

氏 名(本籍)	お がさ わら ひる のぶ 小 笠 原 博 信
学位の種類	博 士 (農 学)
学位記番号	農 博 第 8 6 3 号
学位授与年月日	平 成 18 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科専攻	農学研究科生物産業創成科学専攻 (博士課程)
学位論文題目	麴菌における DNA トランスポゾンの構造と転移活性に 関する研究
論文審査委員	(主 査) 教 授 五 味 勝 也 (副 査) 教 授 神 尾 好 是 教 授 津 田 雅 孝

論文内容要旨

序論

麹菌 *Aspergillus oryzae* は、我が国の伝統的発酵食品である酒、味噌、醤油などの製造において千年以上にわたって利用され、食されてきている重要な微生物である。そのため、安全性については国内のみならず、海外においても GRAS(generally recognized as safe)として評価され、さらには、その高いタンパク質分泌能から有用酵素や生理活性物質生産のための安全な宿主系として産業上の利用も多くなされてきている。また、発酵生産管理を背景とした経験的知見や有用微生物の生理・生化学的研究対象として多くのデータも蓄積されている。しかしながら、*A. oryzae* には有性生活環は未だ認められておらず、形成される分生子も多核であるため、*Neurospora* 属などに代表される古典遺伝学的手法を用いた遺伝子機能解析には適していない点が多い。

一方、近年多くの生物で進められている全ゲノム解析が麹菌においても終了し、麹菌ゲノム情報を活用した遺伝子機能の効率的研究の道が開かれてきている。遺伝子の発現プロファイルを解析するため、DNA マイクロアレイ等による網羅的な遺伝子解析ツールの開発・研究が進められる一方で、機能遺伝子を効率よく特定するための分子生物学的解析技術のニーズも高まっている。

本研究では、Tagging 等の遺伝子機能解析ツールの開発や有用麹菌育種のための新規手法開発を目的として、麹菌の内在性トランスポゾンに着目し、転移活性を持つトランスポゾンの検索と機能解析を進めてきた。トランスポゾンは原核生物からヒトまでの多くの生物に広く分布していることが知られており、RNA を介して転写した DNA を転移するレトロトランスポゾンとトランスポゼースと呼ばれる酵素により DNA ユニットの切り出して転移する DNA トランスポゾンの2クラスに大きく分けられる。糸状菌の *Fusarium* 属や *Neurospora* 属などにおいては、両クラスの各種活性型トランスポゾンが多数単離され、特性解明がなされてきている。トランスポゾンの活性化により、機能遺伝子上に挿入転移または切り出された場合、標的遺伝子の不活性化や活性化を引き起こし遺伝子構造や表現型に影響を及ぼす可能性がある。したがって、麹菌などの有性世代を持たない生物種においては、環境適応や多様性を生み出す機構としてトランスポゾンのような可動性 DNA 因子が重要な役割を果たしていることが示唆されている。すでに、麹菌においてもゲノム情報をもとに5種のレトロトランスポゾン、1種の DNA トランスポゾンが同定・解析されているが、転移活性を有する可動性のトランスポゾンはまだ見出されていない。

しかしながら、これらトランスポゾンは麹菌内に多コピーで存在する株が多いことや、醤油用麹菌 *Aspergillus sojae* にも同様に分布していることが明らかとなり、可動性という特徴だけではなく種間の水平伝搬の可能性も推察された。そこで、さらに検索を進めたところ、実用株である *A. oryzae* OSI1013 株の *niaD* 変異株のなかに、偶発的に *niaD* 遺伝子内に転移した新規 DNA トランスポゾン *Aoimp1* が見出された。

本研究では *Aoimp1* の特性解明と優良株育種などの醸造現場への応用を目的として、麹菌での転移活性化およびその転移様式を検討するとともに、構造的特性について菌株間での比較解析を行った。

第1章 新規 DNA トランスポゾン *Aoimp1* の構造と転移活性

1-1. *Aoimp1* の構造的特徴

Aoimp1 は実用株 *A. oryzae* OS11013 株において偶発的に *niaD* 遺伝子内に挿入された転移ユニットとして見出された。このトランスポゾンは両端に 22-bp の terminal inverted repeat (TIR) を有し、その外側に TA2-bp の target site duplication (TSD) がある典型的な Class II DNA トランスポゾンであった (Fig. 1A、Table 1)。また、transposase 部分のアミノ酸配列が *Fusarium* 属の *impala* とよばれる DNA トランスポゾンの transposase と相同性が高いことから (Fig. 1B)、このトランスポゾン・ユニットを *Aoimp1* と命名した。*impala* は *Tc1/mariner* ファミリーに属し、転移活性が高いトランスポゾンとして知られており、*A. oryzae* OS11013 株でコピー数が約 16 と多く存在する *Aoimp1* も麹菌で高い転移活性が期待された (Fig. 2)。

1-2. *Aoimp1* 活性化条件の検討

これまで、*Aspergillus niger* や *Aspergillus fumigatus* などの *Aspergillus* 属糸状菌において、転移活性を持つ可能性のある DNA トランスポゾンの報告はいくつかなされているが、実際に転移活性が証明できたものはない。本研究で見出した *Aoimp1* は、偶発的ではあるが *niaD* 遺伝子への挿入が起こっており、*Fusarium* 属の可動性因子 *impala* との相同性も考慮すると、転移活性を示す可能性を期待できる。そこで、はじめに転移に関与すると考えられる transposase 遺伝子 (*aotA*) の発現誘発条件を調べるため、液体培養における各種ストレス条件下でのノーザン解析を行った (Fig. 3)。*aotA* は、OS11013 株では通常の液体培養条件下でもある程度の転写がなされていたが、イネいもち病菌 (*Magnaporthe grisea*) などのレトロトランスポゾンで活性化効果が報告されている Cu 存在下の培養や高温処理により、わずかながら転写促進が認められた。さらに Cu 濃度や温度処理の影響を詳細に検討したところ、Cu 濃度は 0.4~0.6 mM で、また 37°C より 42°C で明確な転写促進効果が認められた。

1-3. トランスポゾン・トラッピング

Aoimp1 の転移活性を調べるために、transposase 遺伝子 (*aotA*) の転写促進が認められたストレス条件において、転移挿入が起こった株を取得することを目的としてトランスポゾン・トラッピングを行った。OS11013 株を用いて、Cu および熱ストレスをかけた分生子、また Cu 添加ストレス培地で培養して着生した分生子を、0.5 M KClO₃ を含んだプレートで *niaD*⁻ 株を取得する要領で、KClO₃ に耐性を示す株のスクリーニングを行った (Fig. 4)。さらに、0.5 M KClO₃ を含んだプレートで生育を示したコロニーを集め、PCR による *Aoimp1* 挿入株の 2 次スクリーニングを行った (Table 2)。トランスポゾン・トラッピングの対象遺伝子

としては、従来は *niaD*(nitrate reductase) 遺伝子が用いられていたが、今回は麹菌のゲノム解析情報を利用できる利点を生かして、*niaD* 株と同様に KClO_3 耐性となる硝酸塩資化関連遺伝子である *areA* (transcription factor for nitrogen metabolite repression)、*crnA*(nitrate permease)、*nirA*(transcription factor for nitrate induction)についても同時にトランスポゾンの挿入の有無を調べた。

transposase 遺伝子の発現誘導条件をもとに、各種の転移誘発条件について検討したところ、分生子を 42°C の熱ストレス処理および 9 mM CuSO_4 で処理することにより、*crnA* への挿入が推定される 3.5 kb のバンドが認められた (Fig. 5 A)。また、 0.5 M KClO_3 を含む培地において 37°C で培養したり、 4 mM Cu SO_4 を含む最小培地で培養して着生した分生子を用いてスクリーニングすることにより、同様に 3.5 kb の挿入によってサイズが大きくなったバンドが認められた。

さらに、分生子を形成させる場合の Cu 濃度について検討したところ、 4 mM では *crnA* への挿入が観察されたが、 6 mM になると挿入バンドが認められなくなった (Fig. 5 B)。一方、*niaD* 遺伝子を対象にして調べると、 4 mM まで挿入グループは認められなかったが、 6 mM で挿入株が得られるようになった (Fig. 5 C)。このように、*Aoimp1* はストレス条件下で転移活性を示し、実際に麹菌の染色体上で転移することが明らかとなった。

