

いのうえ たいし

氏名 () 井上 大志 ()

学位の種類 博士(農学)

学位記番号 農博第1246号

学位授与年月日 令和2年3月25日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項

研究科, 専攻 東北大学大学院農学研究科(博士課程)生物産業創成科学専攻

論文題目 *Aspergillus* 属糸状菌における解糖系酵素遺伝子の選択的プロモーターによる転写制御機構の解析

博士論文審査委員 (主査) 准教授 新谷 尚弘

教授 阿部 敬悦

教授 米山 裕

教授 五味 勝也

論文内容要旨

Aspergillus 属糸状菌における解糖系酵素遺伝子の
選択的プロモーターによる転写制御機構の解析

東北大学農学研究科
生物産業創成科学専攻

井上 大志

指導教員

新谷 尚弘 准教授

序論

真菌類の子囊菌門に属する *Aspergillus* 属糸状菌には、発酵産業に利用される産業用真菌やヒトの病原菌、穀物のカビ毒汚染原因菌が含まれ、それらは人間社会にも影響を及ぼす(1)。黄麹菌 *Aspergillus oryzae* は、代表的な産業用 *Aspergillus* 属糸状菌の一種であり、米のデンプンや大豆のタンパク質を分解する能力に優れていることから、日本において日本酒や味噌、醤油などの伝統的発酵食品の醸造に古くから利用されている(2)。また、その 1000 年に及ぶ醸造利用の歴史に裏付けられた安全性(3)や高いタンパク質分泌能力(4)、有機酸生産能力(5, 6)から、*A. oryzae* は食品や医薬品用途の有用物質生産宿主としての利用が期待されている。さらに、*A. oryzae* 自身は二次代謝産物をほとんど生産しないため、近年では異種二次代謝産物生産のためのクリーンホストとしての利用も広がりつつある(7, 8)。以上のようにより有用性の高い *A. oryzae* についての理解をさらに深めるため、*A. oryzae* に関する分子生物学的知見の蓄積が進められている。

解糖系は、ほとんどの生物に共通して存在する基本的な代謝系の一つであり、その異化経路(解糖)は、糖の分解に伴う基質レベルのリン酸化によって細胞のエネルギー獲得に寄与する。一方、代謝系の可逆反応を触媒する解糖系酵素群は、2分子のピルビン酸から1分子の糖を合成する同化経路(糖新生)に利用され、細胞構成成分の供給に寄与する。*A. oryzae* では、重要な遺伝子発現プロファイルとして、解糖系酵素遺伝子群がグルコース等の糖存在下において転写レベルで非常に高発現することが知られる(9, 10)。例えば、2-ホスホグリセリン酸とホスホエノールピルビン酸の可逆的な変換反応を触媒するエノラーゼをコードする遺伝子 *enoA* の転写産物量は、*A. oryzae* の代表的な高発現遺伝子である α -アミラーゼ遺伝子 *amyB* に匹敵し、細胞における全 mRNA 量の 3%(w/w)を占めると推定されている(11)。一般的に、代謝系を構成する酵素遺伝子の発現制御は、特定の環境において数時間から数日にわたり細胞の代謝流量を最適化するために重要であると考えられている。そのため、上述したような解糖系酵素遺伝子の発現制御について理解することは、発酵産業における *A. oryzae* の生育制御のための基礎的知見として重要である。また、解糖系酵素遺伝子群のプロモーターは、高発現プロモーターとして生物工学的に利用価値が高い。実際、*A. oryzae* では、有用タンパク質の商業生産に向けた *enoA* プロモーターの改変も試みられている(12)。以上に述べたことから、解糖系酵素遺伝子の発現制御に関わる研究は *A. oryzae* における代謝調節の理解や遺伝子工学的ツールの開発に重要である。しかしながら、その転写制御の詳細な分子機構に関する研究はあまり進んでいない。本博士論文では、重要な遺伝子発現情報の一つである転写開始点(TSSs)に着目した解析を通して、*Aspergillus* 属糸状菌の解糖系酵素遺伝子

における転写制御の分子機構の一端を解明することを目的とした。

第一章 麹菌 *Aspergillus oryzae* のエノラーゼ遺伝子の炭素源依存的選択的プロモーター (AP) による転写制御機構の解析

緒言

A. oryzae の解糖系酵素遺伝子の転写制御機構に関しては、エノラーゼ遺伝子 *enoA* において検討が進められている。主な成果として、当研究室の八巻、高間らによるゲノム配列データ(2)と Expressed Sequence Tag (EST) データ(13)の比較や 5' end Serial Analysis of Gene Expression (5' SAGE) データ(14)から、*enoA* には2つの TSSs (uTSS, dTSS) の存在が確認され (Fig. 1A,B)、それらがグルコース等の発酵性炭素源と酢酸等の非発酵性炭素源の違いによって使い分けられることが明らかにされている。また、当研究室の高間、田路らにより、酢酸培養条件下における uTSS からの *enoA* 発現誘導には、*A. nidulans* において糖新生に必要な酵素遺伝子の発現制御に関わると報告された転写因子 AcuK と AcuM (15, 16)のオーソログの関与が指摘されている。一般的に、環境条件の違いによって使い分けられる TSSs を含むプロモーターは選択的プロモーター (AP) と呼ばれ、真核生物の転写段階における重要な環境応答機構の一つとして知られる(17)。*A. oryzae* のゲノム中において、エノラーゼをコードする遺伝子は *enoA* 一つのみであり(11, 18)、AP は炭素源の違いに応じたエノラーゼ発現量調節において極めて重要な機構であることが予想される。また、AP の存在は真菌類において複数例報告されているが(19-24)、解糖系酵素遺伝子における AP の存在については報告例がなく、その特徴を明らかにすることは真菌類における AP の学術的理解を促進する上で重要である。本章では、*A. oryzae* の AP による *enoA* 転写制御の詳細な意義と分子機構を調べるとともに、*A. oryzae* の解糖系酵素遺伝子群における AP の存在について検討した。

結果と考察

遺伝子発現制御における一般的な AP の機能としては、1)環境変化に応答した転写のタイミングと量の制御、2)コードされるタンパク質の一次構造における多様性の創出、3)5' UTR の多様性創出とそれに基づく翻訳制御が指摘されている(17, 25-27)。*enoA* においては、AP 内の2つの TSSs に由来する転写産物間でコード領域の配列に違いが認められないため (Fig. 1B)、2)の機能は考えられない。また、*enoA* の AP における 3)の機能を検討するため、2つの TSSs に由来するそれぞれの 5' UTR 配列を相互に置換した *enoA* プロモーターの活性を評

価したが、野生型と比較して有意な活性変化は認められなかった。したがって、*enoA* の AP においては 1) の機能のみが重要であると考えられた。そこで、5 種類の炭素源 (グルコース、フルクトース、グリセロール、酢酸、エタノール) 存在下における *enoA* の TSSs 使用率と転写産物量の関連性を調べたところ、糖炭素源存在条件における dTSS 由来の転写誘導はグルコース条件、非糖類系炭素源存在条件における uTSS 由来の転写誘導は酢酸条件でそれぞれ最も強く、さらにグルコース条件における dTSS 由来の転写誘導は酢酸条件における uTSS 由来のものよりも強いことが示唆された (Fig. 1B-E)。以上より、AP による転写制御は、異なる炭素源の種類に応答した *enoA* 発現量の調節に関与することが考えられた。

