

サーチェーンによる *Aspergillus nidulans* の代謝制御機構の解明

2017 年 1 月

伊藤 英里子

サーチェーンによる *Aspergillus nidulans* の代謝制御機構の解明

筑波大学大学院

生命環境科学研究科

生物機能科学専攻

博士（農学）学位論文

伊藤 英里子

目次

略語.....	iv
序章 序論.....	6
1. 糸状菌の産業応用と生態解析.....	6
2. 糸状菌のサーチュイン.....	6
3. 本研究の目的および構成.....	7
第一章 サーチュイン E は糸状菌の対数期から定常期への転写の移行をグローバルに制御する.....	10
1-1. 序論.....	10
1-2. 材料および方法.....	11
1-2-1. 使用菌株.....	11
1-2-2. <i>sirE</i> 遺伝子破壊株の作製.....	11
1-2-3. 蛍光顕微鏡観察.....	12
1-2-4. 定量 PCR.....	12
1-2-5. ウェスタンブロットティング.....	13
1-2-6. 菌体重量、培地中グルコース濃度、菌体の生存率の定量と算出.....	13
1-2-7. 菌体外酵素の活性測定.....	13
1-2-8. RNA シーケンシング解析.....	14
1-2-9. DNA マイクロアレイ解析.....	15
1-2-10. ステリグマトシスチン生産量の比較.....	15
1-2-11. クロマチン免疫沈降法 (Chromatin immunoprecipitation、 ChIP).....	15
1-3. 結果.....	16
1-3-1. サーチュイン様タンパク質の配列の比較.....	16
1-3-2. SirE による H3 のリジン 9、18 および 56 番目のリジン残基の脱アセチル化.....	17
1-3-3. SirE はカビの自己溶菌を促進させる.....	17
1-3-4. SirE は分生子形成を制御する.....	18
1-3-5. SirEΔのトランスクリプトーム解析.....	19
1-3-6. SirE はステリグマトシスチン生合成、分生子形成、菌体外加水分解酵素の発現を制御する.....	19
1-3-7. SirE は菌体外加水分解酵素の活性を正に制御する.....	20
1-3-8. SirE は定常期に一次代謝を抑制する.....	20
1-3-9. SirE は定常期に細胞壁合成酵素遺伝子群を抑制する.....	21
1-3-10. SirE による一次代謝遺伝子のプロモーター領域の脱アセチル化.....	22

1-3-11. 炭素飢餓応答と SirE による遺伝子発現制御	23
1-4. 考察	24
第二章 SirA は二次代謝のグローバルな制御因子である	48
2-1. 序論	48
2-2. 材料および方法	49
2-2-1. 使用した菌株、培地、培養条件	49
2-2-2. DNA マイクロアレイ解析	50
2-2-3. 二次代謝産物の解析	50
2-2-4. 定量リアルタイム PCR	50
2-3. 結果	51
2-3-1. SirA は一次代謝および二次代謝に関連する遺伝子群の発現を制御する	51
2-3-2. SirA は二次代謝系遺伝子クラスターを制御する	52
2-3-3. SirA によって制御される他の二次代謝系遺伝子クラスター	53
2-3-4. SirA はステリグマトシスチンとオースチノールの生産を制御する	54
2-3-5. SirA Δ 株と SirE Δ 株のトランスクリプトーム解析の比較	55
2-4. 考察	56
第三章 <i>Aspergillus nidulans</i> のサーチユインの二次代謝に対する機能解析	71
3-1. 序論	71
3-2. 材料および方法	72
3-2-1. 使用菌株、培地、培養方法	72
3-2-2. 二次代謝産物の生産量の比較	72
3-2-3. サーチユインの組換えタンパク質の作製と活性測定	73
3-2-4. <i>sirB</i> 、 <i>sirC</i> 、 <i>sirD</i> 遺伝子破壊株の作製	73
3-2-5. 蛍光顕微鏡観察	74
3-2-6. 定量リアルタイム PCR	74
3-2-7. ウェスタンブロットティング	74
3-2-8. RNA シーケンシング解析	74
3-3. 結果	74
3-3-1. サーチユイン様タンパク質の配列の比較	74
3-3-2. サーチユイン遺伝子破壊株の表現型	75
3-3-3. サーチユイン遺伝子破壊株の二次代謝産物	75
3-3-4. サーチユイン様タンパク質の組換え体の活性測定	76
3-3-5. サーチユイン遺伝子破壊株のヒストンアセチル化レベル	77
3-3-6. SirC の細胞内局在	77
3-3-7. SirC Δ のトランスクリプトーム解析	78
3-4. 考察	78

総括.....	92
謝辞.....	99
参考文献.....	100

略語

ADPR: Adenosine 5'-diphosphate ribose

bp : base pair

DNA : deoxyribonucleic acid

DEAE : diethylaminoethyl

DMAT: dimethyl-allyl-tryptophan

EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid

GFP: Green Fluorescent Protein

GO: gene ontology

GST : glutathione-S-transferase

HA: hemagglutinin

HDAC: Histone Deacetylase

HEPES: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

HPLC : High performance liquid chromatography

Hsp: heat shock protein

IPTG : Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

MALDI-TOF-MS : time of flight mass spectrometry

MS: cobalamin-independent methionine synthase

MS: Mass Spectrometry

NAD⁺: nicotinamide adenine dinucleotide oxidized form

NAM: nicotinamide

NRPS: non-ribosomal peptide synthetase

ORF : open reading frame

PAGE : polyacrylamide gel electrophoresis

PCA: principal-component analysis

PCR : polymerase chain reaction

PEG : polyethylene glycol

PKS: polyketide synthase

PMF: peptide mass fingerprinting

RNA : ribonucleic acid

SDS : sodium dodecyl sulfate

ST: Sterigmatocystin

TAP: tandem affinity purification

Tris : (hydroxymethyl) aminomethane

序章 序論

1. 糸状菌の産業応用と生態解析

糸状菌は古くからクエン酸発酵、酒類、味噌、醤油などの食品の醸造、医薬品原料の生産菌、アミラーゼやペクチナーゼなどの酵素生産に用いられてきた(1)。その一方で、糸状菌にはカビ毒を生産し、ヒトや動植物に病害をもたらすものも多く知られる。このように、糸状菌は産業や医療上高い重要性を有するにもかかわらず、それらに関わる生理学的背景の解明は他の生物に比べ遅れている。未だ明らかとなっていない部分が多い糸状菌の生理を分子レベルで明らかにすることによって、糸状菌の更なる産業利用の拡大が期待できる。本研究では、麴菌の類縁種であり、近年、全ゲノム情報が公開された糸状菌のモデル生物である *Aspergillus nidulans* を用いて糸状菌の代謝制御機構を解明することを目指した。

クエン酸発酵や食品の発酵作用は栄養源が豊富に存在する間に行われる一次代謝によるものであり、毒物や医薬品となる生理活性物質を生産する二次代謝やアミラーゼやペクチナーゼなどの生産は、飢餓条件などに応答し培養後期に誘導される。このような有用物質や有害物質の生産を人為的に制御するためには、糸状菌の代謝の制御機構の理解が重要となる。糸状菌は栄養源が存在する際には対数増殖を行い、飢餓になるとその生育は定常期を迎える。また定常期に飢餓状態が続くと死滅期に入り、各種の溶菌酵素の生産を増加させ自己溶菌を始める。栄養源に応答する機構が糸状菌の生育期とそれとともに代謝の移行に関与すると予想されるが、その詳細は不明である。一方、近年、カビの代謝、特に二次代謝に次節で述べるサーチュインが関与すると判明しつつある。

2. 糸状菌のサーチュイン

アセチル化、メチル化、SUMO 化によるヒストンの修飾は、遺伝子の発現をグローバルに制御する。histone acetyltransferase と histone deacetylase (HDAC) の働きによってヒストンのリジン残基のアセチル化と脱アセチル化が行われる。ヒストンの脱アセチル化はヘテロクロマチンの形成を促す。ヘテロクロマチンは凝集したクロマチンであり、それが形成された染色体上の領域では転写が不活性化される。NAD⁺ 依存的な HDAC である Silent information regulator 2 protein (sirtuin、サーチュイン) は、この機構によって多

くの細胞プロセス (代謝、エネルギー変換、発達、ストレス応答など) に関与するジーンサイレンシング因子として働くことが知られている (2)。サーチュインは真核生物に広く保存され、I から IV および U の 6 つが知られる HDAC のクラスのうち、クラス III に属する(3, 4)。既に機能が判明している *Aspergillus nidulans* の SirA は、*Saccharomyces cerevisiae* の Sir2p と Hst1p、ヒトの SIRT1 のアイソザイムである。SirA はヒストン H4 の 16 番目のリジン残基 (H4K16ac) を脱アセチル化し、二次代謝産物であるペニシリンやステリグマトシスチンの生合成遺伝子の発現を抑制する (5)。一方、*Magnaporthe oryzae* の SirA アイソザイムである MoSir2 は非ヒストンタンパク質である MoJmjC (Cupin-like JmjC domain-containing protein) を脱アセチル化することによって、植物病原性を制御している(6)。*A. nidulans* の HstA は *Schizosaccharomyce. pombe* の Sir2 と類似のヒストン脱アセチル化酵素であると予想されており、ペニシリンやノルソロリン酸の生合成遺伝子の発現を抑制する (7)。*A. oryzae* AoHstD は、*S. cerevisiae* の Hst4p のアイソザイムであり、分生子形成、二次代謝 (8)、ストレス耐性 (9)に関与する。このように糸状菌のサーチュインの機能は多様だが、一次代謝への関与は不明であり、サーチュインが発現制御する遺伝子や代謝系についての網羅的な解析は行われていない。*A. nidulans* では、SirA を含む 6 つのサーチュイン様タンパク質の存在が予測されているが、それぞれの機能や役割分担は未知である (5)。

3. 本研究の目的および構成

本研究では、サーチュインによって制御されている *A. nidulans* の遺伝子発現及び代謝経路の解明を目指した。

第一章では、サーチュイン E (SirE) の機能解析を行った。*sirE* 遺伝子は生育の定常期に発現し、SirE は核に局在した。また、定常期の *sirE* の遺伝子破壊株 (SirEΔ株) ではヒストン H3 の 9、18、56 番目のリジン残基のアセチル化レベルが上昇した。さらに、SirEΔでは自己溶菌、胞子形成、ステリグマトシスチンの生合成、菌体外加水分解酵素の活性化等の定常期に行われる代謝が低下した。トランスクリプトーム解析によって、SirE がこれらの関連遺伝子の発現を正に制御する一方、一次代謝関連遺伝子のそれを抑制することが示された。このうち、グルカン合成遺伝子 *agsB*、解糖系遺伝子 *pfkA*、*pkiA* および *gdpA* のプロモーター領域のヒストンのアセチル化レベルが SirEΔで上昇したことと、SirE がこれらの遺伝子プロモーターに結合していたことから、SirE がこれらの遺伝子の発現を直接抑制すると考えられた。また、SirE が制御する遺伝子群、対数期と定

常期で発現が変化する遺伝子群、炭素飢餓に応答する遺伝子群の間には有意な相関がみられた。以上の結果から、SirE は、定常期に引き起こされる炭素飢餓に応答してヒストンを脱アセチル化することによって、一次代謝から定常期の代謝への移行を制御する新たな因子であることが示された。

第二章では、サーチェイン A (SirA) が二次代謝に与える影響を網羅的かつ経時的に解析した。まず、*sirA* 遺伝子が培養後期に発現誘導されることを新たに示した。野生株と *sirA* 遺伝子の遺伝子破壊株 (SirAΔ 株) のトランスクリプトームを比較したところ、SirA は培養後期に二次代謝関連遺伝子を有意に発現抑制することが示された。また、SirA によるこの制御は二次代謝遺伝子クラスターごとであったことから、SirA は二次代謝のグローバルな発現制御因子であると考えられた。さらに、SirA は、オースチノールとデヒドロオースチノールの生産量を液体・固体培養のいずれの場合においても制御することが明らかとなった。さらに、SirAΔ 株、SirEΔ 株および野生株のトランスクリプトームを比較したところ、SirA と SirE はステリグマトシスチンやエメリセラミドといった二次代謝系遺伝子と菌体外加水分解酵素の発現をそれぞれ、負および正に制御することが明らかとなった。また、SirE は一次代謝に関与する遺伝子群の発現を抑制したが、SirA はこれらの発現を上昇させた。このことから、両サーチェインは一部の遺伝子を共通の標的とし、反対方向の制御を行い遺伝子発現と代謝のバランスを調節すると考えられた。

第三章では、*A. nidulans* のサーチェインである SirB、SirC、SirD の二次代謝に与える影響を検証した。これらは全てサーチェイン活性ドメインを有し、SirB 以外は核移行シグナルを有した。SirA から SirE の遺伝子の遺伝子破壊株を固体 GMM で培養後、菌体抽出物を HPLC を用いて解析したところ、SirE を除くサーチェインの遺伝子破壊株では野生型株と比較して二次代謝産物の生産量が増加したことから、SirB、SirC および SirD も前述の SirA と同様に二次代謝系の発現を抑制することが示された。さらに、SirA の他に、SirB と SirC が脱アセチル化活性を有することが新たに判明した。*sirB* と *sirC* の遺伝子破壊株 (それぞれ SirBΔ 株と SirCΔ 株とする) では、ヒストン H4 の 16 番目のリジン残基のアセチル化レベルが野生株に比べ増加したが、その程度は SirCΔ でより顕著であった。さらに、SirC は核に局在したことから、特に SirC が核内でヒストンの脱アセチル化を行うと考えられた。SirC に注目し、PD 培地で培養した SirCΔ のトランスクリプトーム解析を行ったところ、二次代謝系遺伝子の発現は有意に変化していなかったが、アルドン酸代謝を抑制することがわかった。また、約 1500-2000 の遺伝子を制御す

る SirA や SirE と比べ制御下にある遺伝子数が 45 と少なかったことから、PD 培地で培養した場合の SirC の制御は狭い範囲の遺伝子の発現にのみ及ぶことが明らかとなった。

本研究により、*A. nidulans* のサーチュインアイソザイムが対数期から死滅期に至る広範な生育期に様々な代謝を制御することが判明した。本研究の応用上のインパクトは多岐にわたると期待される。即ち、まず、SirE の機能の阻害と SirA の発現の増強を介して、培養条件に関わらず一次代謝に関与する遺伝子群の発現を増強することによって、有機酸などの発酵効率を改善することに繋がると期待される。これとは反対に、SirE の機能を人為的に増強させることによって糸状菌に自己溶菌を引き起こし、菌体内に蓄積された有用物質を抽出し利用することが容易になることも期待できる。また、SirA、SirB、SirC、SirD の遺伝子発現を抑制することによって二次代謝産物の生産量の向上や、新たな二次代謝産物の開発に応用できるだろう。サーチュインは糸状菌の生存や毒素の生産に関与することから、サーチュインを標的とする薬剤の開発は、糸状菌による病害や汚染の防除にも役立つだろう。さらに、サーチュインの基礎的な研究の発展にも貢献できる。これまでに、1 つの生物が複数のサーチュインアイソザイムを有することが多いことが判明しているが、それらの役割や標的がどのように区別されているのかは、ヒトや酵母などのよく研究されている生物以外ではほぼ不明であった。本研究により、糸状菌のサーチュインの標的や制御する遺伝子群および活性化する生育フェーズの差異が明らかになった。このように、本研究によって得られた成果は、産業への応用のための基礎的知見およびサーチュインの機能の知見となり、社会に大きく貢献するものである。

第一章 サーチューイン E は糸状菌の対数期から定常期への転写の移行をグローバルに制御する

1-1. 序論

カビは栄養飢餓にさらされると一次代謝と対数増殖をやめ、その生育は定常期を迎える。定常期になるとカビは二次代謝を活発化させ、多くの低分子代謝物を生産する。この中には医薬品に応用される有用な物質もあるが、生命に重篤な危機を与えるカビ毒も含まれる。有性および無性胞子の分化や自己溶菌もまた定常期に発生するイベントの一つである。自己溶菌は菌糸を自己分解する現象であり、菌体外の β -1,3-glucanase EngB、chitinase B (ChiB)、N-acetyl-D-glucosaminidase NagA が細胞壁のグルカンやキチンを分解し、その結果、細胞が溶解することで引き起こされる(10–12)。自己溶菌したカビの培養液からは、細胞内に蓄積される有用物質を容易に取り出すことができるため醗酵産業において重要である(13)。また、自己溶菌に関与する上述の加水分解酵素自体も工業的に有用である(14)。一方、自己溶菌を阻害することによって、一次代謝や二次代謝系によって生成される有用な物質の生産を長期化させることができる(14)。これらのことから、対数増殖期に起きる一次代謝から定常期に起きる代謝への移行のメカニズムを解明することは重要である。

グルコースはカビの重要な炭素源でありエネルギー源である。栄養生長中にグルコース飢餓にさらされると、一次代謝系を構成する解糖系遺伝子、脂質同化遺伝子、窒素同化遺伝子などのハウスキーピング遺伝子の発現が抑制される (15, 16)。しかし、グルコース飢餓がどのように一次代謝の遺伝子を抑制するかは未知である。一方、グルコース飢餓によってカーボンカタボライト抑制が解除される。*A. nidulans* の CreA は最も研究されているカーボンカタボライト抑制を担う糸状菌の DNA 結合タンパク質であり、十分なグルコースが添加されたときに菌体外加水分解酵素の生産、分生子形成および二次代謝産物の生産に関連する遺伝子を発現抑制する機能を有する (17–19)。また、CreA はグルコースの存在下で定常期に起こるメカニズムの発現を抑制することが報告されているものの (20)、CreA の機能の多くは未解明である。また、*creA* の変異株では解糖系の構成酵素の活性が上昇するとの報告があるが (21)、CreA がグルコース飢餓に応答してこれらの遺伝子を発現抑制するという報告はない。したがって、CreA がグルコース飢餓に応答して対数増殖期に行われる一次代謝を抑制するとは考えにくく、CreA とは別に一次代謝を抑制する因子が存在すると予想される。

本章では *A. nidulans* の Class Ic サーチユイン であるサーチユイン E (SirE) が定常期にヒストン H3 の 9 番目、18 番目および 56 番目のアセチルリジン残基を脱アセチル化することを明らかにした。また、トランスクリプトーム解析、遺伝学的解析、生理学的解析によって、SirE は自己溶菌、分生子形成、ステリグマトシスチンの生合成に関与する遺伝子の発現を増加させることを明らかとした。トランスクリプトーム解析によって、SirE は解糖系や tricarboxylate (TCA) 回路、窒素同化、細胞壁の合成を含む一次代謝に関与する遺伝子の発現を定常期に抑制することが示された。このうち、細胞壁の合成に関与する α -1,3-glucan synthase をコードする *agsB* 遺伝子、解糖系遺伝子 *pfkA*、*pkIA* および *gdpA* 遺伝子のプロモーター領域のヒストン H3 が SirE によって脱アセチル化され、それらの遺伝子の発現が抑制されることが示された。さらに、SirE の制御下にある遺伝子群、対数増殖期から定常期にかけて発現が変化する遺伝子群、炭素飢餓に応答して発現が変化する遺伝子群 (16) の 3 つの遺伝子群の間には有意な相関が見られた。以上の結果から、本章では SirE が炭素飢餓に応答して、一次代謝から二次代謝への移行を制御する新たな因子であることが示された。

1-2. 材料および方法

1-2-1. 使用菌株

Aspergillus nidulans A26 株 (*biA1*)、A89 (*biA1*, *argB2*) (Fungal Genetic Stock center, University of Missouri) および ABPUN (*biA1*, *argB2*; *pyrG89*; *yA2*; *pyroA4*) (5) を使用した。分生子 2×10^8 個を 500 mL 容フラスコに入った 200 mL の GMM 培地 (22) に播種し、120 rpm、30°C で培養した。固体 GMM には 1.5% の寒天を加えた。定量 PCR に供する菌体は、固体 GMM にセロファン膜を敷き、その上に分生子 1×10^6 個をスプレッターで播種、37°C で培養した。二次代謝産物の分析に供する菌体の培養はセロファン膜を用いずに同様に培養した。栄養要求性株の培養時には biotin (0.25 mg L^{-1})、arginine (0.2 mg L^{-1})、pyridoxine (0.1 mg L^{-1})、uracil (1.12 g L^{-1}) and uridine (1.2 g L^{-1}) を培地に添加した。薬剤耐性の検討の際は、分生子 (1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 and 1×10) を $15 \text{ }\mu\text{g/mL}$ Calcofluor White (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA) または $25 \text{ }\mu\text{g/mL}$ Congo red (Wako Pure Chem., Osaka, Japan) を含む GMM に滴下し 37 度で 48 時間培養した。

1-2-2. *sirE* 遺伝子破壊株の作製

A. nidulans A26 株のゲノム DNA を鋳型として、*sirE* 遺伝子の 5'-および 3'-非転写領域

と *argB* 遺伝子の DNA 断片をそれぞれ Prime star HS DNA polymerase (Takara, Kyoto, Japan) を用いて PCR 法により増幅させた。この 3 つの DNA 断片を KOD plus DNA polymerase (Toyobo, Tokyo, Japan) を用いた PCR 法を用いて融合させた。使用したプライマーを Table 1-1 に示した。得られた形質転換用 DNA カセットを UltraClean 15 DNA Purification Kits (MO BIO Laboratories, Carlsbad, CA, USA) を用いて精製し、(22) に示した方法で *A. nidulans* A89 株に導入した。得られた形質転換体の全 DNA をサザンブロット法で解析し *sirE* 遺伝子の破壊を確認し、この株を SirE Δ 株とした。

1-2-3. 蛍光顕微鏡観察

gpdA 遺伝子プロモーター、*sirE* または *sirA* 遺伝子、*egfp* 遺伝子を Table 1-1 に示したプライマーを用いた PCR 法により増幅させ、さらに PCR 法によって融合させた。このカセットを *Xba*I と *Sac*II または *Not*I を用いて制限酵素処理し、同様に処理をした pBSpyrG (*pyrG* 遺伝子の配列を有する) (22) に導入した。このプラスミドを pSirE-gfp および pSirA-gfp と名付けた。これらを ABPUN と SirE Δ または *sirA* 遺伝子破壊株 (5) を交配し作製した株にそれぞれ導入し、SirE-GFP 株 (*biA1*; *argB2*; *pyrG89*; *yA2*; *pyroA4*; *sirE Δ ::argB*; *gpdA-sirE-gfp::pyrG*) と SirA-GFP 株 (*biA1*; *argB2*; *pyrG89*; *yA2*; *pyroA4*; *sirA Δ ::argB*; *gpdA-sirA-gfp::pyrG*) を構築した。ABPUN に pBSargB と pBSpyrG とをそれぞれ導入した株、SirE-GFP 株、SirA-GFP 株の分生子を、カバーガラスを沈めた液体 GMM 培地にそれぞれ播種し、25°C で 24 時間静置培養した。培養後、4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI, Wako) を用いて染色し、8HE filter set (excitation BP470/40; emission BP525/50) を GFP の蛍光の観察用に、49 filter set (excitation G365; emission BP445/50) を DAPI の蛍光の観察用に装着した Axio Observer Z1 microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany)を用いて観察した。観察、解析、画像処理には ZEN 2.1 (Carl Zeiss) ソフトウェアを用いた。

1-2-4. 定量 PCR

A26 株および SirE Δ を液体培養で 48 時間または固体培養で 24 時間培養した後、前述の方法でこれらの全 RNA を抽出した。PrimeScript™ Reverse Transcriptase (Takara, Kyoto, Japan) を用いて Single-strand cDNA を合成し、(23) の方法に従って定量リアルタイム PCR を行った。Table 1-1 に使用プライマーを示す。転写物の量は、*actin* 遺伝子 (*actA*)の発現量を用いて補正して得られる相対値として表した。

1-2-5. ウェスタンブロッティング

液体 GMM 培地中で 24 時間または 48 時間培養した *A. nidulans* の菌体から核画分を (24)の方法に従って抽出した。これを Laemmli (25) のゲル (分離ゲルのアクリルアミド濃度は 15%) を用いた sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) に供した後、ニトロセルロース膜に転写した。これを 5% ウシ血清アルブミン (BSA) を含んだ TBST 緩衝液 (25 mM Tris HCl (pH 8.0)、140 mM NaCl、3 mM KCl、0.1% Tween 20) に浸し、室温で 1 時間ブロッキングした後、抗 histone H3 (acetyl K9) 抗体、抗 histone H3 (acetyl K18) 抗体、抗 histone H3 (acetyl K56) 抗体、抗 histone H3 抗体、抗 histone H4 抗体 (ab10812、ab1191、ab76307、ab1791、and ab10158、Abcam、Cambridge、UK) および抗 acetyl-histone H4 (Lys16) 抗体 (07-329、Millipore、Billerica、MA、USA) と 0.05%BSA を含んだ TBST 緩衝液に浸して 2 時間室温で保温した。抗体の希釈倍率は 1:1,000 とした。TBST 緩衝液での 10 分間の洗浄を 3 回繰り返した後、抗ウサギ IgG 二次抗体 (711-035-152、Jackson ImmunoResearch Laboratories、West Grove、PA、USA) と 0.05%BSA を含んだ TBST 緩衝液に浸して 1 時間室温で保温した。抗体の希釈倍率は 1:20,000 とした。化学発光は、ECL detection system (GE Healthcare、Waukesha、WI、USA) と ImageQuant LAS4000 Mini (GE Healthcare) を用いて検出した。

1-2-6. 菌体重量、培地中グルコース濃度、菌体の生存率の定量と算出

液体培養した菌体の乾燥重量の測定は (11) に従った。固体培養した菌体の乾燥重量は、プレートからセロファン膜ともに菌体を回収した後で測定した。培地内のグルコース含量は、液体培地を濾過して得られた上清、または、菌体とセロファン膜を剥離した後の固体培地を溶かして得た培地に Glucose CII-test kits (Wako) を用いて測定した。

培養上清の濁度はフィルター濾過して得た培養上清を 600 nm の波長の吸光度を測定して求めた。カビの生存率は AlamarBlue® (AB) Cell Viability Reagent (Invitrogen) を用いた。カビの培養物(0.5 mL) と GMM (1 mL)を AB reagent (終濃度 10%) と混ぜた後に、24 ウェルプレートに移し 4 時間遮光して 37°C で保温した。その後、570 と 600 nm の波長の吸光度を測定し、(26) に示された計算式でカビの生存率を求めた。

1-2-7. 菌体外酵素の活性測定

カビの培養液をフィルター濾過することにより培養上清を回収し、それらの菌体外加

水分解酵素の活性を測定した。Chitinase 活性は (27) の方法に従って測定した。 β -1,3-glucanase 活性は (28) の方法に以下の修飾を加えて測定した。培養上清(62.5 μ L) と 10% ラミナリン (62.5 μ L) を 37°C で 16 時間保温した。これにジニトロサリチル酸試薬 (5-ジニトロサリチル酸 0.5 g、2N 水酸化ナトリウム溶液 20 mL、ロッシェル塩 30 g を水に溶かして 100 mL としたもの、375 μ L) を加え、5 分間煮沸した後、遠心分離し沈殿物を除去した。得られた上清の 535 nm の波長の吸収の吸光度を測定した。chitinase と glucanase の比活性は、それぞれ *N*-acetylglucosamine とグルコースを 1 分間に 1 μ mol 生成する活性を 1 unit と定義した。

他の加水分解酵素の活性は以下の方法で測定した。液体培養後の培養上清 125 μ l に 50 mM 酢酸ナトリウムバッファー (pH 6.0) を等量加え、50°C で 10 分間あらかじめ加熱した後、各酵素の基質である *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (α -glucosidase)、*p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (β -glucosidase) 、 *N*-acetyl- β -D-glucosaminide (*N*-acetyl- β -D-glucosaminidase) 、 *p*-nitrophenyl- β -D-cellobioside (β -cellobiase) 、 *p*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (β -galactosidase) 、 *p*-nitrophenyl- β -D-xylopyranoside (β -xylosidase)、*p*-nitrophenyl- β -D-mannopyranoside (β -mannosidase) (Sigma) を 2 mM ずつそれぞれ添加し、37°C で 30 分間保温した後に 2 M の炭酸ナトリウム 500 μ L を加えて反応を停止させ 405 nm の波長の吸収の吸光度を測定することで、*p*-nitrophenol の生成量を算出した。1 分間に 1 nmol の *p*-nitrophenol を生成する酵素の活性を 1 unit とした。各酵素の活性測定のネガティブコントロールとしては、培養液の代わりに菌を添加していない液体培地を加えたものを使用した。

1-2-8. RNA シーケンシング解析

Aspergillus nidulans A26 株と SirE Δ 株を48時間液体培養した後、菌体をフィルター濾過で回収した。これを直ちに液体窒素で凍結および破碎し、RNeasy plant mini kits (Qiagen) を用いて total RNA を得た。以下は BGI 株式会社に依頼した。相補的 DNA を RNA から合成し、HiSeq4000 (Illumina, San Diego, CA, USA)を用いて ~ 1 Gb の DNA 配列を決定した (50-bp single reads)。Phred scores (Q) < 20 の配列を抽出し、このクリーンリードを *A. nidulans* FGSC A4 株の DNA 配列 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>) を参照してマッピングした。ゲノムのマッピングには BWA (<http://bio-bwa.sourceforge.net/>) を、遺伝子のマッピングには Bowtie 2 (<http://bowtie-bio.sourceforge.net/index.shtml>) を使用した。

遺伝子の発現量は、RSEM software package (29) を使用して定量化した。有意に上方

または下方制御された遺伝子を fragments per kilobase of exon per million mapped fragments (FPKM)の値 (2 連の実験の平均値) から算出した (probability ≥ 0.8)。RNA sequencing データは GenBank の NCBI BioProject (PRJNA337983) に登録した。

Gene ontology (GO) を AspGD (<http://www.aspgd.org/>) で公表されている アノテーションをもとに、ASpGD で配布されているツールを用いて解析した。注目した代謝に関与する遺伝子群は KEGG pathway database (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes、<http://www.genome.jp/kegg/>)を参考にした。

1-2-9. DNA マイクロアレイ解析

第二章 2-2-2 に示した。

1-2-10. ステリグマトシスチン生産量の比較

A26 株および SirEΔ を液体 GMM で 2 日間培養した。液体培養した培養物 20 mL に 20 mL の酢酸エチルを加え、12 時間振盪した。酢酸エチル画分を回収し減圧乾燥させた後、500 μL のメタノールに溶解させた。これを高速液体クロマトグラフィー (high-performance liquid chromatography、HPLC) を用いて解析した。この際、250 \times 4.6-mm Purospher® Star RP-18 end-capped column (particle size = 5 μm 、Millipore、Billerica、MA、USA) を装着させた 1200 Infinity series instrument (Agilent Technologies、Palo Alto、CA、USA) を用い、分離溶液としてアセトニトリル (solvent B)と 0.05% 酢酸アンモニウム水溶液 (pH 4.0) (solvent A) を用いた。溶媒の勾配は以下のとおりである。0-5 分 40% B、5-10 分 40-80% B、10-15 分 80% B、15-25 分 80-100% B、25-27 分 100% B、27-29 分 100-60% B、29-35 分 60% B、流速 0.8 mL min⁻¹、カラムオーブンの温度 40°C。210 nm の波長の吸光度を計測し定量した。

1-2-11. クロマチン免疫沈降法 (Chromatin immunoprecipitation、ChIP)

(30) の方法に従って行った。ウェスタンブロットに用いた抗アセチル化ヒストン抗体と抗体ヒストン抗体を 2 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 、抗 GFP 抗体 (3999-100、BioVision、California、USA) を 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ の濃度で用いた。QIAquick PCR purification kit (Qiagen) を用いて DNA を精製し、Table 1-1 のプライマーを用いた定量リアルタイム PCR でインプット DNA に対する相対的な免疫沈降された DNA 量を算出した。A26 株および SirEΔ 株の各遺伝子プロモーターに蓄積したアセチル化ヒストンの量は、抗アセチル化ヒストン抗体と抗体ヒ