1-4. *Aoimp1* 挿入様式

Aoimp1 の転移挿入が認められた株において、挿入の位置と様式を検討するため、挿入部位の塩基配列決定を行ったところ、 4 mM Cu ストレス培養で着生した分生子から得られた挿入株では、*crnA* プロモーター領域への挿入が順位および逆位の両方向とも認められ、TA の位置に *Aoimp1* 端の TA を組換えて挿入が起きていた (Fig. 6 A)。また、分生子のストレス処理をせず、 KClO_3 培養時に 37°C で培養したグループからは、順位および逆位でコード領域内の異なる3箇所挿入が起きた株が得られた (Fig. 6 B)。さらに、 6 mM Cu ストレス培養により着生した分生子から得られた *niaD* 遺伝子への *Aoimp1* 挿入株はプロモーター領域に順方向で挿入されている株が多く得られた (Fig. 7 A)。なお、このストレス条件でスクリーニングしてきた KClO_3 耐性で硝酸塩非資化性を示す株のうち、半数近くが *niaD* 遺伝子への *Aoimp1* 挿入株であったことから、このようなストレス条件下では高頻度で *Aoimp1* の転移が起こっているものと考えられる (Fig. 7 B)。また、いずれの挿入株も TA を組み換えて *Aoimp1* 挿入が起きていた。さらに、YPD 培地では Cu ストレス効果による転移活性化が低下する傾向が認められた。ストレス条件と挿入を確認して得られた頻度について Table 3 に示した。

1-5. 復帰変異株 (再転移株) と footprint 配列の解析

Aoimp1 の転移条件の詳細な検討と転移効率の測定を目的に、*crnA* プロモーターに挿入が起きた株 (順位および逆位の両株) を用いて、分生子のストレス処理による復帰変異株のスクリーニングを行った。

なお、*crnA* プロモーター挿入株については、定量 RT-PCR により *crnA* 遺伝子の転写量が 1/10 に低下していることを確認している (Fig. 8)。その結果、転移挿入条件と同様に高温ならびに Cu ストレスによって、高頻度に復帰変異株が得られた (Fig. 9, Fig. 10)。また、低頻度ながら、酸処理、過酸化水素水および UV 処理によっても再転移が認められた (Fig. 10)。さらに、復帰変異株の *crnA* プロモーター上の *Aoimp1* が挿入されていた部位の塩基配列を調べてみると、いずれの株にも 5'-CTTTA-3' の 5 塩基の挿入配列が残っており、挿入の方向にかかわらず同一の footprint が残されることが示された。さらに、*niaD* プロモーター挿入株からの復帰変異株についても同様の footprint が残されていた。以上の結果から、*A. oryzae* OS11013 株では、ストレス条件下で DNA トランスポゾンである *Aoimp1* が転移活性を示し、実際に染色体上に転移を起こすことが明らかとなった。ここで、挿入株はいずれも Cu ストレスに対して感受性が高くなっており、1~2 mM Cu 処理区で高い転移効率を示し、復帰変異株の取得率から算出された *Aoimp1* の転移頻度は、T-11-1 株において最も頻度の高い 1mM Cu 処理 6 時間の条件下で 1.6×10^{-4} であった。

さらに、*Aoimp1* のゲノム上での転移について検討することを目的に、挿入株と復帰変異株についてサザン比較解析を行った (Fig. 11)。その結果、親株 (OS11013) と比較し大きなバンドパターンの変化はほとんど認められなかったが、そのなかで T-11-3 株 (*crnA* プロモーター逆位挿入) の復帰変異株において 9.5kb バンドの消失が認められ、*Aoimp1* の染色体上での転移があらためて明らかとなった。

第2章 *Aoimp1* の麹菌における分布と菌株間での構造比較解析

2-1. *Aoimp1* の各種麹菌株における分布と配列比較

転移活性を有する *Aoimp1* を遺伝子解析用ツールとして適用するために、各種麹菌 (*A. oryzae*) 株におけるコピー数や分布、ならびに醸造現場で長年使用されてきた *A. oryzae* と *A. sojae* の間でのトランスポゾンの水平伝搬の可能性などについて興味を持たれた。そこで、醸造用麹菌の各種菌株における *Aoimp1* ユニットの分布および配列について比較検討を行った。

TIR 部分をプライマー (Table 1) とした PCR を行ったところ、RIB40 や実用株 (AOK; 秋田今野商店保存株) を含む *A. oryzae* のほとんど (13/15)、さらには *A. sojae* の多く (6/10) で *Aoimp1* に相当するバンドが増幅された (Fig. 12)。これらのうち、*A. oryzae* についてサザン解析を行ったところ、ハイブリダイゼーション・パターンに大きな違いが認められた。興味深いことに、RIB40 等の 1 コピーと推定される株ではハイブリダイゼーション・バンドが非常に薄いという現象が認められた。また、そのほかに 2-3 コピーの明瞭なバンドを持つグループと OS11013 株と同様に多コピーでハイブリダイゼーション強度の強いグループが認められ (Fig. 13A)、多コピー株では OS11013 株と同じく 14-16 コピー保有していると推定された (Fig. 13B)。

transposase に相当する ORF 領域の塩基配列を決定して比較したところ、塩基配列によるグループ分けとハイブリダイゼーション・パターン様式によるグループ分けとの間に相関が認められた (Fig. 14)。全ゲノム解析に用いられた RIB40 株では、*Aoimp1* の transposase ORF の塩基配列は OSI1013 株のものと 90% と相同性が低く (Table 4)、配列中ほとんどが GC→AT の RIP (Repeat induced point mutation) 様の塩基置換を受けており、その結果 ORF 全体にわたってストップコドンが多く生じていることから、RIB40 では *Aoimp1* は機能していないものと推定された (Fig. 15)。さらに、この RIP 様塩基置換機構について検討するため、制限酵素による GC メチル化解析を行ったが、違いは認められず transposase ORF 内のメチル化は検出されなかった (Fig. 16)。

2-2. 各種麹菌の変異型 *Aoimp1* の転移活性の検討

各種の麹菌株から単離された変異型の *Aoimp1* と OSI1013 株由来の野生型との転移活性を比較するため、transposase 遺伝子の発現をノーザン解析により調べた。塩基配列が OSI1013 株のものと一致している *Aoimp1* を有する RIB128 株では、OSI1013 株と同様の転写産物が認められたが、transposase に 2 個のアミノ酸変異を持つ RIB209 株 (3コピー) および RIP 様変異を多く持っている RIB40 株ではシグナルは認められなかった (Fig. 17)。このことから、OSI1013 株と同様の配列を持っている RIB128 株などの *Aoimp1* は転移活性を有する可能性が示された。一方、アミノ酸置換のある transposase を持つ *Aoimp1* は転移活性が低いと考えられるが、保持しているコピー数が少ないためにノーザン解析では発現が認められなかったことも考えられるので、今後 RT-PCR などによる解析が必要である。

第3章 総合考察

麹菌 *A. oryzae* のゲノム情報を利用した未知遺伝子の機能解析や有用遺伝子のスクリーニング、さらには有用麹菌育種のためのツールとして、麹菌の内在性トランスポゾンに着目し検索と機能解析を行ってきた。本研究では、実用株 OSI1013 株より見いだされ、転移活性が期待された新規の DNA トランスポゾン *Aoimp1* について構造と転移活性について解析を行った。

Aoimp1 は構造上の類似性から *Tc1/mariner* superfamily に属する Class II DNA トランスポゾンである。高温や Cu 添加培養によって transposase 遺伝子の転写レベルでの活性化が認められ、硝酸塩資化関連遺伝子を用いたトランスポゾン・トラッピングの結果、*niaD* のみならず *crnA* への挿入も認められた。

Aoimp1 の *crnA* と *niaD* 領域への挿入には処理する Cu 濃度に閾値が認められ、一方 YPD 培地などの富栄養条件では挿入効率の低下が見られることから、ストレス処理条件によって挿入される遺伝子領域が異なる可能性が示唆された。また、スクリーニング時の高温培養によって *crnA* コード領域への挿入株が得られ、ストレスの種類によっても挿入遺伝子が異なる傾向が見られた。また、挿入位置はすべて TA

の位置に *Aoimp1* 端の TA を組換えて起きていたが、挿入周辺領域の配列にコンセンサスは見いだせなかった。一方、同時にスクリーニングを行った硝酸塩資化関連遺伝子の *areA*、*nirA* については、現在まで挿入株は得られていない。