AP による遺伝子発現量制御の意義を知るためには、関連する転写因子の機能を明らかにすることが重要である。そこで、初めに *enoA* プロモーター内に存在するシスエレメントの同定を目指した。*A. oryzae* を含む複数の *Aspergillus* 属糸状菌のエノラーゼ遺伝子上流配列を用いた MEME 解析(28)を行ったところ、2 つのコンセンサス配列(CE_1、CE_2)が見出された (Fig. 2A,B)。*enoA* の uTSS 上流に位置する CE_1 内には、上述の転写因子 AcuK/AcuM の推定結合モチーフが含まれており (Fig. 2A,B)、AcuK/AcuM に着目した各種再解析を行った結果、これらの転写因子が酢酸条件における *enoA* 発現に関与することが改めて示された (Fig. 2C-F)。一方、CE_2 の欠失変異や CE_2 配列に部位特異的変異を導入したプロモーター活性を評価したところ、グルコース条件において有意なプロモーター活性の低下を示した (Fig. 2G,H)。以上より、*enoA* プロモーターのシスエレメントは CE_1 と CE_2 内に含まれることが示唆された。

enoA の uTSS が使用される際の 5' UTR 内では、440 bp に及ぶ長大な領域がイントロンとしてスプライシングされる (Fig. 1B, D)。このイントロンの機能を検討するため、スプライス部位における部位特異的変異とイントロン欠失変異をそれぞれ有する *enoA* プロモーター活性の評価とレポーター遺伝子の転写産物解析を行った (Fig. 3A-D)。その結果、イントロンのスプライシングは酢酸条件における uTSS 由来の転写産物の正常な翻訳に必要であることに加え、イントロン配列が uTSS 由来の転写産物量増加に関与することが示唆された。さらに、イントロン欠失と AcuK/AcuM 結合モチーフ変異を組み合わせたプロモーターの活性は酢酸条件においてほとんど消失したことから (Fig. 3E)、イントロン配列と AcuK/AcuM による uTSS 由来の転写量増加はそれぞれ独立した機構によるものであり、それらの機構は酢酸条件における *enoA* の遺伝子発現に必要であることが考えられた。

enoA における AP の一般性に関する知見を得るため、*enoA* 以外の解糖系酵素遺伝子群における AP の有無を、EST データと 5' SAGE データ、さらにグルコースまたは酢酸培養条件

における Rapid Amplification of 5' cDNA Ends (5' RACE) 解析に基づいて検討した。解糖と糖新生に必要な 11 の酵素遺伝子とピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子 *pycA* について調べた結果、アルドラーゼ遺伝子 *fbaA* と *pycA* において 2 つの明瞭な TSSs の使用が認められ、いずれも 5' UTR 内にイントロンの存在が示唆された (Fig. 4A-C)。 *fbaA* は、 *enoA* と類似した炭素源の違いに依存した TSSs 選択パターンを示し (Fig. 4B)、 *pycA* の TSSs 選択パターンは *enoA* や *fbaA* とは逆の傾向を示した (Fig. 4C)。他の遺伝子においても、5' UTR 内イントロンの存在や複数の TSSs の使用が認められるものが含まれていたが、炭素源の違いによる TSSs の厳密な使い分けは認められなかった (Fig. 4A)。 *fbaA* のプロモーター上には、uTSS 上流付近に 1 つの AcuK/AcuM の結合モチーフ、dTSS の上流付近に 2 つの *enoA* における CE_2 内の推定シスエレメント配列がそれぞれ存在している (Fig. 5A)。これらの配列への部位特異的変異導入が *fbaA* プロモーター活性に及ぼす影響を調べた結果、グルコースまたは酢酸培養条件においてそれぞれの配列因子が *fbaA* 発現量増加に関与することが示唆された (Fig. 4B-E)。以上より、AP による転写制御は全ての解糖系酵素遺伝子に共通するものではないものの、 *enoA* 特異的なものではないことが明らかとなった。また、 *fbaA* の AP による転写制御は *enoA* のものと類似した機構であることが考えられた。

第二章 転写開始点の比較解析から探る *Aspergillus* 属糸状菌間の解糖系酵素遺伝子群の転写制御における多様性

緒言

これまでに 350 種以上が報告されている *Aspergillus* 属糸状菌は、最も多様性を示す真菌群の一つといわれており、その多様化の根底にある分子機構の解明は学術的に興味深い課題の一つである (1, 29)。 *Aspergillus* 属糸状菌のそれぞれの種は、それらが資化可能な炭素源の種類において多様性を示すことから、上述の課題解決の一環として一次代謝遺伝子の多様性について主に比較ゲノミクス解析に基づいた研究が進んでいる (18, 29)。一方、 *Aspergillus* 属糸状菌においては、同一の炭素源種に対してもその資化能力に差が認められる。例えば、 *A. oryzae* のグルコースに対する資化速度と生育速度は、モデル糸状菌である *Aspergillus nidulans* やクエン酸生産菌である *Aspergillus niger* に比べて高いことが知られている (18, 29)。この違いに関わる分子機構の解明は、 *Aspergillus* 属糸状菌の一次代謝の多様性を理解するだけでなく、発酵産業における *Aspergillus* 属糸状菌の高度利用を考える上でも重要であるが、その詳細な解析は進んでいない。一方、AP は真核生物の転写段階における

重要な環境応答機構であるが、動物や植物では種間における転写制御の多様化に AP が関連する可能性が指摘されている(30-33)。例えば、ヒトやマウス等の哺乳類ではほとんど全ての遺伝子に組織細胞種や発生段階の違いに応答する AP が認められるが(34)、半数以上の遺伝子において AP における TSSs 使用様式が 2 種間で異なることが報告されている(33)。しかし、真菌類では種間における AP の比較解析例自体が報告されておらず、AP の進化的意義の理解は動物や植物に比べて遅れているのが現状である。本章では、解糖系酵素遺伝子の AP における TSSs の比較解析により、*Aspergillus* 属糸状菌間の AP の TSSs 使用法における多様性を検討した。また、解糖系酵素遺伝子群における AP 多様化の意義と分子機構に検討を加えた。

結果と考察

enoA の AP が *Aspergillus* 属糸状菌間で保存されているかどうかを検討するため、*A. nidulans*、泡盛や焼酎の醸造に用いられる黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* (*A. niger* の類縁菌)、*Aspergillus* 属糸状菌と近縁な *Penicillium* 属糸状菌の一種である *Penicillium chrysogenum* の 3 種において、グルコースまたは酢酸 (*A. luchuensis* の場合はエタノール) 培養条件下でエノラーゼ遺伝子の 5' RACE 解析を行った。その結果、3 種全てにおいて明瞭な 2 つの TSS (uTSS, dTSS) と 5' UTR 内のイントロンの存在が認められたが、グルコース培養条件における TSSs 使用様式は *A. oryzae* のものとは異なることが示された (Fig. 6A, *A. luchuensis* と *P. chrysogenum* のデータは省略)。*A. nidulans* のエノラーゼ遺伝子 *acuN* について、TSSs 使用率と転写産物量の関連性を評価したところ、糖類系炭素源存在下において dTSS よりも uTSS の方が優先的に使用されており、さらに *A. oryzae* において認められたグルコース条件特異的な高発現誘導が *A. nidulans* では認められなかった (Fig. 6B-D)。以上より、種間で異なる AP の TSSs 使用法が各種炭素源条件における転写産物量パターンの違いと関連することが考えられた。

A. oryzae と *A. nidulans* 間のグルコースと酢酸培養条件下における転写量比パターンと AP の多様性を網羅的に検討するため、Cap Analysis Gene Expression(CAGE)法(35)によるトランスクリプトームデータを取得し、転写産物量と TSSs に関する比較解析を行った。一次代謝 (解糖、糖新生、ピルビン酸代謝、TCA サイクル、ペントースリン酸回路) に関連する 55 のオーソログな関係にある遺伝子(18)について、グルコースと酢酸培養条件下における転写量比パターンを 2 種間で比較したところ、*A. nidulans* と比較して *A. oryzae* において、解糖系酵素遺伝子群がグルコース条件でより高発現する傾向が認められた (Fig. 7A-C, Table1)。一方、7 遺伝子において、2 種間で異なる TSSs の使用様式が認められ、その内 5 遺伝子は

エノラーゼ遺伝子を含む解糖系酵素遺伝子であった (Table2)。以上の結果から、*A. oryzae* の特徴的な解糖系酵素遺伝子群のグルコース条件における高発現には、AP における TSSs 使用様式の多様化が関連することが考えられた。