ストン抗体によって免疫沈降法された DNA 量の比で求めた。SirE-GFP 株は各遺伝子プロモーターに蓄積した SirE-GFP 融合タンパク質の免疫沈降のために用いた。この株の対照として、YMT 株 (*yA2, pyrG89; pyroA4*) (31) に *pryG* 遺伝子を導入した YMT1 株を用いた。

1-3. 結果

1-3-1. サーチュイン様タンパク質の配列の比較

これまでのアミノ酸配列の分子系統学的解析によって、*A. nidulans* のゲノムは、SirA、SirB、SirC、SirD、SirE、HstA の 6 つのサーチュイン様タンパク質をコードする遺伝子を有することが示されている (5, 7)。これらのアミノ酸の配列を比較したところ、これら 6 つのサーチュイン様タンパク質は、NAD⁺結合サイト、ジンクフィンガーモチーフ、真核および原核生物のサーチュイン全てに共通して見られる His-Gly 残基が含まれる約 275 残基のサーチュイン相同領域を有していた (Fig. 1-1A)。このことから、これらは *A. nidulans* の細胞内でサーチュインとして機能する可能性が高いと考えられた。サーチュインはサーチュイン相同領域の配列によって Class I から Class IV および Class U の 5 つのクラスに分類され、さらに Class I は a-c、Class IV は a と b のサブクラスに分類される (32) *A. nidulans* の SirA は Class Ia に属し、*A. nidulans* の SirB (AN7461) および SirD (AN11873) は Class Ib、SirE は Class Ic、HstA は Class II、SirC (AN1782) は Class III にそれぞれ属する (8) (Fig. 1-1B)。また、アミノ酸の配列から、SirB 以外は核移行シグナル配列 (Nuclear localization signal、NLS) を有することが判明した (Fig. 1-1C)。SirA には pa t4、pat 7 および bipartite タイプの NLS が存在し、SirC と SirD には pat 4 と pat 7 タイプの NLS が存在した。SirE には 2 つの pat 4 および 6 つの pat 7 タイプの NLS が存在した (Fig. 1-1C)。

gpdA 遺伝子プロモーター下で SirE と GFP が融合したタンパク質 (SirE-GFP) を発現する SirE-GFP 株を作製し、蛍光顕微鏡下で観察した。この SirE-GFP は DAPI によって染色された核と同じ位置に局在した (Fig. 1-2A)。同様の現象が GFP-SirA 融合タンパク質でも確認された。このことから、SirA と SirE は核で機能すると考えられた。SirA は核でヒストンの脱アセチル化を行うことから (5)、SirE もヒストンの脱アセチル化を行うと考えられた。この章では、Class Ic サーチュインファミリーの一員である SirE に注目したサーチュインの機能の解析を目指した (Fig. 1-1B)。

1-3-2. SirE による H3 のリジン 9、18 および 56 番目のリジン残基の脱アセチル化

液体培養した A26 株の定量 PCR を行ったところ、*sirE* 遺伝子の発現量は経時的に変化しており、定常期（培養開始後 48 時間後）では対数増殖期（同 24 時間後）に比べて 3.3 倍の *sirA* の発現がみられた (Fig. 1-2B)。また、ウェスタンブロッティングによって、対数増殖期に比べ定常期では 0.4 倍の H3 の 9 番目のアセチル化リジン残基 (H3K9ac)、0.5 倍の H3 の 18 番目のアセチル化リジン残基 (H3K18ac) および 0.3 倍の H3 の 56 番目のアセチル化リジン残基 (H3K56ac) が蓄積されることが示された (Fig. 1-2C)。H3K9ac と H3K18ac の蓄積量の経時変化は *sirE* 遺伝子の発現量の変化と一致した。これに対して、H4 の 16 番目のアセチル化リジン残基 (H4K16ac) の蓄積量には経時的な変化は見られなかった。一方、*sirE* 遺伝子の領域を *argB* 遺伝子（形質転換マーカーとして用いた）で置き換えた *sirE* 遺伝子の遺伝子破壊株 (SirEΔ株) を作製した (Fig. 1-3)。培養開始後 48 時間後の SirEΔ株では、A26 株に比べて H3 の 9 番目のリジン残基 (H3K9) と 18 番目のリジン残基 (H3K18) のアセチル化シグナルがそれぞれ 2 倍ずつ、56 番目のリジン残基 (H3K56) のアセチル化シグナルが 4 倍検出され (Fig. 1-2C)、H4K16ac のシグナル強度には変化はなかった。このことから、SirE が定常期に H3K9ac、H3K18ac および H3K56ac を脱アセチル化すると考えられた。また、培養開始後 24 時間後の SirEΔ株においては、H3K56ac のシグナル強度が A26 株のそれと比べ 1.6 倍であったことから、SirE は定常期に加えて対数増殖期にも H3K56ac を脱アセチル化すると考えられた。

1-3-3 . SirE はカビの自己溶菌を促進させる

A26 株と SirEΔ株を液体培養し、それらの生育を観察した (Fig. 1-4A)。両株とも培養開始後 48 時間目に培地中のグルコースを使い切り、乾燥菌体重量の増加が停止したことから、生育の定常期に入ったことが示された。A26 株の乾燥菌体重量は培養開始後 48 時間目以降、徐々に減少したが、SirEΔ株ではこの減少の程度が小さかった (Fig. 1-4A)。SirEΔ株は培養開始後 144 時間目まで A26 株よりも大きな菌糸ペレットを形成し (Fig. 1-4B および C)、144 時間培養した時点での培養上清の濁度が小さかった (Fig. 1-4D)。この培養上清の濁りは、菌糸が溶菌して細胞内の成分が培養液中に溶出したことによるものであり、これに伴い、菌糸ペレットも小さくなる。これは A26 株が定常期以降に示した培養上清の濁度の上昇や菌糸ペレットの縮小といった現象と一致していた (Fig. 1-4C および D)。菌体の生存率を AB に対する還元活性を指標として測定 (26) したとこ

る、培養開始後 48 時間後では、AB が還元されて生じる赤い色素が両株で確認されたことから (Fig. 1-4C)、両株がこの時点で生存していることが示された。培養開始後 96 時間後には、A26 株で 39%、SirEΔ株で 82%の AB が還元された。培養開始後 144 時間後には、両株とも 70%以上の細胞が死滅した (Fig. 1-4E)。以上の結果から、SirE は定常期において細胞の生存率を低下させる機能があることが示された。乾燥菌体重量の減少、菌糸ペレットの縮小、生存率の減少、培養上清の濁度の上昇は、自己溶菌する菌糸に見られる特徴である (33)。このことから、SirE は定常期に自己溶菌を活性化すると推察された。

カビは自己溶菌に伴い、細胞壁を分解する加水分解酵素の生産を増加させる (14)。そこで、培養上清中の自己溶菌に関与する加水分解酵素である chitinase、 β -1,3-endoglucanase および *N*-acetyl- β -D-glucosaminidase (10–12) の酵素活性を測定した。A26 株では全ての酵素の活性が定常期以降増加したが、SirEΔ株ではその増加の程度は低かった (Fig. 1-5A-C)。さらに、SirEΔ株では chitinase B、 β -1-3-endoglucanase、*N*-acetyl- β -D-glucosaminidase をコードする *chiB*、*engA* および *nagA* 遺伝子の発現が A26 株に比べ減少していた (Fig. 1-5D)。これらの結果から、SirE は、定常期におけるこれらの自己溶菌関連遺伝子の正常な発現に必要であり、菌体の自己溶菌活性を増加させることが示された。

1-3-4. SirE は分生子形成を制御する

次に、固体培養における定常期での SirE の役割を解析した。定量 PCR 解析により、固体培養時に、*sirE* 遺伝子の発現量が定常期から培養後期に上昇することが明らかとなった (Fig. 1-2B)。このことから、SirE は固体培養時においても、液体培養時と同様に、定常期以降に行われる代謝に関与する可能性が考えられた。カビは固体培養時に菌糸を伸ばし、分生子を形成する。そこで顕微鏡でカビのコロニーを観察したところ、SirEΔ株ではA26株に比べ分生子の着生数が少なかった (Fig. 1-6A)。経時的に観察したところ、いずれの培養時間においても SirEΔ株ではA26株に比べ分生子数が少なかった (Fig. 1-6B)。固体培養時の SirEΔ株と A26 株の乾燥菌体重量はほぼ同程度であったことから (Fig. 1-6C)、この分生子の着生数の差は生育の差によるものではなく、SirE が分生子形成を促進させることによるものだと考えられた。分生子形成の開始に必須な転写因子をコードする *brlA* 遺伝子の発現量は、培養開始後 30 時間目と 36 時間目のいずれにおいても、SirEΔ株ではA26株に比べ減少していた (Fig. 1-6D)。後述のトランスクリプトーム

解析解析においても、SirEΔ株では分生子形成に関与する遺伝子の発現量が低下していた (Table 1-5)。以上の結果から、SirEは定常期に分生子形成を誘導することが示された。

1-3-5. SirEΔのトランスクリプトーム解析

定常期の A26 株と SirEΔ株の全 RNA の RNA-seq を行い、定常期に SirE の制御下にある遺伝子を同定した。A. nidulans のゲノム塩基対の 12 倍に相当する RNA の配列を決定し、得られた全配列の 61%~68 %を参考配列 (A. nidulans FGSC A4 株のゲノム DNA 配列、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>) に対してマッピングした (Table 1-2、1-3)。A26 株と SirEΔ株のトランスクリプトームを fragments per kilobase of exon region per million mapped reads (FPKM) を指標として比較した。全遺伝子の 82%にあたる 9,000 遺伝子が検出され (Table S1-1)、SirEΔ株では A26 株に比べ、701 遺伝子の発現が 2 倍以上上昇し、748 遺伝子の発現が 2 倍以上減少することが示された (Probability ≥ 0.8)。

1-3-6. SirE はステリグマトシスチン合成、分生子形成、菌体外加水分解酵素の発現を制御する

A26 株に比べ SirEΔ株で 8 倍以上発現量が減少した 381 遺伝子を Table S1-2 に示した。これらの遺伝子群に対して AspGD database (<http://www.aspgd.org/>) のアノテーションを用いた Gene ontology (GO) 解析を行ったところ、“Biological Process” カテゴリーのうち、有意な数の遺伝子が secondary metabolism の GO term を有することが判明した ($P < 1 \times 10^{-6}$)。この中にはカビ毒の一種であるステリグマトシスチンや他の二次代謝産物の代謝や生合成に関わる遺伝子が含まれていた (Table 1-4)。これは A26 株ではステリグマトシスチンが生産されるのに対して、SirEΔでは生産量が減少する現象と一致した (Fig. 1-7)。このことから、SirE はステリグマトシスチンの生合成系遺伝子の発現を増加させることが示された。

上記の遺伝子群には、“asexual spore wall assembly” ($P = 0.01$) や“melanin biosynthetic process” ($P = 6 \times 10^{-4}$) といった分生子形成に関与する GO term をもつ遺伝子も濃縮されており、これは前述した SirEΔの分生子形成の異常と一致する結果であった。“Molecular Function” のカテゴリーの遺伝子のうち、最も頻繁に見られた GO term は“oxidoreductase activity”、“carboxylic ester hydrolase activity”、“heme binding” および“tetrapyrrole binding” (それぞれ $P < 0.01$) であった (Table 1-4)。また、“Cellular Component” のカテゴリーでは、“extracellular region” ($P = 6 \times 10^{-8}$) が濃縮された (Table 1-4)。この

カテゴリーには多糖類分解酵素をコードする遺伝子(推定遺伝子も含む)が含まれていた。

1-3-7. SirE は菌体外加水分解酵素の活性を正に制御する

多糖類の分解に関する SirE の役割を理解するため、Saykhedkar ら (34) によって列挙された多糖類の分解に関わる菌体外加水分解酵素をコードする 100 遺伝子の発現プロファイルを作製した。100 遺伝子中 17 の遺伝子の発現が SirE Δ 株では A26 株に比べて 2 倍以上減少していた (Table 1-5)。このことから、SirE Δ 株は有意な数の菌体外加水分解酵素の遺伝子の発現を抑制することが示された ($P = 1.8 \times 10^{-4}$)。培養液中のこれらの酵素活性を測定したところ、A26 株では、培養 48 時間以降に β -cellobiase、 β -glucosidase、 β -mannosidase および β -galactosidase の活性が上昇していたのに対し、SirE Δ 株ではこの上昇の程度が低かった (Fig. 1-8)。 β -glucosidase (*bglL*、*bglA*)、 α -1,2-mannosidase (*mns1B*) および β -galactosidase (*lacF*) については、トランスクリプトーム解析で得られた遺伝子発現の減少と酵素活性の減少が一致していた。一方、SirE Δ では α -glucosidase や β -xylosidase の活性が A26 株よりも低かったが、これらの酵素をコードする遺伝子の発現は減少していなかった。このことは、未同定の遺伝子にコードされた酵素が α -glucosidase や β -xylosidase の活性を有しており、それらが SirE によって発現制御されている可能性を示している。また、“extracellular region” に含まれる遺伝子には、自己溶菌時に細胞壁の分解を担う酵素遺伝子である *chiB*、*engA* および *nagA* が見いだされ、これらの発現量は SirE Δ において減少していた (Table 1-5)。これは前述の SirE が自己溶菌を正に制御するという結果と一致した (Fig. 1-4 および 1-5)。

マイクロアレイ解析を用いて、A26 株の定常期 (培養開始後 48 時間後) と対数増殖期 (同 24 時間後) のトランスクリプトームを比較したところ、上記の多糖類加水分解酵素や自己溶菌関連酵素の遺伝子は、対数増殖期より定常期において高発現していた。これらの結果から、SirE は定常期に菌体外加水分解酵素や自己溶菌関連酵素の発現を誘導する機能があると考えられた。

1-3-8. SirE は定常期に一次代謝を抑制する

1-3-5 に示したトランスクリプトームの中から、A26 株に比べ SirE Δ 株で 8 倍以上発現量が上昇した 300 遺伝子抽出した (Table S1-3)。AspGD database (<http://www.aspgd.org/>) のアノテーションを用いた GO 解析を行ったところ、“Biological Process” カテゴリーの

うち、organic acid metabolism、organic acid biosynthesis および oxidoreductase に関する GO term をもつ遺伝子が有意に濃縮されていた (P values < 0.01 、Table 1-4)。この中には炭素やエネルギー源の一次代謝に関与する遺伝子が含まれている。そこで、解糖系、ペントースリン酸経路および TCA 回路を構成する遺伝子を選抜し、それらの発現を検証した。Figure 1-9A から C には、その結果をヒートマップとして示した。SirE Δ において2倍以上発現が上昇した遺伝子 (Table 1-6) がこれらのリストに有意に濃縮されていた (それぞれ $P < 0.01$)。このことから、SirE株では、解糖系、ペントースリン酸経路および TCA 回路の構成遺伝子の発現が増加することがわかった。また、“nitrite transmembrane transporter activity” ($P = 0.004$) および “nitrite uptake transmembrane transporter activity” ($P = 0.004$) の GO term も濃縮されていた (Table 1-4)。これらの GO term には硝酸を窒素源として利用する一次代謝に関わる nitrate reductase (*niaD*)、nitrite reductase (*niiA*) および nitrate transporters (*nrtB*、*crnA*、*nitA*) が含まれていた (Fig. 1-9D)。これらの結果から、SirE は定常期に炭素源と硝酸塩の一次代謝系の発現を抑制すると示された。A26 株の対数増殖期と定常期における上述の一次代謝に関与する遺伝子群の発現を 1-3-7 と同様に DNA マイクロアレイ解析によって比較したところ、対数増殖期に比べて定常期に発現が減少することが判明した (Fig. 1-9 および Table 1-6)。また、この傾向は *sirE* 遺伝子の破壊によって生じる遺伝子の発現変化とよく一致していた ($r = 0.87$ 、 $P < 0.001$)。これらの結果から、SirE は定常期にこれらの一次代謝を抑制する機能を有することが明らかとなった。

1-3-9. SirE は定常期に細胞壁合成酵素遺伝子群を抑制する

細胞壁の α -および β -glucan と chitin の正常な生合成は、対数増殖期に起こるイベントであり、細胞が正常な菌糸を形成するのに必要不可欠なものである。細胞壁の多糖類に結合する色素である Congo red (CR) や Calcofluor white (CFW) を培地に添加したところ、SirE Δ 株は A26 株よりもそれらに対する生育の感受性が高かった (Fig. 1-10)。この表現型は細胞壁に欠陥のある変異株に典型的に見られるものである。このことと SirE Δ 株において発現が増加した遺伝子に “cell periphery” ($P = 0.009$) の GO term を持つ遺伝子が濃縮されていたこととを考え合わせ (Table 1-4)、SirE Δ 株では細胞壁に関連する遺伝子の発現が増加していると予想された。そこで Groot ら (35) の報告による細胞壁合成に関連する 37 遺伝子について、1-3-5 で示したトランスクリプトーム解析の結果をまとめたところ、SirE Δ において 7 遺伝子の発現が増加していることが判明した ($P = 8 \times 10^{-3}$)

(Table 1-7)。このうち、本菌の主たる α -1,3-glucan synthase である *agsB*、chitin synthase *chsF*、 β -1,3-glucan の代謝に關与する SUN-family proteins である *sunA* と *sunB*、transglycosylase *crhB* および β -1,3-transglycosylase *gelE* の発現が SirE Δ 株では 4 倍以上上昇していた。このことから、SirE は細胞壁合成に關わる遺伝子の発現を抑制することが示された。A26 株の対数増殖期と定常期における上述の細胞壁の合成に關与する遺伝子群の発現を 1-3-7 と同様に DNA マイクロアレイ解析で比較したところ、A26 株において、Table 1-7 に示した 7 つの細胞壁合成に關連する遺伝子のうち 6 つの遺伝子の発現が対数増殖期に比べ定常期に抑制されることが判明した (Table 1-7)。このことから、SirE は定常期に抑制される細胞壁合成關連の遺伝子の発現を定常期に抑制することが示された。

1-3-10. SirE による一次代謝遺伝子のプロモーター領域の脱アセチル化

1-3-5 に示した RNA シーケンシング解析の結果から、SirE が解糖系遺伝子である推定 6-phosphofructokinase をコードする *pfkA*、pyruvate kinase をコードする *pkiA*、Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase をコードする *gpdA*、および細胞壁合成酵素 α -1,3-glucan synthase をコードする *agsB* の発現を抑制することが判明した (Fig. 1-9、Table 1-6 および 1-7)。そこで、抗アセチルヒストン抗体を用いた ChIP 解析を行った。その結果、培養開始後 24 時間 (対数増殖期) の SirE Δ 株では A26 株と比較して、*pfkA* 遺伝子のプロモーター領域のヒストン H3K18 と H3K56 のアセチル化レベルが 1.5 倍高かったが、この遺伝子の発現量には有意な差はなかった (Fig. 1-11A)。一方、培養開始後 48 時間 (定常期)では、この領域のヒストン H3K9 と H3K56 のアセチル化レベルがそれぞれ 2.0 倍および 1.7~1.9 倍であり、遺伝子の発現量は 2.6 倍であった (Fig. 1-11A)。この結果は、プロモーター領域のヒストン H3K9 のアセチル化レベルが遺伝子の発現量に影響を与えることを示している。同様の結果は、*gpdA* 遺伝子と *agsB* 遺伝子についても得られた。即ち、SirE Δ 株では A26 株と比較して、対数増殖期では両遺伝子のプロモーター領域のヒストン H3K9 のアセチル化レベルと遺伝子の発現量に有意な差は見られなかったが、定常期では *gpdA* と *agsB* 遺伝子のプロモーター上の H3K9 のアセチル化レベルは、それぞれ 1-3 倍、1.6~2.1 倍上昇し、それらの遺伝子の発現はそれぞれ 1.8 倍、2.0 倍であった (Fig. 1-11C および D)。以上の結果から、SirE は定常期の菌体において、*pfkA*、*gpdA* および *agsB* 遺伝子のプロモーター領域のヒストン H3K9 を脱アセチル化することによってそれらの遺伝子の発現を抑制することが示された。一方、*pkiA* 遺伝子プロモーターのヒストン H3K9 のアセチル化レベルはいずれの生育時期において

も両株間で差が見られなかったが、SirE Δ 株では A26 株と比較して、H3K56 のアセチル化レベルが定常期に 1.4~1.5 倍上昇し、遺伝子の発現量が 1.8 倍上昇した (Fig. 1-11B)。このことから、SirE は *pkiA* 遺伝子のプロモーター領域のヒストン H3K56ac を脱アセチル化することによって遺伝子発現を抑制することが示された。SirE によって発現が正に制御されるキチナーゼをコードする *chiB* 遺伝子のプロモーター領域では、培養時間によらずどのヒストン残基においても両株間でのアセチル化レベルには有意な差は見られなかったことから、SirE が一次代謝に関与する上記の遺伝子を選択的に標的とすると考えられた (Fig. 1-11E)。しかしながら、A26 株および SirE Δ 株の両方で、これらのプロモーター領域のヒストン H3K9、H3K18 および H3K56 のアセチル化レベルは、対数増殖期において定常期の 2~15 倍であり、*sirE* 遺伝子の遺伝子破壊によるヒストンのアセチル化レベルの変化の程度よりも大きかった (Fig. 1-11A~E)。それにもかかわらず、定常期の SirE Δ 株の一次代謝に関連する遺伝子の発現量は、A26 株および SirE Δ 株の同程度またはそれを上回っていた (Fig. 1-11A~D)。このことは、一次代謝に関連する遺伝子が定常期に対数増殖期と同程度に発現するには、SirE が制御するアセチル化レベルの変化だけで十分であることを示している。さらに、SirE-GFP 株を用いた ChIP 解析を行い、これらの遺伝子のプロモーター領域に SirE-GFP タンパク質が結合していることが示された (Fig. 1-12)。SirE に制御されるこれらの遺伝子是对数増殖期の間のハウスキーピング遺伝子でもあることから、SirE は *A. nidulans* が対数増殖期から定常期に突入する際の一次代謝のグローバルな抑制因子であると考えられた。

1-3-11. 炭素飢餓応答と SirE による遺伝子発現制御

本章では、SirE が自己溶菌、分生子形成、菌体外加水分解酵素に関する遺伝子の発現を促進し、炭素や窒素の代謝、細胞壁の合成に関する遺伝子の発現を抑制することを発見した。このような生育時期に依存する遺伝子発現の制御メカニズムは炭素飢餓のそれと相関することが予想される。そこで、SirE の制御下にある遺伝子と炭素飢餓に応答する遺伝子 (16) を比較した。Fig. 1-13A のベン図は SirE によって抑制される 701 の遺伝子、対数増殖期に比べ定常期に抑制される 2111 の遺伝子、炭素飢餓に応答して抑制される 2208 遺伝子の重なり合いを表したものである。この 3 群の遺伝子で重複するものの中には、前述の一次代謝に関連する遺伝子も含まれている (Fig.1-9、Tables 1-6 および 1-7 内の “§” が付いた遺伝子)。重複する遺伝子は解糖系に関与する 9 遺伝子中 6 遺伝子、TCA 回路に関与する 8 遺伝子中 6 遺伝子、ペントースリン酸経路に関与する 4

遺伝子中 2 遺伝子、窒素同化に関与する 4 遺伝子中 3 遺伝子であった。これらの結果から、SirE が発現抑制する遺伝子の多くが炭素飢餓に応答して定常期に抑制される遺伝子と一致すると示された。

一方、Fig. 1-13B のベン図は SirE によって発現が上昇する 748 の遺伝子、対数増殖期に比べ定常期に発現が上昇する 2749 の遺伝子、炭素飢餓に応答して発現が上昇する 2622 の遺伝子の重なり合いを表したものである。この 3 群の遺伝子で重複するものの中には、前述の自己溶菌、分生子形成、多糖類分解酵素に関連する遺伝子も含まれている (Table 1-5 内の “\$” が付いた遺伝子)。重複する遺伝子は自己溶菌に関与する 3 遺伝子 (*chiB*、*nagA*、*engA*) の全て、その他の多糖類分解酵素に関与する 14 遺伝子中 11 遺伝子、分生子形成に関与する 3 遺伝子中 2 遺伝子であった。これらの結果から、SirE が正に発現制御する遺伝子は炭素飢餓に応答して定常期に発現が上昇する遺伝子と有意に一致する ($P < 0.0001$) と示された。

対数増殖期に比べ定常期で上方 (2749 遺伝子) および下方 (2111 遺伝子) 制御される遺伝子と炭素飢餓に応答して上方 (2622 遺伝子) および下方 (2208 遺伝子) 制御される遺伝子は、それぞれ SirE によって発現が促進される 748 遺伝子および発現抑制される 701 遺伝子とそれぞれ 44~70%程度一致していた ($P < 0.0001$) (3 遺伝子群で重なり合う遺伝子はそれぞれ 279 遺伝子および 215 遺伝子であった ($P < 0.0001$))。これは、カビが炭素飢餓に応答して対数増殖期から定常期への生育期を移行させるという私の主張と一致するものである (Fig. 1-13A~B)。以上の結果を総合して、SirE は定常期や栄養飢餓条件で遺伝子発現を正常に制御する機能を有すると考えられた。

1-4. 考察

本章では、糸状菌の新規サーチュインアイソザイムである SirE が、定常期に発現し、核に局在し、ヒストンを脱アセチル化することを示した。さらに、栄養源、特に炭素源の枯渇に反応して定常期に一次代謝系遺伝子の発現を抑制することを示した (Fig. 1-13C)。酵母や哺乳類のサーチュインは一般的に、代謝のホメオスタシスの維持や寿命の延長を行うことによって栄養制限状態への適応に関与する。例えば、*S. cerevisiae* のサーチュイン Sir2p は *A. nidulans* の SirE と同様に、対数増殖期の後に解糖系や細胞壁の合成を抑制して、代謝をシフトさせる (36)。このことは、これらの生物のサーチュインは貧栄養下で一次代謝に関与する遺伝子群の発現を抑制する点で共通した機能を有することを示している。*A. nidulans* の他のサーチュインである SirA (5) や HstA (7)、非

サーチェーンタイプの HDAC である HdaA (37) は二次代謝の生産や分生子形成を抑制するが、これらはみな一次代謝を抑制するという報告がない。従って、今日まで、両方のタイプの代謝に関与する既知の真菌の転写調節因子は同定されていない。この章の結果は、SirE が一次代謝と定常期におきる代謝を協調させる新たな因子であることを示している。

S. cerevisiae の Sir2p と Hst1p は SirE と同様に対数増殖期の後にクロマチンの構造を制御し一次代謝系の発現を抑制することが知られる(36)。このことから、ヒストンの脱アセチル化によって代謝を制御することは、真菌間で進化的に保存されている機能だと考えられる。一方、本章では、酵母にはみられない *A. nidulans* の定常期に生じるイベント (自己溶菌、分生子形成、ステリグマトシスチンの生産、菌体外加水分解酵素の生産) をサーチェーンが制御するという別の機能も示した。分生子形成にヒストン脱アセチル化酵素が関与することは *A. oryzae* のサーチェーンである AoHstD の研究 (8) によって明らかとなっていたが、自己溶菌や菌体外加水分解酵素の生産をサーチェーンが制御するという発見は初である。サーチェーンは一般的に、ヒストンの脱アセチル化を介して遺伝子の発現を抑制するとされているが、これでは定常期の代謝を正に制御する SirE の機能を説明できない。おそらく、SirE は遺伝子を発現抑制する転写因子遺伝子の周辺のヒストンを脱アセチル化しこの転写因子の遺伝子発現を抑制することで、間接的に定常期の代謝の促進に関わると考えることができる。一方、SirE の制御下にある遺伝子群と炭素源の枯渇に応答する遺伝子群との間には有意な相関が見られたことは、この SirE による間接的な制御と炭素応答に関わる因子が密接に関連している可能性を示している。*A. nidulans* の炭素源の応答に関わる転写因子の一つとして、CreA が同定されている。CreA は利用可能なグルコースがあるうちはグルコース以外の糖を利用するための酵素の遺伝子発現を抑制する転写因子である (17)。CreA の制御下に SirE によって制御される菌体外加水分解酵素が含まれていたこと (Table 1-5) は、CreA と SirE が発現制御する遺伝子が共通していることを意味する。しかしながら、トランスクリプトーム解析では、CreA は SirE の制御下になかったので、SirE による定常期の代謝制御は *creA* の転写の調節を介さないものと考えられる。今後、SirE が CreA そのものを脱アセチル化してその機能を制御するのか、CreA の分解や分解の抑制に関与することが知られる CreB、CreC (38) および CreD (39) などを SirE が脱アセチル化するのか、CreA と SirE の二重破壊によって定常期の代謝に影響が出るのかなどを検討することによって、炭素飢餓と CreA および SirE の関係についての詳細が明らかになると期待される。直接的な関係は

まだ立証されていないものの、分生子形成 (40) やステリグマトシスチン生合成に必要な遺伝子の発現を抑制する転写因子 (16) が炭素飢餓に応答して転写が促進されることもわかっている。SirE はこれらの転写因子の上流にある遺伝子をヒストンの脱アセチル化によって転写レベルで抑制するか、他の生物で報告されているように、転写因子のアセチルリジンを脱アセチル化することによって翻訳後に活性を抑制している可能性も考えられる (41)。

真核生物は複数のサーチュインアイソザイムを有し、これらはそれぞれ異なるヒストン残基を標的とする。Class Ic サーチュインは真菌に特異的なサーチュインであり、*S. cerevisiae* の Hst3p と Hst4p は H3K56 を脱アセチル化し、DNA の損傷シグナルに関与することが知られる (42)。本章で述べた研究によって、*A. nidulans* の Class Ic サーチュインに属する SirE はこの H3K56 を脱アセチル化することが明らかとなった。これに加えて、SirE はクラスが異なるが相同性の高いヒトの SIRT6 や SIRT7 (ともに Class IV サーチュイン) と同様に H3K9ac と H3K18ac も脱アセチル化することが判明した (Fig. 1-2C) ことから、SirE は H3K56ac、H3K9ac、H3K18ac の 3 残基を標的とするといえる。H3K56ac に対する脱アセチル化能は対数増殖期と定常期で認められたが (Fig. 1-2C)、後者 2 つのアセチルリジン残基は定常期にのみ脱アセチル化が認められた (Fig. 1-2C) ことから、生育フェーズによって SirE の標的が変化すると考えられた。これに対して *A. nidulans* の class Ia サーチュイン である SirA は同じクラスに属する哺乳類の SIRT1 や *S. cerevisiae* の Sir2p と同様に H4K16ac を脱アセチル化するが、H3K9 は標的としないことが明らかとなっている (5)。このことから、糸状菌のサーチュインは既に役割分担が判明しているヒトや酵母のそれらとは異なる役割分担を行っている可能性がある。サーチュインの配列と標的とするヒストン残基の関係性を解明するためには、より多くの生物種のサーチュインについて本研究と同様の研究を行うことが重要であると考えられる。

ChIP アッセイによって、定常期に SirE が一次代謝に関連する遺伝子のプロモーター領域のヒストン H3K9ac を脱アセチル化することと、SirE がこれらのプロモーター領域に結合することが示された。また、*Aspergillus nidulans* では、一次代謝系に関与する遺伝子のプロモーター領域のヒストン H3 の 3 残基のアセチル化レベルが、対数増殖期から定常期にかけて 2-10 倍程度減少することも明らかとなった。SirE の制御によるヒストンの脱アセチル化はこの生育フェーズの移行に伴う脱アセチル化よりも小規模ではあったが、一次代謝系に関与する遺伝子の発現量は、定常期における SirE の脱アセチ

