology, **11**:5710-5709.
 17. **Drysdale, C., E. Duenas, B. Jackson, U. Reusser, G. Braus, and A. Hinnebusch** 1995. The transcriptional activator GCN4 contains multiple activation domains that are critically dependent on hydrophobic amino acids. Mol Cell Biol. **15**:1220-1233.
 18. **Drysdale, M. R., S. E. Kolze, and J. M. Kelly** 1993. The *Aspergillus niger* carbon catabolite repressor encoding gene, *creA*. Gene. **130**:241-5.
 19. **Espeso, E. A., T. Roncal, E. Diez, L. Rainbow, E. Bignell, J. Alvaro, T. Suarez, S. H. Denison, J. Tilburn, H. N. Arst, Jr., and M. A. Penalva** 2000. On how a transcription factor can avoid its proteolytic activation in the absence of signal transduction. [published erratum appears in EMBO J 2000 May 15;19(10):2391] Embo J. **19**:719-28.
 20. **Felenbok, B., and J. M. Kelly** 1996. Regulation of carbon metabolism in mycelial fungi, p. 369-380. In Brambl, and Marzluf (eds), The Mycota III, Biochemistry and Molecular Biology. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
 21. **Galas, D. J., and A. Schmitz** 1978. DNase footprinting: a simple method for the detection of protein-DNA binding specificity. Nucleic Acids Res. **5**:3157-70.
 22. **Gems, D., I. Johnstone, and A. Clutterbuck** 1991. An autonomously replicating plasmid transforms *Aspergillus nidulans* at high frequency. Gene. **98**:61-67.
 23. **Gibson, A., L. Wojciechowicz, S. Danzi, B. Zhang, J. Kim, Z. Hu, and C. Michels** 1997. Constitutive mutations of the *Saccharomyces cerevisiae* MAL-activator genes MAL23, MAL43, MAL63, and mal64. Genetics. **146**:1287-1298.
 24. **Gomi, K., T. Akeno, T. Minetoki, K. Ozeki, C. Kumagai, and Y. Iimura** 2000. Molecular cloning and characterization of a transcriptional activator gene, *amyR*, involved in the amylyolytic gene expression in *Aspergillus oryzae*. Bioscience,

- Biotechnology, and Biochemistry. **64**:816-827.
25. **Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*. **166**:557-580.
 26. **Hata, Y., K. Tsuchiya, K. Kitamoto, K. Gomi, G. Tamura, and S. Hara** 1991. Nucleotide sequence and expression of the glucoamylase-encoding gene (*glaA*) from *Aspergillus oryzae*. *Gene*. **108**:145-150.
 27. **Higgins, V. J., M. Braidwood, P. Bissinger, I. W. Dawes, and P. V. Attfield** 1999. Leu343Phe substitution in the Malx3 protein of *Saccharomyces cerevisiae* increases the constitutivity and glucose insensitivity of *MAL* gene expression. *Current Genetics*. **35**:491-498.
 28. **Higuchi, M., C. Wong, L. Kochhan, K. Olek, S. Aronis, C. Kasper, H. J. Kazazian, and S. Antonarakis** 1990. Characterization of mutations in the factor VIII gene by direct sequencing of amplified genomic DNA. *Genomics*. **6**:65-71.
 29. **Hrmova, M., E. Petrakova, and P. Biely** 1991. Induction of cellulose- and xylan-degrading enzyme systems in *Aspergillus terreus* by homo- and heterodisaccharides composed of glucose and xylose. *J Gen Microbiol*. **137**:541-547.
 30. **Hu, Z., A. W. Gibson, J. H. Kim, L. A. Wojciechowicz, B. Zhang, and C. A. Michels** 1999. Functional domain analysis of the *Saccharomyces MAL*-activator. *Current Genetics*. **36**:1-12.
 31. **Hu, Z., J. O. Nehlin, H. Ronne, and C. A. Michels** 1995. MIG1-dependent and MIG1-independent glucose regulation of *MAL* gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*. **28**:258-66.
 32. **Hull, E. P., P. M. Green, H. N. Arst, Jr., and C. Scazzocchio** 1989. Cloning and physical characterization of the L-proline catabolism gene cluster of *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol*. **3**:553-9.
 33. **Hynes, M. J., C. M. Corrick, and J. A. King** 1983. Isolation of genomic clones containing the *amdS* gene of *Aspergillus nidulans* and their use in the analysis of structural and regulatory mutations. *Mol Cell Biol*. **3**:1430-9.
 34. **Johnston, S. A., and J. E. Hopper** 1982. Isolation of the yeast regulatory gene *GAL4* and analysis of its dosage effects on the galactose/melibiose regulon. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **79**:6971-5.
 35. **Kanemori, Y., K. Gomi, K. Kitamoto, C. Kumagai, and G. Tamura** 1999. Insertion analysis of putative functional elements in the promoter region of the *Aspergillus oryzae Taka-amylase A* gene (*amyB*) using a heterologous *Aspergillus nidulans amdS-lacZ* fusion gene system. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. **63**:180-183.