A. oryzae のグルコース培養条件における解糖系酵素遺伝子群の高発現の意義を検討するため、*A. oryzae* のグルコース資化特性と *enoA* の dTSSs 由来の高発現機構の関連性を調べた。まず、*A. oryzae* と *A. nidulans* の最少培地におけるバッチ培養での生育とグルコース資化特性を比較したところ、*A. oryzae* においてより高い生育速度とグルコース消費速度が認められ、さらに *A. oryzae* では *A. nidulans* において見られなかった培養液の一時的な pH 低下が観察された (Fig. 8)。以上の資化特性における *enoA* 高発現の意義を検討するため、染色体上の *enoA* プロモーターを CE_2 内推定シスエレメントに変異導入したプロモーターに置換することで *enoA* 低発現 *A. oryzae* 株を取得し、そのグルコース資化特性を調べた。その結果、*enoA* 低発現株では生育速度とグルコース消費速度が低下するとともに、増殖過程における培養液の pH 低下が抑制された。以上の結果から、*A. nidulans* には見られない dTSS の優先的な使用に由来するグルコース存在下の *enoA* 高発現は、*A. oryzae* の素早い生育とグルコース消費に重要であることが示唆された。さらに、エノラーゼ遺伝子の AP における TSSs 使用様式の種間の変化がプロモーター配列の違いによるものかどうかを調べるため、染色体上の *enoA* プロモーターを *A. nidulans* の *acuN* プロモーターに置換した *A. oryzae* 株を作製した。*acuN* プロモーター置換株は、グルコースと酢酸の両培養条件下において野生型の *A. oryzae* 株と同等の生育を示し、両培養条件における 2 つの TSSs 使用法と転写産物量比パターンに野生型との顕著な差は認められなかった。以上より、*Aspergillus* 属糸状菌におけるエノラーゼ遺伝子の AP における TSSs 使用様式の多様化は、種間におけるプロモーター配列の変化とは異なる機構により起こったことが考えられた。

結論

本研究では、*Aspergillus* 属糸状菌における解糖系遺伝子の選択的プロモーター (AP) による転写制御について解析を行った。第一章では、日本の醸造産業に重要な黄麹菌 *A. oryzae* において、エノラーゼ遺伝子 *enoA* の炭素源の違いに応答した発現量調節に重要と思われた AP による転写制御機構の一端が解明された。また、同様の分子機構がアルドラーゼ遺伝子 *fbaA* の AP による転写制御にも働いている可能性が示された。第二章では、*Aspergillus* 属糸状菌の解糖系酵素遺伝子において、AP の TSSs 使用様式が種間で異なることが示唆され、その機構が *A. oryzae* の特徴的なグルコース資化特性に重要である可能性が示された。以上

の研究成果は、*A. oryzae* の一次代謝における転写制御の役割を理解するための基礎的知見になるとともに、*Aspergillus* 属糸状菌の遺伝子発現制御における進化機構について一つの新しい知見をもたらしたものとする。

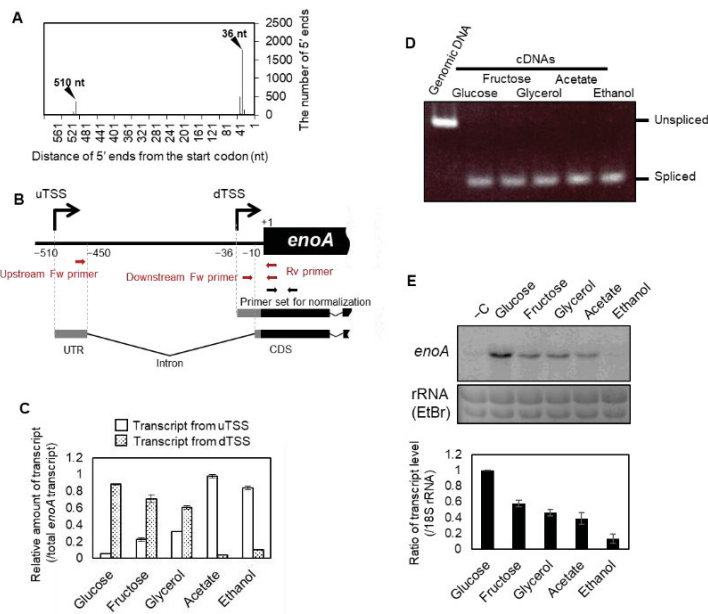


Fig. 1 *enoA* alternative TSS use depends on carbon source.

a *enoA* 5' end clones obtained by 5' SAGE.

b Schematic representation of two TSSs in *enoA* and the primer binding sites used for qRT-PCR analysis.

c uTSS or dTSS-derived *enoA* transcript levels depending on the carbon source.

d *enoA* RT-PCR analysis.

e Top panel: Northern blot analysis on *A. oryzae enoA*. Bottom panel: *enoA* transcript level quantification. The *enoA* transcript signal intensity was normalized to the 18S rRNA signal. The amount of *enoA* transcript in glucose conditions was set to 1.0.

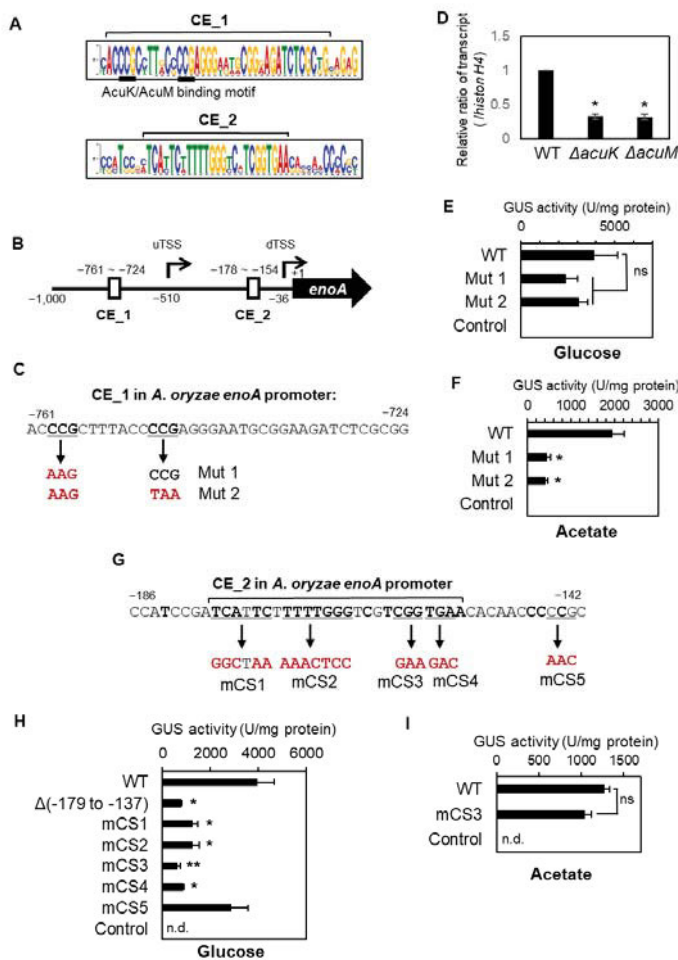


Fig. 2 Highly conserved sequences in enolase-encoding gene promoters among *Aspergilli*

a Two highly conserved sequences within enolase-encoding gene promoters in *Aspergilli*.

b Schematic representation of the CE_1 and CE_2 positions in the *A. oryzae enoA* promoter.

c The CE_1 sequence in the *A. oryzae enoA* promoter and mutations used for the GUS reporter assay.

d *enoA* transcription levels in wild-type, Δ *acuK*, and Δ *acuM* strains in the presence of acetate. *P*-values were calculated by unpaired Student's *t*-test. *: *P* < 0.05 versus WT

e and **f** GUS activity of the transformants harboring GUS gene (*uidA*) expression constructs in glucose (**e**) or acetate (**f**) culture conditions. Values are the means of three independent experiments. Error bars represent the standard errors. *P*-values were calculated by unpaired Student's *t*-test. *: *P* < 0.05, **: *P* < 0.01 versus WT.

g The CE_2 sequence in the *A. oryzae enoA* promoter and mutations used for GUS reporter assays.

h and **i** GUS activity of transformants harboring GUS gene (*uidA*) expression constructs in glucose (**h**) or acetate (**i**) culture conditions. *P*-values were calculated by unpaired Student's *t*-test. *: *P* < 0.05, **: *P* < 0.01 versus WT.