ル化能によって対数増殖期よりも減少することが示され、**SirE** は定常期における一次代謝系遺伝子の主要な制御因子であると考えられた。

微生物は対数増殖期から定常期にかけて、一次代謝から二次代謝へと代謝を移行する。本研究は、ヒストンの修飾が生育期による遺伝子発現の変化を制御することができることを初めて示したものである？。また、**SirE**は一次代謝と二次代謝の両方の遺伝子発現を制御する初期段階の転写制御因子であることも明らかとなった。この発見は、今後の**SirE**の機能の詳細な解明の足がかりとなるだけでなく、有機酸や医薬品原料の生産の制御の研究にも応用できると考えられる。

Table 1-1 Primers used in this study.

primer	Nucleotide sequence	used to generate
<i>Cassette for gene disruption</i>		
SirE-5 F	5'-ATCAGTCCCAGGACAACAGG-3'	5'-region of <i>sirE</i>
SirE-5-argB R	5'-AAAACCGCGAAAATAAAGCTTGGGATGACGCGAGAGTAGAG-3'	
SirE-3-argB F	5'-CGCAATGGCTGTAGGTCGACTAGATATGCCGTTGGCGTTT-3'	3'-region of <i>sirE</i>
SirE-3-R	5'-TCCATTACCTTGC GACTAGC-3'	
argB-F	5'-AAGCTTTATTTCCGGGTTT-3'	<i>argB</i>
argB-R	5'-GTCGACCTACAGCCATTGCG-3'	
SirE-5-F2	5'-GAGCGGACTGAGGCTAACAG-3'	disruptant cassette for <i>sirE</i>
SirE-3-R2	5'-CTTGAATTCGAGGGGTTTCAG-3'	
<i>Plasmids for GFP-fused protein production</i>		
GAP F xba1	5'-GCTCTAGAAAAAGTCACACAACACAAGC-3'	<i>gdpA</i> promoter
GAP R	5'-CCATTGTGATGTCTGCTCAA-3'	
GAP SirE F	5'-TTGAGCAGACATCACAAATGGATGGCACCTCGCAAACCAA-3'	<i>sirE</i>
SirE linker R	5'-GGCACCGGCTCCAGCGCCTGCACCAGCTCCATCAAGCAACTGCCCATTC-3'	
GAP SirA F	5'-CCGCTTGAGCAGACATCACAAATGGACCTTGTTCAGCGCC-3'	<i>sirA</i>
SirA linker R	5'-GGCACCGGCTCCAGCGCCTGCACCAGCTCCTCCGCTAACCTTGAATACAT-3'	
linker GFP F	5'-GGAGCTGGTGCAGGCGCTGGAGCCGGTGCCATGGTGAGCAAGGGCGAGGA-3'	<i>gfp</i>
GFP sac2 R	5'-GTGCCCGCGTTACTTGTACAGCTCGTCCA-3'	
GFP not1 R	5'-CGCGCGCGGCGGCCGCTTACTTGTACAGCTCGTCCA-3'	
<i>Quantitative PCR</i>		
agsB RT F	5'-CTTATCTGGGTGGTGCCT TG-3'	<i>agsB</i>
agsB RT R	5'-CTGCACGTTACCTGGTA TG-3'	
agsA RT F	5'-GTATGAACCCAGACGGGAAG-3'	<i>agsA</i>
agsA RT R	5'-AGGGTGTTTCAGGGAGGATG-3'	
fksA RT F	5'-GCGGGACCTTCAATTTACAC-3'	<i>fksA</i>
fksA RT R	5'-GCGAGAAGAGAGACCCAGAA-3'	
chsA RT F	5'-GGACGAAACCCACTTTACGA-3'	<i>chsA</i>
chsA RT R	5'-CTTTGCCCATGTACGAGAC-3'	
chsB RT F	5'-CCCGAGGAGAAGGAAGAGAA-3'	<i>chsB</i>
chsB RT R	5'-ATGCAGACAGCGAGAAGACC-3'	
chsC RT F	5'-GTGGAGGTGCTTGTGGTGAG-3'	<i>chsC</i>
chsC RT R	5'-CCAGGATGTTGCTGAGCTTG-3'	
chiB RT F	5'-TACAGGAGATGACGCCGTAC-3'	<i>chiB</i>
chiB RT R	5'-GGTTCACAGCTTGGACAGTG-3'	
engA RT F	5'-AGGGTGTTTCAGGGAGGATG-3'	<i>engA</i>
engA RT R	5'-CTACATGGTGAGGCAGAGCA-3'	
nagA RT F	5'-TTCCAACTTCAACCCATC-3'	<i>nagA</i>
nagA RT R	5'-GCGTCCCAATCTTCCACATC-3'	
fluG RT F	5'-TACCTGCGGCTTTGAGATTG-3'	<i>fluG</i>
fluG RT R	5'-CCAGGAATGGTTGGTCACAG-3'	
flbA RT F	5'-GTCGCTGTTCCTTCGTCTTC-3'	<i>flbA</i>
flbA RT R	5'-AAAAGTGGGTGTGGTTGTGG-3'	
brlA RT F	5'-CGAACTCCTGGTTCTGCT TC-3'	<i>brlA</i>
brlA RT R	5'-TTCTGCCCCTTCCATGCTAC-3'	
actA RT F	5'-GAAGTCTACGAACTGCCTGATG-3'	<i>actA</i>
actA RT R	5'-AAGAACGCTGGGCTGGAA-3'	
<i>ChIP assay</i>		
pfkA #1 F	5'- TTGAGCAGTAATTCGTGTGTG -3'	<i>pfkA</i>
pfkA #1 R	5'- GAAGCAGTGACGAAAGAGTGA -3'	
pfkA #2F	5'- CACGTGCTCCTGTATTACGC -3'	
pfkA #2 R	5'- TCTTTATGCCTGGGTAATTGG -3'	
pkiA #1 F	5'- TAGCGACGAGACAGGAAAAG -3'	<i>pkiA</i>
pkiA #1 R	5'- CGTTTGGTGGAGAGAAGAAG -3'	
pkiA #2 F	5'- TTGCTGGACGATTTATCAGG -3'	
pkiA #2 R	5'- TCGGTTGTTGCTTATCTGTTG -3'	
gpdA#1 F	5'- TTGCCATATTTTCTGCTCTC -3'	<i>gdpA</i>
gpdA#1 R	5'- TGGGAAGGATGGAGTATGGA -3'	
gpdA#2 F	5'- TTGCTCCGATCTGGTAAAAG -3'	
gpdA#2 R	5'- GGAGAGGCACGATATTGGA -3'	
agsB #1 F	5'-CATCAACGACTCACCGACAC-3'	<i>agsB</i>
agsB #1 R	5'-CCGATAGACGAGACAAGACGA-3'	
agsB #2 F	5'-TTTCAGTTCCTCGAAGGTTG-3'	
agsB #2 R	5'-TCGTCTGGCTGTGAGTGTA-3'	
chiB #1 F	5'- CCTGCTTGTTCCTATGCTC -3'	<i>chiB</i>
chiB #1 R	5'- GTGCAGTCTGACCTCTCCTC -3'	
chiB #2 F	5'- AGCGCTGAGTAAGCAACTTC -3'	
chiB #2 R	5'- AACTGTACCTGAGACGCTGTG -3'	

Table 1-2 Summary of mRNA sequencing experiments.

Experiment	Sample	Total reads	Total bases
1	WT	7,449,337	365,017,513
1	SirE Δ	7,445,910	364,849,590
2	WT	7,450,921	365,095,129
2	SirE Δ	7,448,668	364,984,732

Table 1-3 Alignment statistics of reads aligned to the reference genome and the genes.

Sample	Total mapped reads (%)	Perfect match (%)	Mismatch (%)	Unique match (%)	Multi-position match (%)	Total unmapped reads (%)
Genome						
WT-1	91.76	85.08	6.68	91.32	0.44	8.24
SirEΔ-1	90	83.57	6.43	89.55	0.45	10
WT-2	89.89	79.39	10.5	89.35	0.54	10.11
SirEΔ-2	88.49	80.03	8.46	87.99	0.5	11.51
Gene						
WT-1	64.86	60.39	4.46	64.66	0.2	35.14
SirEΔ-1	68.58	64.13	4.45	68.34	0.24	31.42
WT-2	61.54	54.76	6.78	61.28	0.26	38.46
SirEΔ-2	62.14	56.5	5.64	61.9	0.24	37.86

Table 1-4 Gene Ontology terms enriched in regulated genes in SirEΔ.Genes of log₂ ratio ≤ -3 or ≥3, Probability ≥ 0.8, and P < 0.01 were selected.

GO ID	GO term	Cluster frequency (%)	P value
Down-regulated genes in SirEΔ (381 genes)			
<i>Biological process</i>			
45460	sterigmatocystin metabolic process	4.0	2.38E-09
9404	toxin metabolic process	4.3	7.95E-09
45461	sterigmatocystin biosynthetic process	3.7	7.96E-09
1901376	organic heteropentacyclic compound metabolic process	4.3	3.53E-08
9403	toxin biosynthetic process	4.0	3.91E-08
19748	secondary metabolic process	9.1	8.62E-08
1901378	organic heteropentacyclic compound biosynthetic process	4.0	1.29E-07
44550	secondary metabolite biosynthetic process	7.2	1.03E-06
42438	melanin biosynthetic process	1.6	0.0006
44710	single-organism metabolic process	27.8	0.00077
6582	melanin metabolic process	1.6	0.00185
5975	carbohydrate metabolic process	9.9	0.00581
42243	asexual spore wall assembly	1.1	0.00975
<i>Molecular function</i>			
16705	oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen	5.1	0.00261
52689	carboxylic ester hydrolase activity	2.4	0.00773
20037	heme binding	4.5	0.00811
46906	tetrapyrrole binding	4.5	0.00811
<i>Cellular component</i>			
5576	extracellular region	8.3	5.70E-08
Up-regulated genes in SirEΔ (300 genes)			
<i>Biological process</i>			
44710	single-organism metabolic process	37.5	5.83E-13
44281	small molecule metabolic process	22.9	1.92E-11
44711	single-organism biosynthetic process	19.5	1.68E-10
44283	small molecule biosynthetic process	13.0	4.06E-10
46394	carboxylic acid biosynthetic process	8.2	5.06E-10
16053	organic acid biosynthetic process	10.2	2.17E-09
6082	organic acid metabolic process	15.4	7.48E-09
43436	oxoacid metabolic process	13.0	2.36E-08
55114	oxidation-reduction process	19.1	6.77E-08
19752	carboxylic acid metabolic process	12.3	1.54E-07
6633	fatty acid biosynthetic process	3.8	1.28E-05
72330	monocarboxylic acid biosynthetic process	4.1	3.08E-05
44699	single-organism process	42.3	0.00011
1901605	alpha-amino acid metabolic process	5.8	0.00026
1901607	alpha-amino acid biosynthetic process	4.1	0.00059
32787	monocarboxylic acid metabolic process	6.1	0.00232
33559	unsaturated fatty acid metabolic process	1.4	0.00393
6636	unsaturated fatty acid biosynthetic process	1.4	0.00393
6631	fatty acid metabolic process	4.1	0.00903
<i>Molecular function</i>			
16491	oxidoreductase activity	23.8	1.49E-09
48037	cofactor binding	10.5	3.67E-05
16705	oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen	6.1	0.00037
15113	nitrite transmembrane transporter activity	1.0	0.00402
15513	nitrite uptake transmembrane transporter activity	1.0	0.00402
<i>Cellular component</i>			
5886	plasma membrane	7.5	0.00329
45277	respiratory chain complex IV	1.4	0.00696
5751	mitochondrial respiratory chain complex IV	1.4	0.00696
71944	cell periphery	9.5	0.00897

Table 1-5. Genes for polysaccharide degradation and conidiophore development up-regulated by SirE during stationary phase.

Gene ID	Name	Putative products	SirEΔ/WT*	24/48 h [†]	Carbon starvation [‡]
			<i>log₂R</i>	<i>log₂R</i>	<i>log₂R</i>
<i>Cellulose</i>					
AN2828 [§]	<i>bglL</i>	β-Glucosidase	-10.04	-8.59	4.25
AN4102	<i>bglA</i>	β-Glucosidase	-2.45	-0.98	4.54
<i>Hemicellulose</i>					
AN8007 [§]	<i>abnC</i>	α-1, 5-L-Arabinosidase	-8.65	-3.81	2.92
AN8138 [§]	<i>aglC</i>	α-Galactosidase	-5.42	-3.83	1.67
AN9380		Chitin deacetylase	-1.48	-0.08	8.14
<i>Hemicellulose (pectin)</i>					
AN2395 [§]		β-Glucuronidase	-3.58	-2.54	4.39
AN2463	<i>lacF</i>	β-Galactosidase	-2.55	-1.98	-2.59
<i>Hemicellulose (mannan)</i>					
AN2325 [§]		Predicted mannanase	-6.59	-3.32	5.17
AN1197 [§]		Predicted mannanase	-5.32	-1.07	2.94
AN0787 [§]	<i>mns1B</i>	α-1,2-mannosidase	-3.74	-2.41	4.31
<i>Fungal cell wall degradation/remodeling proteins (autolytic enzymes)</i>					
AN4825 [§]		α-1-3-Glucosidase	-9.38	-7.33	4.44
AN4871 [§]	<i>chiB</i>	Chitinase class V	-7.92	-4.15	3.47
AN0245 [§]		Predicted Glucanase	-6.11	-1.80	5.62
AN1502 [§]	<i>nagA</i>	N-Acetyl-β-glucosaminidase	-6.11	-5.68	4.69
AN9042 [§]	<i>agnC</i>	α-1,3-glucanase	-5.64	-3.31	3.44
AN0472 [§]	<i>engA</i>	β-1,3-Glucosidase	-3.57	-2.17	2.75
AN0779 [§]		β-1,3-Glucosidase	-2.34	-1.21	1.34
<i>Conidiophore development</i>					
AN0973 [§]	<i>brlA</i>	Transcription factor	-8.69	-7.30	8.69
AN6635	<i>yA</i>	Conidial laccase	-3.69	-0.22	3.69
AN1937 [§]	<i>wetA</i>	Regulatory protein of conidial development	-3.27	-1.48	3.27

Determined using *DNA microarrays, [†]mRNA sequencing and [‡]according to Szilágyi *et al.*

[§]Overlap among genes up-regulated by SirE, stationary-phase and carbon starvation. ID, identity.

Table 1-6. Up-regulated genes in the stationary growth phase SirEΔ.

Gene ID	Name	Putative products	SirEΔ/WT*	24/48 h [†]	Carbon starvation [‡]
			<i>log₂R</i>	<i>log₂R</i>	<i>log₂R</i>
<i>Glycolytic metabolisms</i>					
AN2286 [§]	<i>alcC</i>	Alcohol dehydrogenase III	8.19	6.06	-1.62
AN4888 [§]	<i>pdcA</i>	Pyruvate decarboxylase	6.03	6.26	-4.69
AN3223	<i>pfkA</i>	6-Phosphofructokinase	3.78	3.09	0.2
AN8041	<i>gpdA</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	2.94	0.86	-3.05
AN5210 [§]	<i>pkiA</i>	Pyruvate kinase	2.88	2.38	-1.14
AN5746 [§]	<i>acuN</i>	Phosphopyruvate hydratase	2.36	1.23	-1.95
AN1246 [§]	<i>pgkA</i>	Phosphoglycerate kinase	2.2	2.44	-2.84
AN4591		Phosphopentomutase	1.4	-0.63	-0.81
AN6900 [§]	<i>tpiA</i>	Triose-phosphate isomerase	1.38	1.64	-1.3
<i>TCA cycle metabolisms</i>					
AN5447 [§]		Glutamate decarboxylase	5.79	6.1	-4.12
AN4376 [§]	<i>gdhA</i>	NADP-linked glutamate dehydrogenase	5.24	4.17	-1.34
AN2436 [§]	<i>aclB</i>	ATP citrate synthase	3.08	1.4	-1.99
AN2435 [§]	<i>aclA</i>	ATP citrate synthase	2.86	1.64	-1.69
AN8275 [§]	<i>citA</i>	Mitochondrial citrate synthase	2.37	2.18	-3.54
AN6717	<i>mdhA</i>	Mitochondrial malate dehydrogenase	1.82	2.23	-0.16
AN5790 [§]		Isocitrate dehydrogenase (NAD ⁺)	1.6	1.69	-1.11
AN1003		Isocitrate dehydrogenase (NAD ⁺)	1.53	2.23	-0.82
<i>Pentose phosphate pathway</i>					
AN3954 [§]		Phosphogluconate dehydrogenase	2.66	1.53	-2.23
AN0240	<i>pppA</i>	Transaldolase	2.42	1.39	-0.65
AN0688		Transketolase	1.98	1.96	0.61
AN2981 [§]	<i>gsdA</i>	Glucose 6-phosphate 1-dehydrogenase	1.58	1.86	-2.37
<i>Nitrate assimilation</i>					
AN1006 [§]	<i>niaD</i>	Nitrate reductase (NADPH)	9.34	10.56	-4.21
AN1007 [§]	<i>niiA</i>	Nitrite reductase	8.41	5.92	-4.33
AN1008 [§]	<i>crnA</i>	Nitrate transporter	7.33	7.49	-2.09
AN0399	<i>nrtB</i>	High-affinity nitrate transporter	6.59	6.41	0.06

Determined using *DNA microarrays, [†]mRNA sequencing and [‡]according to Szilágyi *et al.*

[§]Overlap among genes up-regulated by SirE, stationary-phase and carbon starvation. ID, identity.

Table 1-7. Genes for cell wall synthesis down-regulated by SirE.

Gene ID	Name	Putative products	SirE Δ /WT*	24/48 h [†]	Carbon starvation [‡]
			<i>log₂R</i>	<i>log₂R</i>	<i>log₂R</i>
AN3307 [§]	<i>agsB</i>	α -1,3-glucan synthase	7.82	5.36	-4.35
AN4367	<i>chsF</i>	Chitin synthase III	5.21	0.96	-3.09
AN4515	<i>crhB</i>	Transglycosidase	2.9	2.18	-0.61
AN6697	<i>sunA</i>	SUN-family protein	2.88	0.52	-1.21
AN0726	<i>sunB</i>	SUN-family protein	2.78	1.54	3.15
AN7511 [§]	<i>gelE</i>	β -1,3-Transglycosidase	2.45	5.51	-3.74
AN10709	<i>gfaA</i>	Glutamine fructose-6-phosphate transaminase	1.46	-0.01	0.96

Genes in SirE Δ were up-regulated > 2-fold. Determined by *DNA microarray, [†]mRNA sequencing and [‡]according to Szilágyi *et al.* [§]Overlap among genes up-regulated by SirE, stationary-phase and carbon starvation. ID, identity.

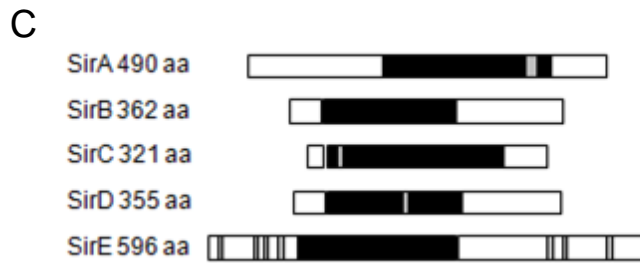
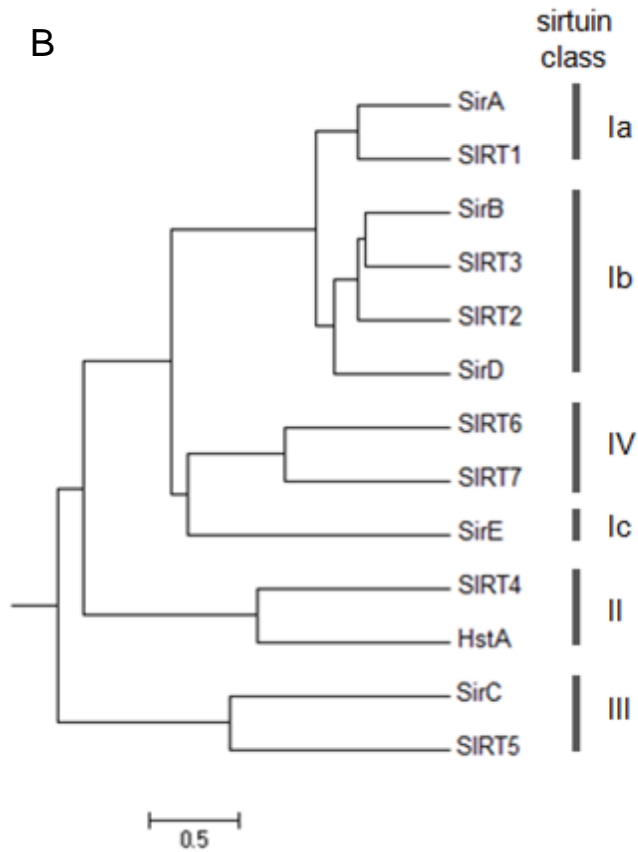
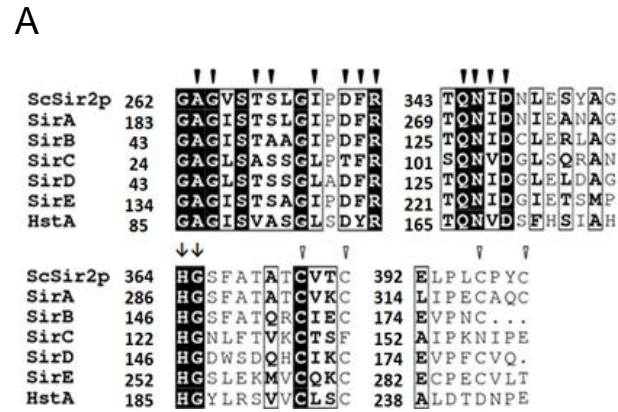


FIGURE 1-1. Sirtuins of *A. nidulans*.

(A) Amino acid sequence alignment of the *A. nidulans* sirtuins isozymes. (B) Structures of *A. nidulans* sirtuin isozymes. The conserved sirtuin core domains (black) and NLS (gray) are shown. (C) Phylogenetic tree of sirtuins of *A. nidulans* and human.

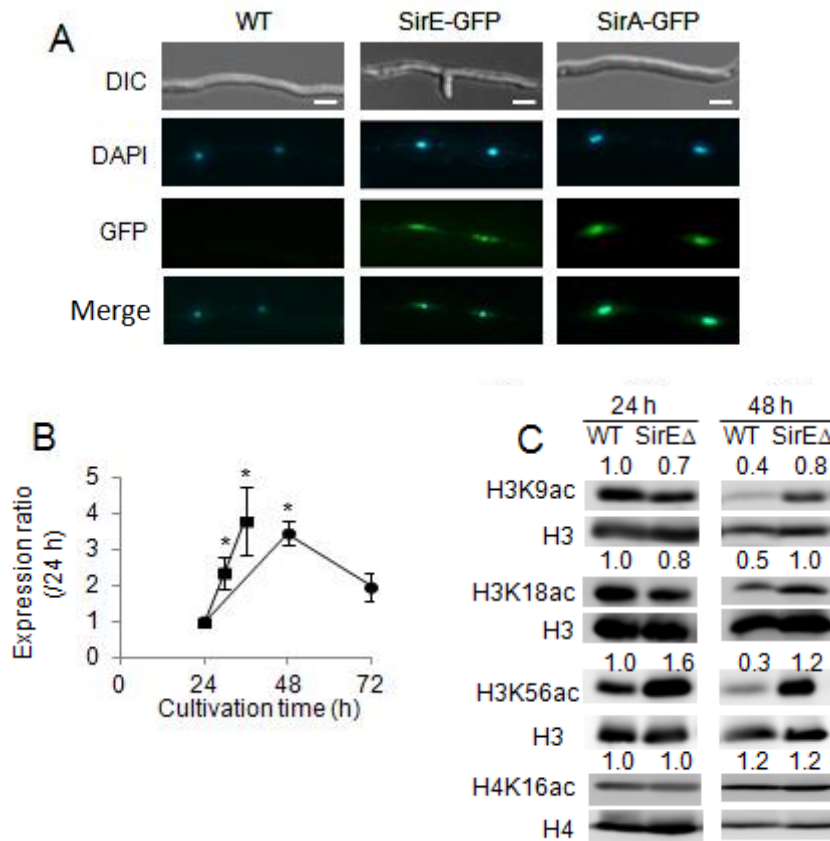


FIGURE 1-2. Identification of fungal SirE.

(A) Fluorescence microscopy of *A. nidulans* producing GFP and SirE or SirA fusion proteins. Nuclei are stained with DAPI. Bars, 2 μ m. (B) PCR quantified *sirE* transcript. Strain A26 was cultured in liquid (●) and solid agar (■) GMM medium. Relative values to *actA* transcript at 24 h were taken as 1. (C) Western blots of *A. nidulans* nuclear extracts. *A. nidulans* A26 (WT) and SirE Δ were cultured for 24 and 48 h, and their nuclear extracts (20 μ g) were separated by SDS-PAGE. Left, antibodies that detected signals. Relative signal intensity is shown above panels. Data are means \pm standard error of three experiments. * $P < 0.05$ vs. 24 h.

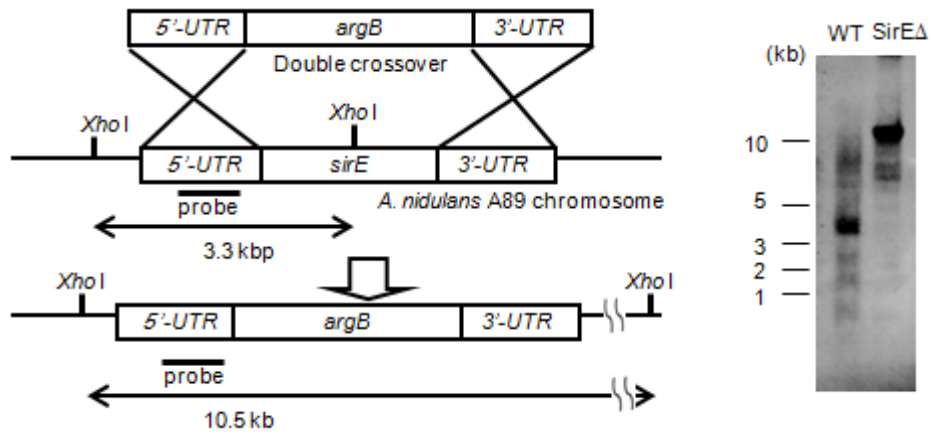


FIGURE 1-3. Gene disruption of *A. nidulans sirE*.

Strategy for disruption of *sirE* gene (left) and Southern blot of total DNA of WT and *SirEΔ* strains digested with *XhoI* (right). Bars indicate positions and sizes of hybridization probes.

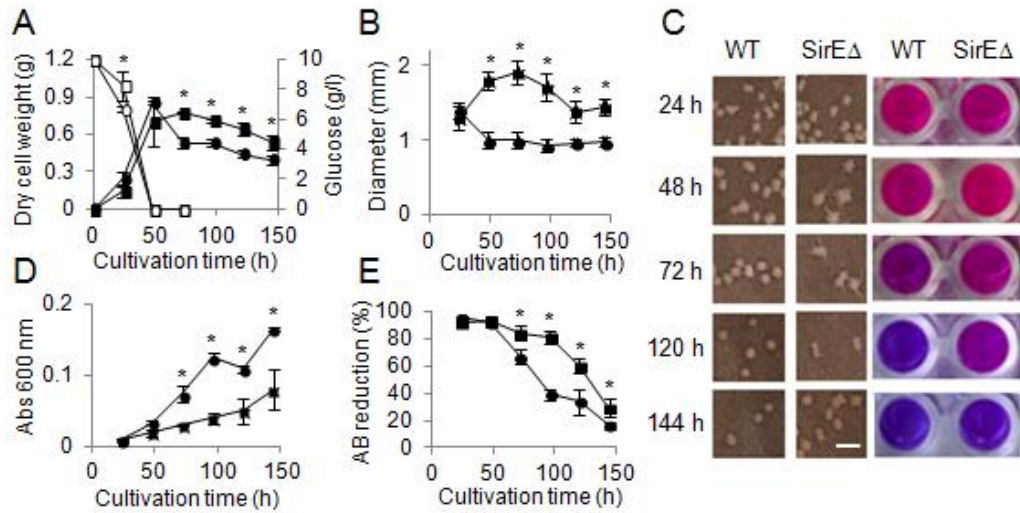


FIGURE 1-4. SirE up-regulates fungal autolysis in stationary growth phase.

Aspergillus nidulans A26 (WT) (●○) and SirEΔ (■□) were cultured in liquid GMM medium at 30°C. (A) Time-dependent changes in cell mass (●■) and residual glucose (○□). (B) Diameter of mycelial pellets of WT and SirEΔ strains. (C) Morphology of mycelial pellets (*left*) and AB assay of viable cells (*right*). Bar indicates 1 mm. (D) Time-dependent increase in optical density of culture supernatant due to autolytic release of cell ingredients into culture medium. E, Reduced AB determined by absorbance at 570 nm and 600 nm. Data are means ± standard error of three experiments. * $P < 0.05$ vs. WT.

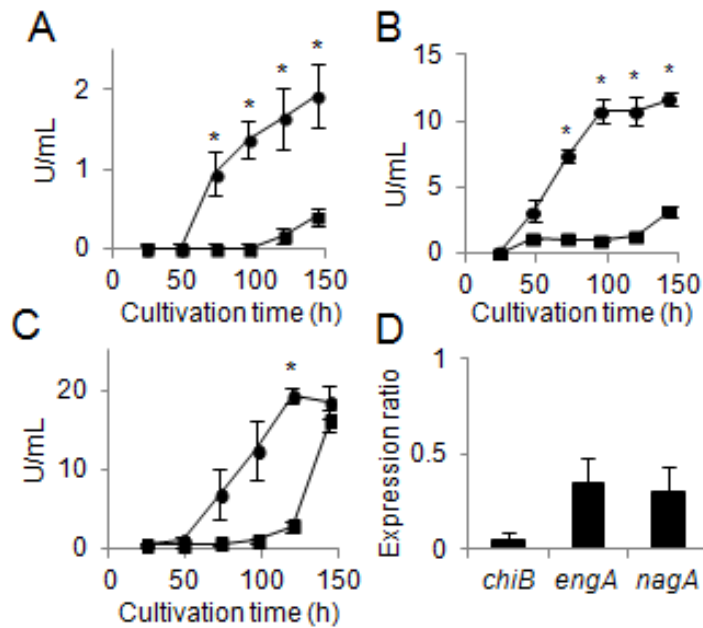


FIGURE 1-5. SirE up-regulates production of extracellular hydrolases.

Aspergillus nidulans A26 (WT) (●) and SirEΔ (■) were cultured in liquid GMM medium at 30°C and then hydrolase activities in culture supernatants were determined. (A-C) Chitinase, β-1, 3-glucanase and N-acetyl-D-glucosaminidase, respectively. Data are means ± standard error of three experiments. * $P < 0.05$ vs. WT. (D) Amounts of gene transcripts in 48-h cultures of SirEΔ determine by real-time PCR. Values are relative to those of WT. Data are means ± standard error of three experiments. $P < 0.05$.