36. **Kato, M., A. Aoyama, F. Naruse, T. Kobayashi, and N. Tsukagoshi** 1997. An *Aspergillus nidulans* nuclear protein, AnCP, involved in enhancement of *Taka-amylase A* gene expression, binds to the CCAAT-containing *taaG2*, *umdS*, and *gata* promoters. *Molecular and General Genetics*. **254**:119-126.
37. **Kato, M., A. Aoyama, F. Naruse, Y. Tateyama, K. Hayashi, M. Miyazaki, P. Papagiannopoulos, M. A. Davis, M. J. Hynes, T. Kobayashi, and N. Tsukagoshi** 1998. The *Aspergillus nidulans* CCAAT-binding factor AnCP/AnCF is a heteromeric protein analogous to the HAP complex of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and General Genetics*. **257**:404-411.
38. **Kato, M., K. Sekine, and N. Tsukagoshi** 1996. Sequence-specific binding sites in the *Taka-amylase A G2* promoter for the CreA repressor mediating carbon catabolite repression. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. **60**:1776-1779.
39. **Kato, N., S. Sachie, S. Masao, K. Masashi, K. Tetsuo, and T. Norihiro** submitted. Isomaltose-producing enzyme, a cellular α -glucosidase of *Aspergillus nidulans*; possible roles in amylase induction.
40. **Kelly, J. M.** 1994. Carbon catabolite repression, p. 355-367. *In* S. D. Martinelli, and J. R. Kinghorn (eds), *Aspergillus: 50 years on*. Elsevier, Amsterdam.
41. **Kelly, R., and K. Kwon-Chung** 1992. A zinc finger protein from *Candida albicans* is involved in sucrose utilization. *Journal of Bacteriology*. **174**:222-232.
42. **King, D. A., L. Zhang, L. Guarente, and R. Marmorstein** 1999. Structure of a HAP1-DNA complex reveals dramatically asymmetric DNA binding by a homodimeric protein. *Nat Struct Biol*. **6**:64-71.
43. **Kuras, L., and K. Struhl** 1999. Binding of TBP to promoters in vivo is stimulated by activators and requires Pol II holoenzyme. *Nature*. **399**:609-13.
44. **Lachmund, A., U. Urmann, K. Minol, S. Wirsal, and E. Ruttkowski** 1993. Regulation of α -amylase formation in *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus nidulans* transformants. *Current Microbiology*. **28**:47-51.
45. **Levine, J., L. Tanouye, and C. A. Michaels** 1992. The UAS_{MAL} is a bidirectional promoter element required for the expression of both the *MAL61-MAL62* genes of *Saccharomyces MAL6* locus. *Current Genetics*. **22**:181-189.
46. **Li, X. Y., A. Virbasius, X. Zhu, and M. R. Green** 1999. Enhancement of TBP binding by activators and general transcription factors. *Nature*. **399**:605-9.
47. **Liang, S. D., R. Marmorstein, S. C. Harrison, and M. Ptashine** 1996. DNA sequence preferences of GAL4 and PPR1: how a subset of Zn² Cys⁶ binuclear cluster proteins recognizes DNA. *Mol Cell Biol*. **16**:3773-80.
48. **Lukens, A. K., D. A. King, and R. Marmorstein** 2000. Structure of HAP1-PC7

