



東北大学大学院農学研究科 五味 勝也

麹菌における有用遺伝子の発現制御機構の解明とその応用研究

はじめに

麹菌は日本酒や醤油、味噌などのわが国の発酵醸造食品製造に1,000年以上の昔から利用されてきており、わが国を代表する産業微生物と言っても過言ではない。それゆえ、麹菌が生産する多様な酵素や生理学的な特性、また醸造現場サイドにおける培養プロセス管理などを中心とした研究が古くから多くなされ、わが国の応用微生物学や生化学などの研究基盤形成に多大な貢献をなしてきた。それに対して、麹菌が有性生活環を持たないことや多核細胞ゆえの古典遺伝学的解析の困難さから、分子レベルにおける遺伝子発現制御解析などは同じ醸造用真核微生物である酵母に比べてきわめて遅れていた。しかし、演者らにより、世界に先駆けて麹菌における遺伝子導入法と宿主ベクター系が開発されて以降、多くの大学や企業の研究者が麹菌をはじめとする糸状菌の分子生物学研究に参入することになり、糸状菌における分子レベルの研究が著しく発展してきた。演者はこれまで開発した麹菌の遺伝子工学技術を活用して、タンパク質などの有用物質生産に適した麹菌の育種などの産業上重要な課題に加えて、有用遺伝子の発現制御機構の解明という基盤的な研究にも取り組んできた。その中でも麹菌が生産する産業上最も重要な酵素の一つであるアミラーゼの生産制御機構は、遺伝子発現制御に関するすぐれたモデルとなり得るものであり、本講演では演者が長年取り組んできたこのアミラーゼの遺伝子発現制御機構に関する研究成果を紹介することとした。

1. アミラーゼ遺伝子発現制御に必要な2種類の転写因子

アミラーゼ遺伝子の発現は、細胞外のデンプンやマルトースなどによって誘導される。3種類のアミラーゼ遺伝子(α-アミラーゼ、グルコアミラーゼ、α-グルコシダーゼ)のクローニングと塩基配列決定に引き続き、プロモーター領域中に高い相同性を有する保存領域を見出した。プロモーターの欠失変異体の解析から region III と名付けた配列がマルトースなどの誘導基質による遺伝子発現に重要であるシスエレメントであることを明らかにした。このシスエレメントを多コピー有する株ではα-アミラーゼ生産性が著しく低下するという現象 (titration) を見出し、その titration 現象を抑制する遺伝子をショットガンスクリーニングすることにより、アミラーゼ生産に必須である Zn₂Cys₆ 型転写因子 AmyR を発見した。amyR 遺伝子の周辺配列を調べてみたところ、その下流に AmyR の発現制御下にある α-グルコシダーゼ遺伝子 (agdA) と麹菌に3コピー存在する α-アミラーゼ遺伝子の一つである amyA が存在し、遺伝子クラスターを形成していることが明らかとなった。さらに、その後のゲノム解析の結果、興味深いことに、この遺伝子クラスターのすぐ下流に AmyR に相同性の高い Zn₂Cys₆ 型転写因子をコードする遺伝子が見出された。この遺伝子は機能解析により、菌体外プロテアーゼやペプチダーゼの生産に関わる転写因子 PrtR であることが示された。麹菌のゲノムサイズは 38 Mb と

大きいにもかかわらず、日本酒製造に必須なアミラーゼと醤油や味噌製造に必須なプロテアーゼの生産を制御する2種類の転写因子が数kbというきわめて近傍の領域に存在することは、転写因子の分子進化を考える上でも興味深い。