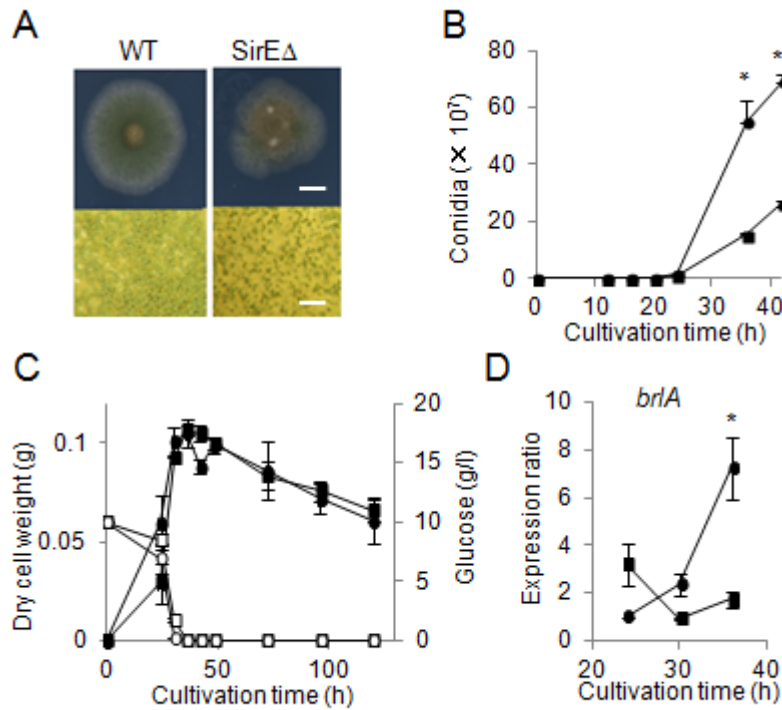


FIGURE 1-6. Conidiophore development by WT and SirEΔ strains.

Aspergillus nidulans A26 (WT) (●○) and SirEΔ (■□) were cultured on solid GMM medium at 30°C. (A) Morphology of colonies after 72 h of culture. Bars, 10 mm (upper panel) and 10 μm (lower panel). (B) Time-dependent changes in numbers of conidia in colonies. (C) Cell mass (●■) and residual glucose (○□). (D) Transcript of *brlA* gene. Values relative to *actA* transcript at 24 h are taken as 1. Data are means ± standard errors of three experiments. * $P < 0.05$ vs. WT. E, HPLC analysis of sterigmatocystin in mycelial extracts obtained from 48-h cultures. ST, commercial sterigmatocystin.

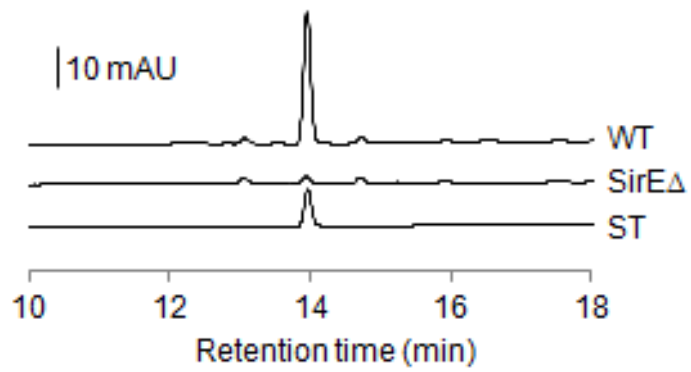


FIGURE 1-7. Sterigmatocystin production by WT and SirE Δ strains. HPLC analysis of sterigmatocystin in mycelial extracts obtained from 48-h cultures. ST, commercial sterigmatocystin.

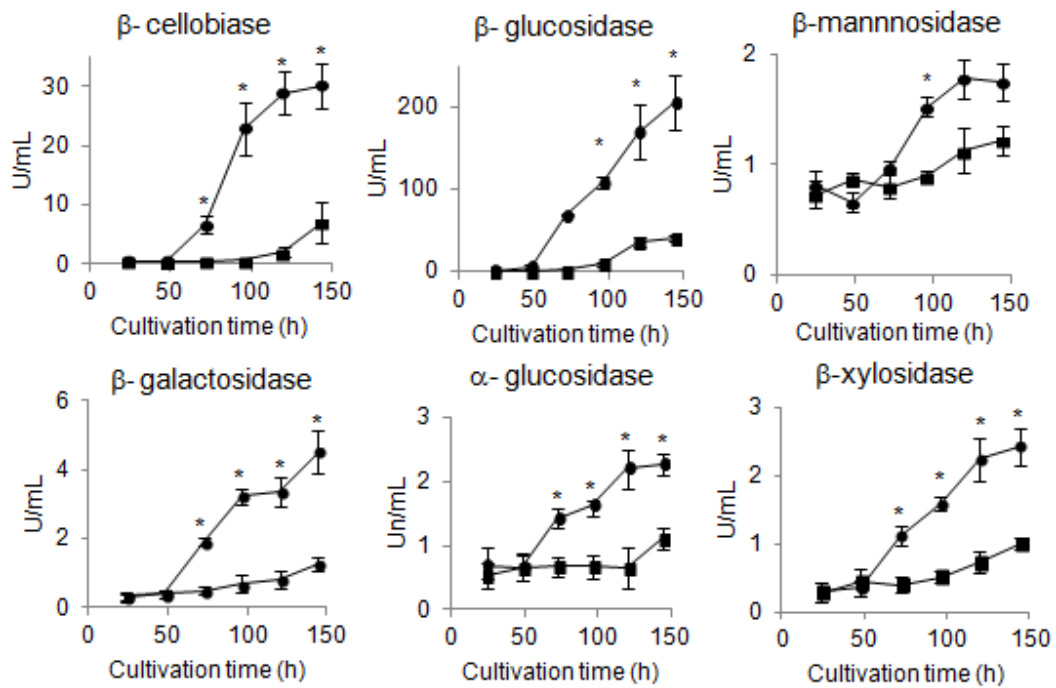


FIGURE 1-8. Activity for extracellular hydrolases in *A. nidulans* culture supernatant. The *A. nidulans* A26 (WT) (●) and SirEΔ (■) were cultured in liquid GMM medium at 30°C, and hydrolase activities in the fungal culture supernatants were determined. The activities of β -cellobiase, β -xylosidase, α -glucosidase, β -glucosidase, β -galactosidase, and β -mannosidase were measured. Data are the mean \pm the standard errors for three experiments. *, $P < 0.05$ versus WT.

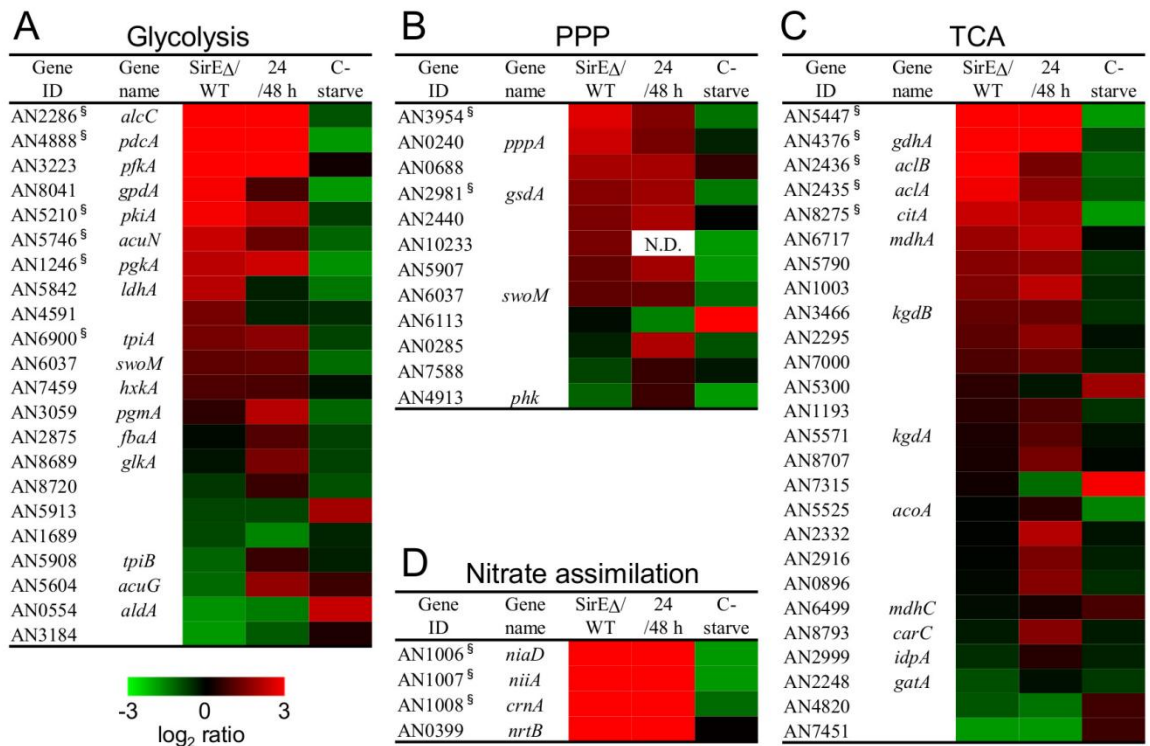


FIGURE 1-9. Transcriptome analysis of primary metabolism in *A. nidulans*.

Aspergillus nidulans A26 (WT) and SirEΔ were cultured in liquid GMM medium at 30°C. (A-D), Heat maps represent ratios of FPKM between SirEΔ and WT at 48 h (stationary phase) determined by mRNA sequencing (SirEΔ/WT). Signal log ratios between exponential and stationary growth phase cultures of *A. nidulans* A26 determined by DNA microarray analysis (24 h/48 h). Transcriptome data from carbon-starved fungus were obtained from C-starve (16). Genes expressing molecules involved in glycolysis (A), pentose phosphate pathway (B), TCA cycle (C) and nitrate assimilation (D) were selected based on gene classification by KEGG.

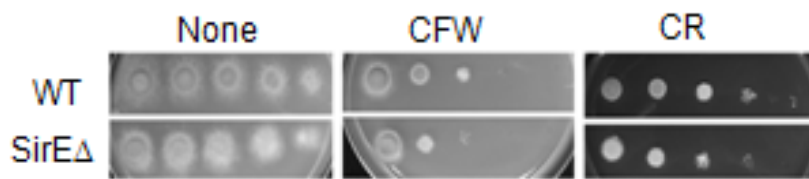


FIGURE 1-10. SirE regulates vegetative mycelial cell walls.

Serial dilutions of conidia were spotted onto GMM medium containing $15 \mu\text{g mL}^{-1}$ Calcofluor white (CFW) and $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ Congo red (CR) and incubated at 37°C for 48 h to determine growth.

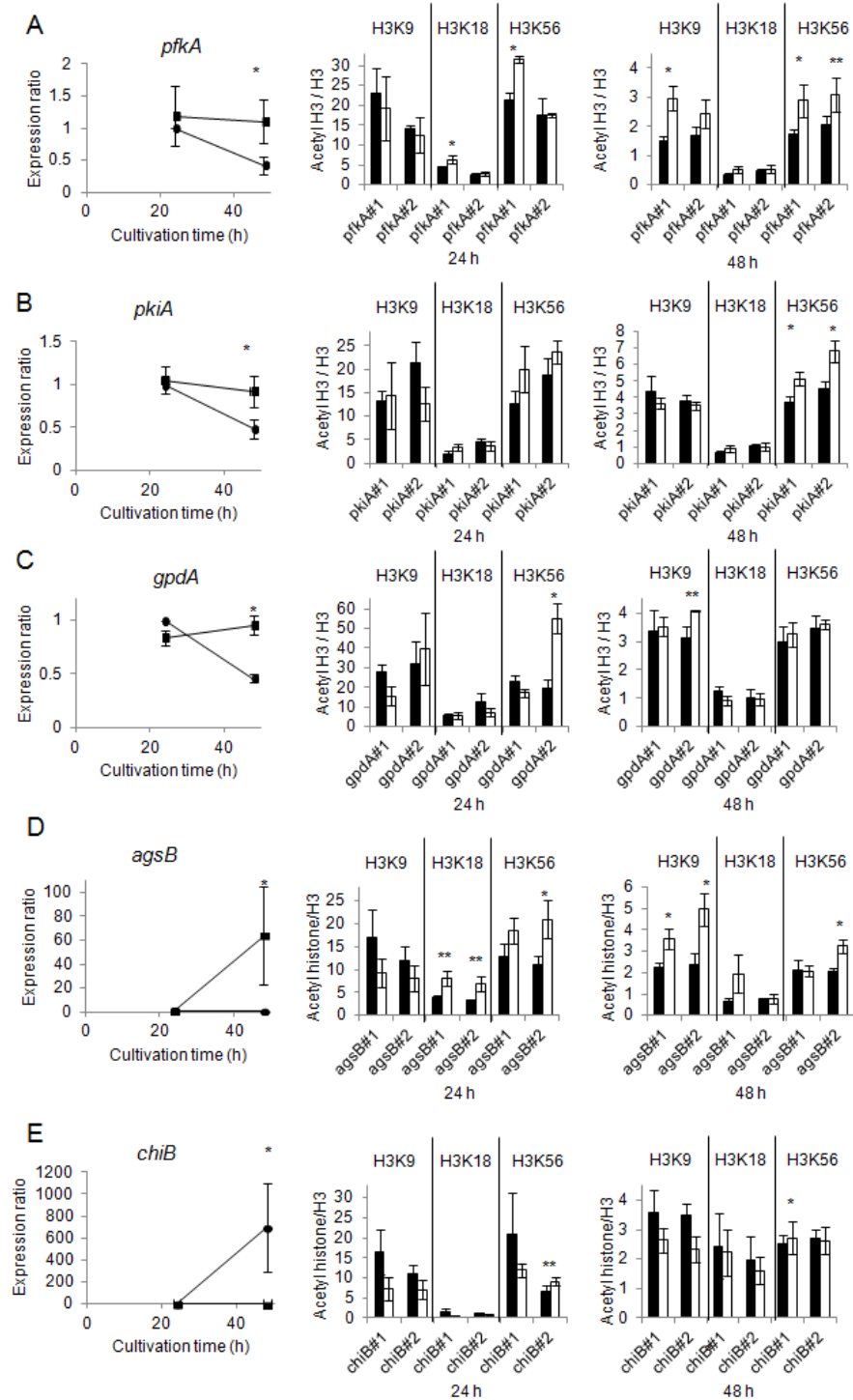


FIGURE 1-11. SirE deacetylates histone H3 in the promoters of primary metabolic genes and represses these gene expressions.

Transcript of each gene (*left*) and chromatin immunoprecipitation analyses using antibodies for H3K9ac, H3K18ac, and H3K56ac on their promoters in each strain cultured for 24 h (*middle*) or 48 h (*right*). chromatin immunoprecipitation analyses indicate that SirE is associated with *pfkA*, *pkiA*, *gpdA*, and *agsB* gene promoter in *A. nidulans* A26 (WT) (filled bars) and SirEΔ (unfilled bars). Data are means \pm standard errors for three experiments. *, $P < 0.05$, and **, $P < 0.07$ and $P > 0.05$ versus WT.

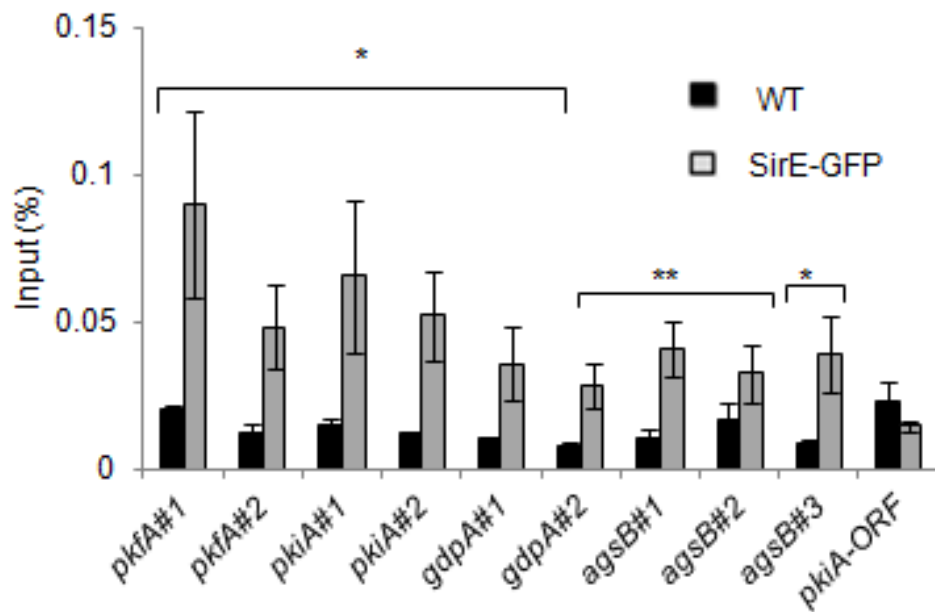


FIGURE 1-12. SirE interacted with the promoters of primary metabolic genes. Chromatin immunoprecipitation analyses indicate SirE association with primary gene promoters in *A. nidulans* SirE-GFP strain (gray bars) cells cultured for 24 h. Data are the mean \pm the standard errors for three experiments. *, $P < 0.05$, and **, $P < 0.07$ and $P > 0.05$ versus YMT1 strain (WT) (filled bars).

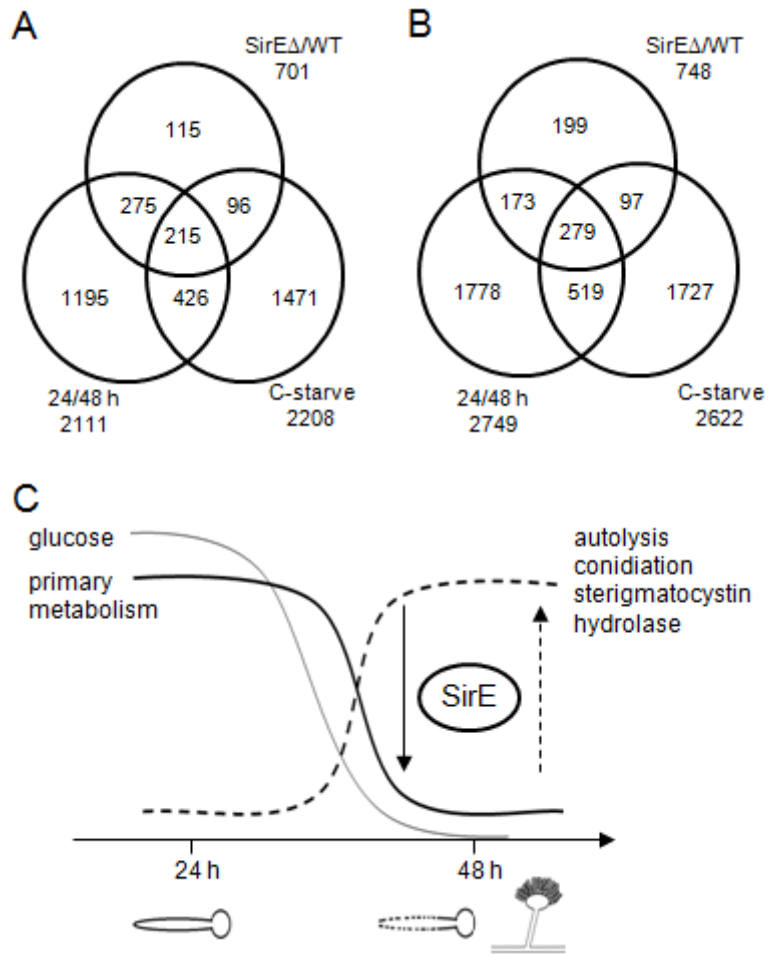


FIGURE 1-13 Correlation between sirE-dependent gene regulation and carbon starvation during growth phases.

(A-B) Venn diagrams show numbers of genes identified by transcriptomes. Genes regulated by SirE (SirEΔ/WT), growth phase (24 h/48 h) (this study) and carbon starvation (C-starve) (16) were analyzed. (A, B) Up (≥ 1)- and down (≤ -1)-regulated genes, respectively, in SirEΔ. (C) Model of transition between exponential- to stationary-growth phases driven by SirE as result of carbon starvation.

第二章 SirA は二次代謝のグローバルな制御因子である

2-1. 序論

糸状菌は多種多様な二次代謝産物を生産する。これには医学的に有用な抗生物質とともに、アフラトキシンやトリコテセンのようなカビ毒も含まれる (43)。ガビのゲノムがコードするこれらの二次代謝産物の生合成遺伝子は生合成される化合物ごとにクラスターを形成していることが多く、ゲノム解析によって複数の生合成遺伝子遺伝子クラスターの存在が予測されている (44)。様々な医薬品の開発やカビ毒の生産の抑制のために、これまでカビの二次代謝産物やそれらの生産機構について多くの研究がなされてきた。

子囊菌類の *Aspergillus* 属 (45) やそのモデル生物である *Aspergillus nidulans* は複数の二次代謝遺伝子クラスターを有する (46)。*A. nidulans* の二次代謝産物の代表的なものには抗生物質であるペニシリン G (penicillin, PN) (47) や発がん物質であるアフラトキシンの前駆体であるステリグマトシスチン (sterigmatocystin, ST) がある (48)。二次代謝産物の生産はヒストンのアセチル化やメチル化によって制御されることが知られる。例えば、*A. nidulans* HstA はヒストン脱アセチル化能を有すると予想されており、これをコードする遺伝子と HDAC をコードする *hdaA* および *hosB* 遺伝子の三重破壊株では PN とノルソロリン酸の生合成遺伝子の発現が上昇することが知られる (7)。さらに、*S. cerevisiae* Sir2p のホモログである *A. nidulans* のサーチュイン A (SirA) が PN と ST の生合成遺伝子のプロモーター領域のヒストン H4 のリジン 16 番目の残基を脱アセチル化し遺伝子の発現と生合成を抑制することも明らかになっている (5)。しかしこれらの研究は二次代謝産物の一部にのみ注目したものであり、SirA が二次代謝産物の生産をグローバルに制御するかどうかは依然として不明である。

本章では、*A. nidulans* の *sirA* 遺伝子破壊株 (SirAΔ) のトランスクリプトーム解析を行い、SirA が制御する遺伝子群を経時的に解析し、特に二次代謝系遺伝子群の発現量に与える影響の検証を試みた。その結果、SirA が液体培養後 48 時間 (定常期) に一次代謝に関与する遺伝子群の発現を常用させる機能があることが示された。また、SirA が定常期に二次代謝に関連する遺伝子群の転写を抑制することが示された。さらに、SirA はこれまで知られていたように二次代謝系遺伝子の発現を抑制するだけでなく、促進させることが示された。一方、固体培地で培養した SirAΔ株の抽出物を HPLC を用いて解析したところ、A26 株と比較して ST、オースチノール (austinol, AUS) およびデヒドロオ

ースチノール (dehydroaustinol, DAUS) の生産量が上昇することが明らかとなった。これらの結果から、SirA は定常期に二次代謝遺伝子クラスターをグローバルに制御することが示された。さらに、SirA と SirE の制御下にある遺伝子群を比較したところ、両サーチチェーンが一次代謝や自己溶菌、菌体外加水分解酵素および一部の二次代謝に関与する遺伝子群に対して逆方向の制御を行うことが示された。これは同一生物種のサーチチェーンが協調して共通の遺伝子群の発現を制御するという初の発見であった。

本章の研究によって、SirA が先行研究で明らかとなった ST や PN の生合成に加え、多様な二次代謝系遺伝子クラスターの発現を抑制することが明らかとなった。実際に生合成量が増減した化合物は ST の他には AUS と DASU のみであったが、培地の種類や状態、温度などの培養条件を変化させることによって、他の二次代謝産物の生産量にも影響を与え得るだろう。SirA は *A. nidulans* の二次代謝産物を広く制御する新たな制御因子であると考えられた。この研究はサーチチェーンの制御を介した二次代謝の制御を可能にするための基礎的知見となる。二次代謝を人為的に制御することができれば、これまでサーチチェーンによって抑制され生産されていなかった新規な二次代謝産物を発見することが可能となり、医薬品や食品の開発に役立つと期待される。また、二次代謝産物の一種であるカビ毒の生産の抑制は人間や植物への病害の防除に応用できるだろう。さらに、同一生物種内のサーチチェーンの役割分担を明らかにしたことによって、他のサーチチェーンを有する生物でも同様の制御が起きている可能性を示した。これは真核生物に広く保存されたサーチチェーンの理解を深める一助となるだろう。

2-2. 材料および方法

2-2-1. 使用した菌株、培地、培養条件

Aspergillus nidulans A26 株 (*biA1*) (Fungal Genetic Stock Center, University of Missouri, Columbia, MO, USA) と SirA Δ 株 (*biA1*, *argB2*, Δ *sirA::argB*) (5) の分生子 2×10^8 個を 500 mL 容フラスコに入れた 200 mL の GMM (22) に播種し、120 rpm、30°C で培養した。固体 GMM には 1.5% の寒天を加えた。定量リアルタイム PCR に供する菌体の培養はプレートにセロファンメンブレンを敷き、二次代謝産物の解析に供する菌体の培養は直接固体培地に分生子 1×10^6 個をスプレッターで播種した後、37°C で培養した。培地には 0.25 mg L^{-1} biotin を加えた。

2-2-2. DNA マイクロアレイ解析

A26 株および SirAΔ 株を 200 mL の液体 GMM を用いて 24、48 および 72 時間培養した。その後、全 RNA を RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen、Hilden、Germany) を用いて精製した。トランスクリプトームをカスタム合成した *A. nidulans* GeneChip を用いて解析した(49)。(49) に示された方法に従い、各培養時間で培養した A26 と SirAΔ の遺伝子の発現比を signal log₂ ratio として算出した。なお、得られた数値は Gene Expression Omnibus (GEO) に accession number: GSE85319 として公表した。3 点の培養時間中 1 点以上で 2 倍以上上方または下方制御された遺伝子を、その発現パターンに従って *k*-平均法を用いて 3 つのセットに分類した (50)。セットの数は主成分解析 (51) により決定した。各遺伝子セットに有意に濃縮された Gene ontology (GO) を AspGD (<http://www.aspgd.org/>) で公表されているツールを用いて解析した。

2-2-3. 二次代謝産物の解析

A26 株および SirAΔ 株を液体 GMM または固体 GMM で 4~5 日間培養した。液体培養して得られた培養物 20 mL と固体培養して得られた培養物 30 cm² に 20 mL の酢酸エチルを加え、12 時間振盪した。酢酸エチル画分を回収し、第一章 1-2-10 に示した方法で HPLC による解析を行った。質量スペクトルは LCMS-8030 instrument (Shimadzu、Kyoto、Japan) を用いて測定した。測定条件は以下の通りである。: Capillary 電圧 4.5 kV、検出範囲 *m/z* 50 - 600、脱溶媒管の温度 250°C、ヒートブロックの温度 400 °C、ネブライザーの窒素ガスの流速 3 L/min、ドライガスの流速 15 L/min。イオン源の極性はポジティブモードまたはネガティブモードに設定した。クロマトグラフィーの条件は HPLC と同じ条件 (第一章 1-2-10) を用いた。

2-2-4. 定量リアルタイム PCR.

A26 株および SirAΔ 株を液体培養で 48 時間、固体培養で 24 時間培養した後、前述の方法で全 RNA を抽出し cDNA を合成し、定量リアルタイム PCR を行った。Table 2-1 に使用したプライマーを示した。

2-3. 結果

2-3-1. SirA は一次代謝および二次代謝に関連する遺伝子群の発現を制御する

SirA は液体、固体培養時のどちらにおいても、培養後期に多くの遺伝子の発現を上昇させた (Fig. 2-1A)。SirA が *A. nidulans* の転写に与えるグローバルな影響について調べるため、*sirA* 遺伝子破壊株 (SirA Δ 株) と A26 株を液体 GMM で培養し、転写産物の経時変化を GeneChip (49) を用いた DNA マイクロアレイを用いて解析し、signal log₂ ratio を算出した。その結果、有意な発現シグナルが検出された遺伝子数は 9,336 だった (Table S2-1)。これは GeneChip でカバーされた遺伝子の 87% であった。このうち、1 点以上の培養時間で A26 株に比べ SirA Δ 株で 2 倍以上発現が上方または下方制御された遺伝子数は 3,393 (36%) であった。各培養時間に発現が変化した遺伝子数は Table 2-2 に示す。主成分分析と *k*-平均法でこれらの遺伝子を発現の経時変化に基づき 3 つのセットに分類した (Table S2-1)。セット 1 には 1,434 遺伝子 (42%) が分類された。このセットは培養 48 時間に SirA Δ 株で発現が抑制された遺伝子群であった (Fig. 2-1B)。セット 2 とセット 3 はそれぞれ 455 遺伝子 (13%) および 1,504 (44%) 遺伝子を含み、これらは培養後期 (培養開始後 48 時間および 72 時間) に SirA Δ において発現が上昇した遺伝子群であった (Fig. 2-1C および D)。セット 2 に分類された遺伝子群の SirA Δ 株での発現量は A26 株のそれに比べ培養後期に上昇していたが、セット 3 の遺伝子群は培養開始後 48 時間に発現が上昇し、同 72 時間に減少していた。

AspGD データベース (<http://www.aspgd.org/>) においてアノテーションされた情報を元に、得られたトランスクリプトームの Gene ontology (GO) 解析を行ったところ、セット 1 には “Biological Process” カテゴリーのうち、“single-organism” ($P < 8 \times 10^{-3}$) の GO term にアノテーションされる遺伝子が有意な数濃縮されていた。この GO term には “arginine biosynthetic process” ($P = 7 \times 10^{-4}$)、 “oxoacid metabolic process” ($P = 2 \times 10^{-3}$)、 “pyruvate metabolic process” ($P = 5 \times 10^{-3}$) および “cellular amino acid metabolic process” ($P = 7 \times 10^{-3}$) などが含まれていた (Table 2-3)。これらの分類項目は炭素源 (グルコース) やアミノ酸の代謝に関与する遺伝子が含まれており、このことから SirA は定常期において、一次代謝に関連する遺伝子群の転写を促進すると考えられた。

セット 2 には “secondary metabolite biosynthetic process” ($P < 7 \times 10^{-7}$) や “secondary metabolic process” ($P < 2 \times 10^{-5}$) の GO term を持つ遺伝子が濃縮されていた。後者の GO term には二次代謝産物の生合成遺伝子が 32 含まれていた。これらは ST、PN、キサントン およびシャムキサントン (xanthone および shamixanthone、XPT)、糸状菌シデロ

ホア (siderophore、SID)、エメリセラミド (emericellamide、EAS)、オースチノールおよびデヒドロオースチノール (austinol および dehydroaustinol、AUS/DAUS)、アスペルニジン A (aspermidine A、ASP)、シコリン (cichorine、CIC)、ent-pimara-8(14),15-diene (EPD) (52)、芳香族アミノ酸、フミキナゾリン C、麦角アルカロイド、未知ポリケチドの生合成遺伝子であった (Table S2-2)。また、“monodictyphenone metabolic process” ($P < 1 \times 10^{-5}$) や “monodictyphenone biosynthetic process” ($P < 1 \times 10^{-5}$) の GO term を持つ遺伝子もセット 2 に濃縮されていた。*A. nidulans* の二次代謝産物の一つであるモノジクチフェノン (monodictyphenone、MDP) の生合成遺伝子は *mdp* 遺伝子クラスターを形成することが知られる (53)。セット 3 には “Molecular Function” カテゴリーのうち、“oxidoreductase activity” ($P = 6 \times 10^{-6}$) の GO term を持つ遺伝子が濃縮されていた (Table 2-3)。セット 3 には二次代謝に関連する GO term は見られなかったが、この GO term には “secondary metabolic process” の GO term を持つ 21 の遺伝子と、二次代謝遺伝子クラスター内やその近隣に位置する 7 つの cytochrome P450 (予測も含む) が含まれていた (Table S2-2 内の ‘*’ が付いた遺伝子) (54)。これらの結果から、セット 2 とセット 3 に分類された遺伝子には二次代謝生産に関与するものが豊富に含まれており、SirA が培養後期にカビの二次代謝産物の生合成をグローバルに制御することが示された。