以上のことから、*Aoimp1* 転移はランダムではなく転移誘発条件や挿入される遺伝子のマクロな構造に影響されるものと推察される。さらに、今までのところ転移が認められていない通常の培養条件や低ストレス条件でも transposase 遺伝子は転写されていることから、ストレスによる転移抑制機構の不活性化の可能性も考えられる。これら転移機構の解明は挿入される遺伝子領域の周辺構造との関連性の面からも今後の大きな課題である。

挿入株の *Aoimp1* 再転移に関する解析から、ストレス条件と転移効率の相関が再確認されるとともに、同一の 5-bp の footprint (5'-CTTTA-3') が残されることが明らかとなった。この footprint 配列をもとにして解析することにより、長年の醸造現場での選抜育種の際に、麹菌において不活性化されてきた遺伝子群を同定できる可能性も考えられる。

麹菌において *Aoimp1* は *A. oryzae* のみならず *A. sojae* にも広く分布しており、また、様々なコピー数で保有されていることが認められた。RIB40 株などの低コピー株では高度に RIP 様変異が起きており、おそらく水平伝播した後に短時間で不活性化機構が働いたことが推察される。RIP 様変異の前段階と考えられる配列中のメチル化については検出できなかったが、今後、トランスポゾン遺伝子解析ツールとして応用していく上で、麹菌における DNA トランスポゾンの不活性化機構についての解明が望まれる。一方、RIB128 などの多コピーを有する株では同一の配列の状態に保持されており、OSI1013 株と同様にストレス条件によって活性化、転移が引き起こされるものと考えられる。

本研究において *Aspergillus* 属のみならず糸状菌において、人為的条件による Class II DNA トランスポゾンの転移および転移活性の制御が初めて示された。今後、麹菌において *Aoimp1* や他のトランスポゾンを用いた遺伝子機能解析ツールの開発や、「組換えを用いない」分子育種技術の開発への応用と発展が期待される。

要約

1. *Aoimp1* は *Tc1/mariner* Family に属し、実用株 OSII1013 株では、CuSO₄ や高温処理により transposase 遺伝子の転写促進が認められ、転移活性の向上が期待された。
2. CuSO₄ ストレス条件で培養した分生子を用いて KClO₃ スクリーニング (トランスポゾン・トラッピング) を行ったところ、*niaD* 遺伝子のみならず、*crnA* 遺伝子にも *Aoimp1* の挿入が認められた。
3. ストレス条件の違いにより、*Aoimp1* の転移挿入位置や挿入様式が異なる傾向が見られた。
4. 復帰変異株取得による転移効率の測定を行ったところ、転移挿入条件と同様に高温ならびに Cu ストレスによって、高頻度に復帰変異株が得られ、低頻度ながら、酸処理、過酸化水素水および UV 処理によっても再転移が認められた。
5. *crnA* への挿入方向の違いや *niaD* 遺伝子挿入にかかわらず同一の footprint (5'-CTTTA-3') が残されていた。
6. 転移株のサザン比較解析により、復帰変異株の一部で消失バンドが認められ、染色体上での転移が明らかとなった。
7. *Aoimp1* は、*A. oryzae* および *A. sojae* の実用株や保存株を含む広い菌株に分布している。
8. RIB40 などの1コピーでGC⇒AT変異が多い株においては、transposase 領域での RIP 様の機構による DNA 変異、さらにはメチル化以外の修飾や構造変化が起きていることが推定された。
9. 内在性 Class II transposon の人為的ストレスによる転移が、*Aspergillus* 属のみならず糸状菌で初めて認められ、*Aoimp1* による遺伝子機能解析や育種への応用が期待できる。

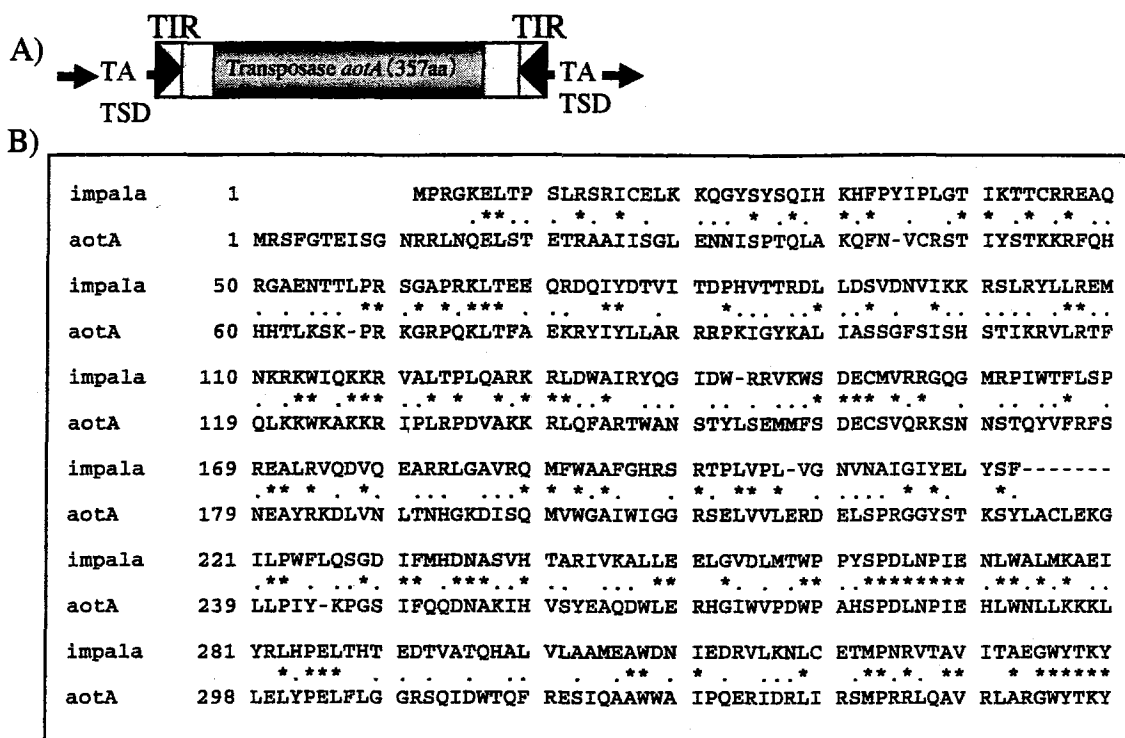


Fig. 1 Structural feature of *Aoimp1*

(A) Schematic representation of the structure of *Aoimp1*.

TIR = terminal inverted repeats TSD = target site duplication

(B) Alignment of amino acid sequence of the *Aoimp1* transposase *aotA* and *impala* transposase.

*, identical amino acid residues; ., similar amino acid residues.

Table 1 Characterization of DNA transposons

Transposon	<i>impala</i>	<i>Aoimp1</i>
Length	1281-bp	1294-bp
Transposase	340-aa	357-aa
TIR	27-bp	22-bp

Table 2 PCR primers used in this study

Primer name	Sequence	Positions relative to ATG
<i>Aoimp1</i> -IR	5'-GGTCAAAAAGTCTGACTACAC-3'	Inverted repeat of <i>Aoimp1</i>
<i>areA</i> -PF	5'-CACTCGAGCCTTTTTAGCTG-3'	<i>areA</i> (-561 to -542)
<i>areA</i> -R	5'-ATTACAGACTCATCGTCAAC-3'	<i>areA</i> (+2671 to +2652)
<i>crnA</i> -PF	5'-CCCTTTGCTTTGTCCACATC-3'	<i>crnA</i> (-472 to -453)
<i>crnA</i> -R	5'-TTATACCATCTGACGCTCTG-3'	<i>crnA</i> (+1740 to +1721)
<i>nirA</i> -PF	5'-AGTATTGAAACACCCGCAAC-3'	<i>nirA</i> (-560 to -541)
<i>nirA</i> -R	5'-CTAGAACAGGAGGTTGGTCA-3'	<i>nirA</i> (+2410 to +2391)
<i>niaD</i> -PF	5'-CATTGTCTCCATCATTCTTC-3'	<i>niaD</i> (-508 to -489)
<i>niaD</i> -R	5'-GAACGCCGTTATGACCCATG-3'	<i>niaD</i> (+3037 to +3018)
<i>crnART</i> -L	5'-CACACACAATCCGTCTGGTC-3'	<i>crnA</i> (+1305 to +1324)
<i>crnART</i> -R	5'-ACCTCCTAGGTTGCCCATTC-3'	<i>crnA</i> (+1605 to +1586)

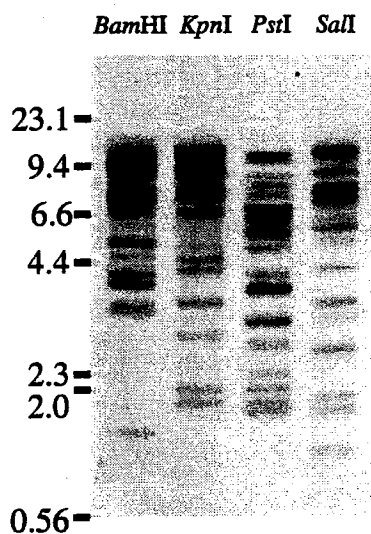


Fig. 2 Southern blot analysis of *Aoimp1* from *A. oryzae* OSI1013
Genomic DNA was digested with several restriction enzymes indicated. The probe used for hybridization was the full length of *Aoimp1* (1.3kb).

