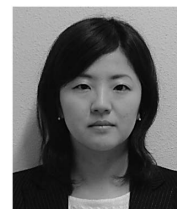


糸状菌におけるリグノセルロース分解酵素遺伝子の発現制御機構に関する分子生物学的研究



三重大学大学院生物資源学研究科 國 武 絵 美

はじめに

糸状菌は自然環境に存在する多様な炭素源を分解・資化することが可能である。この能力は古くから醸造・発酵に使用され、また多糖分解酵素を含む糸状菌由来の酵素が食品分野、化学工業分野、医薬分野など多くの分野で利用されてきた。さらに近年、バイオマス資源の有効利用の観点からセルラーゼやヘミセルラーゼの重要性は極めて高まった。しかし、糸状菌によるこれら酵素の生産制御メカニズムに関しては十分に解明されておらず、これが酵素生産コスト低減に対して障壁のひとつとなっている。植物体はセルロースやキシランなどのヘミセルロースといった多糖類を主成分とする。糸状菌は土壤中などでこれら混合物を感知し、適切なタイミングで適切な組成の分解酵素を生産すると考えられるため、酵素生産制御メカニズムを解明することは分解者としての生態を理解することにもつながる。セルラーゼ・ヘミセルラーゼ生産はそれらの基質となる多糖由来の少糖による転写誘導と、グルコースのような資化しやすい炭素源によるカーボンカタボライト抑制により制御される。筆者は *Aspergillus* 属糸状菌を研究対象として、誘導と抑制の両面から解析を行い、セルラーゼ・ヘミセルラーゼ遺伝子の発現制御経路の全容解明を目指して研究を進めてきたので、その成果について紹介する。

1. セルラーゼ・ヘミセルラーゼ遺伝子の転写誘導機構の解明

1-1. *Aspergillus aculeatus* のセルラーゼ遺伝子発現を制御する新奇転写活性化因子の同定

研究開始当初、糸状菌におけるセルラーゼ、ヘミセルラーゼ遺伝子発現誘導に関わる制御因子はキシラナーゼ遺伝子特異的な転写活性化因子 XlnR のみが知られており、これがセルラーゼ遺伝子の制御にも関与していることが報告されていた。一方で XlnR 非依存的な発現を示すセルラーゼ遺伝子の存在も見出されていたことから、筆者はセルラーゼ生産菌 *A. aculeatus* を対象として、XlnR 非依存的経路を介したセルラーゼ遺伝子の発現に関与する転写制御因子を遺伝学的手法により同定することに着手した。まず、本菌においてランダム変異導入及び変異遺伝子の特定の容易な T-DNA タギング法の利用を可能にした¹⁾。次に XlnR 非依存的な誘導パターンを示すセロビオヒドロラーゼ遺伝子 (*cbhI*) プロモーター制御下でピリミジン生合成に関与する Orotidine-5'-phosphate decarboxylase 遺伝子 (*pyrG*) を発現する株を作成し、変異導入の宿主として用いた。当該酵素は基質であるオロチン酸のアナログ 5-fluoroorotic acid (FOA) を代謝して毒性物質に変換する。そのためこの株ではセルラーゼ誘導条件下での FOA 含有培地で生育することができない。しかし T-DNA 挿入により *cbhI* の発現誘導因子が破壊されると、*pyrG* の発現が消失することにより FOA 耐性を示すため、セルラーゼ遺伝子発現誘導因子欠損株をポジティブスクリーニン

グすることができる。この戦略に則ってスクリーニングを実施し、真菌特異的な転写活性化因子に見られる Zn(II)₂Cys₆型 DNA 結合ドメインを持つタンパク質をコードする遺伝子を同定し *clbR* と命名した。ClbR はセルラーゼ遺伝子の発現に必須ではないものの、セルロースにตอบสนองした遺伝子発現誘導に重要であることを示した²⁾。また *clbR* 高発現によりセルラーゼとキシラナーゼを持続的に高生産させることに成功した³⁾。