2-3-2. SirA は二次代謝系遺伝子クラスターを制御する

セット 2 とセット 3 には二次代謝に関連する 85 の遺伝子が含まれていた (Table S2-2)。このうち、73 の遺伝子は 25 の既知または Ingli らによって予測された二次代謝遺伝子クラスター(45)に所属していた (Table S2-3)。Figure 2-2A と B にこれらの遺伝子クラスターをヒートマップとして示した。培養後期 (培養開始後 48 または 72 時間) の SirA Δ 株は A26 株と比べ、14 の遺伝子クラスターにおいて検出された遺伝子の 50% 以上がその発現を 2 倍以上上昇させていた (Fig. 2-2A)。これらには ST、PN、EAS、XPT、MDP、SID、citreisocoumarin、6,8-dihydroxy-3-(4-hydroxy-3-oxopentyl)-isocoumarin および alternariol (COU/ALT)、および 6-hydroxy-7-methyl-3-nonylisoquinoline-5,8-dione (HMN) (55) の生合成遺伝子クラスターがあり、SirA がこれらの遺伝子クラスターの発現を抑制することが示された。ST と PN の生合成遺伝子クラスターを発現抑制したことは、SirA がプロモーター領域のヒストンの脱アセチル化によってそれらの生合成遺伝子を抑制するという報告と一致した (5)。また、SirA Δ 株では A26 株と比べ、二次代謝産物の生合成に関与すると予測される非リボソームペプチド合成酵素 (non-ribosomal

peptide synthetases、NRPS) の遺伝子クラスター (AN2924、AN8105、AN11820 および AN4827 遺伝子クラスター) や、ポリケチド合成酵素 (polyketide synthases、PKS) の遺伝子クラスター (AN9005 および AN1784 遺伝子クラスター) において、検出された遺伝子の 50%以上がその発現を 2 倍以上上昇させていた (Fig. 2-2A)。これらの結果から、SirA はこれらの遺伝子クラスターの発現を抑制することが示された。

2-3-3. SirA によって制御される他の二次代謝系遺伝子クラスター

セット 2 とセット 3 内で、SirAΔ 株で A26 株と比べてクラスターを構成する遺伝子の発現が上昇した二次代謝遺伝子クラスターがある一方、二次代謝に関与する 10 の遺伝子クラスターでは、含まれる遺伝子の半数以上の発現が有意に上昇していなかった。(Fig. 2-2B)。これには、AUS/DAUS、オルシノールおよび F9775 (orcinols および F9775、ORS/F9775)、ASP、CIC、microperfuranone (MIC)、EPD、2,4-dihydroxy-6-[(3E,5E,7E)-2-oxonona-3,5,7-trienyl] benzaldehyde (DOTB) (55)、2-ethyl-4,6-dihydroxy-3,5-dimethylbenzaldehyde (EDD) (55)、フェルタミド B (fellutamid B、INP) (56)、推定 NRPS (AN10297 遺伝子クラスター)、および推定 PKS (AN8910 遺伝子クラスター) の生合成遺伝子クラスターが含まれた。このことから、SirA がこれらの遺伝子クラスターに含まれる遺伝子群を抑制すると結論することはできない。特に、AUS/DAUS、ORS/F9775、ASP、MIC、DOTB、EDD、INP 遺伝子クラスターについては、それぞれが構成する遺伝子の半数以上の発現が SirAΔ 株では A26 株と比べ 2 倍以上減少していたことから、SirA がこれらの遺伝子クラスターに含まれる遺伝子群の転写を促進することが示された。また、セット 1 にも GO term “secondary metabolic process” にアノテーションされる遺伝子が 52 あった (Table S2-4)。このうち、9 つの遺伝子が 6 つの二次代謝遺伝子に所属していた。これらはニジュラリン A (nidulalin A、NID)、テレキノン (terrequinone、TDI) の生合成遺伝子クラスター、NRPS 遺伝子クラスター (AN0016、AN5318 および AN9226 遺伝子クラスター)、そして PKS 遺伝子クラスター (AN6431 遺伝子クラスター) であった (Fig. 2-2C)。TDI、AN5318 および AN9226 遺伝子クラスター検出された遺伝子のうち、半数以上の遺伝子が培養後期の SirAΔ で A26 株と比べ発現が 2 倍以上抑制されていた。このことから、SirA は培養後期にこれらの遺伝子クラスターに含まれる遺伝子群の転写を促進することが示された。これらのことから、SirA は二次代謝遺伝子クラスターによって制御の方向が異なることが明らかとなった。

2-3-4. SirA はステリグマトシスチンとオースチノールの生産を制御する

液体 GMM で 4 日間または 5 日間培養した SirAΔ 株と A26 株の二次代謝産物を HPLC で解析した。SirAΔ 株は A26 株と比べ 1.5 または 1.4 倍の ST を生産した (Fig. 2-3)。ST の保持時間は標品の ST と同様であった。この結果は SirA が ST の生産量を抑制するという報告と一致した (5)。固体 GMM で 4 日間または 5 日間培養した場合も液体培養と同様に、SirAΔ 株は A26 株と比べ 1.7 または 1.2 倍の ST を生産した (Fig. 2-3)。これと一致して、ST 生合成に関わる *aflR*、*stcJ* および *stcU* の発現量は、SirAΔ 株で A26 株と比べ増加していた (Fig. 2-4)。この結果から、SirA は液体培養時だけでなく固体培養時にも ST の生合成を遺伝子発現のレベルで抑制することが示された。

LC-MS で解析したところ、保持時間 12.1 分に検出された化合物は $m/z = 459.1, 481.1$ 、および 497.1 であり、AUS (分子量 = 458.50、 $C_{25}H_{30}O_8$) の $[M+H]^+$ 、 $[M+Na]^+$ および $[M+K]^+$ の質量に一致した (57)。また、保持時間 12.6 分に検出された化合物は $m/z = 457.2$ および 495.2 であり、DAUS (分子量 = 456.49、 $C_{25}H_{28}O_8$) の $[M+H]^+$ および $[M+K]^+$ の質量に一致した (57)。これらの吸収極大はそれぞれ 246 nm と 234 nm であったことと考え合わせ、これらの化合物が AUS と DAUS であることが明らかとなった (58)。液体培養 4 日目の SirAΔ 株の培養物では、A26 株に比べて AUS と DAUS の蓄積量がそれぞれ 30% と 19% であった。また、これらの蓄積は SirAΔ 株でも A26 株でも培養 5 日目には消失した。これはカビによって AUS と DAUS が消費された可能性を示している。この結果はマイクロアレイ解析で明らかになった SirAΔ 株における AUS および DAUS 生合成遺伝子の発現の減少 (Fig. 2-2B) や、SirAΔ 株では A26 株よりも *ausA* 遺伝子 (AUS と DAUS の生合成遺伝子) の発現量が減少していること (Fig. 2-4) と一致した。これらの結果から、SirA は液体培養時に AUS と DAUS の生合成を遺伝子発現レベルで増強することが示された。

これとは対照的に、固体培養 5 日目の SirAΔ 株では A26 株に比べてそれぞれ 1.4 および 1.3 倍の AUS と DASU が生産された (Fig. 2-3)。定量リアルタイム PCR によって、固体培養時には SirAΔ 株では A26 株に比べて 2.7 倍の *ausA* 遺伝子の発現が検出された (Fig. 2-4)。これらの結果から、SirA は固体培養時に AUS と DAUS の生合成を遺伝子発現レベルで抑制するという、液体培養時とは反対の機能を有することが示された。

2-3-5. SirAΔ株と SirEΔ株のトランスクリプトーム解析の比較

第一章と本章で解析した培養開始後 48 時間の SirAΔ株と SirEΔ株のトランスクリプトームから、この 2 つのサーチュインの制御下にある遺伝子群を比較した。A26 株と比較したとき両株で 2 倍以上発現が減少する遺伝子は 105 あり、これらにはアミノ糖代謝 (特にグルコサミン) に関与する GO term や ‘asexual spore wall assembly’ の GO term が濃縮されていた (Table 2-4)。このことから、SirA と SirE は共通してグルコサミン代謝と分生子形成の関連遺伝子群の発現を増強することが明らかとなった。サーチュインは遺伝子の発現抑制を行う因子であるので、これは両サーチュインによる脱アセチル化の直接的な機能ではなく、これらの代謝を制御する転写因子をコードする遺伝子の発現の抑制や、転写因子に対する脱アセチル化による間接的な機能であると考えられた。

一方、A26 株と比べ両株で発現が 2 倍以上上昇する遺伝子は 85 あったが、有意に濃縮された GO term はみられなかった。このことは、SirA と SirE が異なる遺伝子群を抑制する可能性を示している。

次に、第一章と本章で明らかになった両サーチュインの制御下にある遺伝子群の発現を比較した。第一章で SirE が有意に制御することが判明した ST 生合成、分生子形成、菌体外加水分解酵素、一次代謝、細胞壁合成に関わる遺伝子群の SirAΔ株でのトランスクリプトームを解析した。その結果、SirEΔ株において A26 株と比較して発現が減少する菌体外加水分解酵素遺伝子のうち自己溶菌に関与するものを含まない 10 の遺伝子のうち、6 つの遺伝子が SirAΔ株で A26 株と比べて発現が上昇していた (Table 2-5)。このことから、SirE によって 発現が上昇する菌体外加水分解酵素の遺伝子は、SirA によって有意に抑制されることが示された ($P = 0.0006$)。しかし、自己溶菌に関与する酵素をコードする遺伝子 7 つのうち 3 つの遺伝子の発現が SirEΔ株と同様に SirAΔ株で減少したことから、SirE と SirA は自己溶菌を促進する共通の機能があると考えられた (Table 2-5)。また、SirEΔ株において A26 株と比較して発現が上昇した解糖系、TCA 回路およびペントースリン酸経路といった炭素代謝に関する一次代謝遺伝子 21 中 8 遺伝子の発現が SirAΔ株では A26 株と比較して減少したことから、SirA がこれらの一次代謝遺伝子に対して SirE とは逆の制御、即ち遺伝子発現の促進を行っていることが判明した (Table 2-6、 $P = 0.0015$)。さらに、細胞壁合成酵素をコードする遺伝子群についても同様の結果であった。A26 株と比べ SirEΔ株で発現が上昇した細胞壁の合成に関わる 7 遺伝子のうち 3 遺伝子の発現が SirAΔ株では A26 株と比較して減少していた (Table 2-6、 $P = 0.034$)。一方、窒素代謝関連遺伝子については有意な相関性が見られなかった (Table 2-6)。また、

分生子形成遺伝子については、SirE と SirA 両方で遺伝子の発現を正に制御していた (Table 2-5)。この結果は前述の GO term 解析の結果と一致する (Table 2-4)。さらに、本章で示した SirA の制御下にある二次代謝系遺伝子について SirEΔ 株のトランスクリプトームを解析した。A26 株と比べ SirAΔ 株で遺伝子発現が上昇した二次代謝系遺伝子クラスターのうち、SirEΔ 株では A26 株と比べ ST と EAS の生合成に関与する遺伝子クラスター内の遺伝子の発現が減少していた (Table 2-7)。一方、SirAΔ 株で遺伝子発現が減少する ORS/ F9775 遺伝子クラスターは、SirEΔ 株では発現が上昇していた (Table 2-7)。このことから、これらの二次代謝系遺伝子に対しても、SirA と SirE が反対の制御を行うことが示された。一方、SID、AUS/DAUS、TDI 遺伝子クラスターに対する制御は SirA と SirE で同様であった (Table 2-7)。これらの結果から、SirE と SirA は一部の遺伝子を共通の標的とし、それらを反対向きに発現制御することが示された。これにより、SirE と SirA は、これらの遺伝子発現のバランスを取っていると考えられる。

2-4. 考察

本章のトランスクリプトーム解析によって、SirA が定常期に二次代謝だけでなく一次代謝も含むグローバルな遺伝子の発現を制御し、特に培養後期に Fig. 2-2A 示した二次代謝系遺伝子クラスターの発現を制御することが判明した。さらに、SirA は培地条件に応答して *ausA* 遺伝子の発現を制御し、AUS と DAUS の生合成を調節することが新たに示された。液体培養または固体培養の違いが二次代謝遺伝子の発現に影響することはよく知られているが (52)、*A. nidulans* の SirA が培地の状態を識別して二次代謝遺伝子である AUS と DAUS の生合成遺伝子の発現を制御することは、本研究で初めて明らかとなった。現在までに、SirA が培養条件に応答する仕組みについては不明であるが、今後この仕組みを明らかにすることができれば、サーチュイン機能の制御とあわせて、二次代謝の活性化の技術開発に役立つと期待される。

従来、サーチュインは遺伝子発現を抑制すると考えられてきたが、第一章で述べた SirE と同様に、SirA は遺伝子発現を正に制御することも明らかとなった。このような遺伝子発現の増強は、ヒストンの脱アセチル化による直接的な制御ではなく、転写因子の制御を介した間接的なものだと考えられる。サーチュインが遺伝子の上方制御を行うという結果は、*S. cerevisiae* の Sir2p や Hst1p、*A. oryzae* のサーチュインアイソザイムである AoHstD のトランスクリプトーム解析の結果と同様であったが、サーチュインによ

って発現が上昇する遺伝子群を詳しく研究した例はない (59) (8)。本研究で初めてサーチュインが遺伝子の発現の上昇に關与する二次代謝遺伝子クラスターの詳細が明らかとなった。また、SirA が定常期に一次代謝に關与する遺伝子群を上方制御するという発見は、*S. cerevisiae* のサーチュインである Sir2p と Hst1p が対数増殖期の終盤に解糖系の遺伝子の発現を抑制し、代謝の移行を促進するという報告とは逆の結果であった (36)。しかし、第一章ではサーチュイン E (SirE) が定常期に一次代謝関連遺伝子を抑制することを発見したので、*A. nidulans* の場合は、SirA ではなく SirE が一次代謝を抑制すると考えられる。このように、*A. nidulans* のサーチュインのアイソザイムはそれぞれ異なる機能を有していると考えられる。

同一生物内のサーチュインアイソザイムの役割分担について明らかにするため、第一章と本章で解析した培養開始後 48 時間の SirA Δ 株と SirE Δ 株のトランスクリプトームを比較したところ、SirA と SirE は菌体外加水分解酵素をコードする遺伝子群、炭素代謝に關与する遺伝子群、細胞壁の合成に關与する遺伝子群および ST、EAS、ORS/ F9775 の生合成遺伝子クラスターに対して逆方向の制御を行うことが示された。同じ生物内の複数のサーチュインをコードする遺伝子の遺伝子破壊株のトランスクリプトームを比較したのは本研究が初である。この研究によって、*A. nidulans* のサーチュインが生物の生存に極めて重要な一次代謝と糸状菌特有の自己溶菌や細胞壁の合成の制御に深く関わっていることが示された。サーチュインの役割分担について更に理解するためには、サーチュインをコードする遺伝子の多重遺伝子破壊株を作製しそのトランスクリプトームや表現型を解析することが重要となるだろう。また、SirA や SirE 以外のサーチュインをコードする遺伝子の遺伝子破壊株のトランスクリプトームを比較すれば、他のサーチュインアイソザイムの遺伝子発現制御の共通性と機能分担が明らかとなると期待される。

第一章で述べた *sirE* は定常期 (培養開始後 48 時間) にその遺伝子発現が最大になり、*sirE* 遺伝子の破壊は定常期のヒストンのアセチル化レベルを増大させたことから、SirE は定常期にその活性が最大となると考えられた。一方、SirA は定常期に制御する遺伝子数が最も多くなったこと (Table 2-2) から、SirE と同様に定常期に最も活性が増強されると考えられた。しかし、*sirA* の発現量は培養開始後 72 時間まで増大していたこと (Fig. 2-1A) や、*sirA* の遺伝子破壊が培養開始後 72 時間の菌体のヒストンのアセチル化を増大させたこと (5) から判断して、SirA の活性は培養後期 (培養開始後 72 時間以降) に最大となるのかもしれない。SirA の活性が生育時期のどの段階で最大となるのかは、経

時的に *SirA*Δ株のヒストンのアセチル化レベルを検証することが必要である。

NAD⁺は哺乳類や酵母のエネルギー状態やエネルギー刺激を反映することから、細胞内の NAD⁺濃度が定常期に *SirA* や *SirE* を活性化する可能性を考えた。実際、酵母や哺乳類では貧栄養下で細胞内の NAD⁺濃度が上昇する (60, 61)。しかし、先行研究で *A. nidulans* を液体培養した場合、細胞内の NAD⁺の加水分解酵素である Nudix hydrolase A が少なくとも培養開始後 72 時間までは細胞内の NAD⁺濃度を維持することが明らかとなっているため (5)、この仮説は否定された。即ち、*SirA* や *SirE* を定常期に活性化させる要因は細胞内の NAD⁺濃度ではないと考えられた。*sirA* 遺伝子 (Fig. 2-1A) と *sirE* 遺伝子 (第一章 Fig.1-2B) のいずれの転写量も定常期や培養後期に上昇したことは、これらのサーチュインの細胞内の活性の制御は転写レベルで制御されていると考えられる。Forkhead Box O (FOXO) ファミリーの転写因子は哺乳類において、栄養飢餓にさらされたときに *SIRT1* 遺伝子の発現を制御する因子である(62)が、*S. cerevisiae* もこのファミリーの転写因子を有していることが判明している。また、このファミリーのタンパク質は他の子囊菌にも広く分布しており、*A. nidulans* には4つの推定タンパク質が存在している (AN4521/*fhpA*、AN8858/*mcnB*、AN2845 および AN4985)。これらがサーチュインの遺伝子発現を定常期に増強しているのかもしれない。この仮説を確かめるためには、FOXO ファミリーの転写因子をコードする遺伝子の遺伝子破壊株を作製し、サーチュインの活性やサーチュインをコードする遺伝子の発現量を検証することが重要であろう。本章の研究から、*SirA* が先行研究で明らかとなった ST や PN の生合成に加え、多様な二次代謝系遺伝子クラスターの発現を抑制することが明らかとなった。実際に生合成量の増減を確認できた化合物は、ST、AUS、DAUS のみであったが、*SirA* が培地条件によって制御を変化させたことは、培地の種類や状態、温度などの培養条件を変えることによって、他の二次代謝産物の生産量への影響が見られる可能性が高いと予想できる。従って、本章で得られた結果は、*SirA* が *A. nidulans* の二次代謝産物を広く制御する新たな制御因子であることを強く示唆するものである。今後、サーチュインの阻害剤を糸状菌に投与することによって、サーチュインによって抑制され生産されていなかった新規な二次代謝産物を発見することや既知の有用な二次代謝産物の増産が可能となり、医薬品や食品の開発に役立つだろう。また、二次代謝産物の一種であるカビ毒の生産の抑制は人間や植物への病害の防除に応用できる。さらに、同一生物種内のサーチュインの役割分担や協調の研究は、糸状菌の代謝の制御だけでなく、ヒトなどの真核生物のサーチュインの機能の解明の一助となるだろう。

Table 2-1. Primers included in quantitative PCR analyses.

Primer	Nucleotide sequence	Target gene
ausA RT F	5'- ACAGACCGAGAGCCAAAGAG-3'	<i>ausA</i>
ausA RT R	5'- GTGCGTGTGGTAGCAAAGAG-3'	
aflR RT F	5'-CTGCCTTGCGAGTATATGGTTTC-3'	<i>aflR</i>
aflR RT R	5'-TTGGTGATGGTGCTGTCTTG-3'	
stcJ RT F	5'- AGCCAATACCGGACACG-3'	<i>stcJ</i>
stcJ RT R	5'-TGTAGTGTGGACTTGCCGC -3'	
stcU RT F	5'-CATTTCATTCAAGCCGATGT-3'	<i>stcU</i>
stcU RT R	5'-CCAGGTATCCGAAGTGCTCAA-3'	
actA RT F	5'-GAAGTCCTACGAACTGCCTGATG-3'	<i>actA</i>
actA RT R	5'-AAGAACGCTGGGCTGGAA-3'	

Table 2-2. Numbers of genes up- or down-regulated for ≥ 2 -fold in SirA Δ .

	24 h	48 h	72 h
Up	533	1, 429	266
Down	544	1, 262	521

Table 2-3. Gene ontology terms enriched among regulated genes in SirAΔ.

GO ID	GO term	Cluster frequency (%) [*]	Gene number / total gene number [†]	P value
Set 1 (1434 genes)				
<i>Biological process</i>				
44710	Single-organism metabolic process	24.4	334/1983	2.17E-07
44699	Single-organism process	35.7	487/3133	6.65E-07
10033	Response to organic substance	3.3	45/153	2.42E-05
6082	Organic acid metabolic process	8.2	112/552	8.98E-05
71310	Cellular response to organic substance	2.8	38/124	9.54E-05
44711	Single-organism biosynthetic process	10.4	142/750	0.00013
19752	Carboxylic acid metabolic process	6.4	87/412	0.00048
44283	Small molecule biosynthetic process	5.8	80/372	0.00067
6526	Arginine biosynthetic process	0.6	8/9	0.0007
44281	Small molecule metabolic process	12.1	166/940	0.00124
43436	Oxoacid metabolic process	6.4	87/425	0.00194
42221	Response to chemical	7.2	99/510	0.00447
1901135	Carbohydrate derivative metabolic process	5.3	73/346	0.00453
6090	Pyruvate metabolic process	1.2	16/37	0.00467
6022	Aminoglycan metabolic process	1.3	60/269	0.00645
6040	Amino sugar metabolic process	1.3	18/46	0.00645
6520	Cellular amino acid metabolic process	3.5	18/46	0.00747
44763	Single-organism cellular process	25.1	48/201	0.00773
Set 2 (455 genes)				
<i>Biological process</i>				
44550	Secondary metabolite biosynthetic process	6.9	29/208	7.37E-07
1900813	Monodictyphenone metabolic process	1.9	8/15	1.07E-05
1900815	Monodictyphenone biosynthetic process	1.9	8/15	1.07E-05
19748	Secondary metabolic process	7.6	32/286	2.48E-05
46189	Phenol-containing compound biosynthetic process	2.6	11/37	3.93E-05
42537	Benzene-containing compound metabolic process	2.1	9/24	6.28E-05
18958	Phenol-containing compound metabolic process	2.6	11/46	0.00044
42180	Cellular ketone metabolic process	2.8	12/72	0.00805
Set 3 (1504 genes)				
<i>Biological process</i>				
55085	Transmembrane transport	9.0	130/687	0.00592
<i>Molecular function</i>				
16491	Oxidoreductase activity	14.5	210/1124	5.70E-06
3824	Catalytic activity	6.0	87/407	0.00062

^{*}Ratio of numbers of genes with each GO term versus total numbers of genes found in the gene sets.

[†] Numbers of genes with each GO term and those encoded by whole fungal genome.

Table 2-4. Gene ontology terms enriched among down-regulated genes in SirAΔ and SirEΔ.

GO ID	GO term	Cluster frequency (%) [*]	Gene number / total gene number [†]	<i>P</i> value
6046	N-acetylglucosamine catabolic process	2.9	3/3	0.00026
6044	N-acetylglucosamine metabolic process	2.9	3/4	0.00105
42243	Asexual spore wall assembly	2.9	3/6	0.00519
1901071	Glucosamine-containing compound metabolic process	4.8	5/44	0.0183
6040	Amino sugar metabolic process	4.8	5/46	0.02275
1901072	Glucosamine-containing compound catabolic process	3.8	4/25	0.02671

Table 2-5. Expression of genes encoding extracellular hydrolases and involved in conidiophore development in the stationary growth phase SirEΔ and SirAΔ.

Gene I. D.	Name	SirEΔ /A26	SirAΔ /A26
Cellulose		<i>log₂R</i>	<i>log₂R</i>
AN2828	<i>bglL</i>	-10.04	0.25
AN4102	<i>bglA</i>	-2.45	0.56
Hemicellulose			
AN8007	<i>abnC</i>	-8.65	3.74
AN8138	<i>aglC</i>	-5.42	-2.19
AN9380		-1.48	4.60
Hemicellulose (pectin)			
AN2395		-3.58	2.51
AN2463	<i>lacF</i>	-2.55	1.34
Hemicellulose (mannan)			
AN2325		-6.59	1.75
AN1197		-5.32	0.75
AN0787	<i>mns1B</i>	-3.74	1.02
Fungal cell wall degradation/remodeling proteins (autolytic enzymes)			
AN4825		-9.38	-0.73
AN4871	<i>chiB</i>	-7.92	-1.07
AN0245		-6.11	2.73
AN1502	<i>nagA</i>	-6.11	-2.97
AN9042	<i>agnC</i>	-5.64	-1.28
AN0472	<i>engA</i>	-3.57	-0.15
AN0779		-2.34	0.97
Conidiophore development			
AN0973	<i>brlA</i>	-8.69	-0.15
AN6635	<i>yA</i>	-3.69	-1.73
AN1937	<i>wetA</i>	-3.27	-1.26

Table 2-6. Expression of genes involved in the primary metabolisms in the stationary growth phase SirEΔ and SirAΔ.

Gene I. D.	Name	SirEΔ /A26	SirAΔ /A26	Gene I. D.	Name	SirEΔ /A26	SirAΔ /A26	Gene I. D.	Name	SirEΔ /A26	SirAΔ /A26
Glycolysis		<i>log₂R</i>	<i>log₂R</i>	TCA		<i>log₂R</i>	<i>log₂R</i>	PPP		<i>log₂R</i>	<i>log₂R</i>
AN2286	<i>alcC</i>	8.19	1.76	AN5447		5.79	2.54	AN3954		2.66	-1.32
AN4888	<i>pdca</i>	6.03	0.31	AN4376	<i>gdhA</i>	5.24	-0.44	AN0240	<i>pppA</i>	2.42	-0.69
AN3223	<i>pfkA</i>	3.78	-1.35	AN2436	<i>aclB</i>	3.08	-2.15	AN0688		1.98	-0.63
AN8041	<i>gpdA</i>	2.94	-0.51	AN2435	<i>aclA</i>	2.86	-1.82	AN2981	<i>gsdA</i>	1.58	-1.63
AN5210	<i>pkiA</i>	2.88	-2.30	AN8275	<i>citA</i>	2.37	-1.53	AN2440		1.46	0.55
AN5746	<i>acuN</i>	2.36	-1.30	AN6717	<i>mdhA</i>	1.82	-0.33	AN10233		1.43	N.D.
AN1246	<i>pgkA</i>	2.20	0.21	AN5790		1.60	-0.89	AN5907		1.20	3.14
AN5842	<i>ldhA</i>	2.18	0.47	AN1003		1.53	-0.59	AN6037	<i>swoM</i>	1.13	-1.13
AN4591		1.40	-0.34	AN3466	<i>kgdB</i>	1.17	0.03	AN6113		-0.24	-0.98
AN6900	<i>tpiA</i>	1.38	0.12	AN2295		1.07	-0.27	AN0285		-0.62	0.60
AN6037	<i>swoM</i>	1.13	-1.13	AN7000		0.90	-0.54	AN7588		-1.32	-1.04
AN7459	<i>hxA</i>	0.92	-1.04	AN5300		0.52	0.51	AN4913	<i>phk</i>	-1.94	-0.29
AN3059	<i>pgmA</i>	0.53	-1.07	AN1193		0.49	0.18	Nitrogen metabolism			
AN2875	<i>fbaA</i>	-0.17	-0.46	AN5571	<i>kgdA</i>	0.31	-0.25	AN1006	<i>niaD</i>	9.34	1.88
AN8689	<i>glkA</i>	-0.34	-0.70	AN8707		0.30	0.16	AN1008	<i>crnA</i>	7.33	0.41
AN8720		-1.05	0.52	AN7315		0.20	-1.11	AN0399	<i>nrtB</i>	6.59	0.74
AN5913		-1.35	0.83	AN5525	<i>acoA</i>	-0.05	-1.32	AN1007	<i>niiA</i>	8.41	-0.57
AN1689		-1.40	-1.20	AN2332		-0.05	1.17	AN8449		1.51	-0.83
AN5908	<i>tpiB</i>	-1.94	3.09	AN2916		-0.06	0.31	Cell wall biosynthesis			
AN5604	<i>acuG</i>	-2.07	0.63	AN0896		-0.14	1.33	AN3307	<i>agsB</i>	7.82	0.82
AN0554	<i>aldA</i>	-2.86	-0.51	AN6499	<i>mdhC</i>	-0.24	0.08	AN4367	<i>chsF</i>	5.21	-0.41
AN3184		-3.13	1.05	AN8793	<i>carC</i>	-0.51	0.98	AN4515	<i>crhB</i>	2.9	-0.99
				AN2999	<i>idpA</i>	-0.88	-0.88	AN6697	<i>sunA</i>	2.88	-1.75
				AN2248	<i>gatA</i>	-1.55	0.83	AN0726	<i>sunB</i>	2.78	-1.48
				AN4820		-1.66	0.16	AN7511	<i>geLE</i>	2.45	2.81
				AN7451		-4.20	-0.85	AN10709	<i>gfaA</i>	1.46	-1.41

Table 2-7. Expression of SM genes in the stationary growth phase SirAΔ and SirEΔ.