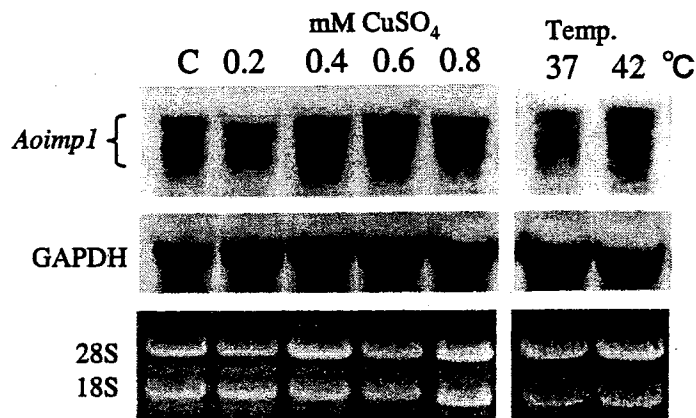


Fig. 3 Northern blot analysis of *Aoimp1* expression under various stress conditions
Total RNAs (5 μ g) extracted from *A. oryzae* OSI1013 cultured under stress conditions for 4 hr were hybridized with the full length of *Aoimp1*. GAPDH was used as a control probe. The 28S and 18S rRNA stained with ethidium bromide was shown in the bottom panel.

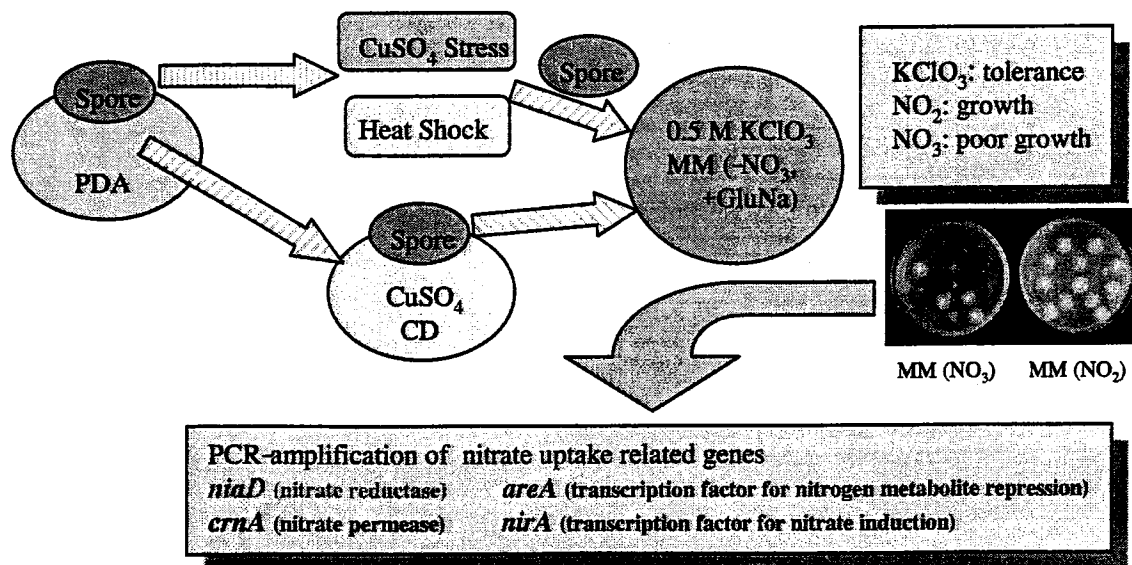


Fig. 4 Strategy for transposon-trapping of *Aoimp1*
Conidia either treated with CuSO_4 or heat shock, or conidiated on CD (Czapek-Dox agar) containing CuSO_4 were subjected to the selection for colonies being tolerant against chlorate and showing poor growth on NO_3 containing medium. The candidates were screened for *Aoimp1* insertion by PCR amplification of nitrate uptake related genes.

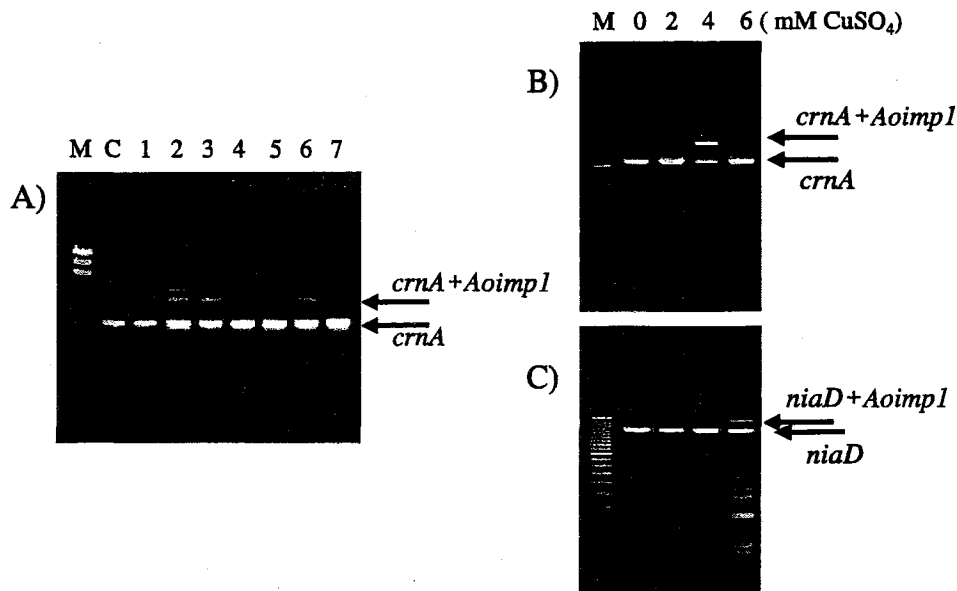


Fig. 5 Transposon trapping of *Aoimpl*

A) Transposition of *Aoimpl* into the *crnA* gene locus by stress treatment was determined by PCR. Distinct additional bands larger than the *crnA* indicate the occurrence of *Aoimpl* insertion. C, Control (conidia incubated at 30°C for 6hr); lane 1, conidia incubated at 42°C for 6hr; lane 2, conidia treated in 9 mM CuSO_4 at 30°C for 6hr; lane 3, conidiated at 37°C; lane 4, conidiated on CD containing 2 mM CuSO_4 ; lane 5, conidiated on YPD containing 2 mM CuSO_4 ; lane 6, conidiated on CD containing 4 mM CuSO_4 ; lane 7, conidiated on YPD containing 4 mM CuSO_4 ; M, λ /*Hind*III marker.

