

# 論文の要旨

氏名 河内護之

論文題目 Functional analysis of histone deacetylases in *Aspergillus oryzae*  
(麴菌 histone deacetylase の機能解析)

## 緒言

麴菌(*Aspergillus oryzae*)は、日本の伝統的な発酵産業に用いられている重要な糸状菌である。また、その高い安全性、優れたタンパク生産能やコウジ酸等の有用二次代謝物質生産能から、酵素や有用物質生産のホストとしても注目されている。

一方、ヒストンアセチル修飾は、エピジェネティックな制御機構の一つであり、モデル生物を中心に染色体レベルで遺伝子発現に大きな影響を与えることが明らかとされている。ヒストンの脱アセチル化は、histone deacetylase (HDAC)によって行われ、クロマチン構造の凝集に働きかけることで遺伝子発現を抑制する。HDACは、高等真核生物を始め幅広い生物で保存され、糸状菌にも保存されている。近年、糸状菌でのHDACの機能についても研究が行われるようになり、糸状菌の生育だけでなく二次代謝物生産や環境ストレス耐性に関係することが示されている。麴菌においてもHDACは重要であると予想されるが、全く知見がなかったことから研究を行うこととした。

## 第一章 麴菌 HDAC の系統解析とそれらの生育、分生子形成、二次代謝への関与

本章では、まず麴菌 HDAC ホモログ(AoHDAC)の検索と系統的解析、さらに AoHDAC 遺伝子破壊株の生育、分生子形成等の基本的表現型解析を行った。

麴菌 RIB40 株のゲノムに対して、出芽酵母及びヒトの既知 HDAC 配列をクエリーにし BLAST 検索を行った結果、11 個の AoHDAC 遺伝子が抽出された。系統解析の結果、AoHDAC 遺伝子群は、酵母や他の糸状菌と同様に class1~class3 に分類され、高等真核生物が保持する class4 HDAC を含んでいなかった。また、菌類特異的な sirtuin *hstD* 遺伝子を有しており、AoHDAC 遺伝子群は他の菌類と類似した進化をしていると考えられた。

これらの全 11 AoHDAC 遺伝子について破壊を試みたところ、10 遺伝子については破壊株が得られ、*hdaB*についてはヘテロカリオン破壊株(以下 *hdaB ht*)しか得られず、必須遺伝子である事が示唆された。これらの破壊株(*hdaB*については *hdaB ht*株)を用いて、基本培地によりプレート・液体培養での表現型について解析した。その結果、*hdaB ht*、 $\Delta hdaD$ 、 $\Delta hstD$ 株で、プレート培養で生育遅延、形態形成異常や分生子形成率の低下が見られた。また  $\Delta hdaD$ 株は、液体培養での菌体量低下も見られた。

糸状菌において分生子形成などの分化と二次代謝物生産は密接に関連していると考えられている。そこで、AoHDAC 遺伝子破壊株の二次代謝物生産について、コウジ酸生産性を指標として解析を行った。その結果  $\Delta hstD$ 株で、コウジ酸生産性が 200 倍上昇し、コウジ酸生産遺伝子の発現も上昇していた。また *hstD*は、ペニシリン生産でもコウジ酸と同様の結果が

得られた。菌類特異的 sirtuin *hstD* の生化学的機能については、出芽酵母で明らかにされているが、生理学上の機能はほとんど明らかではない。本章の解析により、*hstD* は菌類に特有の分生子形成と二次代謝物生産に関係することがはじめて明らかとなった。

糸状菌において、*laeA* 遺伝子は、二次代謝物生産と分化を制御する中心的な因子としてよく知られている。そこで、*laeA* の遺伝子発現について検討した結果、 $\Delta hstD$  株で高発現していることが明らかとなった。 $\Delta laeA / \Delta hstD$  二重破壊株、 $\Delta laeA / hstD$  高発現株、 $\Delta hstD / laeA$  高発現株を用いた遺伝学的な解析を行った結果、*hstD* は、*laeA* の上流で機能していることが示された。以上の解析結果により、菌類特異的 sirtuin *hstD* は、*laeA* の発現制御を介し糸状菌の二次代謝物生産と分化を制御していることが明らかとなった。

## 第二章 麴菌 HDAC 遺伝子破壊株の網羅的表現型解析

高等真核生物において HDAC は、生育や代謝以外にも幅広い細胞機能に関与することが知られている。そこで、本章では AoHDAC 遺伝子破壊株の網羅的な表現型解析を行った。

まず、AoHDAC 遺伝子破壊株のストレス耐性試験を行った結果、*hdaB ht* 株は、幅広いストレスに対し感受性を示した。したがって、*hdaB* の致死性の一因としてストレス全般への耐性低下が示唆された。また興味深いことに  $\Delta hdaA$  株は、液体培養時の浸透圧に対してのみ感受性を示した一方で  $\Delta hstD$  株は、プレート培養時の浸透圧のみ感受性を示した。したがって、プレート培養、液体培養で浸透圧ストレス耐性機構は異なり、それぞれプレート培養では *hstD* が、液体培養では *hdaA* が関係する事が示唆された。

続いて genotoxin、タンパク質合成阻害剤、細胞壁合成阻害剤等に対する耐性試験を行った結果、*hdaB ht*、 $\Delta hdaD$  株は、genotoxin と細胞壁合成阻害剤に、 $\Delta hstD$  株は、genotoxin に対する高い感受性を示した。これらの株では、染色体の維持や細胞壁合成に何らかの異常が生じているものと推察され、これらの異常は、*hdaB* の致死性や、 $\Delta hdaD$ 、 $\Delta hstD$  株の生育不良と関連していることが示唆された。

麴菌は、伝統醸造産業において「麴」として用いられることから、米麴上での生育や酵素生産についても解析を行った。その結果、*hdaB ht*、 $\Delta hdaD$  株では、プレート培養と同様に米麴上での生育が低下し、酵素生産にも影響する事が明らかとなった。また、 $\Delta hdaA$  株で新たに生育の低下が見られた。さらに  $\Delta hstD$  株では、生育には大きな違いが無く、酵素生産にのみ影響が見られ米麴上でのタンパク生産に影響することが示唆された。以上の解析により AoHDAC 遺伝子は、麴菌の幅広い表現型に影響することが明らかとなった。