Gene I. D.	Name	SirAΔ/A26	SirEΔ/A26	Gene I. D.	Name	SirAΔ/A26	SirEΔ/A26
Sterigmatocystin		<i>log2R</i>	<i>log2R</i>	Orcinol and F9775		<i>log2R</i>	<i>log2R</i>
AN7804	<i>stcW</i>	0.76	-8.64	AN7896	<i>dbaA</i>	-0.90	3.52
AN7805	<i>stcV</i>	0.47	-4.94	AN7897	<i>dbaB</i>	-3.62	7.20
AN7806	<i>stcU</i>	0.48	-8.82	AN7898	<i>dbaD</i>	-0.86	10.95
AN7807	<i>stcT</i>	1.66	-14.09	AN7901	<i>dbaG</i>	-1.41	3.64
AN7808	<i>stcS</i>	1.82	-10.05	AN7907		-0.91	-5.62
AN7809		0.97	-9.39	AN7908	<i>axhA</i>	0.72	-1.62
AN7810	<i>stcQ</i>	0.62	-10.90	AN7909	<i>orsA</i>	-6.30	1.05
AN7811	<i>stcO</i>	2.08	-8.39	AN7911	<i>orsB</i>	-4.80	1.97
AN7812	<i>stcN</i>	0.41	-10.19	AN7912	<i>orsC</i>	-5.25	4.00
AN11013	<i>stcL</i>	0.99	-9.47	AN7913		-1.39	1.73
AN7814	<i>stcK</i>	1.11	-3.93	AN7914		-3.03	3.87
AN7815	<i>stcJ</i>	0.69	-4.59	The fungal siderophore			
AN7816	<i>stcI</i>	1.31	-6.73	AN0257	<i>antA</i>	0.69	-1.01
AN7817		1.06	-9.30	AN0607	<i>sidC</i>	3.81	-1.24
AN7818	<i>stcF</i>	1.79	-8.45	AN0608		1.66	0.40
AN7819		0.88	-7.38	AN0609	<i>sidI</i>	0.92	1.12
AN7820	<i>afIR</i>	0.97	-8.68	AN10080	<i>sidL</i>	0.26	-0.81
AN7821	<i>stcE</i>	1.90	-7.81	AN4948		1.12	0.58
AN7822		0.26	-4.29	AN5823	<i>sidA</i>	2.20	3.11
AN7823	<i>stcC</i>	1.75	-3.59	AN6234	<i>sidF</i>	6.17	1.19
AN7824	<i>stcB</i>	2.01	-9.19	AN6235	<i>sidH</i>	5.15	1.01
AN7825	<i>stcA</i>	0.23	-9.97	AN6236	<i>sidD</i>	3.24	1.77
Emericellamide				AN6239		1.54	3.18
AN2545	<i>easA</i>	1.42	-1.99	AN7884		-2.28	4.67
AN2547	<i>easB</i>	3.03	-2.27	AN8539	<i>sidG</i>	4.60	2.10
AN2548	<i>easC</i>	3.40	-2.17	Austinol and dehydroaustinol			
AN2549	<i>easD</i>	3.80	-1.99	AN8383	<i>ausA</i>	-0.32	-1.54
				AN9246	<i>ausE</i>	-1.04	-11.35
				AN9248	<i>CYP650B1</i>	-1.02	-7.74
				AN9249	<i>ausH</i>	-2.77	-11.86
				AN9257	<i>ausL</i>	-1.34	-5.19
				Terriquinone			
				AN8513		-1.49	-7.46
				AN8514		-1.60	-6.78
				AN8516		-2.42	-9.62

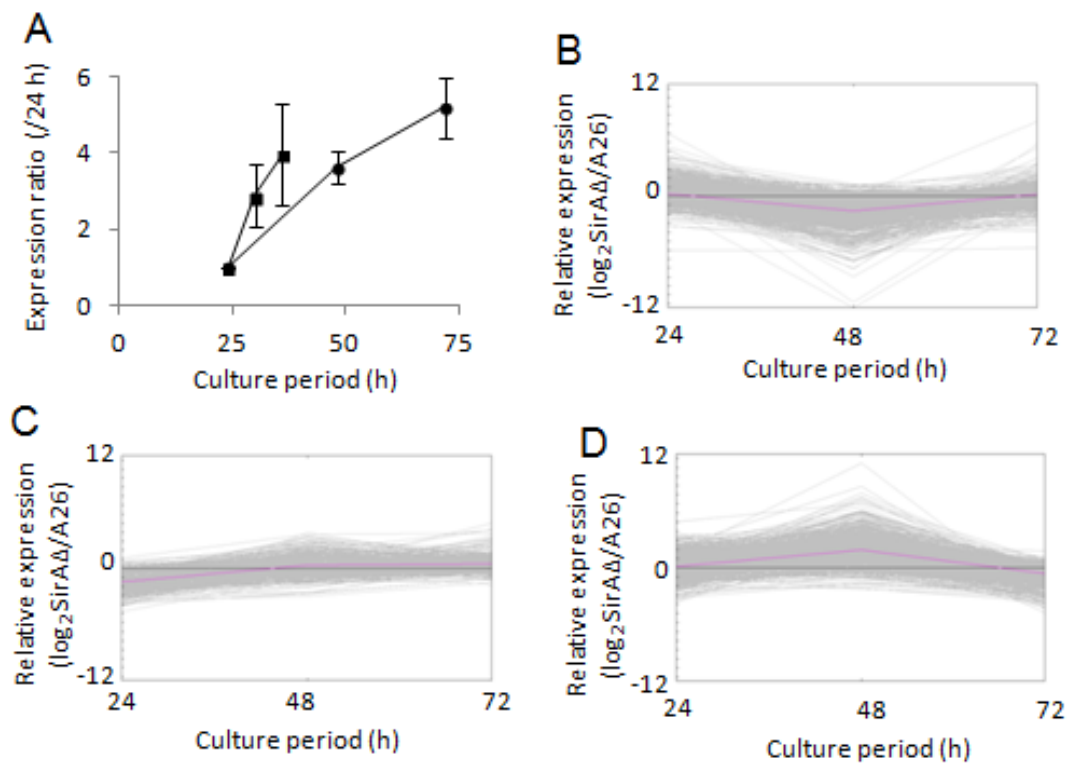


FIGURE 2-1. Sets of differentially expressed genes.

(A) PCR quantified *sirA* transcript. Strain A26 was cultured in liquid (●) and solid agar (■) GMM medium. Relative values to *actA* transcript at 24 h were taken as 1. (B – D) Three sets of genes were grouped using *k*-means clustering. Expression profiles of genes in sets 1 to 3. Signal log ratios ($\log_2 \text{SirA}\Delta/\text{A26}$) are shown in y axis; cultivation periods are shown in x axis.

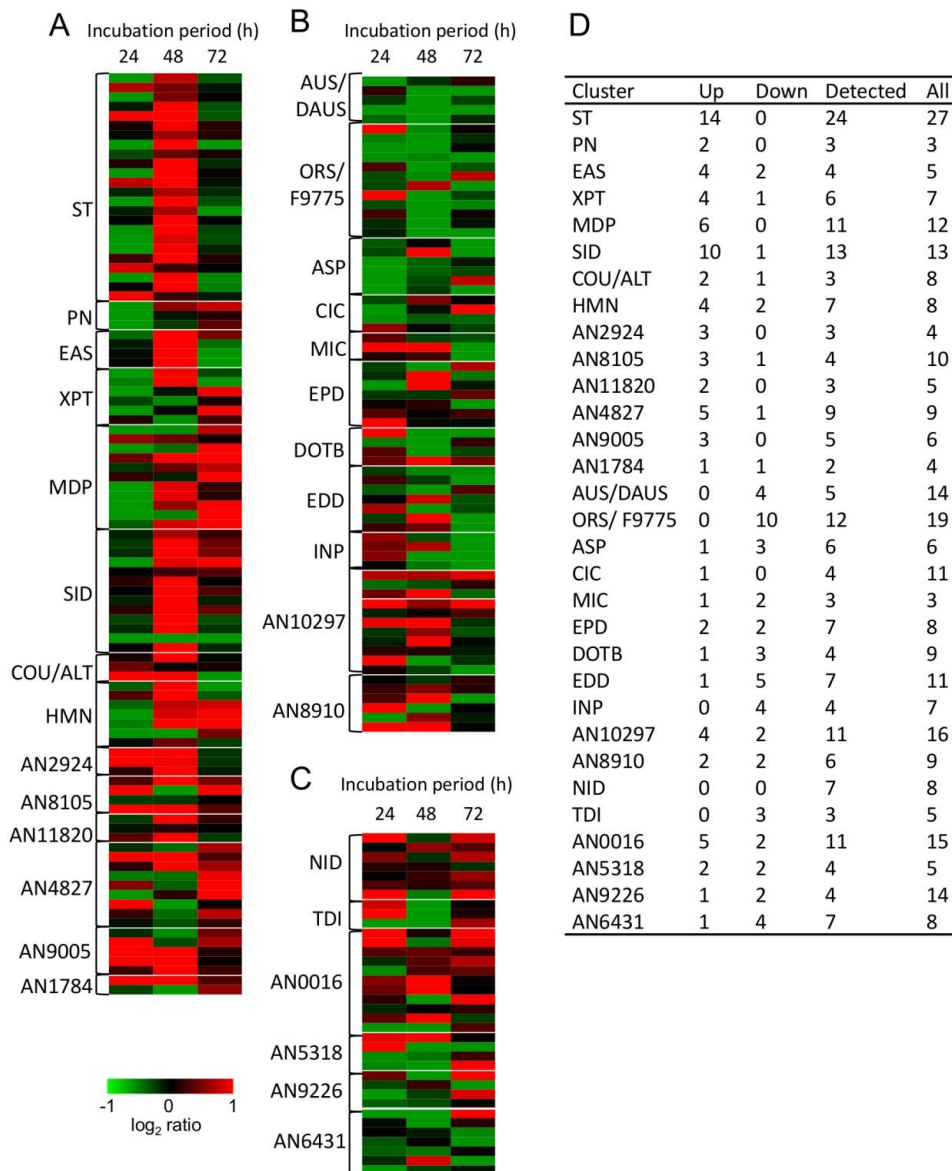


FIGURE 2-2. Transcriptome analysis of *A. nidulans* SM genes.

Aspergillus nidulans A26 and SirA Δ were cultured in liquid GMM medium at 30°C for 24, 48 and 72 h. Heat maps show signal log₂ ratios between SirA Δ and A26 transcripts of genes detected by microarray analysis. Heat maps for SM gene clusters involve genes grouped in sets 2 and 3 (A and B), and SM genes grouped into set 1 (C). A and B, Heat maps for SM gene clusters in which > 50% of the genes were up-regulated ≥ 2 fold (A) and were not up-regulated (B) in SirA Δ cultures incubated for 48 or 72 h. (D) Numbers of SM cluster genes that are up- or down-regulated for ≥ 2 -fold in SirA Δ . Gene clusters are represented by their products and by representative genes when their products were not identified. Abbreviations: ASP, aspernidine A; AUS, austinol; DAUS, dehydroaustinol; CIC, cichorine; COU/ALT, citreoisocoumarin, 6, 8-dihydroxy-3-(4-hydroxy-3-oxopentyl)-isocoumarin and alternariol; DOTB, 2, 4-dihydroxy-6-[(3E, 5E, 7E)-2-oxonona-3, 5, 7-trienyl] benzaldehyde; EAS, emericellamide; EDD, 2-ethyl-4, 6-dihydroxy-3, 5-dimethyl benzaldehyde; EPD, ent-pimara-8(14), 15-diene; INP, fellutamide B; MDP, monodictyphenone; MIC, microperfuranone HMN, 6-hydroxy-7-methyl-3-nonylisoquinoline-5, 8-dione; NID, nidulalin A; ORS/F9775, orcinol and F9775; PN, penicillin G; SID, fungal siderophore; ST, sterigmatocystin; TDI, terrequinone; XPT, xanthone and shamixanthone. Table S2-3 lists all genes in these clusters.

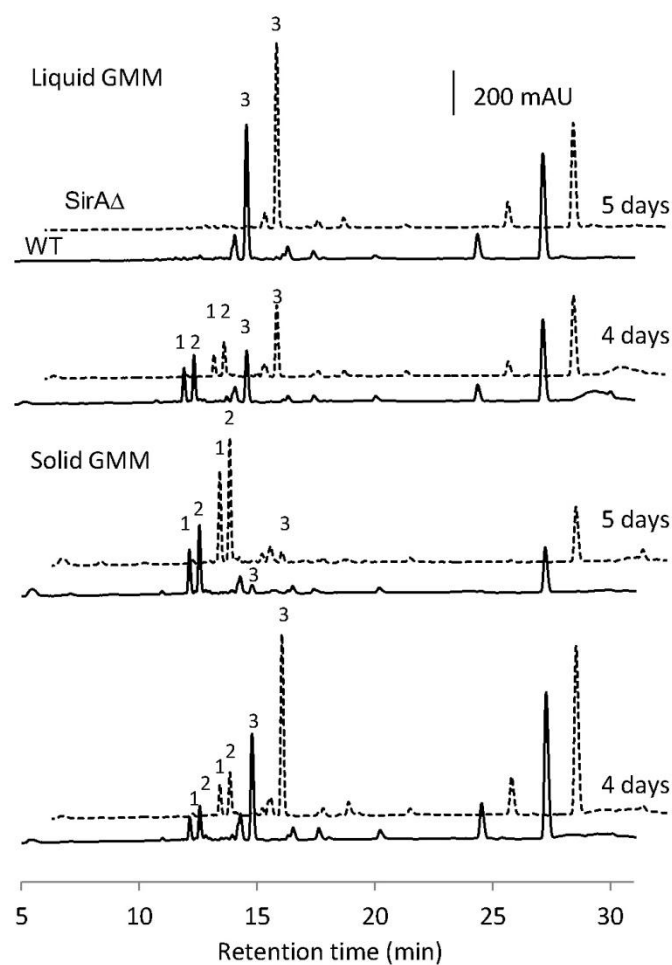


FIGURE 2-3. Amounts of SM produced by *A. nidulans* determined by HPLC. Solid lines, extracts of *A. nidulans* A26; broken lines, *SirA* Δ cultured in both liquid and solid GMM for four and five days. Numbers 1, 2 and 3 represent austinol, dehydroaustinol and sterigmatocystin, respectively.

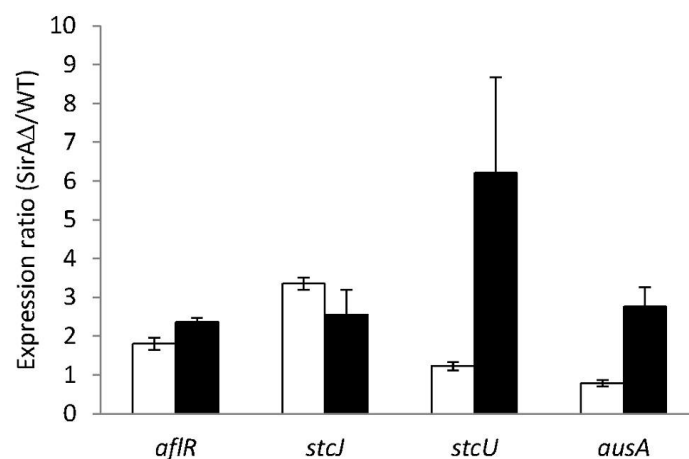


FIGURE 2-4. Amounts of transcripts of genes for producing sterigmatocystin, austinol and dehydroaustinol of SirA Δ determine by real-time PCR.

SirA Δ and A26 were cultured in liquid GMM medium for 48 (unfilled bars) and solid GMM medium for 24 h (filled bars). Values are relative to those of A26. *ausA*, gene for synthesizing austinol and dehydroaustinol; *aflR*, regulatory gene in cluster for synthesizing sterigmatocystin; *stcJ* and *stcU*, genes involved in sterigmatocystin synthesis. Data are presented as means \pm standard error of three experiments.

第3章 *Aspergillus nidulans* のサーチュインの二次代謝に対する機能解析

3-1. 序論

サーチュインはアミノ酸配列によって I から IV のクラスに分類される (32)。Class I サーチュインは Ia、Ib そして Ic のサブクラスに分類される。Class Ia はヒトのサーチュインである SIRT1、*Saccharomyces cerevisiae* の Sir2p と Hst1 および *Aspergillus nidulans* の SirA を含み、SIRT1、Sir2p および Hst1 はヒストン H3 と H4 を、SirA は H4 を脱アセチル化する (3, 5, 8, 63)。SIRT1 は p53 などの転写因子などヒストン以外の基質も脱アセチル化することが知られる (41)。SIRT2 と SIRT3 は Class Ib に所属する。ヒト SIRT2 はヒストン H4 や細胞質内の α -tubulin などを、SIRT3 はオルニチントランスカルバミラーゼなどをアセチル化する。*S. cerevisiae* の Hst2p はこのサブクラスに所属し細胞質に局在するサーチュインであり、*in vitro* でヒストン H4 を脱アセチル化する (4)。また、サーチュインはアセチル化以外の機能を有すものもある。例えば、class II サーチュインである SIRT4 は ADP-リボースをグルタミン酸脱水素酵素に転移させる。また、class III に属する SIRT5 はミトコンドリアに局在するサーチュインであり、脱アセチル化の他に脱スクシニル化と脱マロニル化の活性を有している (64, 65)。

S. cerevisiae は Class I のサーチュインのみを有する (Sir2p、Hst1p、Hst2p、Hst3p および Hst4p) (32) が、糸状菌は Classes I から III のサーチュインを有する (第一章 Fig. 1-1B)。*Aspergillus nidulans* の SirA や *Magnaporthe oryzae* の SirA ホモログは Class Ia に属し、*A. nidulans* の SirB (AN7461) および SirD (AN11873) は Class Ib、SirE は Class Ic、HstA は Class II、SirC (AN1782) は Class III にそれぞれ属する。

本章では前章で機能を解明した SirE と SirA 以外の、*A. nidulans* のサーチュインである SirB、SirC および SirD の機能解明を行った。本研究によって各サーチュイン遺伝子破壊株では A26 株と比較して二次代謝産物の生産量が増大することが明らかとなり、これらのサーチュインが SirA と同様に二次代謝に関与する遺伝子の発現を抑制すると考えられた。さらに、SirB と SirC の組換えタンパク質は NAD^+ 依存的なヒストン脱アセチル化活性を有したこと、各サーチュインをコードする遺伝子の遺伝子破壊株では A26 株と比較してヒストン H4 のアセチル化レベルが上昇したことから、SirB と SirC はヒストンの脱アセチル化を介して二次代謝に関与する遺伝子の発現を抑制し、その生産量を減少させると考えられた。遺伝子破壊によってヒストンのアセチル化レベルが特に上昇した *sirC* 遺伝子破壊株について、液体 PD 培地で培養した場合のトランスクリプトーム

を解析したところ、予想に反して二次代謝に関与する遺伝子群の発現を有意に制御していなかった。

3-2. 材料および方法

3-2-1. 使用菌株、培地、培養方法

使用菌株は *Aspergillus nidulans* A26 (*biA1*), A89 (*biA1*, *argB2*) (Fungal Genetic Stock center, University of Missouri)であった。培養方法は GMM の場合、第一章 1-2-1 に示した方法で行った。PD 培地 (ポテトデキストロースブロス 25 g/L) で培養する場合は、100 mL の培地を 500 mL 容の羽付きフラスコに入れ、各菌株の分生子を 1×10^8 個播種し、120 rpm、30 °C で培養した。培地には 0.25 mg L^{-1} biotin を加えた。

3-2-2. 二次代謝産物の生産量の比較

A26 株および 各サーチュインを液体 GMM、固体 GMM または液体 PD 培地で所定の時間培養し、以下の方法で解析を行った。使用機器は 1200 Infinity series instrument (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) であった。

3-2-2-1. A26 株および SirA Δ 株をニコチンアミド (NAM) を終濃度 100 μM 添加または未添加した液体 GMM 培地 100 mL に播種し、7 日間培養した。培養後濾過で菌体を回収し、速やかに液体窒素で凍結させ後凍結乾燥した。乾重量 30 mg を量り取り、800 μl クロロホルム中で 1 時間ボルテックスし、0.22 μm フィルターで濾過した。これを凍結乾燥し液体を完全に蒸発させ、沈殿物を 200 μl メタノールに溶解し、そのうち 10 μl を HPLC に供した。解析条件は以下のとおりである。使用カラム、KNETEX 2.6 μC_{18} 100A (75 x 3.00 mm) (Phenomenex); 流速、0.4 mL/min; カラム温度、40°C; 検出波長、254 nm; 展開溶液、A (0.05% ギ酸アンモニウム水溶液)、B (0.05% ギ酸アンモニウム入りアセトニトリル); 溶出条件、0-2 分 90% A、2-17 分 90% ~0% A、17-20 分: 0% A、20-23 分、0~90% A、23-27 分、90% A。

3-2-2-2. 固体 GMM で 7 日間培養した A26 株および 各サーチュイン遺伝子破壊株の培養物 30 cm² から (66) の方法に従って代謝物を抽出し、そのうち 10 μl を HPLC に供した。解析条件は以下のとおりである。使用カラム、250 x 4.6-mm Purospher® Star RP-18 end-capped column (particle size = 5 μm , Millipore, Billerica, MA, USA); 流速、0.8 mL min⁻¹; カラム温度、40°C; 検出波長、210 nm; 展開溶液、アセトニトリル (solvent B) および

0.05%酢酸アンモニウム水溶液 (pH 4.0) (solvent A); 溶出条件、0-5 分 40% B、5-10 分 40-80% B、10-15 分 80% B、15-25 分 80-100% B、25-27 分 100% B、27-29 分 100-60% B、29-35 分 60% B。質量スペクトルは第二章 2-2-3 に示した方法で測定した。

3-2-2-3. A26 株および SirC Δ 株を液体 GMM 培地および PD 培地で 5 日間培養し、第一章 1-2-10 に示した方法で解析した。

3-2-3. サーチュインの組換えタンパク質の作製と活性測定

サーチュインの塩基配列に制限酵素の認識配列を付加したプライマーを作製し、これを用いてサーチュイン遺伝子の全長を PCR によって増幅し、同じ制限酵素で切断した pET 21a(+)または pGEX-4T-3 に連結した。このプラスミドを *E. coli* BL21 (DE3) に導入して得られた形質転換体をアンピシリンナトリウム塩 (Amp) 100 mg mL⁻¹ を含む LB 培地 (LBA 培地) 5 mL で 30 °C、8 時間培養した。培養液を 200 mL の LBA 培地に移し、30 °C、120 rpm で 5 時間培養した。O.D600 が 0.6 になった時点で isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) を終濃度 0.4 mM となるように添加し、60 rpm で 12 時間培養した。培養後の菌体を遠心分離によって回収し、-80 °C で保存した。保存した菌体を氷上で融解し、20 mM リン酸バッファーまたは PBS バッファーに懸濁した後、超音波破碎した。破碎液を 100,000 x g で 5 分間遠心分離し、上清を His Trap TM crude カラムまたは GSTrapTM FT カラム (GE healthcare) に供し精製した。Table 3-1 に使用プライマーを示した。サーチュインの活性測定は (5) に示された方法に従って行った。使用したタンパク量はそれぞれ 4 mg ずつとした。活性が低い場合はタンパク質の量を 5~10 倍にして活性を測定し、タンパク量 4 mg あたりの活性を算出した。また、ニコチンアミド (NAM) は終濃度 50 mM になるように加えた。

3-2-4. *sirB*、*sirC*、*sirD* 遺伝子破壊株の作製

各サーチュイン遺伝子の 5'-および 3'-非転写領域および *argB* 遺伝子の DNA 断片を *A. nidulans* A26 株のゲノム DNA を鋳型として、Prime star HS DNA polymerase (Takara, Kyoto, Japan)を用いて PCR 法により増幅させた。この 3つの DNA 断片を KOD plus DNA polymerase (Toyobo, Tokyo, Japan) を用いた PCR 法を用いて融合させた。Table 3-1 に使用プライマーを示した。UltraClean 15 DNA Purification Kits (MO BIO Laboratories, Carlsbad, CA, USA)を用いて DNA カセットを生成後、(22) に示された方法で *A. nidulans* A89 株に導入した。これらの株をそれぞれ SirB Δ 株、SirC Δ 株、および SirD Δ 株とした。

3-2-5. 蛍光顕微鏡観察

gpdA 遺伝子プロモーター、*sirC* 遺伝子、*egfp* 遺伝子を Table 3-1 に示したプライマーを用いた PCR 法により増幅させ、さらに PCR 法によって融合させた。このカセットを *XbaI* と *NotI* を用いて制限酵素処理し、同様に処理をした pBSpyrG (22) (*pyrG* 遺伝子の配列を有する) に導入した。このプラスミドを pSirC-gfp と名付けた。これを ABPUN と SirCΔを交配し作製した株に導入し、SirC-GFP 株を構築した。観察は第一章 1-2-1 に示した方法で行った。

3-2-6. 定量リアルタイム PCR

第一章 1-2-4 に示した方法で行った。

3-2-7. ウェスタンブロッティング

第一章 1-2-5 に示した方法で行った。

3-2-8. RNA シーケンシング解析

Aspergillus nidulans A26 株と SirCΔ株を液体 PD 培地で20時間培養した後、菌体をフィルター濾過で回収した。以下は第一章 1-2-8 に示した方法で行った。RNA シーケンシングデータは GenBank の NCBI BioProject (PRJNA355963) に登録した。

3-3. 結果

3-3-1. サーチュイン様タンパク質の配列の比較

第一章 1-3-1 で述べたように *A. nidulans* の 6 つのサーチュイン様タンパク質 (SirA、SirB、SirC、SirD、SirE、HstA) は NAD⁺結合サイト、ジンクフィンガーモチーフ、真核および原核生物のサーチュイン全てに共通して見られる His-Gly 残基が含まれる約 275 残基のサーチュインホモロジードメインを有しており、サーチュインである可能性が高いと考えられた (Fig. 1-1A および C)。アミノ酸の配列から、SirB 以外は nuclear localization signals (NLS)を有することが判明した (Fig. 1-1C)。SirC と SirD には pat4-と pat7-タイプの NLS が存在した (Fig. 1-1C)。これらの結果から、SirC と SirD は核内で機能するサーチュインであると予測された。

3-3-2. サーチュイン遺伝子破壊株の表現型

各サーチュイン遺伝子の遺伝子破壊株 (SirB Δ 株、SirC Δ 株および SirD Δ 株) を作製し、A26 株、SirA Δ 株、SirE Δ 株と固体培養時の表現型を比較した (Fig.3-1)。その結果、SirE Δ において分生子の着生数が減少したこと (第一章 Fig.1-6A および B) 以外では目立った変化は見られなかった。このことから、SirE 以外は分生子形成の制御系に、少なくとも表現型として顕著に現れるほどには、関与していないと考えられた。

3-3-3. サーチュイン遺伝子破壊株の二次代謝産物

糸状菌を培養する際、サーチュイン阻害剤であるニコチンアミド (NAM) を添加すると二次代謝産物の生産量が上昇するという報告がある (67, 68)。これと一致して、NAM を添加した液体 GMM で A26 株を培養したところ、ステリグマトシスチンの生合成量が増大した (Fig.3-2)。また、SirA Δ 株においても NAM の添加によるステリグマトシスチンの生産量の上昇が生じた (Fig. 3-2) ことから、SirA 以外のサーチュインもステリグマトシスチンやその他の二次代謝に関与する遺伝子の発現を抑制する機能があると予想された。

固体 GMM に各サーチュイン遺伝子破壊株を播種し、培養 7 日後の代謝産物を HPLC を用いて解析したところ、A26 株と各サーチュイン遺伝子破壊株間で得られたピークの強度に差が見られた (Fig. 3-3)。LC-MS で解析したところ、SirE を除く全てのサーチュイン遺伝子破壊株において A26 株よりも生産量が多かったのは、オースチノール (AUS)、デヒドロオースチノール (DAUS) およびステリグマトシスチン (ST) であった。また、未同定の化合物 A および B の生産量も増加していた。A26 株と比較して化合物 A の生産量が増大したのは SirA Δ 株および SirD Δ 株であり、化合物 B は全てのサーチュイン遺伝子破壊株において増大していた。固体 GMM で培養したときの各サーチュイン遺伝子破壊株における AUS、DAUS および ST の生合成遺伝子の発現を検証した (Fig. 3-4A)。AUS と DAUS の生合成遺伝子である *ausA* 遺伝子の発現量は、A26 株と比べ、SirA Δ 株で 1.8 倍増加することは第二章 2-3-4 で示した (Fig. 2-4)。また、SirE Δ 株で 2.3 倍上昇していたが、他のサーチュイン遺伝子破壊株では A26 株と比べその遺伝子の発現量に有意な差は見られなかった (Fig. 3-4A)。AUS の生産量と遺伝子発現の増減が SirA 以外で一致しないのは、SirE Δ 株に関しては生産された AUS が他の化合物に変換され減少した可能性が考えられる。また SirB Δ 株、SirC Δ 株および SirD Δ 株に関しては、*ausA* 遺伝子の

発現が上昇するタイミングにある菌体を定量リアルタイム PCR に用いていない可能性が考えられるので、生産量と遺伝子発現を経時的に測定することによって、AUS および DAUS の生産量と生合成遺伝子の発現量の矛盾の有無を考察できるだろう。一方、ST の生合成遺伝子である *aflR*、*stcJ* および *stcU* 遺伝子の発現量は A26 株と比べそれぞれ SirA Δ 株で 2.4~6.2 倍、SirB Δ 株で 0.8~2.2 倍、SirC Δ 株で 1.6~11.6 倍、SirD Δ 株で 2.4~8.6 倍、SirE Δ 株で 1.1~6.3 倍上昇していた(Fig. 3-4 B~D)。これら結果から、これまで判明していた SirA が ST と AUS および DAUS の生合成を転写レベルで抑制するというに加えて、SirB、SirC、SirD もこれらの生合成遺伝子の発現と代謝物の生合成を抑制することが明らかとなった。

第一章 1-6 では、液体 GMM で培養した場合、SirE は ST の生合成遺伝子の発現と生産量を増加させることが示された (Table 1-4 および Fig. 1-7)。このことから、SirE は ST の生合成遺伝子群の発現に対して、液体培養時と固体培養時に反対方向の制御を行うことが示された。即ち、SirE は液体培養時にこれらの生合成遺伝子の発現を増加させ、固体培養時には抑制すると考えられた。これは第二章で述べた SirA が、液体培養時には AUS と DASU の生合成遺伝子クラスターに含まれる遺伝子の発現を増加させ、固体培養には抑制するという結果と類似している。糸状菌のサーチュインは培養条件に応答して標的に対する制御を変化される可能性が考えられる。

3-3-4. サーチュイン様タンパク質の組換え体の活性測定

ヒスチジンが 6 つ連なったヒスチジンタグ (-His)、またはグルタチオン *S*-トランスフェラーゼ (GST-) を付加したサーチュインの組換えタンパク質 SirB-His、SirC-His、GST-SirD、および GST-SirE を作製および精製し、各サーチュインの組換え酵素が有するヒストンのリジン残基に対する NAD⁺ 依存的な脱アセチル化活性を測定した (Fig. 3-5)。その結果、全てのサーチュイン様タンパク質がこの活性を有することが示された。この活性はサーチュインによって異なる強さであった。SirB はヒト SIRT1 や *A. nidulans* SirA と同等の活性を有した。SirC の活性はそれらの 10 分の 1 以下であり、SirD や SirE の活性は 100 分の 1 以下であった。また、これらの活性は、既知のサーチュインと同様に、NAD⁺ を添加しない時やサーチュインの阻害剤であるニコチンアミド (NAM) を添加した時に減少した。これらの結果から、SirA から SirE がサーチュイン活性を有することが示された。特に、活性の強かった SirB と SirC が NAD⁺ 依存的にヒストンのリジン残基を脱アセチル化すると考えられた。

3-3-5. サーチェイン遺伝子破壊株のヒストンアセチル化レベル

組換え酵素のサーチェイン活性を確認できた SirA、SirB および SirC の *in vivo* でのヒストン脱アセチル化活性を検証するため、ウェスタンブロッティング解析により、液体 GMM で培養した A26 株、SirA Δ 株、SirB Δ 株および SirC Δ 株のアセチル化ヒストンを定量した (Fig 3-6)。培養開始後 48 時間後では、A26 株に比べて SirC Δ 株の 16 番目のリジン残基がアセチル化されたヒストン H4 (H4K16ac) および 4 つのリジン残基がアセチル化されたヒストン H4 (H4tetraKac) のシグナル強度がそれぞれ 3.2 倍および 1.3 倍に増加していた (Fig 3-6A)。しかし、SirA Δ 株および SirB Δ 株では A26 株のアセチル化ヒストンのシグナルの強度と有意な差は見られなかった。一方、培養開始後 72 時間では、A26 株に比べて SirA Δ 株、SirB Δ 株および SirC Δ 株で H4K16ac のシグナル強度がそれぞれ 1.6 倍、1.8 倍および 2.5 倍増加していた (Fig 3-6B)。一方、H4tetraKac のシグナル強度が増加したのは SirA Δ 株と SirC Δ 株であったが、この増強の程度は H4K16ac のそれよりも小さかった。この結果から、SirA、SirB、SirC は H4K16 の脱アセチル化に関与することが示された。これまで SirA によるヒストンの脱アセチル化は培養開始後 72 時間 (培養後期) の菌体でのみ検証されていたが (5)、培養開始後 48 時間 (定常期) の菌体では 72 時間のそれよりも SirA による脱アセチル化の影響が弱いと考えられた。SirB も同様の働きを有すると考えられた。一方、SirC は定常期から培養後期に渡ってヒストンの脱アセチル化に関与すると考えられた。この結果は、第一章で述べたように、サーチェインによって脱アセチル化を行うタイミングや標的になるヒストン残基が異なるという説を支持するものであった。