一方、AmyR欠損株はデンプン培地で生育が悪いものの、マルトース培地では野生株と同様の生育を示すことから、マルトースを資化するための別の制御機構の存在が予想された。EST解析及びゲノム解析データを検索した結果、マルトース輸送体、マルターゼ(α-グルコシダーゼ)をコードする遺伝子(malPおよびmalT)とこれらの遺伝子の発現誘導に関わる転写因子遺伝子malRからなるマルトース資化遺伝子(MAL)クラスターを発見した。このMALクラスターの遺伝子を欠損するとマルトース培地での生育がきわめて悪くなることから、MALクラスターは麹菌のマルトース資化に必須であることが示された。また興味深いことに、これらの遺伝子破壊株ではアミラーゼ遺伝子の転写が著しく遅延することが明らかになった。malPやmalTはマルトース添加後10分で転写誘導されるのに対し、α-アミラーゼ遺伝子(amyA/B/C)はそれよりも20分ほど遅れて転写誘導が起こる一方でイソマルトース添加後には速やかに転写が起こる。これらの結果は、AmyRの転写活性化の直接的な誘導基質はマルトースではなくイソマルトースであることを示唆している。実際にAmyRの細胞内局在解析により、イソマルトースの方がマルトースよりも速やかにAmyRの核移行が起こることが分かった。これらの結果から、麹菌ではマルトース輸送体MalPによりマルトースが細胞内に取込まれ、菌体内α-グルコシダーゼMalTの糖転移活性によりマルトースからイソマルトースが生成することによって、AmyRの転写活性化が起こり、アミラーゼ遺伝子の転写が誘導されることが明らかになった。麹菌が生産するアミラーゼは、マルトースの取込みとイソマルトースへの構造変換に関わる遺伝子の制御を行うMalRと、イソマルトースによって活性化され直接遺伝子発現誘導に関わるAmyRの2種類の転写因子の働きによって生産されることが明らかになった(図1)。

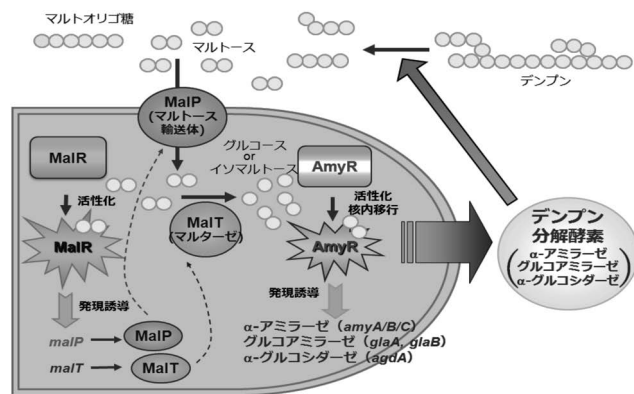


図1 麹菌のアミラーゼ生産制御モデル

2. 固体培養特異的に発現するグルコアミラーゼ遺伝子の発現制御に必須な転写因子

麹菌は2種類のグルコアミラーゼ (GlaA, GlaB) を生産するが、そのうち GlaB が日本酒製造では重要な役割を果たしており、興味深いことに *glaB* 遺伝子は液体培養ではほとんど発現せず、米麹のような固体培養で高発現することが月桂冠の秦らによって明らかにされている。このことが古くから先達たちが液体麹製造を試みたものの失敗してきた理由でもある。*amyR* 破壊株では固体培養でも GlaB は生産されないことから、AmyR が発現に必須であることが分かるが、それ以外に別の転写因子が *glaB* 遺伝子発現に必要であると考えられる。そこで、転写因子破壊株ライブラリーを利用して、固体培養条件を模した培養条件において GlaB 生産に影響がある破壊株を網羅的にスクリーニングすることとした。秦らによって提唱された *glaB* 遺伝子の高発現要因のうち、菌糸成長阻害ストレスと低水分活性を再現できるプレートを用いて、約400株の破壊株を培養し、GlaB 抗体を用いて生産の有無を調べた。その結果、1つの破壊株で α -アミラーゼ生産は野生株と変わらないにもかかわらず GlaB 生産のみがほとんど失われていることを見出した。この破壊株は分子形成に関与すると報告されていた C₂H₂ 型転写因子 FlbC であり、*flbC* 破壊株では *glaB* の発現は認められず、*flbC* 相補株では野生株と同程度の発現に回復したことから、FlbC が *glaB* の発現を正に制御していることが示された。さらに、*flbC* 破壊株の解析から、FlbC はグルコアミラーゼ GlaB と同様に固体培養で高生産される酸性プロテアーゼや中性プロテアーゼなどの日本酒や醤油・味噌醸造でも重要なプロテアーゼの遺伝子発現制御にも必須な転写因子であることが明らかになってきた。FlbC が固体培養環境にどのように応答して *glaB* などの発現を制御しているかについては現在解析中であるが、浸透圧ストレスなどに応答する MAP キナーゼを介したシグナル伝達経路の関与が明らかになりつつある。今後詳細に解析する予定であるが、これまで謎であった固体培養特異的発現を示す醸造産業上必須である酵素の遺伝子の転写制御機構の一端が明らかになったものと考えている。