B), C) Effect of CuSO_4 concentrations on transposition of *Aoimpl* into *crnA* (B) and *niaD* (C). Conidia harvested from colonies grown on CD plates with CuSO_4 ranging from 0 to 6 mM. M, 200 bp ladder

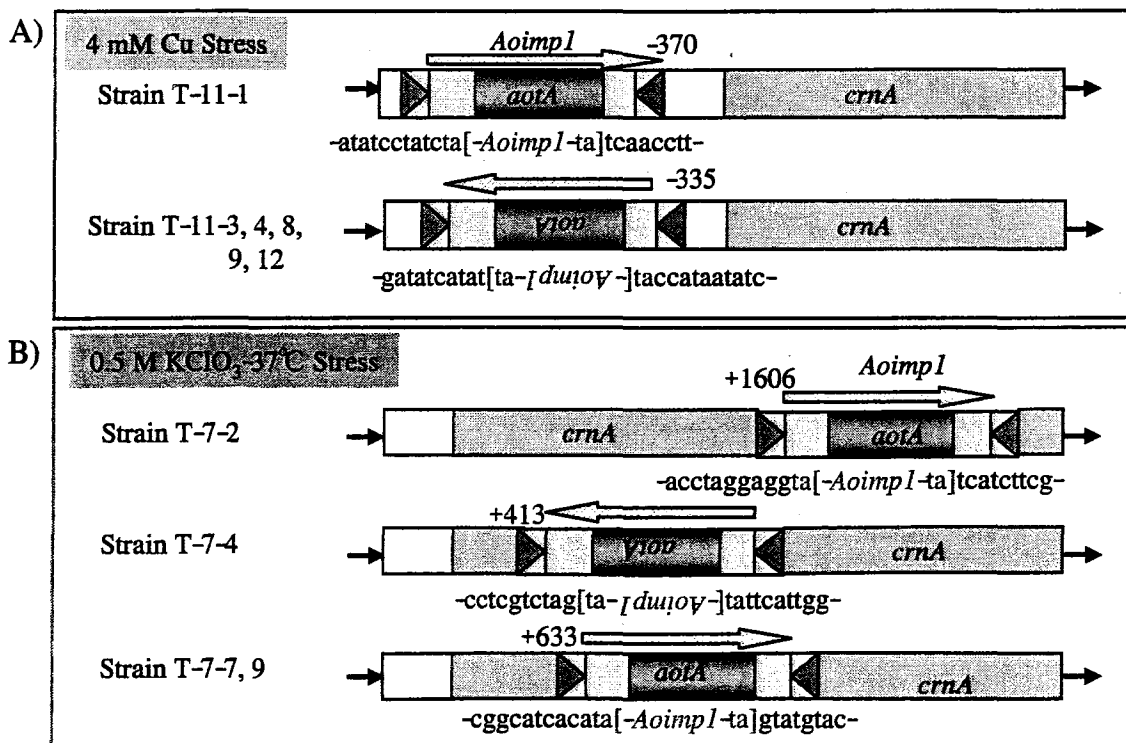


Fig. 6 Mapping of *Aoimpl* insertions within the *crnA* gene

Insertion patterns of chlorate resistant strains obtained following grown on CD containing 4 mM CuSO_4 (A) and CD containing 0.5 M chlorate at 37°C (B) were determined. Sequences around insertion sites and direction of inserted *Aoimpl* (striped arrows) are indicated. The sites of *Aoimpl* insertions are shown relative to ATG (+1). One of TSDs (5'-TA-3') of *Aoimpl* is duplicated on each insertion event.

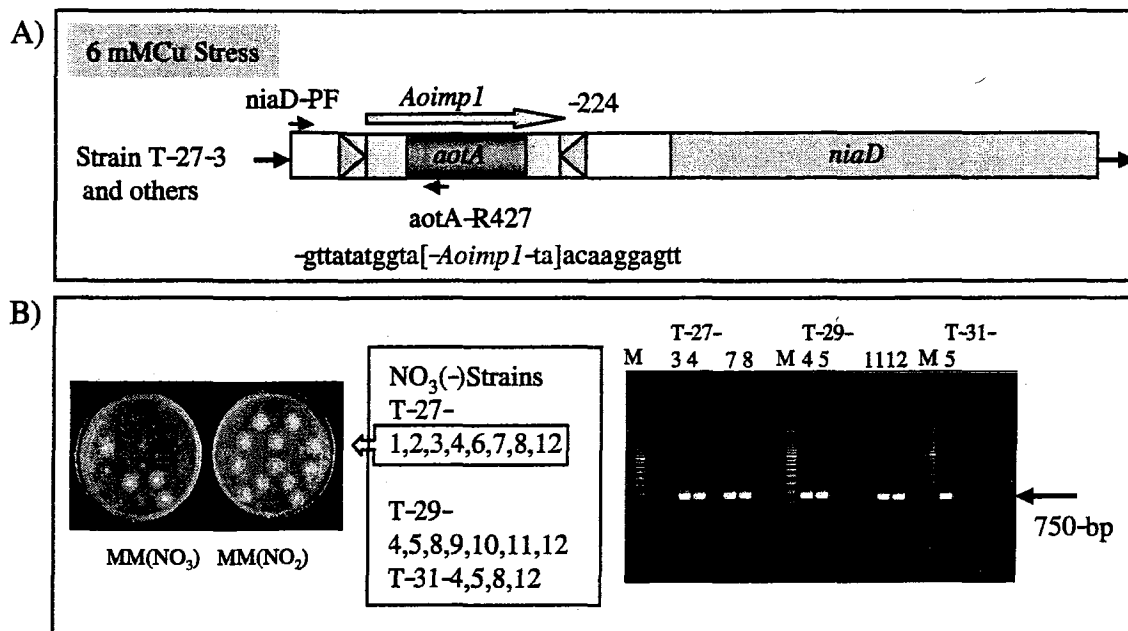


Fig. 7 Mapping of *Aoimp1* insertions within the *niaD* gene

(A) The insertion manner of selected strains from spore grown on CD containing 6mM Cu were determined. The sequence around insertion site and direction of *Aoimp1* (striped arrows) are indicated. One of TSDs (5'-TA-3') of *Aoimp1* is duplicated at the insertion site.

(B) Growth of putative *niaD* mutants and detection of the PCR-amplified fragments caused by *Aoimp1* insertion within the *niaD* gene. Primers used are indicated as arrow heads in panel A (*niaD*-PF and *aotA*-R427).

Table 3 Stress conditions and *Aoimp1* insertion site

Stress condition	Frequency	Gene and insertion site*
Conidiated on 4 mM CuSO ₄	6/12	<i>crnA</i> (-370, F)(1), <i>crnA</i> (-335, R)(5)
Conidiated on 6 mM CuSO ₄	9/18	<i>niaD</i> (-224, F)(6)
Mycelia grown on 0.5 M KClO ₃ at 37°C	4/12	<i>crnA</i> (+413, R)(1), <i>crnA</i> (+633, F)(2), <i>crnA</i> (+1606, F)(1)

*Insertion sites are indicated relative to ATG (+1). F, forward direction; R, reverse direction. The number in the parenthesis represents that of isolates.

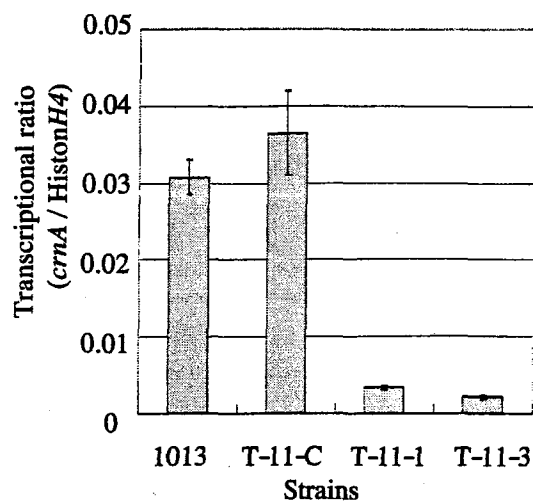


Fig. 8 Quantitative RT-PCR for *crnA* expression 1013, OSI1013; T-11-C, chlorate resistant strain without *Aoimp1* insertion within the *crnA*; T-11-1, *Aoimp1* insertion within the *crnA* promoter (-370, forward); T-11-3, *Aoimp1* insertion within the *crnA* promoter (-335, reverse)