3-3-6. SirC の細胞内局在

前述の研究によって、NLS を有し、サーチェイン活性を示し、定常期から培養後期にかけてヒストンの脱アセチル化に関与する SirC に注目することとした。SirC と GFP が融合したタンパク質 (SirC-GFP) を *gpdA* 遺伝子プロモーター下で発現する SirC-GFP 株を作製し、蛍光顕微鏡下で観察した。この SirC-GFP は培養開始後 15 時間では DAPI によって染色された核と同じ位置に局在したが、同 17 時間では細胞質全体に存在した (Fig. 3-7)。このことから、SirC は生育フェーズによって核と細胞質を移行することが示された。前述のように、SirC Δ 株では A26 株に比べヒストン H4K16 のアセチル化レベルが上昇することから、SirC は核に移行しヒストンの脱アセチル化を行うと予想された。

第一章では、培養開始後 24 時間に SirE と SirA が核に局在することが判明していることから、サーチュインは培養時間や培地中のグルコースの存在量によって核へ誘導されるタイミングが異なる可能性が考えられた。これを検証するには、異なる培養時間やグルコース含有量の培地で培養した場合の各サーチュインの局在を観察する必要がある。

3-3-7. SirCΔのトランスクリプトーム解析

SirC が二次代謝系遺伝子の発現を制御するという仮説のもと、A26 株に比べ SirCΔ株で ST の生合成遺伝子の発現量が上昇する PD 液体培地での培養開始後 20 時間後 (Fig. 3-4B) の A26 株と SirCΔ株の全 RNA の RNA-seq を行い、SirC の制御下にある遺伝子を同定した。A. nidulans のゲノム塩基対の 12 倍に相当する RNA の配列を決定し、得られた全配列の 63% ~ 69 %を参考配列 (A. nidulans FGSC A4 株のゲノム DNA 配列、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>) に対してマッピングした (Tables 3-2 および 3-3)。A26 株と SirEΔ株のトランスクリプトームを fragments per kilobase of exon region per million mapped reads (FPKM) を指標として比較した。全遺伝子の 79%にあたる 8,627 遺伝子が検出され (Table S3-1)、SirCΔ株で A26 株に比べ、35 遺伝子の発現が 2 倍以上上昇し、10 遺伝子の発現が 2 倍以上減少することが示された (Probability ≥ 0.8 , Table S3-2)。

A26 株に比べ SirCΔ株で 2 倍以上発現量が上昇した 35 遺伝子に対し AspGD database (<http://www.aspgd.org/>) のアノテーションを用いた Gene ontology (GO) 解析を行ったところ、“Biological Process” カテゴリーのうち、有意な数の遺伝子が ‘aldonic acid metabolic process’ に属した (Table 3-4、 $P = 0.001421$)。これにはグルコン酸やガラクトン酸の代謝に関与する遺伝子が含まれていたことから、SirC は炭素代謝の一部を抑制すると考えられた。“Molecular function” カテゴリーでは、Table 3-4 に示した GO term が濃縮されていた ($P < 0.01$)。主に輸送体に関連する GO term が濃縮していたが、特定の代謝経路に集中してはいなかった。また、A26 株に比べ SirCΔ株で 2 倍以上発現量が減少した 10 遺伝子に対し同様の解析を行ったが、有意に濃縮された GO term はなかった。この結果から、SirC は PD 培地で 20 時間培養するという条件下では、二次代謝系遺伝子を有意に制御する因子ではないと示された。

3-4. 考察

本章では A. nidulans が有する 6 つのサーチュインのうち、SirB、SirC、SirD の機能を

解明した。アミノ酸配列の比較によって、全てのサーチュイン様タンパク質がサーチュイン活性ドメインを有することが判明したが、このうち SirB は NLS を有さなかった。これは、SirB がリジンを脱アセチル化する機能を有するが、その標的が核タンパク質以外である可能性を示している。しかし、SirB Δ 株ではヒストン H4 のアセチル化レベルが上昇し、かつ、他の NLS を有するサーチュインと同様に二次代謝産物の生産量に変化をもたらしている。この矛盾は、SirB が未同定の NLS を有することが原因である可能性がある。実際、P-Sort (<http://www.genscript.com/psort.html>)を使用した核または細胞質のいずれかにある傾向を識別するスコア NNCN (69) では、SirB が核に局在する確率は 69.6 % と計算されることから、SirB は未知の NLS を有し、核に局在するか、または細胞質と核の両方に存在し、H4K16ac を脱アセチル化することによって二次代謝産物の生産を抑制する可能性もあると考えられた。SirB のヒトのホモログである SIRT2 は NLS を持たないが核に局在し (70)、ヒストン H4K16ac を脱アセチル化することが知られている (71)。また、*S. cerevisiae* が有する SirB のホモログである Hst2p は NLS を持たず大半が細胞質に存在するが、一部が核に局在し (72)、ヒストン H3K9ac と H4K16ac を脱アセチル化することが報告されている (73)。これらのことから、SirB も核に局在しヒストンの脱アセチル化を行う可能性は十分に考えられる。この仮説を検証するためには、SirB に蛍光タンパク質を融合させたタンパク質を生産する株を用いて、蛍光顕微鏡で観察する必要がある。

SirC は NLS を有し、核に局在し、ヒストン H4K16ac を脱アセチル化し、固体 GMM 培地で培養した場合に二次代謝産物の生産を抑制することが判明した。SirC が二次代謝系遺伝子のプロモーター領域のヒストンを脱アセチル化するかについては、今後、SirC やアセチル化ヒストンに対する ChIP アッセイを行うことで明らかとなるだろう。一方、PD 培地中で培養した場合、SirC は ST 生合成遺伝子の発現を抑制することが示されたが、トランスクリプトーム解析の結果では、SirC が二次代謝系遺伝子群を発現抑制するという結果は得られなかった。このことから、SirC は SirA とは異なり、二次代謝全体ではなく ST のみの発現制御に関与すると考えられた。また、SirA や SirE をコードする遺伝子の破壊によって発現が 2 倍以上変化する遺伝子は約 1500-2000 あったが、それに比べ、SirC の制御下にある遺伝子数は 45 と少なかった。このことから、SirC の制御は狭い範囲の遺伝子にのみ及ぶか、もしくは、PD 培地で培養するとサーチュインによる遺伝子発現の制御が小規模になる可能性が考えられた。培養条件が異なるため、SirA、SirE と SirC の制御下にある遺伝子群の比較は一概にはできない。この比較のためには、同

じ培養条件を用いたトランスクリプトーム解析が必要である。

本章の研究によって、**SirB**、**SirC** および **SirD** が二次代謝産物の生産を抑制することが判明した。**SirD** については、細胞内の局在やヒストンの脱アセチル化活性などが不明のままであり、今後明らかになることが期待される。しかしながら、いずれのサーチュインアイソザイムも二次代謝系の発現抑制に関与するという結果は、**SirA** だけでなくこれら 3 つのサーチュインも二次代謝を人為的に増強するための標的となりうることを意味する。例えば、サーチュインアイソザイムによってこれらの活性を阻害する効果をもつ化合物が異なると予想される。このため、これら 3 つのサーチュインの阻害剤の開発を行うことによって、サーチュインによって休眠状態となっている二次代謝系遺伝子の活性を増大させ、新規な有用物質の取得、さらには医薬品や食品の開発といった産業に役立つだろう。

Table 3-1. Primers used in this study.

Primer	Nucleotide sequence
AN1782+1300 rv	5'-CGTACGCAAGCCATTTGTTA-3'
AN1782 -1000fw	5'-CGATGAGCCTCTTGACTGCT-3'
AN1782+1000 rv	5'-TTCGTGAGGAGGAAGTGTC-3'
AN1782 -15 arg atama rv	5'-AAAACCGCGAAATAAAGCTTGGGTGAGTAGGAGGTGGTGA-3'
AN1782 +30 usiro fw	5'-CGCAATGGCTGTAGGTGACATGTTGGTAGGTTGGATTGA-3'
AN7461 -1200 fw	5'-TGACAGACATATCGCCCGTA-3'
AN7461 +1200 rv	5'-CTTTGGACGGAGCTGTCACT-3'
AN7461 -1000 fw	5'-TTATCAAACCTCGCGCAGAAA-3'
AN7461 +1000 rv	5'-CATGGAGAGGAAATCCGAAA-3'
AN7461+30 arg usiro fw	5'-CGCAATGGCTGTAGGTGACGCGTTGAGGATTCGGTGTTC-3'
AN7461 -15 arg atama rv	5'-AAAACCGCGAAATAAAGCTTGATGATCGCCTGTATGACGT-3'
AN11873 -1200 fw	5'-GCTCGATAACCCCAATGCTA-3'
AN11873 +1200 rv	5'-ACTCAACGTGATGCTGATGG-3'
AN11873 -1000 fw	5'-AACGCTTCTGGGCTGTAGAA-3'
AN11873 +1000 rv	5'-TTTGATGTGGAGAGCACGAG-3'
AN11873 -50 arg atama rv	5'-AAAACCGCGAAATAAAGCTTCAACGTAGACGGGGAGACAT-3'
AN11873 +30 arg usiro fw	5'-CGCAATGGCTGTAGGTGACTTCGACTGCGTGCCTTCTAG-3'
pyroA maker Fw	5'-CTGCAGAAGTGCGCGAAAGC-3'
pyroA maker Rv	5'-GGATCCAGGAGTATACGGGT-3'
argB maker fw	5'-AAGCTTTATTTTCGCGTTTT-3'
argB maker rv	5'-GTCGACCTACAGCCATTGCG-3'
AN1226 EcoR fw pet21	5'-CCGAATTCATGGCACCTCGCAAACCAA-3'
An1226 rv sac1 pet21	5'-GCGCGAGCTCttATCAAGCAACTTGCCCATTC-3'
AN1782 EcoR fw pet21	5'-GCGAATTCATGGTCTCTAACGACATCAA-3'
AN1782 Sac1 rv pet21	5'-GCGCGAGCTCttGACTTCCCCAGTGACGCTTT-3'
AN7461 EcoR fw pet21	5'-CGGAATTCATGGGCAATGAATCGTCTAC-3'
AN7461 sac1 rv pet21	5'-GCGCGAGCTCttACGACGAGCAAGGTGCGGGA-3'
AN11873 EcoR fw pet21	5'-GCGAATTCATGTCTCTCTTCGAGCCCA-3'
AN11873 sac1 rv pet21	5'-CGCGGAGCTCttTGCCCCCTCTTTGCCATAA-3'
AN1226 EcoR rv gst	5'-GCGAATTCATCAAGCAACTTGCCCATTC-3'
AN1226 Bam Fw gst	5'-GCGGATCCATGGCACCTCGCAAACCAA-3'
AN11873 BamH Fw pGEX-4T-3	5'-GCGGATCCATGTCTCTCTTCGAGCCCA-3'
AN11873 EcoR Rv pGEX-4T-3	5'-GCGAATTCCTTGCCCCCTCTTTGCCATAA-3'

Table 3-2. Summary of mRNA sequencing experiments.

Experiment	Sample	Total reads	Total bases
1	WT	7,449,253	365,013,397
1	SirC Δ	7,448,244	364,963,956
2	WT	7,449,253	365,013,397
2	SirC Δ	7,448,244	364,963,956

Table 3-3 Alignment statistics of reads aligned to the reference genome and the genes.

Sample	Total mapped reads (%)	Perfect match (%)	Mismatch (%)	Unique match (%)	Multi-position match (%)	Total unmapped reads (%)
Genome						
WT-1	88.42	81.47	6.95	87.92	0.5	11.58
SirCΔ-1	89.08	82.16	6.92	88.54	0.54	10.92
WT-2	87.33	78.08	9.26	86.8	0.53	12.67
SirCΔ-2	87.42	77.72	9.7	86.87	0.55	12.58
Gene						
WT-1	69.09	64.36	4.73	68.82	0.27	30.91
SirCΔ-1	68.82	64.06	4.76	68.54	0.28	31.18
WT-2	64.36	58.01	6.34	64.08	0.28	35.64
SirCΔ-2	63.93	57.35	6.58	63.65	0.28	36.07

Table 3-4. Gene ontology terms enriched among regulated genes in SirCΔ.

GO ID	GO term	Cluster frequency (%)*	Gene number / total gene number†	P value
<i>Up-regulated genes in SirCΔ (300 genes)</i>				
<i>Biological process</i>				
9520	Aldonic acid metabolic process	8.6	3/20	0.0142
<i>Molecular function</i>				
51700	Fructosyl-amino acid oxidase activity	5.7	2/2	0.0033
5215	Transporter activity	25.7	9/493	0.0047
22892	Substrate-specific transporter activity	22.9	8/413	0.0102
16788	Hydrolase activity, acting on ester bonds	20.0	7/310	0.0133
22857	Transmembrane transporter activity	22.9	8/442	0.0167
16647	Oxidoreductase activity, acting on the CH-NH group of donors, oxygen as acceptor	5.7	2/5	0.0332
22891	Substrate-specific transmembrane transporter activity	20.0	7/377	0.0459
5342	Organic acid transmembrane transporter activity	8.6	3/43	0.1105

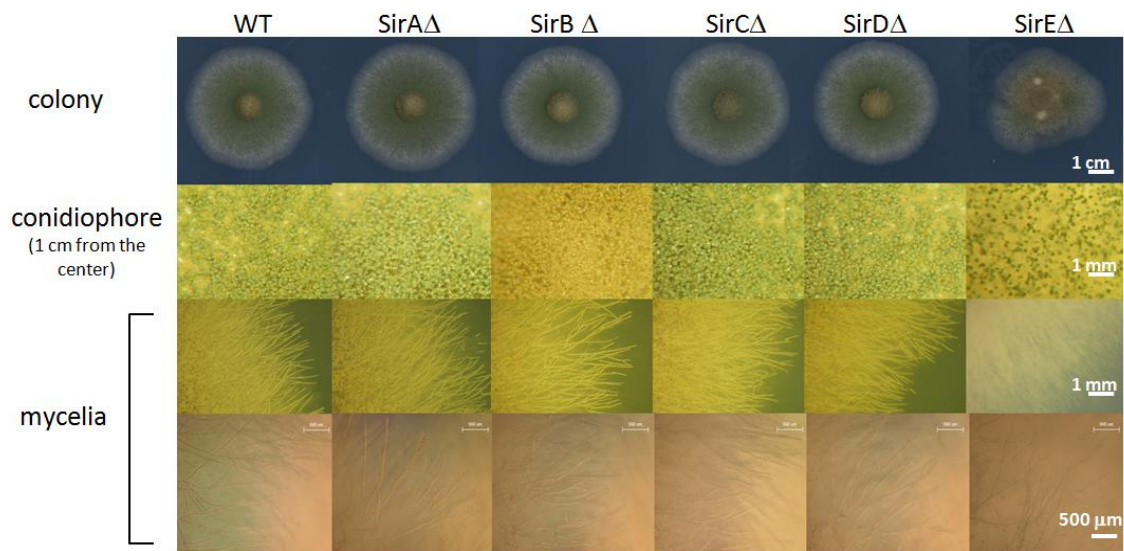


FIGURE 3-1. Morphology of the siruin gene disruptants

Colonies of the *A. nidulans* A26, SirA Δ , SirB Δ , SirC Δ , SirD Δ , and SirE Δ strains.

The strains were cultured in soild GMM for 3 days at 37⁰C.

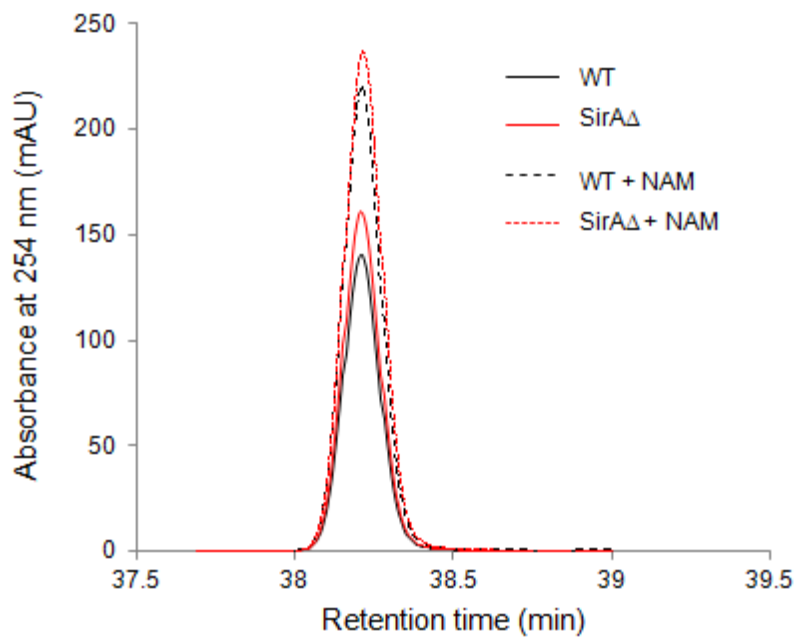


FIGURE 3-2. Sterigmatocystin production by A26 (WT) and SirAΔ strains. The strains were cultured in GMM with or without 100 μM nicotinamide (NAM) for 7 days at 30 °C and their mycelial extracts obtained.

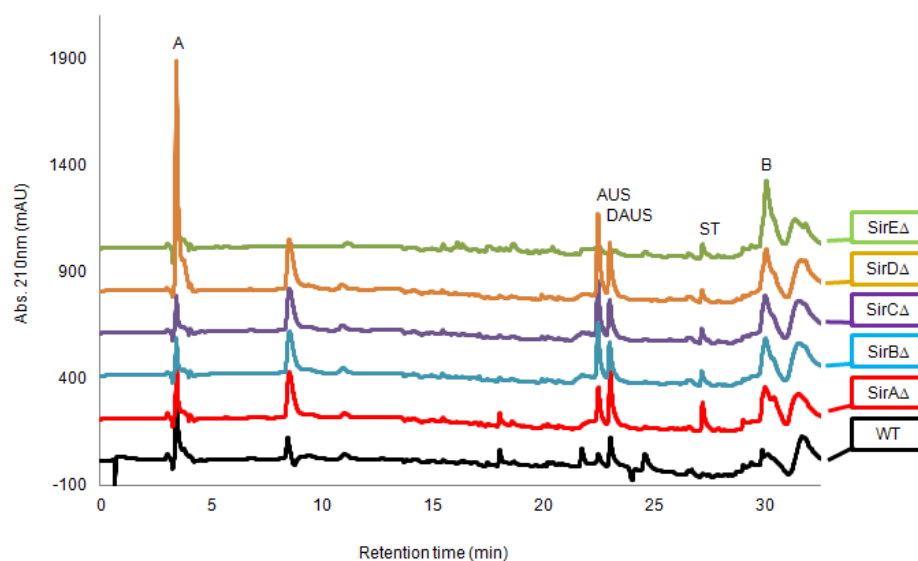


FIGURE 3-3. Amounts of SM produced by *A. nidulans* determined by HPLC.

Extracts of *A. nidulans* A26 (WT), SirA Δ , SirB Δ , SirC Δ , SirD Δ , and SirE Δ strains cultured in solid GMM for seven days. Product A-D is unknown compounds. AUS, austinol; DAUS, dehydroaustinol; ST, Sterigmatocystin. The Table means that production of each compound by each gene disruptions were more (upward arrow) or less (down arrow) that A26 strain.

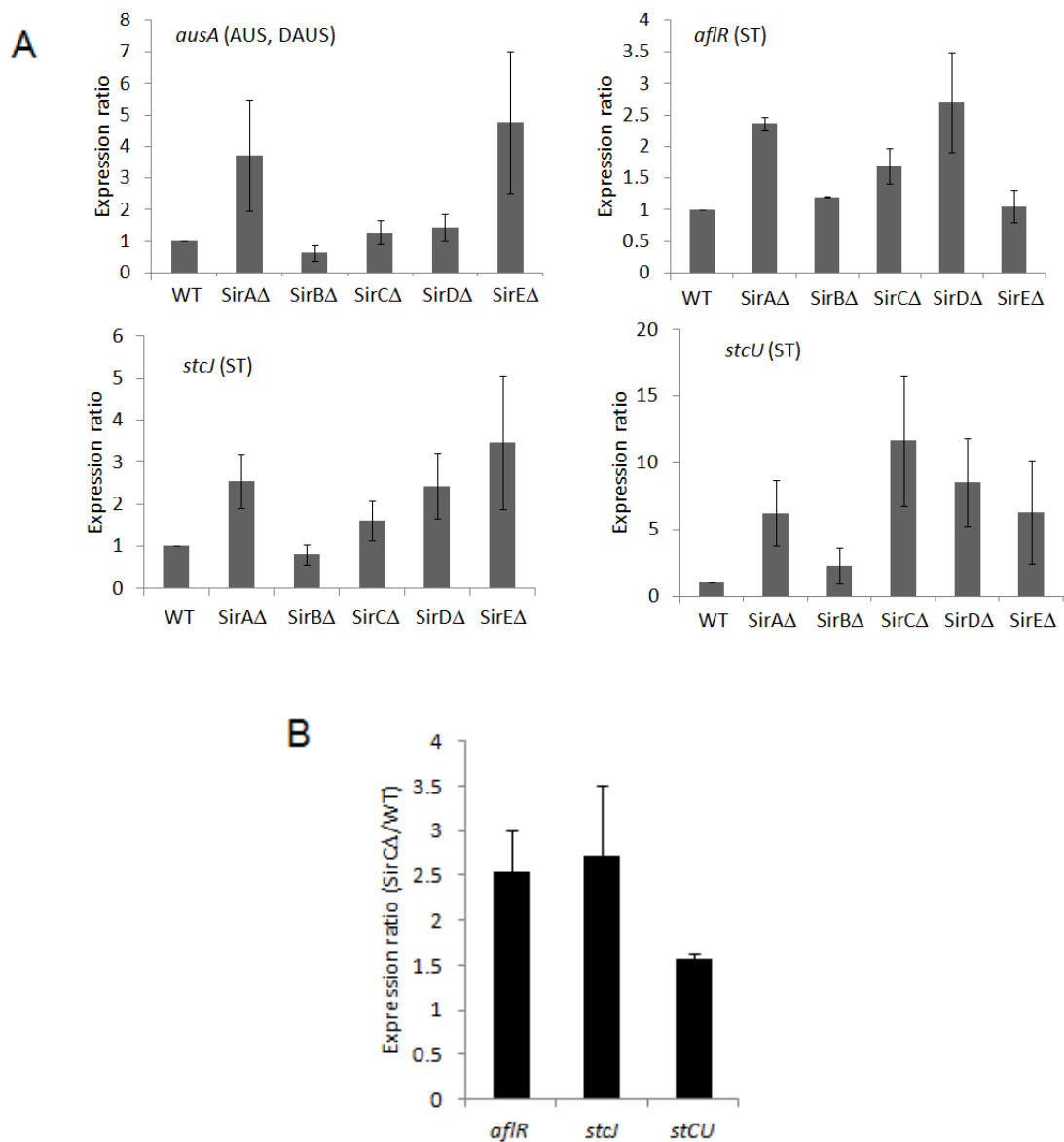


FIGURE 3-4. Amounts of transcripts of genes for producing sterigmatocystin, austinol and dehydroaustinol of sirtuin disruptants determine by real-time PCR.

(A) A26 and sirtuin disruptants were cultured in solid GMM medium for 24 h. Values are relative to those of A26. *ausA*, gene for synthesizing austinol and dehydroaustinol; *aflR*, regulatory gene in cluster for synthesizing sterigmatocystin; *stcJ* and *stcU*, genes involved in sterigmatocystin synthesis. (B) SirC Δ and A26 were cultured in liquid PD medium for 20 h. Values are relative to those of A26. Data are presented as means \pm standard error of three experiments.

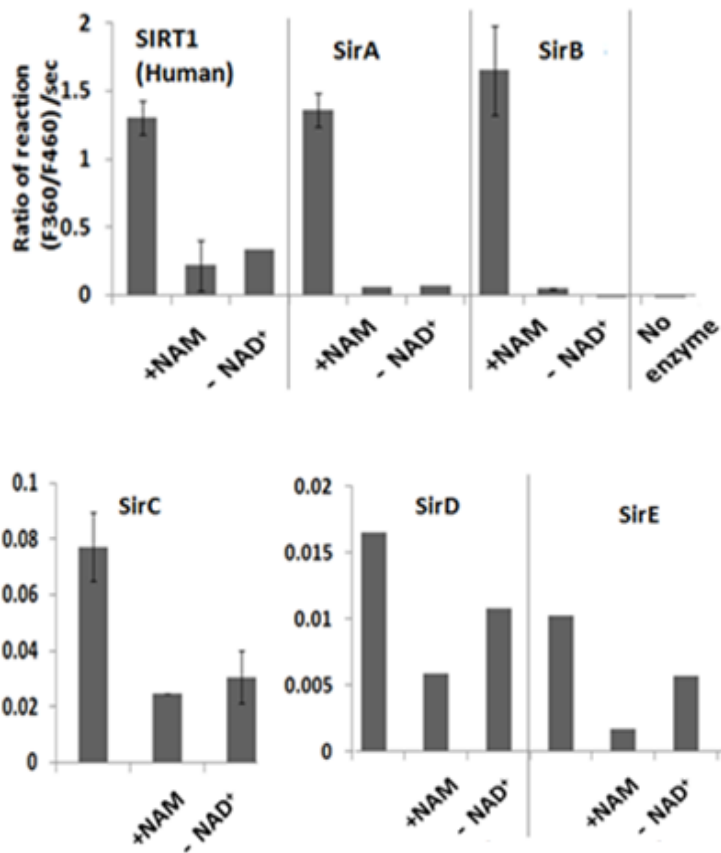


FIGURE 3-5. Sirtuin activity assay

NAD⁺-dependent HDAC activity of recombinant SirA, SirB, SirC, SirD, and SirE with (+NAM) or without 50 mM nicotinamide. Reactions proceeded with NAD⁺ (200 μM), and recombinant sirtuins (4 mg each). Data are means of three experiments. Error bars indicate standard deviations.

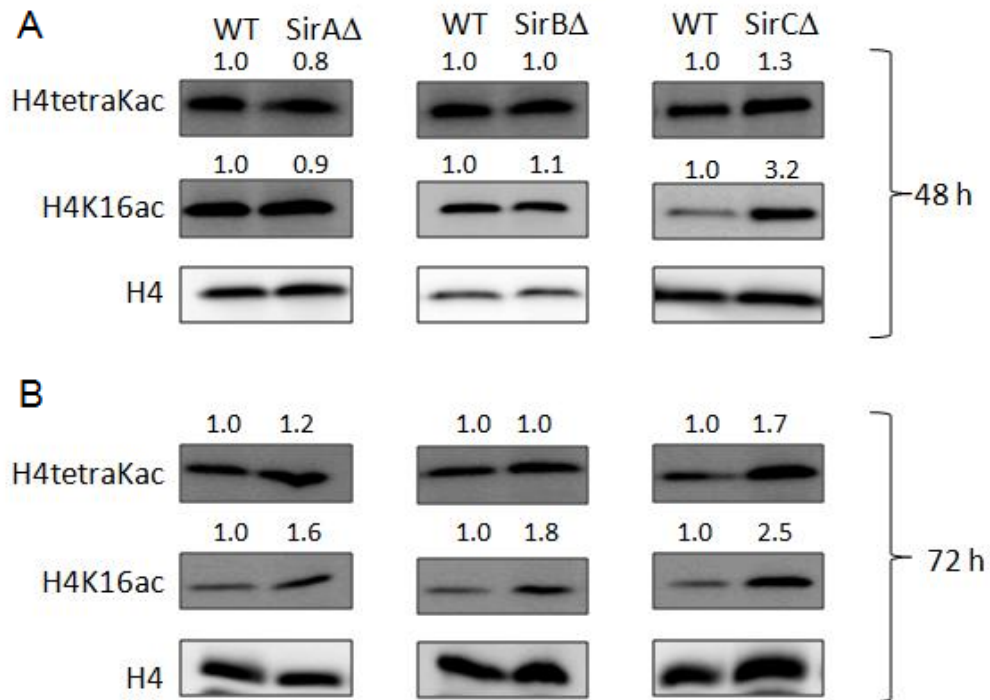


FIGURE 3-6. Acetylation level of histons in sirtuin disruptants.

Western blots of *A. nidulans* nuclear extracts. *A. nidulans* A26 (WT), SirA Δ , SirB Δ and SirC Δ were cultured for 48 and 72 h, and their nuclear extracts (20 μ g) were separated by SDS-PAGE. Left, antibodies that detected signals. Relative signal intensity is shown above panels.

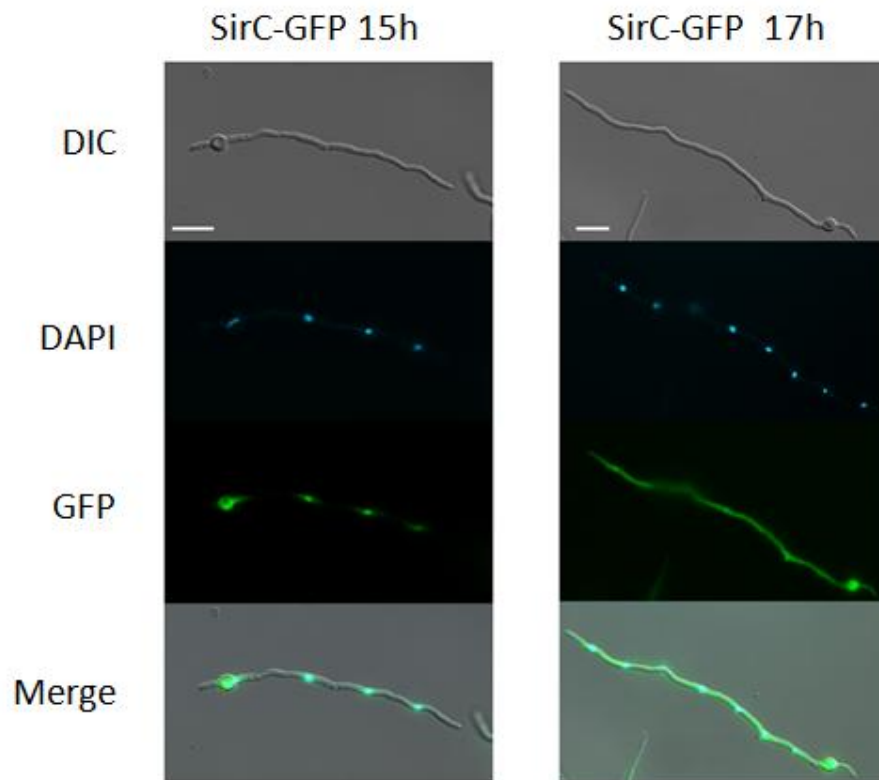


FIGURE 3-7. Fluorescence microscopy of *A. nidulans* producing GFP and SirC fusion proteins.

Nuclei are stained with DAPI. Bars, 10 μm .