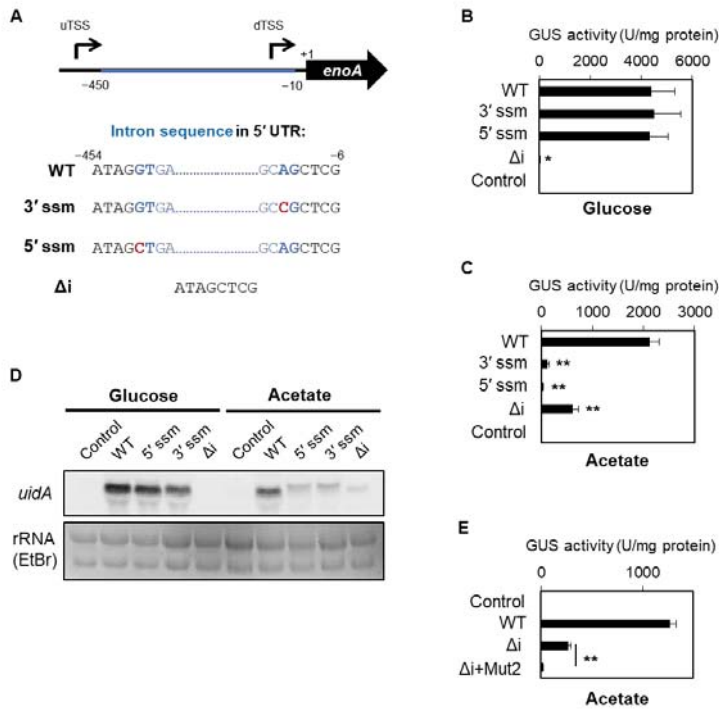


Fig. 3 Functional analysis of 5' UTR intron in *enoA* promoter

a Schematic representation of 5' UTR intron in the *A. oryzae enoA* promoter and mutations used for the GUS reporter assay. Intron sequence is shown in blue. 5' and 3' splice sites of the intron sequence are represented in bold blue and the base substitution of mutations is shown in bold red.

b and **c** GUS activity of the transformants harboring GUS gene (*uidA*) expression constructs in glucose (**b**) or acetate (**c**) culture conditions. *uidA* was expressed by the *enoA* promoter with or without mutations in the 5' UTR intron. *P*-values were calculated by unpaired Student's *t*-test. *: *P* < 0.05, **: *P* < 0.01 versus WT.

d Northern blot analysis on *uidA*.

e GUS activity of the transformants harboring GUS gene (*uidA*) expression constructs in acetate culture condition. *P*-values were calculated by Student's *t*-test. **: *P* < 0.01.

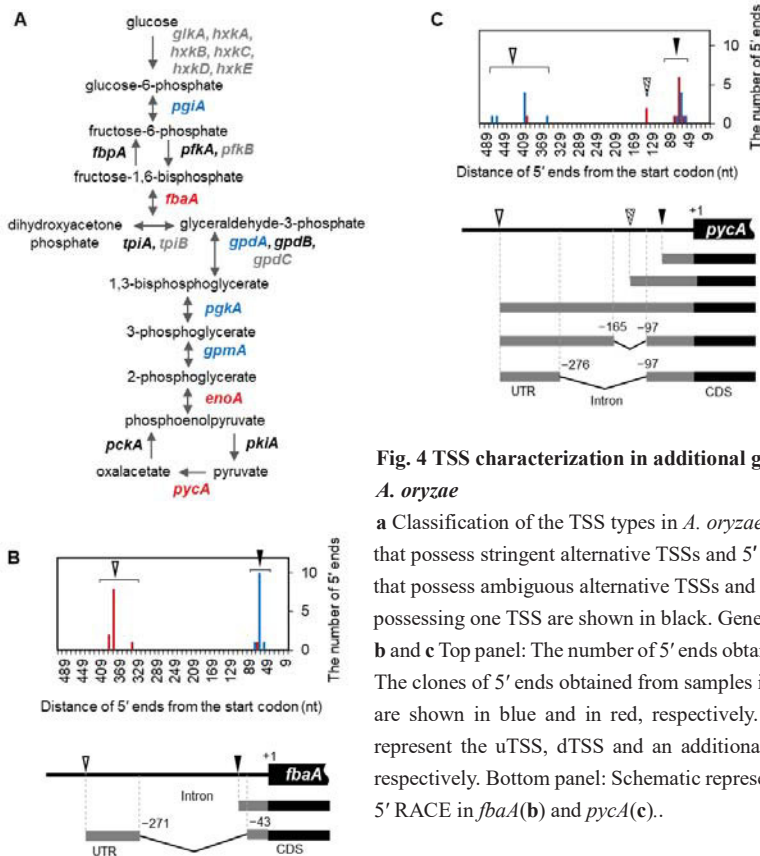


Fig. 4 TSS characterization in additional glycolytic and gluconeogenic genes in *A. oryzae*

a Classification of the TSS types in *A. oryzae* glycolytic/gluconeogenic genes. Genes that possess stringent alternative TSSs and 5' UTR intron are shown in red and genes that possess ambiguous alternative TSSs and 5' UTR intron are shown in blue. Genes possessing one TSS are shown in black. Genes that were not tested are shown in grey.

b and **c** Top panel: The number of 5' ends obtained by 5' RACE in *fbaA* (**b**) and *pycA* (**c**). The clones of 5' ends obtained from samples in glucose and acetate culture conditions are shown in blue and in red, respectively. White, black and hatched arrowheads represent the uTSS, dTSS and an additional TSS within an intron in the 5' UTR, respectively. Bottom panel: Schematic representation of 5' end transcripts obtained by 5' RACE in *fbaA* (**b**) and *pycA* (**c**).

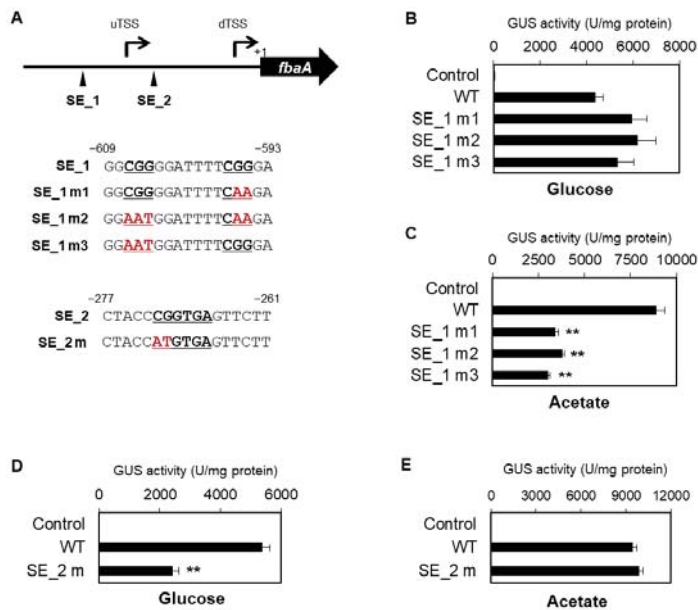


Fig. 5 Similar elements to the putative cis-elements of *enoA* in *A. oryzae*

a Schematic representation of similar elements (SE) to putative cis-elements of *enoA* in the *A. oryzae fbaA* promoter and mutations used for the GUS reporter assay. SE sequence is shown in bold and underlined. The base substitution of mutations is shown in bold red.

b-e GUS activity of the transformants harboring GUS gene (*uidA*) expression constructs in glucose (**b, d**) or acetate (**c, e**) culture conditions. P-values were calculated by unpaired Student's t-test. **: $P < 0.01$ versus WT.

