

## 第 36 回 (平成 20 年度) 研究奨励金受領者研究報告

### 糸状菌 His-Asp リン酸リレー因子の機能と情報伝達ネットワークの解明

名古屋大学大学院生命農学研究科 金丸京子

糸状菌 *Aspergillus nidulans* の生育分化や環境応答を制御する His-Asp リン酸リレー情報伝達機構の分子メカニズムを解明するために、*A. nidulans* に存在する 15 種類のヒスチジンキナーゼ (環境センサー) の機能を明らかにし、リン酸リレー因子間の情報伝達ネットワークの全体像を理解することは重要である。

これまで、それぞれのリン酸リレー因子が生育段階に応じてどのような発現を示すかを定量的 Real Time PCR 等により解析し、その中で低酸素条件下唯一発現する *hysA* を発見した。 *hysA* 遺伝子の破壊株および過剰発現株、リン酸基転移ができない変異株を作成し、HysA が低酸素条件下における分生子形成の制御に関与していることを明らかにした (論文準備中)。

そこで、1. 低酸素条件に応答した HysA の自己リン酸化活性調節機構を、精製 HysA タンパク質を用いた *in vitro* 実験で検証した ( $O_2$  が HysA に直接結合する可能性、あるいは HysA の酸化還元状態による活性への影響など)。また、2. 近縁種、*Aspergillus oryzae* における *hysA* オルソログの同定を行った。

#### 1. *in vitro* における HysA の自己リン酸化活性の検証

*in vitro* で解析するにあたり、HysA の RR ドメインを欠失した HysA H と全長の HysA HR を作成した。HysA の推定リン酸化部位であると推定されるヒスチジン残基をグルタミン残基に置換した変異を Quick Change により HysA H と HysA HR それぞれに導入し、HysA H(HQ) と HysA HR(HQ) を得た。HPt である YpdA についても、推定リン酸化部位に同様に変異を導入し YpdA(HQ) を得た。his-tag を利用したカラムクロマトグラフィーによってこれら 6 種類のリコンビナントタンパクを精製した (Fig. 1 模式図)。

リコンビナント HysA H を用いて *in vitro* リン酸基転移実験系でリン酸化を試みると、HysA H の自己リン酸化によると予想されるバンドが見られた。このバンドは HysA H(HQ) を用いてリン酸化を行った際には見られなかったことから、HysA H であることが確認できた。全長の

HysA HR についても、少し活性は低いが同様のバンドが確認できた。

次に、全長の HysA HR と YpdA を用いてリン酸化を試みたところ、YpdA のリン酸化によるバンドが認められたことから、HysA HR から YpdA へのリン酸基転移を確認することができた。また、HysA の HK ドメインから RR ドメインへのリン酸基転移を確認するために HysA H と HysA HR(HQ) を用いてリン酸化を試みたが、これら 2 つの分子量にほとんど差がないことなどからはっきりとした結果は得られなかった。そこで、HysA H, HysA HR(HQ), YpdA を用いて、リン酸基転移を確認することでリン酸基が HysA の HK ドメインから RR ドメインを介して YpdA に転移することを示すことにした。その結果、YpdA のリン酸化によるバンドが認められた (Fig. 2)。これは HysA H と YpdA のみを用いた際には見られなかったことから、HysA の HK ドメインから RR ドメインを介して YpdA へとリン酸基が転移することを確認できた。

酸化還元が HysA の活性に与える影響について調べるために、酸化剤である過酸化水素や DTNB、還元剤である DTT やグルタチオンを用いて HysA の自己リン酸化を確認した。その結果、HysA は還元状態で自己リン酸化することが明らかとなった。また、一度還元された HysA は、リン酸化反応の際に還元剤が存在しなくても自己リン酸化することも確認できたことから、還元剤は酵素反応ではなく HysA を活性型に変えるために必要だということも明らかとなった。これには、HysA のシステイン残基によるジスルフィド結合の形成が関与していることが示唆された

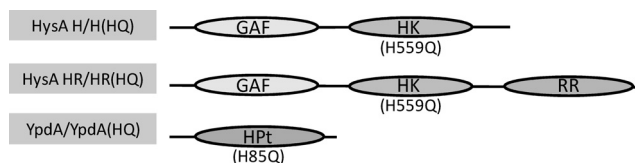


Fig 1.

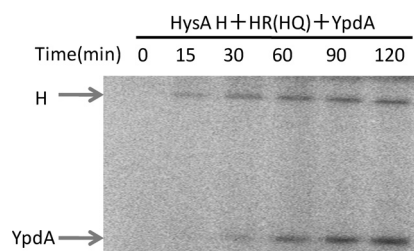


Fig 2.