- bound to DNA: implications for DNA recognition and allosteric effects of DNA-binding on transcriptional activation. [In Process Citation] *Nucleic Acids Res.* **28**:3853-63.
49. **Lundin, M., J. O. Nehlin, and H. Ronne** 1994. Importance of a flanking AT-rich region in target site recognition by the GC box-binding zinc finger protein MIG1. *Mol Cell Biol.* **14**:1979-85.
 50. **Ma, J., and M. Ptashne** 1987. Deletion analysis of GAL4 defines two transcriptional activating segments. *Cell.* **48**:847-53.
 51. **Marmorstein, R., M. Carey, M. Ptashne, and S. C. Harrison** 1992. DNA recognition by GAL4: structure of a protein-DNA complex. [see comments] *Nature.* **356**:408-14.
 52. **Marmorstein, R., and S. C. Harrison** 1994. Crystal structure of a PPR1-DNA complex: DNA recognition by proteins containing a Zn₂Cys₆ binuclear cluster. *Genes Dev.* **8**:2504-12.
 53. **Mathieu, M., S. Fillinger, and B. Felenbok** 2000. In vivo studies of upstream regulatory cis-acting elements of the *alcR* gene encoding the transactivator of the ethanol regulon in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol.* **36**:123-31.
 54. **Mattaj, I., and L. Englmeier** 1998. Nucleocytoplasmic transport: the soluble phase. *Annu Rev Biochem.* **67**:265-306.
 55. **Minetoki, T., K. Gomi, K. Kitamoto, C. Kumagai, and G. Tamura** 1995. Nucleotide sequence and expression of α -glucosidase-encoding gene (*agdA*) from *Aspergillus oryzae*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry.* **59**:1516-1521.
 56. **Minetoki, T., C. Kumagai, K. Gomi, K. Kitamoto, and K. Takahashi** 1998. Improvement of promoter activity by the introduction of multiple copies of the conserved region III sequence, involved in the efficient expression of *Aspergillus oryzae* amylase-encoding genes. *Applied Microbiology and Biotechnology.* **50**:459-467.
 57. **Minetoki, T., Y. Nunokawa, K. Gomi, K. Kitamoto, C. Kumagai, and G. Tamura** 1996. Deletion analysis of promoter elements of the *Aspergillus oryzae agdA* gene encoding α -glucosidase *Current Genetics.* **30**:432-438.
 58. **Naar, A. M., J. M. Boutin, S. M. Lipkin, V. C. Yu, J. M. Holloway, C. K. Glass, and M. G. Rosenfeld** 1991. The orientation and spacing of core DNA-binding motifs dictate selective transcriptional responses to three nuclear receptors. *Cell.* **65**:1267-79.
 59. **Nagata, O., T. Takashima, M. Tanaka, and N. Tsukagoshi** 1993. *Aspergillus nidulans* nuclear proteins bind to a CCAAT element and the adjacent upstream sequence in the promoter region of the starch-inducible *Taka-amylase* gene.

- Molecular and General Genetics. **237**:251-260.
60. **Ni, B. F., and R. B. Needleman** 1990. Identification of the upstream activating sequence of *MAL* and the binding sites for the MAL63 activator of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* **10**:3797-800.
 61. **Nikolaev, I., F. Lenouvel, and B. Felenbok** 1999. Unique DNA binding specificity of the binuclear zinc AlcR activator of the ethanol utilization pathway in *Aspergillus nidulans*. *J Biol Chem.* **274**:9795-802.
 62. **Oakley, B. R.** 1999. Methods for isolating and analyzing mitotic mutants in *Aspergillus nidulans*. *Methods Cell Biol.* **61**:347-68.
 63. **Petersen, K. L., J. Lehmbeck, and J. Christensen** 1999. A new transcriptional activator for *amylase* genes in *Aspergillus*. *Molecular and General Genetics.* **262**:668-676.
 64. **Reece, R. J.** 1993. Determinants of binding-site specificity among yeast C6 zinc cluster proteins. *Science.* **261**:909-911.
 65. **Regier, J., F. Shen, and S. Triezenberg** 1993. Pattern of aromatic and hydrophobic amino acids critical for one of two subdomains of the VP16 transcriptional activator. *Proceedings of National Academic Sciences in USA.* **90**:883-887.
 66. **Rensing, L., C. Monnerjahn, and U. Meyer** 1998. Differential stress gene expression during the development of *Neurospora crassa* and other fungi. *FEMS Microbiol Lett.* **168**:159-66.
 67. **Roberts, C.** 1963. The genetic analysis of carbohydrate utilization in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology.* **31**:45-48.
 68. **Rowlands, R. T., and G. Turner** 1973. The genetic analysis of carbohydrate utilization in *Aspergillus nidulans*. *Molecular and General Genetics.* **126**:201-206.
 69. **Roy, A., F. Exinger, and R. Losson** 1990. cis- and trans-acting regulatory elements of the yeast *URA3* promoter. *Mol Cell Biol.* **10**:5257-70.
 70. **Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis** 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
 71. **Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **74**:5463-7.
 72. **Schjerling, P., and S. Holmberg** 1996. Comparative amino acid sequence analysis of the C6 zinc cluster family of transcriptional regulators. *Nucleic Acids Research.* **24**:4599-4607.
 73. **Sharp, P. A., B. Sugden, and J. Sambrook** 1973. Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-

- ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry*. **12**:3055-63.
74. **Siddiqui, A. H., and M. C. Brandriss** 1989. The *Saccharomyces cerevisiae* PUT3 activator protein associates with proline-specific upstream activation sequences. *Mol Cell Biol*. **9**:4706-12.
 75. **Silver, P., L. Keegan, and M. Ptashine** 1984. Amino terminus of the yeast *GAL4* gene product is sufficient for nuclear localization. *Proceedings of National Academic Sciences in USA*. **81**:5951-5955.
 76. **Sirenko, O.** 1995. Purification and binding properties of the Mal63p activator of *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*. **27**:509-516.
 77. **Strauss, J., R. L. Mach, S. Zeilinger, G. Hartler, G. Stoffler, M. Wolschek, and C. P. Kubicek** 1995. Cre1, the carbon catabolite repressor protein from *Trichoderma reesei*. *FEBS Lett*. **376**:103-7.
 78. **Strauss, J., M. I. Muro-Pastor, and C. Scazzocchio** 1998. The regulator of nitrate assimilation in ascomycetes is a dimer which binds a nonrepeated, asymmetrical sequence. *Mol Cell Biol*. **18**:1339-48.
 79. **Swaminathan, K., P. Flynn, R. J. Reece, and R. Marmorstein** 1997. Crystal structure of a PUT3-DNA complex reveals a novel mechanism for DNA recognition by a protein containing a Zn₂Cys₆ binuclear cluster. *Nat Struct Biol*. **4**:751-9.
 80. **Tada, S., Y. Iimura, K. Gomi, K. Takahashi, S. Hara, and K. Yoshizawa** 1989. Cloning and nucleotide sequence of the genomic *Taka-amylase A* gene of *Aspergillus oryzae*. *Agricultural and Biological Chemistry*. **53**:593-599.
 81. **Tani, S., Y. Katsuyama, T. Hayashi, H. Suzuki, M. Kato, K. Gomi, T. Kobayashi, and N. Tsukagoshi** 2001. Characterization of the *amyR* gene encoding a transcriptional activator for the amylase genes in *Aspergillus nidulans*. *Current Genetics*:accepted for publication.
 82. **Tani, S., T. Kawaguchi, M. Kato, T. Kobayashi, and N. Tsukagoshi** 2000. A novel nuclear factor SREB binds to a *cis*-acting element SRE, required for inducible expression of the *Aspergillus oryzae Taka-amylase A* Gene in *A. nidulans*. *Molecular and General Genetics*. **263**:232-238.
 83. **Thompson, J., D. Higgins, and T. Gibson** 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. **22**:4673-4680.
 84. **Timberlake, W. E.** 1991. Temporal and spatial controls of *Aspergillus* development. *Curr Opin Genet Dev*. **1**:351-7.
 85. **Todd, R. B., and A. Andrianopoulos** 1997. Evolution of a fungal regulatory