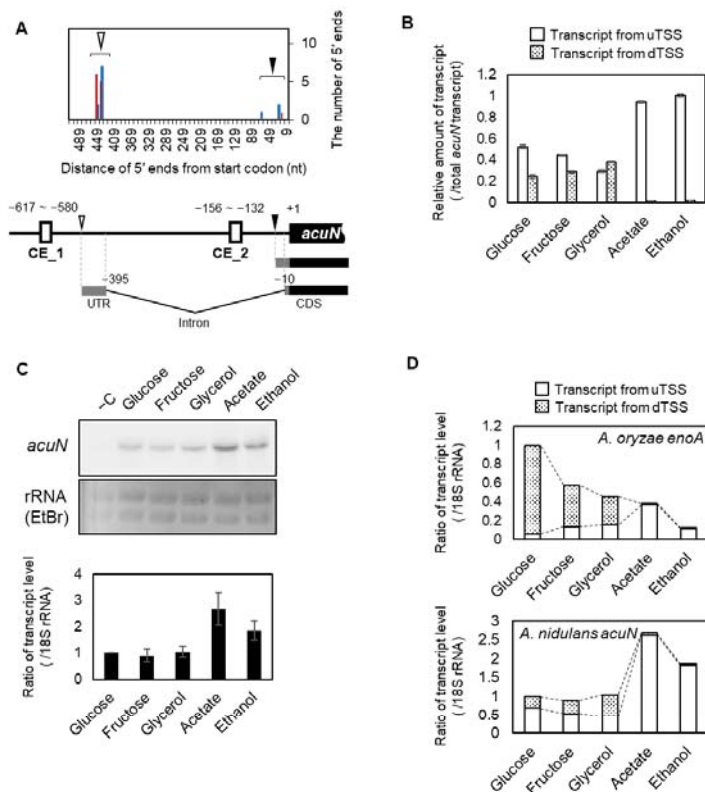


Fig. 6 Characterization of distinct TSS usage in response to carbon source in *A. nidulans acuN*

a Top panels: The number of *acuN* 5' ends obtained by 5' RACE. The 5' end clones obtained from samples in glucose and acetate culture conditions are shown in blue and in red, respectively. White and black arrowheads represent the uTSS and dTSS, respectively. Bottom panel: Schematic representation of 5' end transcripts obtained by 5' RACE.

b uTSS- or dTSS-derived *acuN* transcript depending on the carbon source species. Primer sets were designed using the same strategy as in Fig. 1B.

c Top panel: Northern blot analysis of *A. nidulans acuN*. Bottom panel: *acuN* transcript level quantification. The *acuN* transcript signal intensity was normalized to the 18S rRNA signal. The amount of *acuN* transcript in glucose conditions was set to 1.0.

d Total transcript levels and the usage pattern of alternative TSS in *A. oryzae enoA* (top panel) and *A. nidulans acuN*

(bottom panel) under glycolytic and gluconeogenic conditions. The ratio of total transcript level in *enoA* and *acuN* is same as Fig. 1E and Fig. 6C, respectively. The ratio of each transcript derived from each TSSs in total *enoA* and *acuN* transcripts was estimated from the qRT-PCR results in Fig. 1B and Fig. 6B, respectively.

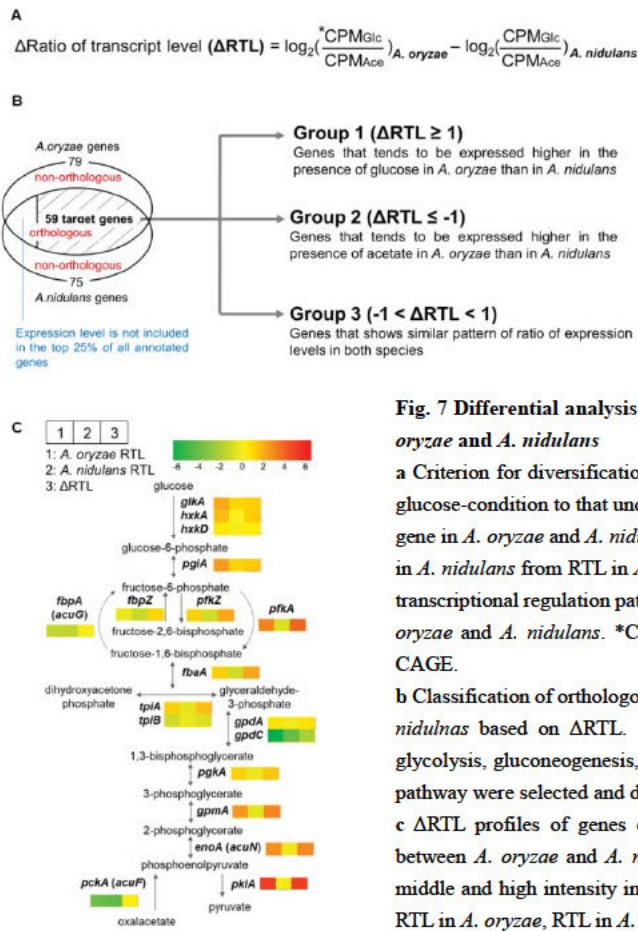


Fig. 7 Differential analysis of ratio of transcript level (RTL) pattern between *A. oryzae* and *A. nidulans*

a Criterion for diversification in gene expression. The ratio of transcript level under glucose-condition to that under acetate-condition (RTL) was calculated in each target gene in *A. oryzae* and *A. nidulans*. Then, ΔRTL was calculated by subtraction of RTL in *A. nidulans* from RTL in *A. oryzae* as the criterion for evaluating diversification in transcriptional regulation pattern in glucose- and acetate-culture condition between *A. oryzae* and *A. nidulans*. *CPM: Counts per million, a unit for expression level in CAGE.

b Classification of orthologous primary metabolic gene sets between *A. oryzae* and *A. nidulans* based on ΔRTL . Highly expressing orthologous gene sets relevant to glycolysis, gluconeogenesis, pyruvate catabolism, TCA cycle and pentose phosphate pathway were selected and divided into three groups.

c ΔRTL profiles of genes encoding enzymes for glycolysis and gluconeogenesis between *A. oryzae* and *A. nidulans*. Green, yellow, red in heat maps indicate low, middle and high intensity in each values, respectively. Columns 1, 2 and 3 represent RTL in *A. oryzae*, RTL in *A. nidulans*, and ΔRTL , respectively.

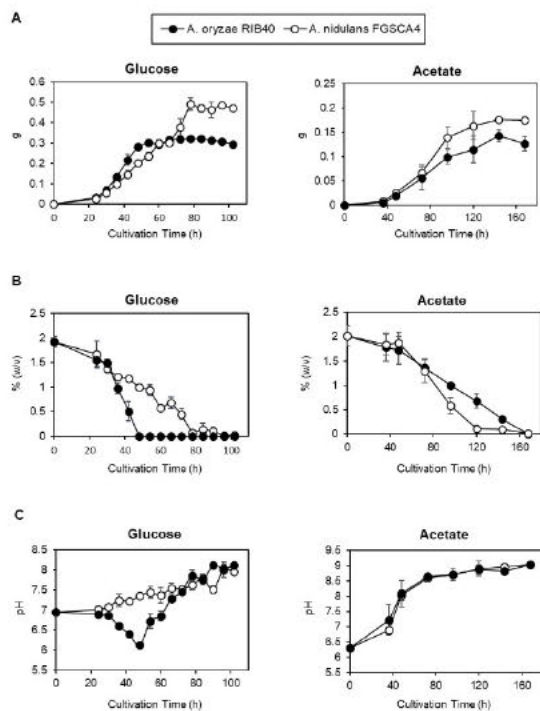


Fig. 8 Characteristic of glucose and acetate assimilation during batch submerged cultivation in *A. oryzae* and *A. nidulans*

a-c Dried mycelial weight (a), glucose or acetate concentration in culture (b) and pH in culture (c) during batch cultivation in submerged medium. Conidia (10^7) of *A. oryzae* RIB40 or *A. nidulans* FGSCA4 were cultivated in MM containing 2% glucose or 2% sodium acetate. Values are the means of three independent experiments. Error bars represent the standard errors.