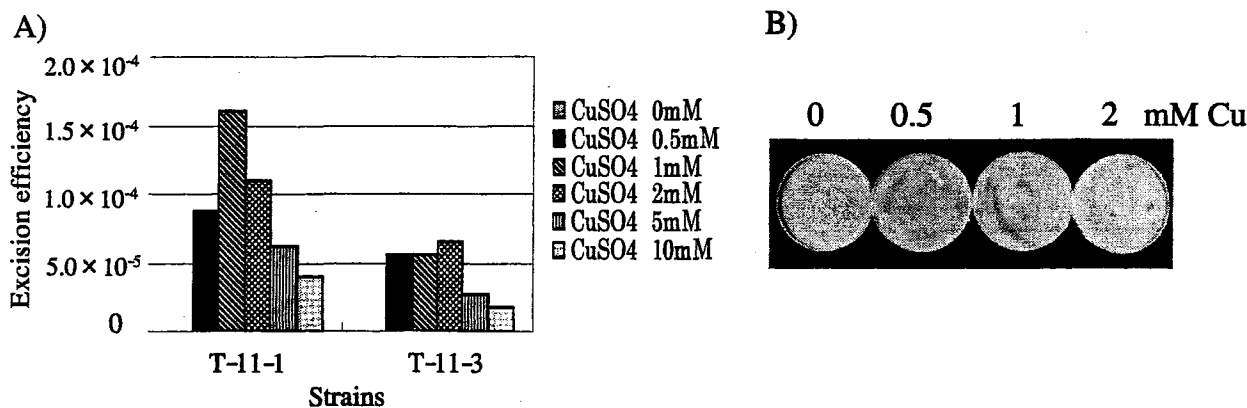


Fig. 9 Effect of CuSO_4 on excision of *Aoimp1* inserted within the *crnA* gene

A) Excision efficiency of *Aoimp1* by treating conidia with various concentration of CuSO_4 .

Conidia of *crnA* mutants were suspended in various concentration of CuSO_4 (0-10 mM), incubated at 30°C for 6hr, and then were grown on CD medium with NO_3 as a sole nitrogen source.

B) Growth of the *crnA* mutant, T-11-1, subjected to Cu^{2+} stress treatment on CD medium with NO_3 . Colonies showing good growth are revertants that the *Aoimp1* has been excised from the *crnA* promoter.

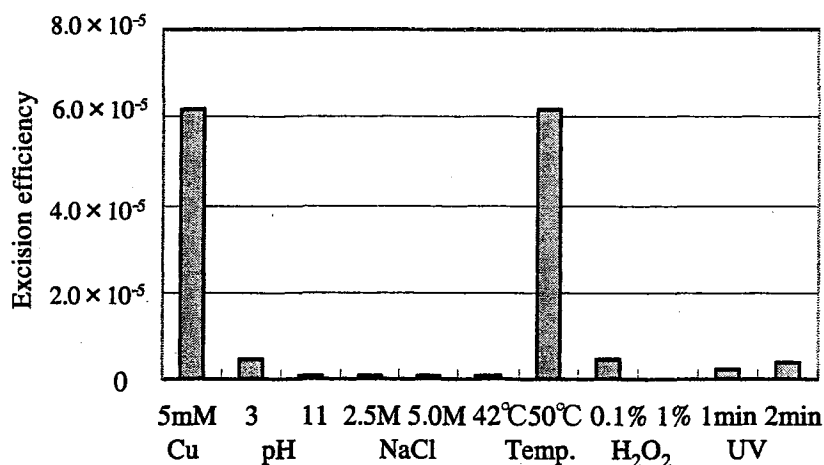


Fig. 10 Effect of various stress conditions on excision of *Aoimp1* inserted within the *crnA* gene

Conidia of the *crnA* mutant (T-11-1) were treated under various stress conditions indicated. pH3 and pH11 indicate 0.2M sodium acetate buffer, pH3.0 and 0.2M sodium phosphate buffer, pH11.0, respectively. Conidia were shaken (200rpm) at 30°C for 6 hr, and then were grown on CD medium with NO_3 as a sole nitrogen source.

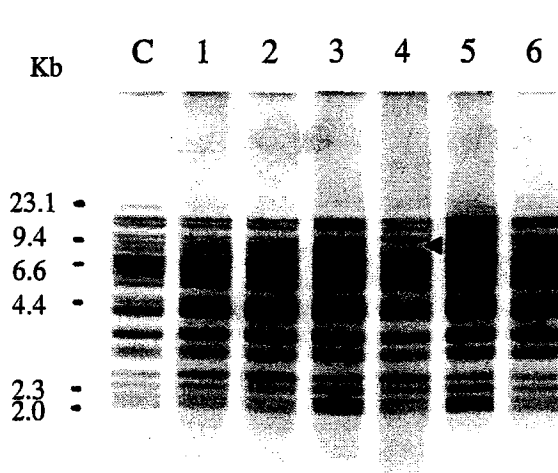


Fig. 11 Southern blot analysis of *Aoimp1* in the strains with insertion and excision

Genomic DNAs digested with *PstI* were separated on agarose gel electrophoresis and hybridized with *Aoimp1* fragment (1.3kbp) of OSI1013.

An arrow head points 9.5kb-fragment absent only in the strain T-11-3R (lane4).

C, parent strain (OSI1013); 1, T-11-1 (*Aoimp1* insertion within the *crnA* promoter in forward direction); 2, T-11-1R (revertant from T-11-1); 3, T-11-3 (*Aoimp1* insertion within the *crnA* promoter in reverse direction); 4, T-11-3R (revertant from T-11-3); 5, T-28-2 (*Aoimp1* insertion within the *niaD* promoter in forward direction); 6, T-28-2R (revertant from T-28-2).



Fig. 12 PCR amplification of the *Aoimp1* in *Aspergillus* strains

Aoimp1 fragments were amplified by PCR using TIR sequence as a primer.

A. oryzae: 1,RIB40; 2,RIB143; 3,RIB203; 4,RIB643, 5,AOK2P; 6,AOK12-2;
7,AOK113; 8,AOK138; 9,AOK139; 10,AOK156; 11,RIB1119; 12,RIB1120;
13,RIB1403; 14,RIB1409; 15,RIB4009

A. sojae :16,RIB401; 17,RIB1348; 18,AOK31-1; 19,AOK32; 20,AOK34; 21,AOK141;
22,AOK224; 23,AOK33; 24,AOK38-1; 25,AOK98

M, Molecular size marker, pHY (4.9, 2.0, 1.4, 1.1, 0.93, 0.66, 0.49 0.27kbp)

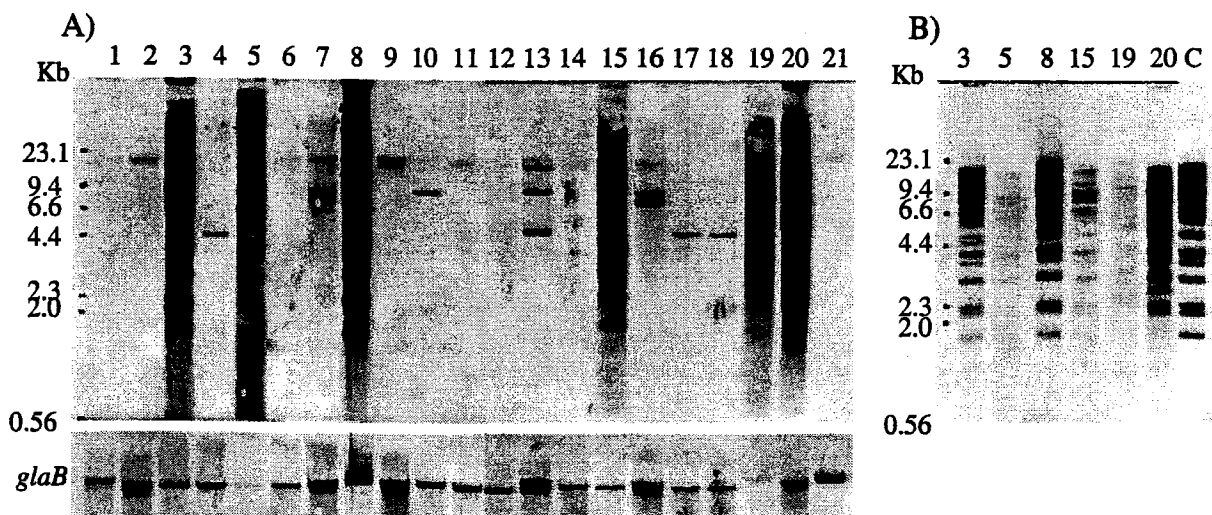


Fig. 13 Southern blot analysis of *A. oryzae* strains

A) Genomic DNAs digested with *Sa*II were separated on agarose gel electrophoresis and hybridized with *Aoimp1* fragment (1.3kbp) of OSI1013. The *glaB* was used as a probe for a single copy gene.