- gene family: the Zn(II)₂Cys₆ binuclear cluster DNA binding motif. *Fungal Genetics and Biology*. **21**:388-405.
86. **Todd, R. B., A. Andrianopoulos, M. A. Davis, and M. J. Hynes** 1998. FacB, the *Aspergillus nidulans* activator of acetate utilization genes, binds dissimilar DNA sequences. *EMBO J*. **17**:2042-54.
 87. **Tsukagoshi, N., M. Furusawa, H. Nagaba, N. Kirita, A. Tuboi, and S. Udaka** 1989. Isolation of a cDNA encoding *Aspergillus oryzae* Taka-amylase A: evidence for multiple related genes. *Gene*. **84**:319-327.
 88. **Vashee, S., H. Xu, S. A. Johnston, and T. Kodadek** 1993. How do "Zn₂ cys₆" proteins distinguish between similar upstream activation sites? Comparison of the DNA-binding specificity of the GAL4 protein in vitro and in vivo. *J Biol Chem*. **268**:24699-706.
 89. **Walters, K. J., K. T. Dayie, R. J. Reece, M. Ptashne, and G. Wagner** 1997. Structure and mobility of the PUT3 dimer. *Nat Struct Biol*. **4**:744-50.
 90. **Wang, D., F. Zheng, S. Holmberg, and G. B. Koblhaw** 1999. Yeast transcriptional regulator Leu3p. Self-masking, specificity of masking, and evidence for regulation by the intracellular level of Leu3p. *J Biol Chem*. **274**:19017-24.
 91. **Wang, J., O. Sirenko, and R. Needleman** 1997. Genomic footprinting of Mig1p in the *MAL62* promoter. Binding is dependent upon carbon source and competitive with the Mal63p activator. *J Biol Chem*. **272**:4613-22.
 92. **Wang, X. W., M. J. Hynes, and M. A. Davis** 1992. Structural and functional analysis of the *amdR* regulatory gene of *Aspergillus oryzae*. *Gene*. **122**:147-54.
 93. **Wirsel, S., A. Lachmund, G. Wildhardt, and E. Ruttkowski** 1989. Three α -amylase genes of *Aspergillus oryzae* exhibit identical intron organization. *Molecular Microbiology*. **3**:3-14.
 94. **Yabuki, M., N. Ono, K. Hoshino, and S. Fukui** 1977. Rapid induction of α -amylase by nongrowing mycelia of *Aspergillus oryzae*. *Applied and Environmental Microbiology*. **34**:1-6.
 95. **Ye, X. S., and S. A. Osmani** 1997. Regulation of p34cdc2/cyclinB H1 and NIMA kinases during the G2/M transition and checkpoint responses in *Aspergillus nidulans*. *Prog Cell Cycle Res*. **3**:221-32.
 96. **Yu, J., P. Chang, D. Bhatnagar, and T. Cleveland** 2000. Cloning of a sugar utilization gene cluster in *Aspergillus parasiticus*. *Biochemical and Biophysical Acta*. **1493**:211-214.
 97. **Zhang, L., and L. Guarente** 1996. The C6 zinc cluster dictates asymmetric binding by HAP1. *EMBO J*. **15**:4676-81.

98. **Zhang, L., and L. Guarente** 1994. The yeast activator HAP1--a GAL4 family member--binds DNA in a directly repeated orientation. *Genes Dev.* **8**:2110-9.

要約

本研究では、タカアミラーゼ A 遺伝子(*taaG2*)をモデル系とし、糸状菌におけるアミラーゼ遺伝子群の発現誘導機構の解明を目指した。

taaG2 の発現誘導機構を解明するに当たり、まず *taaG2* プロモーター上の機能領域を大まかに特定した。*taaG2* プロモーター領域を 5'側より順次欠損し、改変プロモーターの遺伝子発現誘導能を解析した。転写開始点の上流-203 まで欠失すると *taaG2* の発現量の低下と共に誘導能も消失したが、-232 までの欠失は発現量及び誘導能に影響を及ぼさなかったことから、-231~-203 または-203 を含む領域に *taaG2* 発現誘導に必須なシスエレメントが存在している事が示唆された。そこで、特定された領域を含む DNA 断片(-231~-130)をプローブとしてゲルシフトアッセイ・DNase I フットプリンティングを行い、発現誘導に関わる核タンパク質の検出を試みた。誘導・非誘導両条件下で培養した菌体より調製した核抽出液から、*taaG2* プロモーター領域だけでなく、*A. oryzae* α -glucosidaseA 及び、*glucoamylaseA* プロモーターにも特異的に結合する因子が検出された。この因子の *taaG2* プロモーター上の結合配列は、-204~-189 と-182~-168 に二カ所存在し、それぞれに共通配列 5'-GGAAATT-3'が含まれていた。

各結合領域とその周辺に部位特異的に変異を導入し、この改変が発現誘導に与える影響を解析した。上流側の結合領域とその周辺領域の改変のみが *taaG2* 発現量の減少と誘導能の消失を引き起こし、下流域は関与していなかった。従って、上流側結合配列を SRE (starch responsive element)、下流域を ISRE (Inverted SRE)、検出された因子を SREB (SRE binding protein)とした。また、SREB は ISRE よりも SRE に対してより高い親和性を有していることが明らかとなった。