総括

本研究では *A. nidulans* のサーチュインによる遺伝子発現や代謝調節について解明することを目指した。

第一章では、SirE の機能解析を行い、*sirE* 遺伝子が定常期に発現し、SirE は核に局在することを見出した。また、SirE が定常期にヒストン H3 の 9、18、56 番目のリジン残基の脱アセチル化をすることが示された。特に、ヒストン H3 の 9 番目のリジン残基に対する活性によって、一次代謝に関与する遺伝子のプロモーター領域のヒストンを脱アセチル化し、定常期に一次代謝遺伝子の発現を抑制することを示した。一方、*sirE* の遺伝子破壊によって、自己溶菌、孢子形成、ステリグマトシスチンの生合成、菌体外加水分解酵素の活性が抑制されたことから、SirE は定常期に行われるこれらの代謝を増強する機能があると考えられた。SirE がこれらの遺伝子の発現を促進させる機構は不明であるが、SirE の制御下にある遺伝子群はグルコース飢餓に応答して発現量が増加する遺伝子群と有意に重複していたことから、転写因子である CreA や CreA の分解機構や活性化機構と関係があると予想された。この章の結果から、SirE は一次代謝から定常期の代謝への移行を制御する新たな転写制御因子であることが示された。

第二章では、SirA が二次代謝に与える影響を網羅的に解析した。*sirA* 遺伝子は定常期から培養後期にかけて発現誘導され、この時、二次代謝関連遺伝子を有意に発現抑制することが示された。さらに、SirA は、ステリグマトシスチン、オースチノールおよびデヒドロオースチノールの生産量を液体・固体培養のいずれの場合においても制御することが明らかとなった。特にオースチノールとデヒドロオースチノールの生産量と生合成遺伝子の発現量は、液体培養時には SirA によって増大され、固体培養時には抑制されたことから、SirA が培養条件に応答して制御を変化させることが明らかになった。さらに、SirA Δ 株、SirE Δ 株および A26 株のトランスクリプトームを比較したところ、SirA

は二次代謝産物であるステリグマトシスチンとエメリセラミドの生合成、菌体外加水分解酵素に関連する遺伝子群の発現を抑制したが、SirE はそれらの発現量を増強した。また、SirA は二次代謝産物であるオルシノールの生合成、炭素代謝および細胞壁の合成に関連する遺伝子群の発現を上昇させたが、SirE はこれらの発現を抑制した。このことから、両サーチュインは一部の遺伝子を共通の標的とし、反対方向の制御を行い遺伝子発現と代謝のバランスを調節すると考えられた。

第三章では、*A. nidulans* のサーチュインである SirB、SirC、SirD の二次代謝に与える影響を検証した。これらは全てサーチュイン活性ドメインを有し、SirB 以外は核移行シグナルを有した。これら 3 つのサーチュインをコードする遺伝子の遺伝子破壊株を固体 GMM で培養すると、A26 株と比較してステリグマトシスチン、オースチノールおよびデヒドロオースチノールを多く生産したことから、これらも SirA と同様に二次代謝の抑制因子であると考えられた。また、SirA の他に、SirB と SirC が脱アセチル化活性を有することが新たに判明し、この 2 つのサーチュインは *in vivo* でヒストン H4 の 16 番目のリジン残基の脱アセチル化に関与することが示された。さらに、SirC が核に局在したことから、特に SirC が核内でヒストンの脱アセチル化を行うと考えられた。しかし、PD 培地で培養した SirC Δ 株のトランスクリプトーム解析を行ったところ、二次代謝系遺伝子の発現は有意に変化しておらず、SirC の制御下にある遺伝子数が GMM で培養した菌体の SirA や SirE のその 50 分の 1 程度であったことから、SirC は他のサーチュインアイソザイムと比較して少数の遺伝子を発現制御することが明らかとなった。

本研究で各サーチュイン候補タンパク質のサーチュイン活性を測定した際、SirC、SirD および SirE の活性が SirA や SirB に比べ 10 分の 1 から 100 分の 1 程度の強度であることが示された。SirC のアイソザイムであるヒト SIRT5 の脱アセチル化活性がヒト SIRT1 よりも低いことが知られており、これはヒトと本菌に共通の特徴だと考えられた (65)。しかし、SirD や SirE についてはそのホモログである SIRT6 および SIRT7 にその

ような知見はない。このことから、SirD および SirE の活性が SirA の 100 分の 1 程度であったのは、以下の 2 つの理由が考えられた。即ち、本実験で用いた基質が酵母の Sir2p やヒトの SIRT1 などのヒストン H4K16 を標的とするサーチュインの酵素活性用であったため、別のヒストン残基を標的とする SirD や SirE の活性が正確に測定できなかった可能性と、GST タグの負荷による立体構造の変化による影響の可能性である。後者の場合は組換え酵素を精製後にペプチドタグを切断することによってタグが付加していない組換え酵素の活性を測定できるだろう。前者の仮説は、様々なアセチル化ヒストンの配列を模したペプチドを合成し、それを基質として脱アセチル化されたペプチドの割合を LC-MS などによって測定することによって活性を算出することで検証できるだろう。また、この仮説は *A. niduans* のサーチュインが異なるヒストン残基を標的とするという本研究の主張と一致するものである。

第三章で行った SirA と SirE は *in vitro* で示す活性の強度が異なるという結果、さらに、第一章と第三章の SirA、SirE および SirC の細胞内の局在の観察結果から、サーチュインは互いの活性を物理的に阻害する可能性が考えられた。例えば、SirA はヒストン H4K16 を脱アセチル化するが、SirE はこのヒストン残基に結合し、SirA の結合を阻害するという可能性である。この場合、SirE は H4K16 を基質にしないため、H4K16 の脱アセチル化は行われぬ。SirC が培養時間によって細胞内の局在を核と細胞質の間で移動させることが明らかとなったことから、サーチュインは培養時間に応じて核内外を移行し、他のサーチュインの標的に結合しその活性を阻害して、遺伝子発現のバランスを取っている可能性がある。この仮説を検証するためには、全サーチュインの細胞内局在を経時的に観察する必要がある。また、多様なヒストン残基に対する各サーチュインの活性や結合能を比較する必要があるだろう。

トランスクリプトーム解析によって、SirA と SirE については制御する遺伝子群が判明した。しかし、サーチュインがどのようにして標的とする遺伝子を区別しているのか

は依然として不明である。一般的にサーチュインはテロメア近傍の領域のヒストンを脱アセチル化することが知られる (74)。実際、SirA が有意に発現を抑制することが明らかとなった二次代謝系遺伝子のクラスターはテロメア近傍にあるものが多い。SirA によって発現が抑制される遺伝子クラスター14 のうち、テロメア近傍に存在するものは 7 つであった。一方、SirE が発現を抑制した一次代謝系の遺伝子群はテロメア近傍に集中していなかったことから、一般的なサーチュインとは標的とする染色体の部分が異なっている可能性がある。各サーチュインが染色体のどの部分を有意に制御しているのかは、各サーチュインの遺伝子破壊株のトランスクリプトームの結果やヒストンのアセチル化レベルを網羅的に解析する ChIP シーケンシングの結果を染色体地図にマッピングすることで判明するだろう。近年、酵母や哺乳類および植物ではテロメアが核の一部に束状に集中して局在することが明らかとなっている (75) が、このテロメアの核内での配置もサーチュインの制御と関連があるかもしれない。脱アセチル化を含むヒストンの修飾がどのようにして選択的に行われているのかは全生物を通じて謎が多い。染色体上の位置のみがサーチュインの標的を決定しているのかは今後さらなる研究によって明らかとされることが期待される。

本研究全体を通じて、*A. nidulans* のサーチュインアイソザイムは定常期に二次代謝を抑制するという機能に加え、一次代謝や自己溶菌に関与する遺伝子群を制御する機能を有することが示された。とくに SirA と SirE は共通の遺伝子群を標的にし反対方向の制御を行っており、生育フェーズに応じて代謝全体のバランスを調節する因子であると考えられた。また、サーチュイン遺伝子の破壊株のヒストンアセチル化レベルの経時的な検証の結果から、サーチュインアイソザイムは標的とするヒストンのリジン残基が異なることと生育時期によって活性を変化させることが明らかとなった。さらに、液体培養か固体培養か、GMM か PD 培地かなど、培養の条件に応答して下流の遺伝子群の発現への制御を変化させることも初めて明らかとなった。

本研究で明らかになったサーチュインアイソザイムの糸状菌の代謝の制御を Fig.4 にまとめた。菌体がグルコースを消費し尽くし定常期を迎えると、SirE が、一次代謝に関与する遺伝子群の発現をヒストン H3 の 9 番目のリジン残基に対する脱アセチル化を介して抑制する。これに加え、SirE は、おそらく CreA の活性の調節と協調して自己溶菌、分生子形成、ステリグマトシスチンの生合成、菌体外加水分解酵素の活性化を促進する。これに対して SirA は定常期に炭素代謝や細胞壁の合成に関与する遺伝子群の発現を上昇させ、ステリグマトシスチンなどの二次代謝産物の生合成に関与する遺伝子群を抑制する。このような SirA と SirE の拮抗作用によって一次代謝に関与する遺伝子群の発現は抑制され、定常期に生じる代謝に関与する遺伝子群の発現は促進され、糸状菌の代謝は生育フェーズに適応するのだと考えられた。現在までに、SirB、SirC および SirD の役割については未解明な部分が多いが、少なくとも二次代謝に対する効果は SirA と同様であると考えられた。サーチュインの役割や制御をより詳細に明らかにするには、各サーチュインが活性化する生育フェーズ、標的とするヒストン残基および制御下にある遺伝子群、実際に表現型に現れる特徴などを解析する必要があるだろう。

本研究の成果は、産業上の様々な場面や基礎研究の進展に大きな影響をあたえるだろう。まず、SirE の機能の阻害と SirA の発現の増強を介して、栄養条件などの培養条件に関わらず一次代謝に関与する遺伝子群の発現を増強することによって、有機酸などの発酵効率を改善することに繋がると期待される。これとは反対に、SirE の機能を人為的に増加させることによって糸状菌に自己溶菌を引き起こさせることが可能であると期待でき、これによって菌体内に蓄積された有用物質を抽出し利用することが容易になることも期待できる。また、SirA、SirB、SirC、SirD の遺伝子発現や活性を阻害することによって二次代謝産物の生産量の向上や、通常の培養条件で発現しない新たな二次代謝産物の開発に応用できるかもしれない。サーチュインは糸状菌の生存や毒素の生産に関与することから、サーチュインを標的とする薬剤の開発は、糸状菌による病害や汚染の防除にも

役立つだろう。さらに、サーチュインは全ての真核生物が有していることから、他生物のサーチュイン研究の発展にも貢献できる。これまでに、1つの生物が複数のサーチュインアイソザイムを有することが多いことが判明しているが、それらの役割や標的がどのように区別されているのかは、ヒトや酵母などのよく研究されている生物以外ではほぼ不明であった。当研究により、糸状菌のサーチュインが異なるヒストン残基を異なる培養時間に脱アセチル化することが判明した。また、複数のサーチュインが共通の遺伝群の発現を抑制または上昇させ、発現のバランスを調節し得ることが明らかとなった。このように、本研究によって得られた成果は、糸状菌を用いる産業への応用が期待されるだけでなく、サーチュインの基礎的な研究に新たな知見を加えるものであり、社会に大きく貢献するものである。

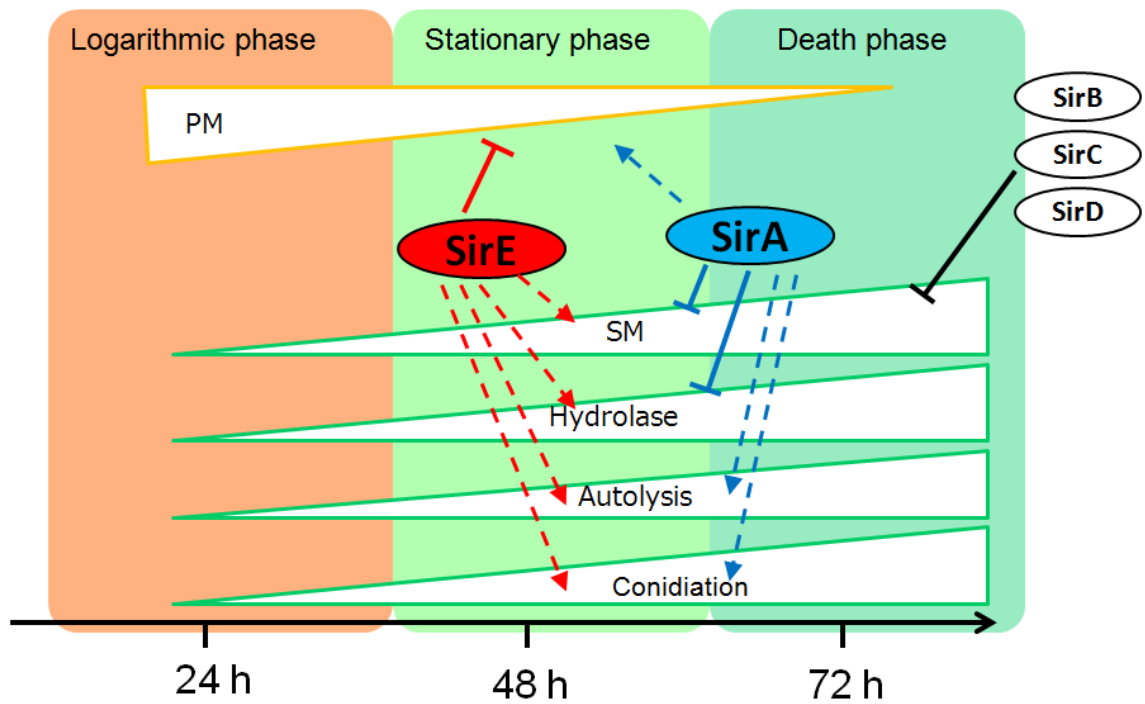


FIGURE 4. Model of regulating stationary-growth phases metabolisms driven by sirtuins as result of carbon starvation. Abbreviations: PM, primary metabolism ; SM, secondary metabolism.

謝辞

本研究を実施するにあたり、多くの方にご協力をいただきました。ここに、心より感謝の意を表します。

本研究を進めるにあたり、終始御指導を賜りました、筑波大学生命環境科学研究科教授 高谷直樹先生に心より感謝致します。

本研究に多大な御協力、御指導を賜りました、筑波大学生命環境科学研究科教授 星野貴行先生、筑波大学生命環境科学研究科教授 中村颯先生、筑波大学生命環境科学研究科教授 野村暢彦先生、筑波大学生命環境科学研究科准教授 橋本義輝先生、筑波大学生命環境科学研究科准教授 應蓓文先生に心より感謝致します。

本研究に多大な御指導、御助言を賜りました、名城大学農学研究科農学専攻助教 志水元亨先生、大阪市立大学大学院医学研究科細菌学助教 老沼 研一先生、筑波大学生命環境科学研究科助教 榊尾俊介先生に心より感謝致します。

また、私が大学院の生活を送るにあたり、公私にわたり多大な御協力、御指導を賜りつつ楽しく過ごさせてくださいました、筑波大学生命環境科学研究科負荷適応分子生物学研究室の皆様方に厚く御礼申し上げます。

参考文献

1. 村上英也 麴学, (財)日本醸造協会 (1986)
2. Michan, S., and Sinclair, D. (2007) Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochem. J.* **404**, 1–13
3. Imai, S., Armstrong, C. M., Kaeberlein, M., and Guarente, L. (2000) Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature.* **403**, 795–800
4. Landry, J., Sutton, A., Tafrov, S. T., Heller, R. C., Stebbins, J., Pillus, L., and Sternglanz, R. (2000) The silencing protein SIR2 and its homologs are NAD-dependent protein deacetylases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 5807–5811
5. Shimizu, M., Masuo, S., Fujita, T., Doi, Y., Kamimura, Y., and Takaya, N. (2012) Hydrolase controls cellular NAD, sirtuin, and secondary metabolites. *Mol. Cell. Biol.* **32**, 3743–3755
6. Fernandez, J., Marroquin-Guzman, M., Nandakumar, R., Shijo, S., Cornwell, K. M., Li, G., and Wilson, R. A. (2014) Plant defence suppression is mediated by a fungal sirtuin during rice infection by *Magnaporthe oryzae*. *Mol. Microbiol.* **94**, 70–88
7. Shwab, E. K., Bok, J. W., Tribus, M., Galehr, J., Graessle, S., and Keller, N. P. (2007) Histone deacetylase activity regulates chemical diversity in *Aspergillus*. *Eukaryot. Cell.* **6**, 1656–1664
8. Kawauchi, M., Nishiura, M., and Iwashita, K. (2013) Fungus-specific sirtuin HstD coordinates secondary metabolism and development through control of LaeA. *Eukaryot. Cell.* **12**, 1087–1096
9. Kawauchi, M., and Iwashita, K. (2014) Functional analysis of histone deacetylase and its role in stress response, drug resistance and solid-state cultivation in *Aspergillus oryzae*. *J. Biosci. Bioeng.* **118**, 172–176
10. Szilágyi, M., Kwon, N. J., Dorogi, C., Pócsi, I., Yu, J. H., and Emri, T. (2010) The extracellular β -1,3-endoglucanase EngA is involved in autolysis of *Aspergillus nidulans*. *J. Appl. Microbiol.* **109**, 1498–1508
11. Yamazaki, H., Yamazaki, D., Takaya, N., Takagi, M., Ohta, A., and Horiuchi, H. (2007) A chitinase gene, chiB, involved in the autolytic process of *Aspergillus nidulans*. *Curr. Genet.* **51**, 89–98
12. Kim, S., Matsuo, I., Ajisaka, K., Nakajima, H., and Kitamoto, K. (2002) Cloning and characterization of the *nagA* gene that encodes beta-n-acetylglucosaminidase from *Aspergillus nidulans* and its expression in *Aspergillus oryzae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**, 2168–2175
13. Emri, T., Molnár, Z., Szilágyi, M., and Pócsi, I. (2008) Regulation of autolysis in

- Aspergillus nidulans*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **151**, 211–220
14. White, S., McIntyre, M., Berry, D. R., and McNeil, B. (2002) The autolysis of industrial filamentous fungi. *Crit. Rev. Biotechnol.* **22**, 1–14
 15. Kim, Y., Islam, N., Moss, B. J., Nandakumar, M. P., and Marten, M. R. (2011) Autophagy induced by rapamycin and carbon-starvation have distinct proteome profiles in *Aspergillus nidulans*. *Biotechnol. Bioeng.* **108**, 2705–2715
 16. Szilágyi, M., Miskei, M., Karányi, Z., Lenkey, B., Pócsi, I., and Emri, T. (2013) Transcriptome changes initiated by carbon starvation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology.* **159**, 176–190
 17. de Vries, R. P., and Visser, J. (2001) *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**, 497–522
 18. Shroff, R. A., O'Connor, S. M., Hynes, M. J., Lockington, R. A., and Kelly, J. M. (1997) Null alleles of *creA*, the regulator of carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol.* **22**, 28–38
 19. Espeso, E. A., and Peñalva, M. A. (1992) Carbon catabolite repression can account for the temporal pattern of expression of a penicillin biosynthetic gene in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* **6**, 1457–65
 20. Ruijter, G. J., and Visser, J. (1997) Carbon repression in *Aspergilli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **151**, 103–114
 21. van der Veen, P., Ruijter, J. G. G., and Visser, J. (1995) An extreme *creA* mutation in *Aspergillus nidulans* has severe effects on D-glucose utilization. *Microbiology.* **141**, 2301–2306
 22. Takasaki, K., Shoun, H., Yamaguchi, M., Takeo, K., Nakamura, A., Hoshino, T., and Takaya, N. (2004) Fungal Ammonia Fermentation, a Novel Metabolic Mechanism That Couples the Dissimilatory and Assimilatory Pathways of Both Nitrate and Ethanol. *J. Biol. Chem.* **279**, 12414–12420
 23. Shimizu, M., Fujii, T., Masuo, S., Fujita, K., and Takaya, N. (2009) Proteomic analysis of *Aspergillus nidulans* cultured under hypoxic conditions. *Proteomics.* **9**, 7–19
 24. Lee, I., Oh, J.-H., Keats Shwab, E., Dagenais, T. R. T., Andes, D., and Keller, N. P. (2009) HdaA, a class 2 histone deacetylase of *Aspergillus fumigatus*, affects germination and secondary metabolite production. *Fungal Genet. Biol.* **46**, 782–790
 25. LAEMMLI, U. K. (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature.* **227**, 680–685
 26. Al-Nasiry, S., Geusens, N., Hanssens, M., Luyten, C., and Pijnenborg, R. (2007) The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells. *Hum. Reprod.* **22**, 1304–9

27. Yanai, K., Takaya, N., Kojima, N., Horiuchi, H., Ohta, A., and Takagi, M. (1992) Purification of two chitinases from *Rhizopus oligosporus* and isolation and sequencing of the encoding genes. *J. Bacteriol.* **174**, 7398–7406
28. Saikia, R., Singh, B. P., Kumar, R., and Arora, D. K. (2005) Detection of pathogenesis-related proteins – chitinase and β -1, 3-glucanase. *Curr. Sci.* **89**, 659–663
29. Li, B., and Dewey, C. N. (2011) RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics.* **12**, 323
30. Bernreiter, A., Ramon, A., Fernández-Martínez, J., Berger, H., Araújo-Bazan, L., Espeso, E. A., Pachlinger, R., Gallmetzer, A., Anderl, I., Scazzocchio, C., and Strauss, J. (2007) Nuclear export of the transcription factor NirA is a regulatory checkpoint for nitrate induction in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 791–802
31. Zhou, S., Narukami, T., Nameki, M., Ozawa, T., Kamimura, Y., Hoshino, T., and Takaya, N. (2012) Heme-Biosynthetic Porphobilinogen Deaminase Protects *Aspergillus nidulans* from Nitrosative Stress. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 103–109
32. Frye, R. (2000) Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **273**, 793–798
33. Emri, T., Molnár, Z., Pusztahelyi, T., and Pócsi, I. (2004) Physiological and morphological changes in autolyzing *Aspergillus nidulans* cultures. *Folia Microbiol. (Praha)*. **49**, 277–284
34. Saykhedkar, S., Ray, A., Ayoubi-Canaan, P., Hartson, S. D., Prade, R., and Mort, A. J. (2012) A time course analysis of the extracellular proteome of *Aspergillus nidulans* growing on sorghum stover. *Biotechnol. Biofuels.* **5**, 52
35. de Groot, P. W. J., Brandt, B. W., Horiuchi, H., Ram, A. F. J., de Koster, C. G., and Klis, F. M. (2009) Comprehensive genomic analysis of cell wall genes in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol.* **46**, S72–S81
36. Li, M., Valsakumar, V., Poorey, K., Bekiranov, S., and Smith, J. S. (2013) Genome-wide analysis of functional sirtuin chromatin targets in yeast. *Genome Biol.* **14**, R48
37. Palmer, J. M., and Keller, N. P. (2010) Secondary metabolism in fungi: does chromosomal location matter? *Curr. Opin. Microbiol.* **13**, 431–436
38. Lockington, R. A., and Kelly, J. M. (2002) The WD40-repeat protein CreC interacts with and stabilizes the deubiquitinating enzyme CreB in vivo in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* **43**, 1173–82
39. Boase, N. A., and Kelly, J. M. (2004) A role for creD, a carbon catabolite repression gene from *Aspergillus nidulans*, in ubiquitination. *Mol. Microbiol.* **53**, 929–940
40. Vienken, K. (2005) The Zn(II)2Cys6 Putative *Aspergillus nidulans* Transcription Factor Repressor of Sexual Development Inhibits Sexual Development Under Low-Carbon

- Conditions and in Submersed Culture. *Genetics*. **169**, 619–630
41. Luo, J., Nikolaev, A. Y., Imai, S., Chen, D., Su, F., Shiloh, A., Guarente, L., and Gu, W. (2001) Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell*. **107**, 137–148
 42. Yang, B., Miller, A., and Kirchmaier, A. L. (2008) HST3/HST4-dependent Deacetylation of Lysine 56 of Histone H3 in Silent Chromatin. *Mol. Biol. Cell*. **19**, 4993–5005
 43. Yu, J.-H., and Keller, N. (2005) Regulation of secondary metabolism in filamentous fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* **43**, 437–58
 44. Khaldi, N., Seifuddin, F. T., Turner, G., Haft, D., Nierman, W. C., Wolfe, K. H., and Fedorova, N. D. (2010) SMURF: Genomic mapping of fungal secondary metabolite clusters. *Fungal Genet. Biol.* **47**, 736–41
 45. Inglis, D. O., Binkley, J., Skrzypek, M. S., Arnaud, M. B., Cerqueira, G. C., Shah, P., Wymore, F., Wortman, J. R., and Sherlock, G. (2013) Comprehensive annotation of secondary metabolite biosynthetic genes and gene clusters of *Aspergillus nidulans*, *A. fumigatus*, *A. niger* and *A. oryzae*. *BMC Microbiol.* **13**, 91
 46. Nielsen, M. L., Nielsen, J. B., Rank, C., Klejnstrup, M. L., Holm, D. K., Brogaard, K. H., Hansen, B. G., Frisvad, J. C., Larsen, T. O., and Mortensen, U. H. (2011) A genome-wide polyketide synthase deletion library uncovers novel genetic links to polyketides and meroterpenoids in *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiol. Lett.* **321**, 157–66
 47. MacCabe, A. P., Riach, M. B., Unkles, S. E., and Kinghorn, J. R. (1990) The *Aspergillus nidulans* npeA locus consists of three contiguous genes required for penicillin biosynthesis. *EMBO J.* **9**, 279–87
 48. Gacek, A., and Strauss, J. (2012) The chromatin code of fungal secondary metabolite gene clusters. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **95**, 1389–1404
 49. Masuo, S., Terabayashi, Y., Shimizu, M., Fujii, T., Kitazume, T., and Takaya, N. (2010) Global gene expression analysis of *Aspergillus nidulans* reveals metabolic shift and transcription suppression under hypoxia. *Mol. Genet. Genomics.* **284**, 415–424
 50. Soukas, A., Cohen, P., Socci, N. D., and Friedman, J. M. (2000) Leptin-specific patterns of gene expression in white adipose tissue. *Genes Dev.* **14**, 963–80
 51. van den Berg, R. A., Hoefsloot, H. C. J., Westerhuis, J. A., Smilde, A. K., and van der Werf, M. J. (2006) Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. *BMC Genomics.* **7**, 142
 52. Andersen, M. R., Nielsen, J. B., Klitgaard, A., Petersen, L. M., Zachariassen, M., Hansen, T. J., Blicher, L. H., Gotfredsen, C. H., Larsen, T. O., Nielsen, K. F., and Mortensen, U.

- H. (2013) Accurate prediction of secondary metabolite gene clusters in filamentous fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, E99-107
53. Chiang, Y.-M., Szewczyk, E., Davidson, A. D., Entwistle, R., Keller, N. P., Wang, C. C. C., and Oakley, B. R. (2010) Characterization of the *Aspergillus nidulans* Monodictyphenone Gene Cluster. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 2067–2074
54. Kelly, D. E., Krasevec, N., Mullins, J., and Nelson, D. R. (2009) The CYPome (Cytochrome P450 complement) of *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol.* **46 Suppl 1**, S53–S61
55. Ahuja, M., and Chiang, Y. (2012) Illuminating the diversity of aromatic polyketide synthases in *Aspergillus nidulans*. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 8212–8221
56. Yeh, H.-H., Ahuja, M., Chiang, Y.-M., Oakley, C. E., Moore, S., Yoon, O., Hajovsky, H., Bok, J.-W., Keller, N. P., Wang, C. C. C., and Oakley, B. R. (2016) Resistance Gene-Guided Genome Mining: Serial Promoter Exchanges in *Aspergillus nidulans* Reveal the Biosynthetic Pathway for Fellutamide B, a Proteasome Inhibitor. *ACS Chem. Biol.* **11**, 2275–2284
57. Lo, H.-C., Entwistle, R., Guo, C.-J., Ahuja, M., Szewczyk, E., Hung, J.-H., Chiang, Y.-M., Oakley, B. R., and Wang, C. C. C. (2012) Two Separate Gene Clusters Encode the Biosynthetic Pathway for the Meroterpenoids Austinol and Dehydroaustinol in *Aspergillus nidulans*. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 4709–4720
58. Bok, J. W., Chiang, Y.-M., Szewczyk, E., Reyes-Dominguez, Y., Davidson, A. D., Sanchez, J. F., Lo, H.-C., Watanabe, K., Strauss, J., Oakley, B. R., Wang, C. C. C., and Keller, N. P. (2009) Chromatin-level regulation of biosynthetic gene clusters. *Nat. Chem. Biol.* **5**, 462–4
59. Bedalov, A., Hirao, M., Posakony, J., Nelson, M., and Simon, J. A. (2003) NAD⁺-Dependent Deacetylase Hst1p Controls Biosynthesis and Cellular NAD⁺ Levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 7044–7054
60. Haigis, M. C., and Guarente, L. P. (2006) Mammalian sirtuins--emerging roles in physiology, aging, and calorie restriction. *Genes Dev.* **20**, 2913–2921
61. Kato, M., and Lin, S.-J. (2014) Regulation of NAD⁺ metabolism, signaling and compartmentalization in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair (Amst)*. **23**, 49–58
62. Nemoto, S., Fergusson, M. M., and Finkel, T. (2004) Nutrient availability regulates SIRT1 through a forkhead-dependent pathway. *Science*. **306**, 2105–8
63. Vaquero, A., Scher, M., Lee, D., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Reinberg, D. (2004) Human SirT1 Interacts with Histone H1 and Promotes Formation of Facultative Heterochromatin. *Mol. Cell.* **16**, 93–105

64. Haigis, M. C., Mostoslavsky, R., Haigis, K. M., Fahie, K., Christodoulou, D. C., Murphy, A. J., Valenzuela, D. M., Yancopoulos, G. D., Karow, M., Blander, G., Wolberger, C., Prolla, T. A., Weindruch, R., Alt, F. W., and Guarente, L. (2006) SIRT4 inhibits glutamate dehydrogenase and opposes the effects of calorie restriction in pancreatic beta cells. *Cell*. **126**, 941–54
65. Du, J., Zhou, Y., Su, X., Yu, J. J., Khan, S., Jiang, H., Kim, J., Woo, J., Kim, J. H., Choi, B. H., He, B., Chen, W., Zhang, S., Cerione, R. A., Auwerx, J., Hao, Q., and Lin, H. (2011) Sirt5 is a NAD-dependent protein lysine demalonylase and desuccinylase. *Science*. **334**, 806–809
66. Smedsgaard, J. (1997) Micro-scale extraction procedure for standardized screening of fungal metabolite production in cultures. *J. Chromatogr. A*. **760**, 264–70
67. Asai, T., Morita, S., Shirata, N., Taniguchi, T., Monde, K., Sakurai, H., Ozeki, T., and Oshima, Y. (2012) Structural diversity of new C13-polyketides produced by *Chaetomium mollipilium* cultivated in the presence of a NAD(+)-dependent histone deacetylase inhibitor. *Org. Lett.* **14**, 5456–9
68. Asai, T., Otsuki, S., Sakurai, H., Yamashita, K., Ozeki, T., and Oshima, Y. (2013) Benzophenones from an endophytic fungus, *Graphiopsis chlorocephala*, from *Paeonia lactiflora* cultivated in the presence of an NAD+-dependent HDAC inhibitor. *Org. Lett.* **15**, 2058–61
69. Reinhardt, A. (1998) Using neural networks for prediction of the subcellular location of proteins. *Nucleic Acids Res.* **26**, 2230–2236
70. Michishita, E. (2005) Evolutionarily Conserved and Nonconserved Cellular Localizations and Functions of Human SIRT Proteins. *Mol. Biol. Cell*. **16**, 4623–4635
71. Feldman, J. L., Dittenhafer-Reed, K. E., and Denu, J. M. (2012) Sirtuin catalysis and regulation. *J. Biol. Chem.* **287**, 42419–42427
72. Wilson, J. M., Le, V. Q., Zimmerman, C., Marmorstein, R., and Pillus, L. (2006) Nuclear export modulates the cytoplasmic Sir2 homologue Hst2. *EMBO Rep.* **7**, 1247–1251
73. Vaquero, A. (2006) SirT2 is a histone deacetylase with preference for histone H4 Lys 16 during mitosis. *Genes Dev.* **20**, 1256–1261
74. Smeal, T., Claus, J., Kennedy, B., Cole, F., and Guarente, L. (1996) Loss of transcriptional silencing causes sterility in old mother cells of *S. cerevisiae*. *Cell*. **84**, 633–42
75. Tiang, C.-L., He, Y., and Pawlowski, W. P. (2012) Chromosome Organization and Dynamics during Interphase, Mitosis, and Meiosis in Plants. *PLANT Physiol.* **158**, 26–34