B) Multi-copy strains were analyzed by the *Aoimp1* probe to determine the copy number.

A. oryzae: 1,RIB40; 2,RIB119; 3,RIB128; 4,RIB143; 5,RIB117; 6,RIB203; 7,RIB209; 8,RIB643;
9,RIB940; 10,RIB1108; 11,RIB1119; 12,RIB1120; 13,RIB1201; 14,RIB1409; 15,AOK2P;
16,AOK11; 17,AOK12-2; 18,AOK113; 19,AOK138; 20,AOK139; 21,AOK156; C,OSI1013

Table 4 Sequence homology and properties of transposase *aotA* in *Aoimp1*

<i>Aspergillus</i> strains	<i>Aoimp1</i>		<i>Aoimp1</i> Southern		<i>aotA</i> DNA		Mutation		<i>aotA</i> a.a. Number of Stop Codon
	TIR PCR	Copy Number	Bam HI I	Sal I	(%)	GC->AT (%)	Homology (%)		
<i>A.oryzae</i>									
RIB40	+	1	1		89.8	24.9	77.0	18	
RIB119	+	1	1		88.5	24.7	77.0	18	
RIB126	+	14			89.9	0.0	100.0	0	
RIB143	+	1	1		98.4	7.1	96.4	7	
RIB177	+	1			89.9	0.0	100.0	0	
RIB203	+	1	1		88.4	24.9	77.0	18	
RIB209	+	3			99.8	0.0	99.4	0	
RIB643	+	>12	16		99.9	0.0	100.0	0	
RIB940	+	1			88.5	24.7	77.0	18	
RIB1108	+	2			90.7	20.1	79.6	21	
RIB1119	+	1	1		88.4	24.9	77.0	18	
RIB1120	+	1	1		88.4	24.7	77.0	18	
RIB1201	+	3			96.6	6.7	93.0	10	
RIB1403	-								
RIB1409	+	2	2		89.9	21.2	78.0	19	
RIB4009	-								
AOK2P	+	>12	16		99.9	0.0	100.0	0	
AOK11	+	3			99.6	0.0	99.4	0	
AOK12-2	+	1	1		96.3	7.1	91.6	5	
AOK113	+	1	1		96.4	6.7	91.6	8	
AOK158	+	>12	16		99.9	0.0	100.0	0	
AOK139	+	>12	16		99.9	0.0	100.0	0	
AOK156	+	1	1		88.5	24.9	77.0	18	
OSI1013	+		16		100.0	0.0	100.0	0	
<i>A.sojae</i>									
RIB401	-								
RIB1348	-								
AOK31-1	+				91.3	20.1	79.6	21	
AOK32	+								
AOK34	+								
AOK141	+								
AOK224	-								
AOK33	+	1			90.7	20.1	79.6	21	
AOK38-1	-	0							
AOK98	+	1							

+ , amplified - , none
Blank no data

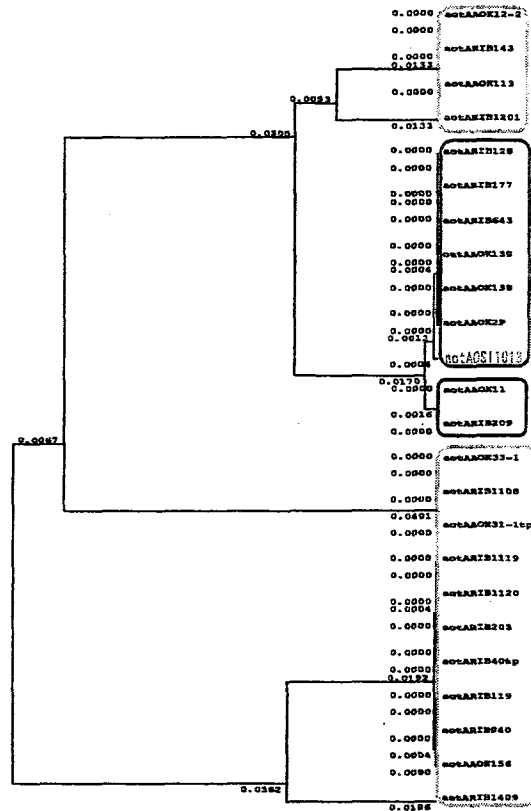


Fig. 14 Dendrogram of *aotA* sequences of *Aspergillus* strains drawn by UPGMA method
 [Solid box] , 100% match in aa;
 [Dashed box] , 2 aa mutation; [Dotted box] , GC to AT mutation

OSI1013	1: ATGAGGTCCTTTTGAAACCGAAATAGTGGAAATAGAAAGTTGAATCAAGAGCTTCTACTGAGACGCCGGCAGCAATTATATCTGGTCTAGAGAAATAAATA	100
RIB40	1: ATGAGGTCCTTTTGAAACCGAAATAGTGGAAATAGAAAGTTGAATCAAGAGCTTCTACTGAGACGCCGGCAGCAATTATATCTGGTCTAGAGAAATAAATA	100
OSI1013	101: TATCGCCCTACTCAACTTTCGGAGCAATTAAGCTCTGTCGGCCTACTATTTACTCAACCAAAAACGGCTTTCAGCACCACACCTTGGAAAAGCAAGCC	200
RIB40	101: TATCGCCCTACTCAACTTTCGGAGCAATTAAGCTCTGTCGGCCTACTATTTACTCAACCAAAAACGGCTTTCAGCACCACACCTTGGAAAAGCAAGCC	200
OSI1013	201: TAGAAAGGGCAGCCCTCAGAAGCTTACCTCCCTGAAAGCCTATATATATCTGCTCCCGCCGGAGGCCAAGATAGGCTACAGGCCCTGAGCGCT	300
RIB40	201: TAGAAAGGGTAGGCTTTCAGAAGCTTACCTCCCTGAAAGCCTATATATATCTGCTCCCGCCGGAGGCCAAGATAGGCTACAGGCCCTGAGCGCT	300
OSI1013	301: AGCAGTGGTTTTCAATCTCTCACTTACTATTAAGCGGACTAGGACTTTCAATTAATAAAGTGAAGAGCTTAGAGCGTATACCTCTAAGACCTG	400
RIB40	301: AGTGGGTGTTTTCAATCTCTCACTTACTATTAAGCGGACTAGGACTTTCAATTAATAAAGTGAAGAGCTTAGAGCGTATACCTCTAAGACCTG	400
OSI1013	401: ATGTGGCTAAAAAACGCGCTTCAATTCGCGGCTACCTCGGCCAAATCTACCTATTATCTGAAATGATGTGTTTCSGACGAAATGTTCTCTCCACGAAAGTC	500
RIB40	401: ACCTGGCTAAAAAACGCGCTTCAATTCGCGGCTACCTCGGCCAAATCTACCTATTATCTGAAATGATGTGTTTCSGACGAAATGTTCTCTCCACGAAAGTC	500
OSI1013	501: GAATTAATCAACCCAAATAAGGGTTCGGCTCTCAATGAGCCATATAGAGAGGATCTAGTTATCCCAAAAACAGAAATGCGTAAAGATGATTTTAAATCGCT	600
RIB40	501: GAATTAATCAACCCAAATAAGGGTTCGGCTCTCAATGAGCCATATAGAGAGGATCTAGTTATCCCAAAAACAGAAATGCGTAAAGATGATTTTAAATCGCT	600
OSI1013	601: TGGGGCGCTATATGGATTTGGTGGCGGATCTGAAATGGCTTATTAAGAAATAGATGAAATGATCTTAAAGGCTGATCTTAAGTCCGCTTAAATTT	700
RIB40	601: TGGGGCGCTATATGGATTTGGTGGCGGATCTGAAATGGCTTATTAAGAAATAGATGAAATGATCTTAAAGGCTGATCTTAAGTCCGCTTAAATTT	700
OSI1013	701: GCTTGAAGAAGGCGCTTCTCAATTAAGGCTGCGCTTCTATGCTGCGCCATAGCTAATGCAAGAGATTCAGTCTCTAGCCGGGCTAGGACGGCTG	800
RIB40	701: GCTTGAAGAAGGCGCTTCTCAATTAAGGCTGCGCTTCTATGCTGCGCCATAGCTAATGCAAGAGATTCAGTCTCTAGCCGGGCTAGGACGGCTG	800
OSI1013	801: AAGGATGCGAATTTGCTGTCGGGATTTGCGCTGTCACACTTGCTGGATTTAAATCCTATTTGACCACTCTGCGAACCTCTTAAAAAGAGCTTTTAAAGCTC	900
RIB40	801: AAGGATGCGAATTTGCTGTCGGGATTTGCGCTGTCACACTTGCTGGATTTAAATCCTATTTGACCACTCTGCGAACCTCTTAAAAAGAGCTTTTAAAGCTC	900
OSI1013	901: TATTCGAGAGCTCTTCTCAGCGCAGCAATCAAGATTGATTCAGCCAAATTTAGGAGAGGATCTCAAGCTCCCTGGTTCCTTATCTCCAGAGCGAATAG	1000
RIB40	901: TATTCGAGAGCTCTTCTCAGCGCAGCAATCAAGATTGATTCAGCCAAATTTAGGAGAGGATCTCAAGCTCCCTGGTTCCTTATCTCCAGAGCGAATAG	1000
OSI1013	1001: ATCCGCTTATCTCGCTTATCGCAAGGCTAGCACTTCAAGGCTTCAAGCTCCCTAGGAGCGGCTTGGTATACAAAATCTCA	1074
RIB40	1001: ATCCGCTTATCTCGCTTATCGCAAGGCTAGCACTTCAAGGCTTCAAGCTCCCTAGGAGCGGCTTGGTATACAAAATCTCA	1074