A. oryzae から、アミラーゼ遺伝子群の発現誘導に関わる因子をコードする *amyR* 遺伝子がクローニングされた。*A. nidulans* においてもより詳細にアミラーゼ遺伝子群の発現誘導機構を解析するために、*A. nidulans* から *amyR* 染色体遺伝子と cDNA をクローニングし、塩基配列を解読した。*A. nidulans* AmyR は 662 アミノ酸から構成され、*A. oryzae* AmyR とは 72%のアミノ酸が保存されて

いた。その機能と発現特性を解析するために、*amyR* 遺伝子破壊株を取得した。デンプン・マルトース・グルコース培地上での生育を比較し、*amyR* 遺伝子破壊株における *taaG2* 発現誘導能を解析した結果、*A. nidulans* においても AmyR がアミラーゼ遺伝子群の発現誘導に関与していることが明らかとなった。また *creA* 機能欠損株を用いた解析より、*amyR* の発現は CreA に依存してグルコースにより負に制御されていることが明らかとなった。

AmyR は、真菌類に多く見られる Cys₆Zn(II)タイプの DNA 結合モチーフを有している。*A. oryzae* AmyR は二種類の DNA 配列を認識すると報告されている。一つは CGGN₅CGG と表記される CGG triplets が 8 塩基を介して位置する配列。他方は、一つの CGG triplet とその直後に AAATTTAA が位置する配列である。大腸菌を宿主として発現した MalE との融合タンパク質、MalE::AmyR タンパク質を用いて DNase I フットプリンティングアッセイを行い、*A. nidulans* AmyR もまた、*agdA* プロモーター領域の CGGN₅CGG 配列を認識する事を明らかにした。

AmyR を介した遺伝子の発現誘導と *in vitro* での結合親和性に関する CGG triplets の役割を解析するために、*A. nidulans agdA* 改変プロモーター上の CGGN₅CGG 配列に変異を導入した。両側の CGG triplets 配列或いはそれぞれ片側の CGG triplet 配列にそれぞれ変位を導入し、各改変プロモーターのアミラーゼ発現誘導能を比較した。単独の CGG triplet 配列のみでもアミラーゼの生産が確認されるものの、誘導的高発現には両側の CGG triplets 配列が必須であった。更に、改変 *agdA* プロモーター断片を用いてゲルシフトアッセイを行い、AmyR はそれぞれ片側の CGG 配列に対しても低い親和性を有すが、CGGN₅CGG 配列に対する結合親和性は著しく増大しており、この配列には二分子の AmyR が協調的に結合する事が示唆された。

また、*taaG2* プロモーター上の単独の CGG triplet 配列を含む領域に関しても AmyR の結合には CGG triplet だけでなく、8 塩基介して下流に位置する AGG 配列が関与しており、*in vitro* での高親和性結合には、CGGN₅C/AGG が重要であることが示唆された。そこで、*taaG2* プロモーター上の CGGN₅AGG 配列を CGGN₅CGG 配列に改変した結果、AmyR 結合親和性は著しく増大した。8 塩基

のスペースを介した CGG triplets が、*in vitro* での AmyR の DNA への協調的な結合に必須であると結論する。

A. nidulans AmyR の機能ドメイン解析を行うに当たり、*Aspergillus* の三種の AmyR と *S. cerevisiae* MAL63p とを CLASTALW を用いてアライメントし、五カ所の相同領域 Zn1, MH1, MH2, MH3, MH4 を特定した。この結果を基に、C 末端欠損 AmyR の構築を行った。アミノ酸の保存性が見いだされなかった C 末端領域と各相同領域を順次欠失した AmyR を、*amyR* 遺伝子破壊株である *A. nidulans* $\Delta 50$ 株で発現させた。これら 5 種類の改変 AmyR を有す株をそれぞれ $\Delta 50Zn0(1\sim 85)$, $\Delta 50Zn1(1\sim 224)$, $\Delta 50Zn2(1\sim 411)$, $\Delta 50Zn3(1\sim 514)$, $\Delta 50Zn4(1\sim 588)$ とする。 $\Delta 50Zn2$, $\Delta 50Zn3$, $\Delta 50Zn4$ 株では $\Delta 50$ 株の表現型が相補された。しかし、 $\Delta 50Zn0$ と $\Delta 50Zn1$ 株では相補株は取得されず、N 末端から MH2 までの領域がアミラーゼ遺伝子群の発現に必須であることが明らかとなった。最も欠失部分の大きい $\Delta 50Zn2$ 株におけるアミラーゼ誘導生産能を測定し、AmyR-Zn2 の機能を解析した。 $\Delta 50Zn2$ 株ではアミラーゼの発現は構成的で且つ野生株よりも高いことから、転写の活性化には N 末端から MH2 までの領域で充分であり、MH3, MH4 には誘導剤へ応答する機能と転写活性化を抑制する機能があることが示唆された。