3. カーボンカタボライト抑制関連因子の機能解析とアミラーゼ生産

麹菌のアミラーゼをはじめとする糸状菌が菌体外に生産する多糖類分解酵素は、カーボンカタボライト抑制 (CCR) 機構によってグルコース存在下で生産が抑制されることが知られている。糸状菌における CCR には C₂H₂ 型転写因子 CreA が関わっており、CreA はユビキチン化/脱ユビキチン化によって機能制御されているという機構が提唱されている。そこで、麹菌において CCR に関わる遺伝子破壊株を作製したところ、*creA* だけでなく CreA の脱ユビキチン化に関与すると考えられている脱ユビキチン化酵素遺伝子 (*creB*) も同時に破壊した二重破壊株で α -アミラーゼ生産が顕著に上昇することを見出した。*creA* と *creB* の二重破壊株ではキシラナーゼや β -グルコシダーゼなどのバイオマス分解酵素の生産量も向上していた。また、これまで他の糸状菌では *creA* 破壊株は生育がきわめて悪くなり、産業上は不利となると報告されていたが、麹菌の *creA* 破壊株は栄養培地における液体培養で野生株と同等の生育を示すことが認められた。特に興味深いことに、野生株では液体培養でペレット状の菌糸形態をとるのに対して、*creA* 破壊株では

パルプ状を呈することから、これが菌体量の増加につながったことが考えられた。パルプ状の菌糸形態での増殖により高密度培養が可能となるため、タンパク質のみならず低分子化合物などの有用物質高生産用宿主としての有用性も期待できる。また、予備的な知見であるが、*creA* 破壊株が示すパルプ状の菌糸形態は、細胞壁構成成分である α -1,3-グルカンの生合成に関わる遺伝子発現に影響を及ぼし、菌糸同士の接着力が弱まるということが要因として示唆されている。

CreA のユビキチン化にはユビキチンリガーゼ HulA とそのアダプタータンパク質 CreD が関与していると考えられている。*creB* 破壊でも *creA* 破壊と同様 CCR が脱抑制され、アミラーゼ生産が上昇するが、これに *creD* 破壊を加える CCR が回復してアミラーゼ生産は抑制された。一方、マルトース輸送体 MalP の発現はグルコース存在下で CCR によって発現抑制されると同時に、膜タンパク質に共通するユビキチン化を受けてエンドサイトーシスによって液泡で分解されることが示された。MalP のユビキチン化とエンドサイトーシスにも CreD が関与しており、さらに CreD の脱リン酸化変異体と *creB* 破壊を組み合わせることで、アミラーゼ生産量の著しい向上を図ることができることを明らかにした。

おわりに

麹菌の遺伝子組換え系の開発から始め、その系を利用した遺伝子発現制御の解析を進めてきた結果、麹菌の最も代表的な酵素であるアミラーゼの遺伝子発現制御機構の全容を完全ではないとは言えかなり明確にすることができたのは研究者として嬉しい限りである。当然のことながら、今後明らかにしなければいけない課題は多く残されており、アミラーゼの生産制御一つとっても解明し尽くすまでの道はまだ遠く感じるのも確かである。また、最近手がけている麹菌と近縁で焼酎製造に必須の黒麹菌におけるアミラーゼの生産制御機構は麹菌と違いが認められており、生物が示す多様な生命現象の奥深さに感銘するとともに、研究の面白さをさらに強く感じている。

謝辞 本研究は、国税庁醸造試験所 (現 (独) 酒類総合研究所) から東北大学大学院農学研究科まで、ほぼ30年間にわたって行ってきたものです。醸造試験所で研究生活を始めるにあたって、当時の醸造試験所長の故・秋山裕一先生が麹菌研究に導いて下さらなければ、このような荣誉ある賞を受賞するには至りませんでした。心より感謝申し上げる次第です。麹菌の遺伝子組換え技術の開発とアミラーゼ遺伝子発現制御の研究は直属の上司であった飯村穰先生 (山梨大学名誉教授) との共同での研究が基盤となっています。有益で楽しいディスカッションが研究を続けるのに非常に役立ちました。厚く御礼申し上げます。また、大学時代に研究の基礎や研究者としてのあるべき姿をお教えいただき、卒業後も暖かく見守り下さりご指導いただきました別府輝彦先生 (東京大学名誉教授) ならびに故・田村学造先生 (東京大学名誉教授) に心より御礼申し上げます。本研究は、醸造試験所から大学に至るまで、多くの研究機関の共同研究者ならびに同僚やポスドク、学生、研究補助員の方々のご協力のもとでなされたものです。紙面の都合でお名前を挙げる事ができませんが、関係された全ての皆様に心から感謝の意を表します。