Fig. 15 Alignment of amino acid sequence of the *Aoimp1* from OSI1013 and RIB40
 Different nucleotides of the *aotA* ORF from that of OSI1013 in RIB 40 are indicated in bold, of which GC to AT mutations are indicated with underlines.

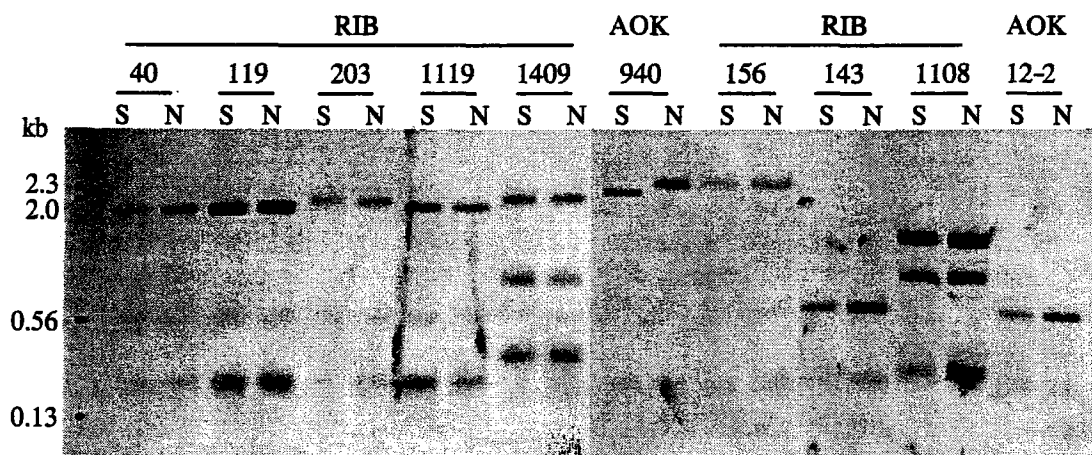


Fig. 16 GC-methylation analysis in mutant strains carrying low copy number of the *Aoimp1*
 Genomic DNAs were digested with GC-methylation sensitive endonuclease, *Sau3AI* (S) and insensitive endonuclease, *NdeII* (N), and then hybridized with full-length of *Aoimp1*.

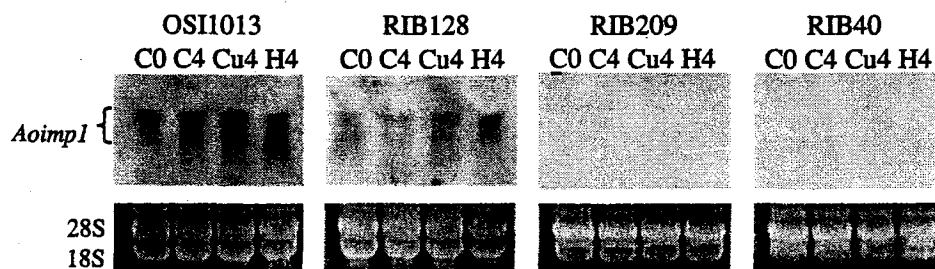


Fig. 17 Northern blot analysis of the *aotA* expression in *A. oryzae* strains
 Total RNAs (5 μ g) were separated and hybridized with the full length of *Aoimp1* (1.3kb) from OSI1013 as a probe. Each strain was precultured in MM supplemented with trace elements and 0.2% casamino acid at 30°C for 36 hr, and then cultured under stress conditions. C0, preculture; C4, control at 30°C; Cu4, cultured in 0.2 mM CuSO₄ at 30°C; H4, cultured at 42°C.

論文審査結果要旨

麹菌はわが国の伝統的発酵食品である酒，醤油，味噌などの製造において千年以上にわたって利用されている重要な微生物である。最近麹菌の全ゲノム解析が終了し，ゲノム情報にもとづく網羅的な遺伝子機能解析が可能となってきた。一方で機能遺伝子を効率よく特定するための分子生物学的解析技術の開発も望まれてきている。本研究は，麹菌の実用株で見出された DNA トランスポゾンを利用したトランスポゾンタギングによる機能遺伝子の同定と優良株育種への応用を目的として，麹菌におけるトランスポゾンの転移活性化および転移様式を明らかにするとともに，麹菌株間での構造的特性を解析したものである。

実用麹菌株の硝酸還元酵素遺伝子に偶発的に転移挿入された DNA トランスポゾンが見出され，その構造を調べたところ，両端に 22bp の terminal inverted repeat を有し，その内部に 357 アミノ酸をコードする ORF が存在した。この ORF にコードされるタンパク質は，*Fusarium* 属カビの転移活性を示すトランスポゾン *impala* に存在するトランスポゼースに相同性が高く，実用株においても多コピー存在することから，転移活性を有しているものと考えられた。トランスポゼース遺伝子の発現を調べたところ，通常の培養条件でも転写されていたが，銅イオン存在下での培養や高温処理によって発現量が増加した。このようなストレス条件下で分生子を処理，または培養して分生子を形成させ，得られた過塩素酸塩耐性株について，耐性に関与する遺伝子をトラップとしてトランスポゾンの転移をスクリーニングした。その結果，硝酸取り込みに関与する *crnA* 及び硝酸還元酵素遺伝子 *niaD* のプロモーターやコード領域にトランスポゾンが挿入された株が効率よく得られた。挿入された位置には TA の重複配列が存在し，*Tcl/mariner* ファミリーに典型的な挿入様式を示した。また，*crnA* プロモーターに挿入されて硝酸塩非還元性となった株を親株として，ストレス処理することによりトランスポゾンの転移脱離が誘発され，硝酸塩培地に生育可能な株が $10^{-4} \sim 10^{-5}$ の頻度で取得できた。トランスポゾンが切り出された領域には，CTTTA の 5 塩基が footprint 配列として残されていた。

麹菌や近縁の醤油麹菌の保存菌株における本 DNA トランスポゾンの分布を調べたところ，多コピー存在するグループ，3 コピー程度存在するグループ，1 コピーのみ存在するグループの 3 種に大別できた。特に，全ゲノム解析に使用した RIB40 株では，サザン解析でうすい 1 本のバンドが認められたのみで，PCR によって増幅されたトランスポゾン領域の塩基配列から，C:G → A:T への置換によりトランスポゼース遺伝子内に多数のストップコドンが生じていることが明らかとなった。

本研究では，これまで転移活性を有するトランスポゾンが見出されていなかった麹菌において，初めて転移可能な DNA トランスポゾンを発見した。また，外的ストレスに応答して DNA トランスポゾンが転移するとともに，挿入遺伝子部位から切り出されることをカビで初めて明らかにした。また，本研究の成果は，麹菌におけるトランスポゾンによる遺伝子タギング法の開発につながることで期待される。以上の研究成果に鑑み，審査員一同は本論文が博士（農学）の学位を授与するに値する内容であると判定した。