A. nidulans *malA1* 株は、デンプン・マルトースを単一炭素源とした培地で著しい生育の低下を示す株として遺伝学的に広く用いられてきた。しかしながら、その原因遺伝子(*malA1*)は、同定されていなかった。*malA1* 株の表現型は $\Delta 50$ 株に極めて類似しており、*malA1* が *amyR* である可能性が示唆された。そこで、*malA1* 株に *amyR* を導入し、相補実験を行った。*amyR* を導入した株の表現型は野生株と同様になり、*malA1* が *amyR* である可能性が強く示唆された。更に、*malA1* 株と $\Delta 50$ 株を交雑して得られた計 10 万個の progeny (cleistothecia 中に含まれる交雑によってできた子孫)について表現型を解析した。グルコース培地上の全てのコロニーは菌糸の伸長・胞子形成能共に良好であったのに対し、デンプン培地上では diffused colony を形成する株しか取得されなかった。以上の結果より、*malA1* は *amyR* である事が示された。そこで、*malA1* 株の *amyR* を含む -864 - 2,129 の領域の塩基配列を解読した。*malA1* 株の *amyR* は、1,483 塩基

目の A が T に置換しており、478 番目の His (CAT) が Leu (CTT) への一アミノ酸置換により AmyR の機能は消失する事が明らかとなった。同様に、他の二種の *malA* 変異株の *amyR* 遺伝子を解読した。*A. nidulans malA11* 株の *amyR* は 80 塩基目の C が T に置換しており、27 残基目の Ser (TCA) が Lue (TTA) へ改変していた。*A. nidulans malA14* 株の *amyR* は 1182 塩基目に G が挿入されており、378 残基以降のアミノ酸がフレームシフトを引き起こし、KRKRRWK 配列付加後にストップコドンが出現していた。

His478 は *A. nidulans*, *A. oryzae*, *A. niger* の AMYR と *S. cerevisiae* MAL63p においても保存されているアミノ酸である。His478 はアライメントの結果で定義した MH3 ドメインの C 末側に存在しており、その周辺における AmyR と MAL63p の相同性は高い。MH3 内の His478 付近がデンプン・マルトースからのシグナルレシーバードメイン或いは転写活性化能を阻害するドメインとして機能する可能性が考えられる。

謝辞

本研究を行うにあたり、終始熱心なご指導を賜りました名古屋大学大学院生命農学研究遺伝子制御学講座、塚越規弘教授に心より感謝いたします。また、本研究の遂行に当たり、終始ご指導ご鞭撻を賜りました小林哲夫助教授、有益なるご助言を頂きました加藤雅士先生に心より御礼申し上げます。