ので、現在 HysA に Cys 変異を導入し、その活性を確認している。

## 2. 近縁種, *Aspergillus oryzae* における *hysA* オルソログの同定

*A. nidulans* における 15 種のヒスチジinkinナーゼのうち、*hysA* を含む 7 種はお互いに高い相同性があり、また *Aspergillus* 属にのみその存在が見いだされるヒスチジinkinナーゼである。*A. oryzae* において同様に分類されるヒスチジinkinナーゼ 5 種のうち *hysA* のように低酸素条件下で誘導されるヒスチジinkinナーゼを *hysA* と同様の方法で見だし、その機能の同定を試みた。

*hysA* オルソログを探索するため、*A. oryzae* に存在する 15 種類の HK すべてについて、さまざまな生育条件での発現レベルを、定量的 Real Time PCR により解析した。その結果、多くの HK (*AotcsB*, *Aohk2*, *AophkA*, *AophkB*, *AonikA*, *AofphA*, *Aohk8-a*, *Aohk8-b*, *Aohk8-d*, *Aohk8-e*, *Aohk9*) において栄養増殖を行う液体培養時に発現量が多く、液体培養から寒天培地へ移し無性生殖を誘導した場合、寒天培地上で酸素を制限した場合では発現量が抑えられることが明らかになった。*hysA* は酸素制限条件下においても発現が抑制されないという特徴を持っているが、*A. oryzae* において同様の発現様式を持つヒスチジinkinナーゼは認められなかったため、この解析では *hysA* オルソログの推定には至らなかった。しかし、本解析により、*A. oryzae* における HK の発現様式（栄養増殖時に多くの HK の発現が誘導される）は、*A. nidulans* での解析結果（無性生殖時に多くの HK の発現が誘導される）と異なることが明らかになった。すなわち、*A. oryzae* では *A. nidulans* と HK の発現様式が大きく異なると考えられる。

近年、*A. nidulans* において農薬存在下 *hysA* の発現量が増加することが報告された<sup>1)</sup>。そこで、農薬の添加による各 HK の発現量の変化を同様の方法で解析した結果、農薬の添加により発現量が減少する HK (*AotcsB*, *Aohk2*, *AonikA*, *AonikB*, *Aohk8-a*, *Aohk8-b*, *Aohk8-c*, *Aohk8*

-d, *Aohk9*) が多いなか、5 種類の HK (*AotcsA*, *AophkB*, *AonikC*, *AofphA*, *Aohk8-e*) において、農薬添加から 15 分後に 1.5 倍以上の発現量の増加が見られた。5 種類存在するファミリーの中で、*Aohk8-e* のみが農薬添加による発現量の増加を示したことから、*AoHK8-e* が *HysA* のオルソログであると推定された。

*Aohk8-e* が *HysA* オルソログであることを同定するため、*A. nidulans* において *Aohk8-e* を誘導的に過剰発現する株 (*alcA(p)::Aohk8-e*) を作製した。具体的には、*alcA* プロモーター下流に His-tag 配列 (6×CAC) の付加された *Aohk8-e* 構造遺伝子を連結した DNA フラグメントを、*A. nidulans*  $\Delta hysA$  株に導入した。これまでの解析により、*hysA* を過剰発現すると低酸素条件下において分生子形成が抑制されること、農薬に耐性になることが示されている。そこで、*alcA(p)::Aohk8-e* 株の酸素制限下における分生子形成、農薬耐性を解析した。その結果、*alcA(p)::Aohk8-e* 株では、野生株で見られる酸素制限による分生子形成の抑制が低下し、BPU1 株の 4 倍程度の分生子を形成した。また、*alcA(p)::Aohk8-e* 株は野生株と同程度の農薬感受性を示した。この結果から、*AoHK8-e* は *hysA* のオルソログではなく、低酸素条件下における分生子形成の低下を抑制する機能を持つことが示唆された。

本解析により、*hysA* オルソログの同定には至らなかった。しかし、*hysA* と低酸素応答において逆の機能を持つ可能性のある HK を同定できたことは、糸状菌における His-Asp リン酸リレー系の全貌を解明するうえで重要な知見である。

最後に本研究の遂行にあたりご援助いただきました(財)農芸化学研究奨励会に深く感謝いたします。

## 参考文献

- 1) Characterization of *NikA* histidine kinase and two response regulators with special reference to osmotic adaptation and asexual development in *Aspergillus nidulans*. Hagiwara D, Mizuno T, Abe K. Biosci Biotechnol Biochem. **73**, 1566–71 (2009)