1-2. *Aspergillus nidulans* のセルラーゼ遺伝子発現を制御する 2 種の転写因子の相互作用解析

モデル糸状菌 *A. nidulans* におけるセルラーゼ遺伝子の特異的な転写活性化因子は後に単離された Zn(II)₂Cys₆型の ClrB である。セルラーゼ遺伝子発現制御にはそれに加え、MADS-box タンパク質 McmA が関与する。McmA はプロテアーゼ生産、有性生殖、分生子形成の制御にも関与する広域転写因子である⁴⁾。セルラーゼ遺伝子発現誘導において、ClrB は必須であるのに対し McmA の依存性は遺伝子により異なることを見出し、この機構を二つの転写因子の DNA 結合特性から解析した。セルラーゼ遺伝子の転写誘導に重要なシスエレメントは CCGN₂CCN₆GG 及びその類似配列である。この配列は McmA 依存的な遺伝子プロモーター上に存在しており、CCN₆GG に McmA がダイマーで結合した。ClrB はモノマーとして CCG triplet に結合したが、McmA なしでは結合できなかったことから、ClrB の上記のシスエレメントへのリクルートを McmA が促進すると考えられる。一方、ClrB 制御下にある非セルラーゼである β-マンノシダーゼ遺伝子 *mndB* の発現は McmA による制御が見られず、プロモーター上に CCGN₂CCN₆GG 及びその類似配列は存在しない。この遺伝子の場合、ClrB はダイマーとして McmA 非依存的に CCGN₂CCG に結合することを明らかにした。部分的に McmA 依存的な発現を示す遺伝子のプロモーターには両方の配列が存在しており、2 種のシスエレメントが McmA 依存性を決定付けていることを示した (図1)。以上の結果より、セルラーゼ遺伝子が最大の発現量を示すためには McmA の作用が重要であると考えられる⁵⁾。

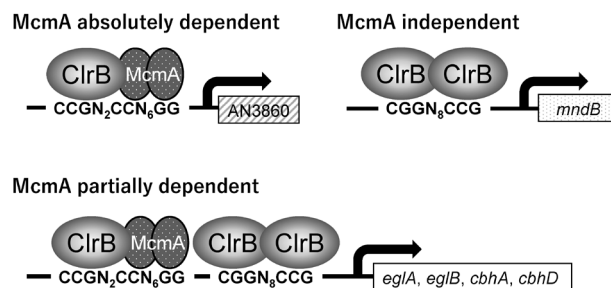


図1. ClrB と McmA の DNA 結合特性の違いによるセルラーゼ遺伝子の協調的な発現制御機構

1-3. *Aspergillus oryzae* 転写因子 XlnR と AraR によるペントース代謝系酵素遺伝子の発現制御

XlnR はキシラナーゼ遺伝子の転写活性化因子であり、ペントース代謝系酵素遺伝子の制御にも関与している。XlnR にはパラログ因子 AraR が存在するため、これらの機能の違いを解析した。まず XlnR と AraR は両者ともキシロース、アラビノースに応答して制御下遺伝子の転写活性化を行うことを明らかにした。また XlnR と AraR はペントース代謝系酵素遺伝子プロモーター上に存在するほぼ同一の配列 (CGGNTAAW と CGGDTAAW) に競合的にモノマーで結合し、一方で、XlnR はキシラナーゼ遺伝子プロモーター上のパリンδροーム構造を持つ TTAGSCTAA にダイマーとして結合することを示した⁶⁾。このように XlnR と AraR は誘導物質応答性や DNA 結合特性は類似しているものの同一ではなく、この機能分化が自然環境中に存在する誘導物質の濃度に応じて酵素生産を複雑に制御していると考えられる。

1-4. *A. nidulans* の pH 応答に関わる転写因子 PacC によるセルラーゼ遺伝子発現制御

環境 pH は酵素生産に影響を与える重要因子の一つである。筆者らはセルラーゼ生産能が極めて低い変異の原因遺伝子が pH シグナリング因子の変異によるものであることを特定し、その最下流にある転写因子 PacC によりセルラーゼ遺伝子の発現が制御されることを明らかにした。pacC 破壊株では ClrB に制御されるほぼ全ての遺伝子群の転写量が減少していた。転写解析と PacC の DNA 結合実験より、ClrB の活性が PacC 制御下の遺伝子産物により制御される可能性を示した⁷⁾。

2. *A. nidulans* における新奇的なカーボカタボライト抑制機構の発見

セルラーゼ遺伝子の発現は、様々な糖により抑制される。このカーボカタボライト抑制 (CCR) には転写抑制因子 CreA が関与することが古くから知られている。しかしアミラーゼとは異なり、セルラーゼの CCR は creA 変異株で解除されないことから、CreA 非依存的経路が主要であると考えられた。筆者らはプロテインキナーゼ破壊株ライブラリーのスクリーニングにより、cAMP 依存性プロテインキナーゼ (PkaA) が CreA 非依存的なセルラーゼ生産の CCR に関与することを見出し、PkaA の上流因子である G タンパク質 α サブユニット 3 種のうち group III の GanB が主としてこれに関与すること明らかにした。各因子遺伝子の単独・二重破壊株を用いたセルラーゼ生産性の解析及びセルラーゼ遺伝子発現解析により、PkaA/GanB が CreA とは独立した CCR 経路に関与することを示した。CreA, PkaA, GanB の CCR に対する寄与の大きさは、抑制炭素源の種類や培養方法 (形態分化を伴うプレート培養又は液体培養) によって異なっていることから、糸状菌が生育環境に応じて最も適した組成の多糖分解や糖質資化に関する酵素遺伝子群を発現するため、複雑な制御機構を獲得したのではないかと考えている⁸⁾。