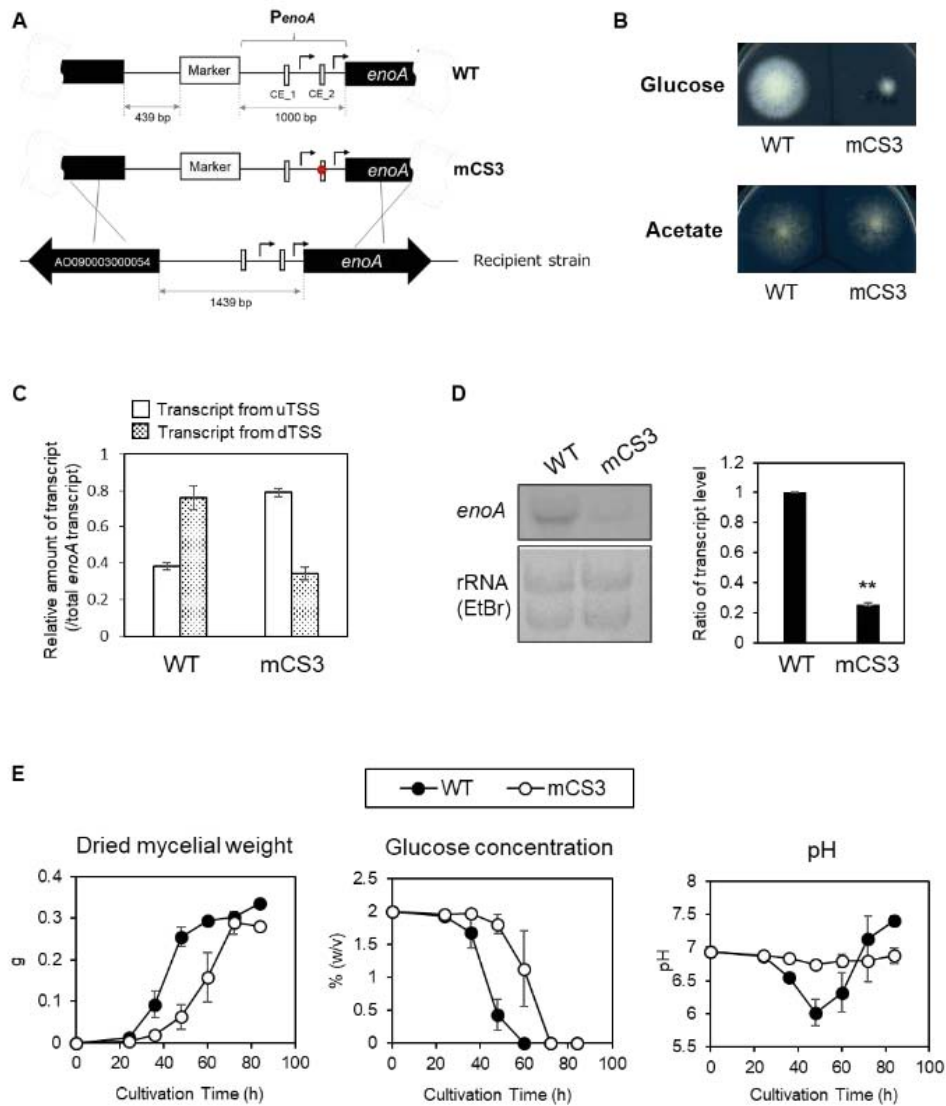


Fig. 9 The effect of putative cis-element mutation in *enoA* promoter on glucose assimilation

a Schematic representation of the replacement of native *enoA* promoter with the promoter harboring mCS3 shown in Fig. 2G. Position of mCS3 mutation is shown in a red dot

b Growth on agar plates with glucose or acetate.

c uTSS or dTSS-derived *enoA* transcript levels depending on the carbon source.

d Left panel: Northern blot analysis on *enoA*. Right panel: Quantification of *enoA* transcript levels. The *enoA* transcript signal intensity was normalized to the 18S rRNA signal. The amount of *enoA* transcript in glucose conditions was set to 1.0. *P*-values were calculated by unpaired Student's *t*-test. **: $P < 0.01$ versus WT.

e Dried mycelial weight (left), glucose concentration in culture (middle) and pH in culture (right) during batch cultivation in submerged medium. Conidia (10^7) were cultivated in MM containing 2% glucose. 2% glucose or 2% sodium acetate.

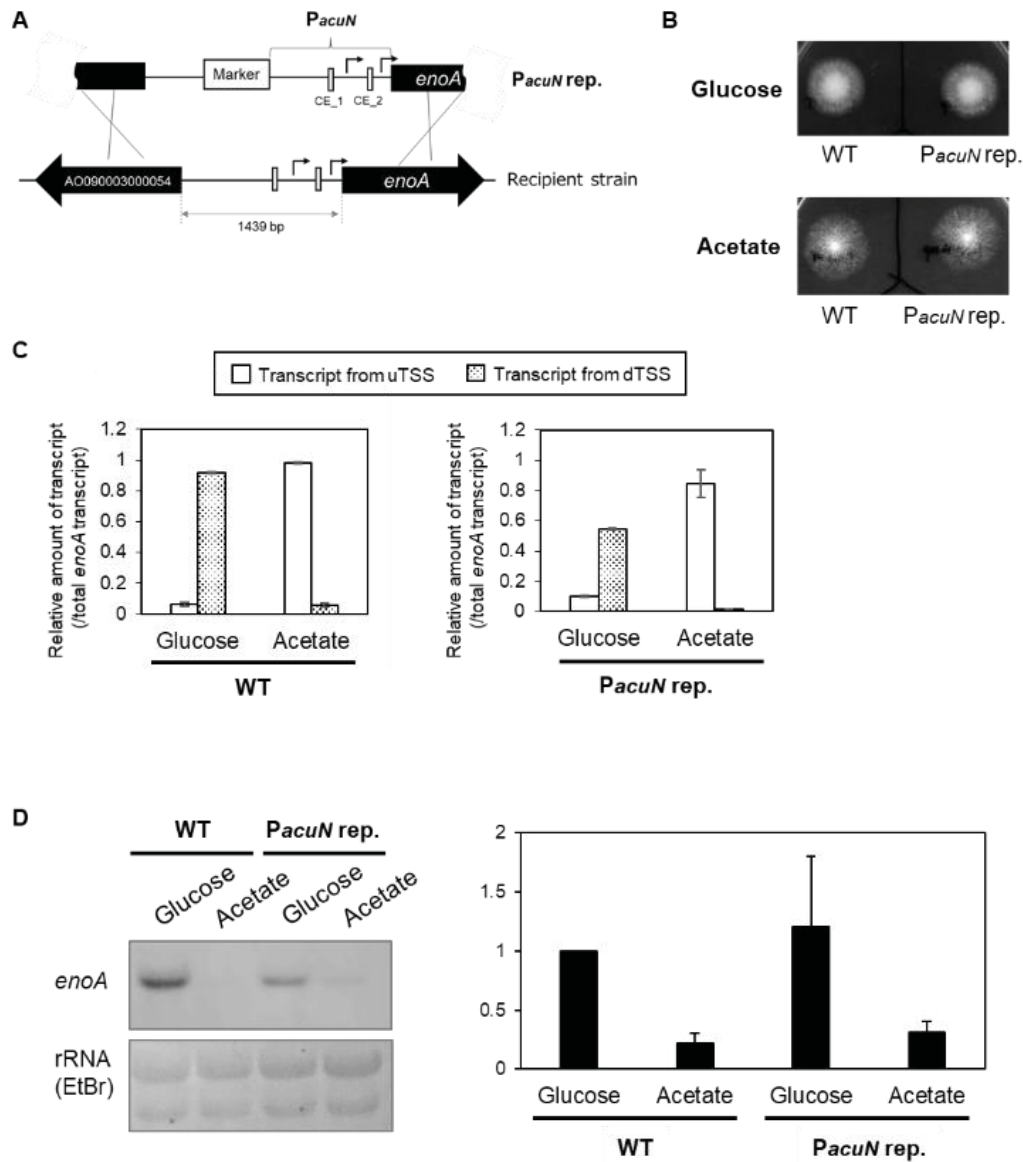


Fig. 10 Replacement of *enoA* promoter with *acuN* promoter in *A. oryzae*

a Schematic representation of the replacement of native *enoA* promoter with the *acuN* promoter in *A. oryzae*

b Growth on agar plates with glucose or acetate.

c uTSS or dTSS-derived *enoA* transcript levels depending on the carbon source. Primer sets were designed using the same strategy as in Fig. 1B.

d Left panel: Northern blot analysis on *enoA*. Right panel: Quantification of *enoA* transcript levels. The *enoA* transcript signal intensity was normalized to the 18S rRNA signal. The amount of *enoA* transcript in glucose conditions in WT strain was set to 1.0.

	$\Delta RTL \geq 1$	$\Delta RTL \leq -1$	$-1 < \Delta RTL < 1$	Total
Glycolysis / Gluconeogenesis	12 (71, 67)	1 (10, 6)	5 (16, 28)	18
Pyruvate catabolism	2 (12, 18)	3 (30, 27)	6 (19, 54)	11
TCA / Glyoxylate cycle	2 (12, 10)	4 (40, 19)	15 (47, 71)	21
Pentose phosphate pathway	1 (6, 11)	2 (20, 22)	6 (19, 67)	9
Total	17 (100, 29)	10 (100, 17)	32 (100, 54)	59

Table1. The number of orthologous gene set in each ΔRTL category The left and right number in parentheses indicates the percentage ratio to the bottom and right total number, respectively. The highest percentage ratios to the bottom and right total number are shown in red.