今日の私の礎となる研究生活を送らせていただいた、三重大学生物資源学部水産利用学研究室の森下達夫前教授、荒木利芳教授、田丸浩様に心より感謝いたします。

遺伝子制御学講座で、実験の指導をしていただいた諸先輩方、共に研究室生活を送った同級生、後輩のみなさまに感謝いたします。

最後に、これまで全ての面において支えて下さった家族に感謝いたします。

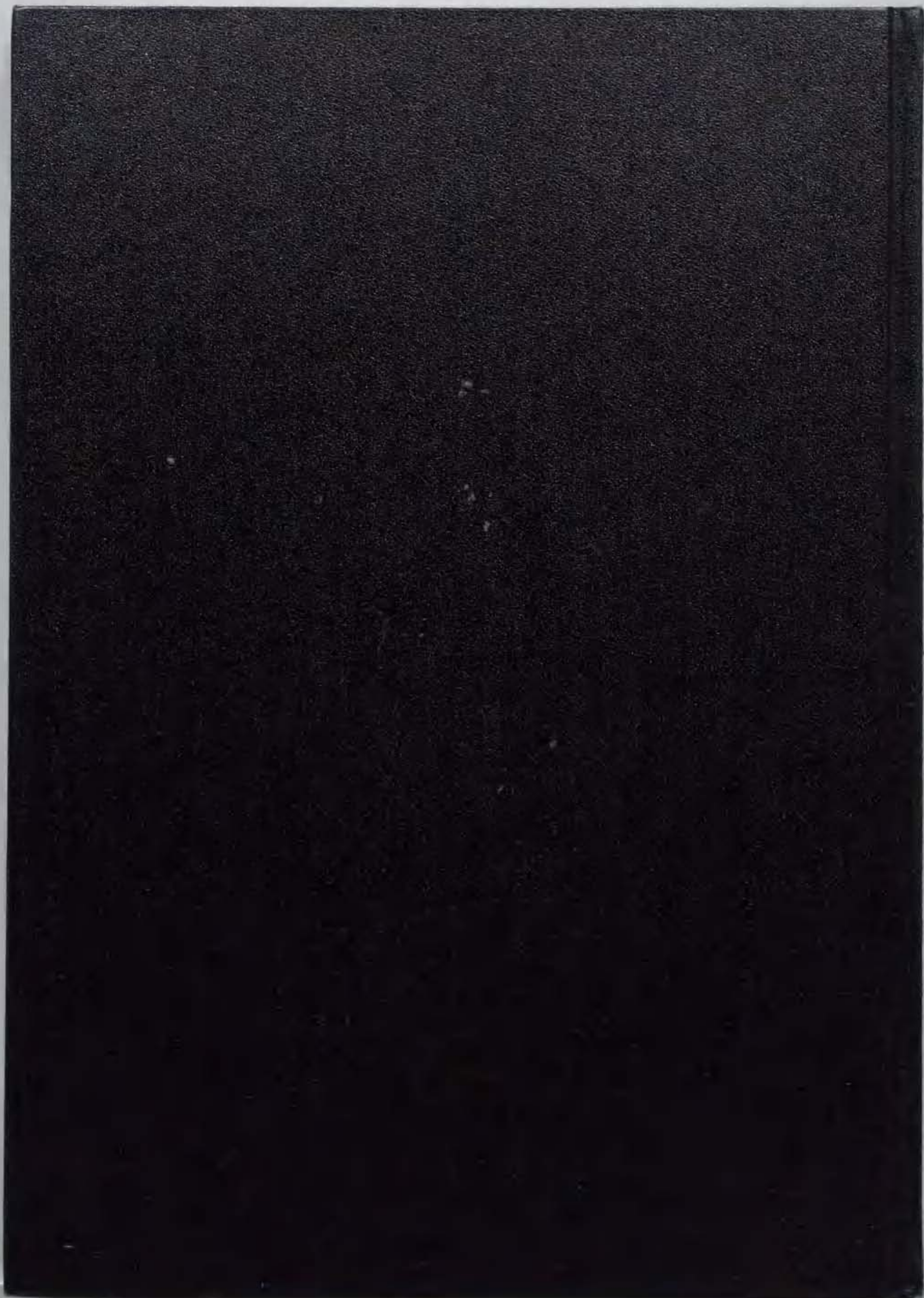
谷 修治

報文目録

1. A novel nuclear factor, SREB, binds to a *cis*-acting element, SRE, required for inducible expression of the *Aspergillus oryzae* Taka-amylase A gene in *A. nidulans*.
Molecular and General Genetics, **263**, 232-238, (2000)
2. Characterization of the *amyR* gene encoding a transcriptional activator for the amylase genes in *Aspergillus nidulans*.
Current Genetics; accepted for publication.
3. *In vivo* and *in vitro* analyses of the AmyR binding site of the *Aspergillus nidulans agdA* promoter; requirement of the CGG direct repeat for induction and high affinity binding of AmyR.
Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. に投稿中

参考論文目錄
参考論文

1. Purification and characterization of β -1,3-xylanase from a marine bacterium, *Vibrio* sp. XY-214.
Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry; **63**, 2017-2019, (1999)



Inches 1 2 3 4 5 6 7 8
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black



Kodak Gray Scale

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19



© Kodak, 2007 TM: Kodak