おわりに

セルラーゼ、ヘミセルラーゼ遺伝子の発現誘導機構には共通して Zn(II)₂Cys₆ 型の転写活性化因子が関与するが、その分子レベルでの発現誘導機構は個々の因子によって大きく異なる。誘導物質の感知やこれら因子の活性化機構など、不明な点は多く残されている。CCR に関して、特にセルラーゼは従来考えられていたモデルよりも極めて複雑な制御が行われていることが判明した。本研究の成果は糸状菌の持つ炭素源資化戦略の

解明に貢献するものであるものの、新たな課題の発見でもあった。今後、これらの因子が関与する制御機構をより深く解析し糸状菌の基盤研究の進展に寄与するとともに、その成果を安定的なセルラーゼ、ヘミセルラーゼ生産を支える分子育種へと展開し、応用的な研究開発にも貢献していきたい。

(引用文献)

- 1) Kunikake E, Tani S, Sumitani J, Kawaguchi T. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Aspergillus aculeatus* for insertional mutagenesis. *AMB express*, 1, 46, (2011)
- 2) Kunikake E, Tani S, Sumitani J, Kawaguchi T. A novel transcriptional regulator, ClbR, controls the cellobiose- and cellulose-responsive induction of cellulase and xylanase genes regulated by two distinct signaling pathways in *Aspergillus aculeatus*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 97(5), 2017-2028, (2013)
- 3) Kunitake E, Kawamura A, Tani S, Takenaka S, Ogasawara W, Sumitani J, Kawaguchi T. Effects of *clbR* overexpression on enzyme production in *Aspergillus aculeatus* vary depending on the cellulosic biomass-degrading enzyme species. *Biosci Biotechnol Biochem*, 79(3), 488-495, (2015)
- 4) Li N, Kunitake E, Endo Y, Aoyama M, Kanamaru K, Kimura M, Kato M, Kobayashi T. Involvement of an SRF-MADS protein McmA in regulation of extracellular enzyme production and asexual/sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 80(9), 1820-1828, (2016)
- 5) Li N, Kunitake E, Aoyama M, Ogawa M, Kanamaru K, Kimura M, Koyama Y, Kobayashi T. McmA-dependent and -independent regulatory systems governing expression of ClrB-regulated cellulase and hemicellulase genes in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol*, 102(5), 810-826, (2016)
- 6) Ishikawa K, Kunitake E, Kawase T, Atsumi M, Noguchi Y, Ishikawa S, Ogawa M, Koyama Y, Kimura M, Kanamaru K, Kato M, Kobayashi T. Comparison of the paralogous transcription factors AraR and XlnR in *Aspergillus oryzae*. *Curr Genet*, 64(6), 1245-1260, (2018)
- 7) Kunitake E, Hagiwara D, Miyamoto K, Kanamaru K, Kimura M, Kobayashi T. Regulation of genes encoding cellulolytic enzymes by Pal-PacC signaling in *Aspergillus nidulans*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 100(8), 3621-3635, (2016)
- 8) Kunitake E, Li Y, Uchida R, Nohara T, Asano K, Hattori A, Kimura T, Kanamaru K, Kimura M, Kobayashi T. CreA-independent carbon catabolite repression of cellulase genes by trimeric G-protein and protein kinase A in *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet*, 65(4), 941-952, (2019)

謝辞 本研究は、大阪府立大学大学院生命環境科学研究科、名古屋大学大学院生命農学研究科、三重大学大学院生物資源学研究所で行われたものです。挑戦的な研究を行う機会を与えていただき糸状菌の面白さを教えてくださった大阪府立大学教授 川口剛司先生、あらゆる面で細部にわたってご指導いただき、研究者としての道へ導いてくださった准教授 谷修治先生、幾度も有意義なご助言をくださった准教授 炭谷順一先生には心より感謝申し上げます。名古屋大学教授 小林哲夫先生には、糸状菌の遺伝子発現制御に関して広く深く研究する機会や、多大な知識、手技、考え方、研究者としての姿勢などの様々なご指導を賜り、本研究の多くの成果をあげることが出来ました。本賞へのご推薦もいただき心より厚く感謝申し上げます。現在自由に研究を行う環境を与え、数多くの有意義なご助言を賜っております三重大学教授 木村哲哉先生に心より御礼申し上げます。本研究を遂行するにあたり、多大なるご助力をくださった全ての先生方、学生諸氏に深く感謝申し上げます。