Metabolic pathway	Enzyme	Gene ID	Gene name	Putative TSSs number	CPM (Glucose)	CPM (Acetate)	RTL	ΔRTL
Glycolysis	Enolase	AO090003000055	<i>enoA</i>	2	1942.0	276.9	2.81	3.03
		AN5746	<i>acuN</i>	2	1108.3	1290.5	-0.22	
	Aldolase	AO090003000725	<i>fbaA</i>	2	764.7	336.2	1.19	2.28
		AN2875	<i>fbaA</i>	2	551.3	1181.2	-1.10	
	Phospho fructokinase 1	AO090003001390	<i>pfkA</i>	2	104.0	11.4	3.19	3.99
		AN3223	<i>pfkA</i>	1	169.5	293.9	-0.79	
	Phospho fructokinase 2	AO090012000976	<i>pfkZ</i>	1	29.8	13.1	1.18	2.24
		AN5144	<i>pfkZ</i>	2	106.4	221.3	-1.06	
Pyruvate kinase	AO090005001556	<i>pkiA</i>	1	850.6	24.2	5.14	5.12	
	AN5210	<i>pkiA</i>	2	304.7	300.6	0.02		
TCA cycle	Malate dehydrogenase	AO090701000013	<i>mdhA</i>	2	239.4	1221.5	-2.35	-1.84
		AN6499	<i>mdhC</i>	2	1179.4	1681.5	-0.51	
Pyruvate catabolism	Pyruvate carboxylase	AO090023000801	<i>pycA</i>	2	676.1	1488.6	-1.14	-0.951
		AN4462	<i>pycA</i>	2	392.4	446.9	-0.19	

Table2. The list of orthologous gene set that shows different TSSs usage between *A. oryzae* and *A. nidulans* The number began with AO and AN shows *A. oryzae* Gene ID and *A. nidulnas* Gene ID, respectively.

References:

1. Gibbons JG, Rokas A. 2013. The function and evolution of the *Aspergillus* genome. *Trends in Microbiology* **21**:14-22.
2. Machida M, Asai K, Sano M, Tanaka T, Kumagai T, Terai G, Kusumoto KI, Arima T, Akita O, Kashiwagi Y, Abe K, Gomi K, Horiuchi H, Kitamoto K, Kobayashi T, Takeuchi M, Denning DW, Galagan JE, Nierman WC, Yu JJ, Archer DB, Bennett JW, Bhatnagar D, Cleveland TE, Fedorova ND, Gotoh O, Horikawa H, Hosoyama A, Ichinomiya M, Igarashi R, Iwashita K, Juvvadi PR, Kato M, Kato Y, Kin T, Kokubun A, Maeda H, Maeyama N, Maruyama J, Nagasaki H, Nakajima T, Oda K, Okada K, Paulsen I, Sakamoto K, Sawano T, Takahashi M, Takase K, Terabayashi Y, Wortman JR, et al. 2005. Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature* **438**:1157-1161.
3. Machida M, Yamada O, Gomi K. 2008. Genomics of *Aspergillus oryzae*: Learning from the History of Koji Mold and Exploration of Its Future. *DNA Research* **15**:173-183.
4. Oda K, Kakizono D, Yamada O, Iefuji H, Akita O, Iwashita K. 2006. Proteomic analysis of extracellular proteins from *Aspergillus oryzae* grown under submerged and solid-state culture conditions. *Applied and Environmental Microbiology* **72**:3448-3457.
5. Brown SH, Bashkirova L, Berka R, Chandler T, Doty T, McCall K, McCulloch M, McFarland S, Thompson S, Yaver D, Berry A. 2013. Metabolic engineering of *Aspergillus oryzae* NRRL 3488 for increased production of L-malic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology* **97**:8903-8912.
6. Yang L, Lubeck M, Lubeck PS. 2017. *Aspergillus* as a versatile cell factory for organic acid production. *Fungal Biology Reviews* **31**:33-49.
7. Sakai K, Kinoshita H, Nihira T. 2012. Heterologous expression system in *Aspergillus oryzae* for fungal biosynthetic gene clusters of secondary metabolites. *Applied Microbiology and Biotechnology* **93**:2011-2022.
8. Yoshimi A, Yamaguchi S, Fujioka T, Kawai K, Gomi K, Machida M, Abe K. 2018. Heterologous Production of a Novel Cyclic Peptide Compound, KK-1, in *Aspergillus oryzae*. *Frontiers in Microbiology* **9**:12.
9. Nakajima K, Kunihiro S, Sano M, Zhang Y, Eto S, Chang YC, Suzuki T, Jigami Y, Machida M. 2000. Comprehensive cloning and expression analysis of glycolytic genes from the filamentous fungus, *Aspergillus oryzae*. *Current Genetics* **37**:322-327.
10. Maeda H, Sano M, Maruyama Y, Tanno T, Akao T, Totsuka Y, Endo M, Sakurada R, Yamagata Y, Machida M, Akita O, Hasegawa F, Abe K, Gomi K, Nakajima T, Iguchi Y. 2004. Transcriptional analysis of genes for energy catabolism and hydrolytic enzymes in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae* using cDNA microarrays and expressed sequence tags. *Applied Microbiology and Biotechnology* **65**:74-83.
11. Machida M, Chang YC, Manabe M, Yasukawa M, Kunihiro S, Jigami Y. 1996. Molecular cloning of a cDNA encoding enolase from the filamentous fungus, *Aspergillus oryzae*. *Current Genetics* **30**:423-431.
12. Tsuboi H, Koda A, Toda T, Minetoki T, Hirotsune M, Machida M. 2005. Improvement of the *Aspergillus oryzae* enolase promoter (P-enoA) by the introduction of cis-element repeats. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **69**:206-208.
13. Akao T, Sano M, Yamada O, Akeno T, Fujii K, Goto K, Ohasi-Kunihiro S, Takase K, Yasukawa-Watanabe M, Yamaguchi K, Kurihara Y, Maruyama JI, Juvvadi PR, Tanaka A, Hata Y, Koyama Y, Yamaguchi S, Kitamoto N, Gomi K, Abe K, Takeuchi M, Kobayashi T, Horiuchi H, Kitamoto K, Kashiwagi Y, Machida M, Akita O. 2007. Analysis of expressed sequence tags from the fungus *Aspergillus oryzae* cultured under different conditions. *DNA Research* **14**:47-57.

14. Hashimoto S, Suzuki Y, Kasai Y, Morohoshi K, Yamada T, Sese J, Morishita S, Sugano S, Matsushima K. 2004. 5'-end SAGE for the analysis of transcriptional start sites. *Nature Biotechnology* **22**:1146-1149.
15. Hynes MJ, Szewczyk E, Murray SL, Suzuki Y, Davis MA, Lewis HMS. 2007. Transcriptional control of gluconeogenesis in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **176**:139-150.
16. Suzuki Y, Murray SL, Wong KH, Davis MA, Hynes MJ. 2012. Reprogramming of carbon metabolism by the transcriptional activators AcuK and AcuM in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology* **84**:942-964.
17. de Klerk E, t Hoen PAC. 2015. Alternative mRNA transcription, processing, and translation: insights from RNA sequencing. *Trends in Genetics* **31**:128-139.
18. Flippi M, Sun JB, Robellet X, Karaffa L, Fekete E, Zeng AP, Kubicek CP. 2009. Biodiversity and evolution of primary carbon metabolism in *Aspergillus nidulans* and other *Aspergillus* spp. *Fungal Genetics and Biology* **46**:S19-S44.
19. Prade RA, Timberlake WE. 1993. The *Aspergillus nidulans* *brlA* regulatory locus consists of overlapping transcription units that are individually required for conidiophore development. *EMBO Journal* **12**:2439-2447.
20. Szewczyk E, Andrianopoulos A, Davis MA, Hynes MJ. 2001. A single gene produces mitochondrial, cytoplasmic, and peroxisomal NADP-dependent isocitrate dehydrogenase in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Biological Chemistry* **276**:37722-37729.
21. Cheng CK, Au CH, Wilke SK, Stajich JE, Zolan ME, Pukkila PJ, Kwan HS. 2013. 5'-Serial Analysis of Gene Expression studies reveal a transcriptomic switch during fruiting body development in *Coprinopsis cinerea*. *Bmc Genomics* **14**:17.
22. Kaur JN, Panepinto JC. 2016. Morphotype-specific effector functions of *Cryptococcus neoformans* PUM1. *Scientific Reports* **6**:9.
23. Guo N, Qian Y, Zhang QQ, Chen XX, Zeng GH, Zhang X, Mi WB, Xu C, Leger RJS, Fang WG. 2017. Alternative transcription start site selection in Mr-OPY2 controls lifestyle transitions in the fungus *Metarhizium robertsii*. *Nature Communications* **8**:13.
24. Taggart J, MacDiarmid CW, Haws S, Eide DJ. 2017. Zap1-dependent transcription from an alternative upstream promoter controls translation of RTC4 mRNA in zinc-deficient *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology* **106**:678-689.
25. Ayoubi TAY, VanDeVen WJM. 1996. Regulation of gene expression by alternative promoters. *Faseb Journal* **10**:453-460.
26. Davuluri RV, Suzuki Y, Sugano S, Plass C, Huang THM. 2008. The functional consequences of alternative promoter use in mammalian genomes. *Trends in Genetics* **24**:167-177.
27. Rojas-Duran MF, Gilbert WV. 2012. Alternative transcription start site selection leads to large differences in translation activity in yeast. *RNA* **18**:2299-2305.
28. Bailey TL, Boden M, Buske FA, Frith M, Grant CE, Clementi L, Ren JY, Li WW, Noble WS. 2009. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Research* **37**:W202-W208.
29. de Vries RP, Riley R, Wiebenga A, Aguilar-Osorio G, Amillis S, Uchima CA, Anderluh G, Asadollahi M, Askin M, Barry K, Battaglia E, Bayram O, Benocci T, Braus-Stromeier SA, Caldana C, Canovas D, Cerqueira GC, Chen FS, Chen WP, Choi C, Clum A, dos Santos RAC, Damasio ARD, Diallinas G, Emri T, Fekete E, Flippi M, Freyberg S, Gallo A, Gournas C, Habgood R, Hainaut M, Harispe ML, Henrissat B, Hilden KS, Hope R, Hossain A, Karabika E, Karaffa L, Karanyi Z, Krasevec N, Kuo A, Kusch H, LaButti K, Lagendijk EL, Lapidus A, Lefebvre A, Lindquist E, Lipzen A, Logrieco AF, et al. 2017. Comparative genomics reveals high biological diversity and specific adaptations

in the industrially and medically important fungal genus *Aspergillus*. *Genome Biology* **18**:45.

30. Frith MC, Ponjavic J, Fredman D, Kai C, Kawai J, Carninci P, Hayashizaki Y, Sandelin A. 2006. Evolutionary turnover of mammalian transcription start sites. *Genome Research* **16**:713-722.
31. Tanaka T, Koyanagi KO, Itoh T. 2009. Highly Diversified Molecular Evolution of Downstream Transcription Start Sites in *Rice* and *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **149**:1316-1324.
32. Cotney J, Leng J, Yin J, Reilly SK, DeMare LE, Emera D, Ayoub AE, Rakic P, Noonan JP. 2013. The Evolution of Lineage-Specific Regulatory Activities in the Human Embryonic Limb. *Cell* **154**:185-196.
33. Young RS, Hayashizaki Y, Andersson R, Sandelin A, Kawaji H, Itoh M, Lassmann T, Carninci P, Bickmore WA, Forrest AR, Taylor MS, The FC. 2015. The frequent evolutionary birth and death of functional promoters in mouse and human. *Genome Research* **25**:1546-1557.
34. Forrest ARR, Kawaji H, Rehli M, Baillie JK, de Hoon MJL, Haberle V, Lassmann T, Kulakovskiy IV, Lizio M, Itoh M, Andersson R, Mungall CJ, Meehan TF, Schmeier S, Bertin N, Jorgensen M, Dimont E, Arner E, Schmidl C, Schaefer U, Medvedeva YA, Plessy C, Vitezic M, Severin J, Semple CA, Ishizu Y, Young RS, Francescato M, Alam I, Albanese D, Altschuler GM, Arakawa T, Archer JAC, Arner P, Babina M, Rennie S, Balwierz PJ, Beckhouse AG, Pradhan-Bhatt S, Blake JA, Blumenthal A, Bodega B, Bonetti A, Briggs J, Brombacher F, Burroughs AM, Califano A, Cannistraci CV, Carbajo D, Chen Y, et al. 2014. A promoter-level mammalian expression atlas. *Nature* **507**:462-+??.
35. Murata M, Nishiyori-Sueki H, Kojima-Ishiyama M, Carninci P, Hayashizaki Y, Itoh M. 2014. Detecting Expressed Genes Using CAGE, p 67-85. *In* Miyamoto-Sato E, Ohashi H, Sasaki H, Nishikawa J-i, Yanagawa H (ed), *Transcription Factor Regulatory Networks: Methods and Protocols* doi:10.1007/978-1-4939-0805-9_7. Springer New York, New York, NY.

原著論文：

Taishi Inoue*, Hiroki Toji, Mizuki Tanaka, Mitsuru Takama, Sachiko Hasegawa-Shiro, Yuichi Yamaki, Takahiro Shintani and Katsuya Gomi. 2020. Alternative transcription start sites of the enolase-encoding gene *enoA* are stringently used in glycolytic/gluconeogenic conditions in *Aspergillus oryzae*. *Current Genetics*: in press

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名	井上 大志
審 査 委 員	主査：准教授 新谷 尚弘 副査：教授 阿部 敬悦 教授 米山 裕 教授 五味 勝也
学 位 論 文 題 目	<i>Aspergillus</i> 属糸状菌における解糖系酵素遺伝子の選択的プロモーターによる転写制御機構の解析
論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨	
<p>我が国の醸造産業で主要な役割を果たしている麹菌 (<i>Aspergillus oryzae</i>) および <i>Aspergillus</i> 属糸状菌のモデル生物である <i>Aspergillus nidulans</i> における解糖系遺伝子の転写制御、特に選択的転写プロモーターによる制御に関わる論文が審査された。エノラーゼは解糖系およびその逆反応である糖新生にも必須の酵素であり、麹菌では <i>enoA</i> 遺伝子、<i>A. nidulans</i> では <i>acuN</i> 遺伝子のみコードされている。1) <i>enoA</i>、<i>acuN</i> 遺伝子ともに、解糖系の基質である糖質系炭素源（グルコース、フルクトースなど）で生育する時は下流（dTSS）の、糖新生の基質である酢酸やエタノールで生育する時は上流の転写開始点（uTSS）から転写されるが、<i>enoA</i> 遺伝子は糖質系炭素源を、<i>acuN</i> 遺伝子は糖新生基質を炭素源とする培地でより転写が活性化された。2) 上流の転写開始点から <i>enoA</i> 遺伝子が転写される場合には、5'非翻訳領域に存在するイントロンがスプライシングされることが重要であること、他の糖新生酵素フルクトース-1,6-ビスリン酸アルドラーゼ遺伝子 <i>fbA</i> の転写においても同様の転写開始点の使い分けがあることが示された。3) さらに、uTSS 上流付近には転写因子 AcuK/AcuM の結合モチーフがあり、dTSS 付近に dTSS からの転写に重要な推定シスエレメント CE_2 を見出した。興味深いことに、麹菌 <i>enoA</i> 遺伝子 CE_2 内の点変異により、グルコースの高資化性、グルコースを炭素源とした培養における pH の低下（おそらく有機酸生成による）などの麹菌の培養特性が <i>A. nidulans</i> のそれに近づいた。<i>Aspergillus</i> 属糸状菌の生育特性が、解糖系遺伝子の発現パターンの違いによって規定されている可能性が示され、<i>enoA</i> を始めとした解糖系/糖新生経路で共用されている遺伝子群の選択的転写がその中心的な役割を果たしている可能性が示された。</p> <p>本博士論文研究は、<i>Aspergillus</i> 属糸状菌の遺伝子発現制御の比較解析が <i>Aspergillus</i> 属糸状菌の生理の理解に繋がった興味深い内容を含んでおり、<i>Aspergillus</i> 属糸状菌の基礎生物学に貢献するものである。よって、審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。</p>	