

## 糸状菌における多糖分解酵素遺伝子群の発現制御に関する研究



名古屋大学大学院生命農学研究科 小林 哲 夫

## はじめに

微生物酵素の産業利用の始まりは1894年のタカジアスターゼに遡る。タカジアスターゼは麹菌の分泌酵素の混合物でありその主成分はアミラーゼである。その後、セルラーゼ、マンナンナーゼ、キシラナーゼなどの糸状菌多糖分解酵素が次々と工業的に生産されるようになり、現在の我々の日常生活に大きく関わっている。さらに、近年のバイオマス有効活用への流れにより多糖分解酵素の産業上での重要性は増すこととなった。一方、産業用酵素の長い歴史や需要の高まりに比べて、その生産制御に関する基礎研究は未だ途上であり、まだまだ多くの謎が解明されていない。

演者らは *Aspergillus* 属糸状菌を研究対象として遺伝子発現制御という視点からこれら酵素の生産制御に関する研究を行い、酵素生産の効率化に資する基盤情報の整備を目指してきた。未だその途上であるが、本講演では演者らが明らかにしてきた研究成果について紹介したい。

## 1. 多糖分解酵素遺伝子の発現誘導機構

## 1-1. アミラーゼ

アミラーゼ遺伝子の転写誘導を司る転写活性化因子は  $Zn(II)_2Cys_6$  型 DNA 結合ドメインを持つ AmyR である。モデル糸状菌の *A. nidulans* では、AmyR の標的遺伝子は主としてアミラーゼ、グルコアミラーゼ、 $\alpha$ -グルコシダーゼ及びトランスポーターであり、AmyR の機能欠損はデンプンやマルトース資化能の著しい低下を引き起こす。AmyR 依存的な転写誘導の最も強力な誘導物質はイソマルトースで、コージビオースやマルトース、また D-グルコースも誘導物質として働く。ただし、マルトースによる誘導には  $\alpha$ -グルコシダーゼ活性が必要であるため真の生理的誘導物質であるとは言えない。*A. nidulans* は強力なイソマルトース合成活性を持つ  $\alpha$ -グルコシダーゼ (AgdB) を有しており、本酵素の糖転移活性によりマルトースの約30%がイソマルトースに変換される。また、D-グルコースは同時にカーボンカタボライト抑制 (CCR) を引き起こすため、野生株では顕著な発現誘導は見られない。これらの誘導物質は細胞質に存在する AmyR の核移行を引き起こし、これによりアミラーゼ遺伝子の転写活性化が起こる。イソマルトースは nM オーダーで核移行を誘発するが、コージビオースやマルトースではその100倍、D-グルコースでは10,000倍の濃度が必要である。

AmyR は機能ドメインとして N 末端側に核移行シグナルを含む DNA 結合ドメイン、中央部に転写活性化ドメイン、C 末端の核移行制御ドメインを持つ。認識配列は  $CGGN_6CGG$  及びその類似配列であり、2分子の AmyR が本配列に結合して転写を活性化する。C 末端の核移行制御ドメインを欠失した AmyR は恒常的に核に局在し、誘導物質に依存しないアミラーゼ生産を引き起こす。

AmyR の核移行を制御する分子メカニズムの詳細は未だ明

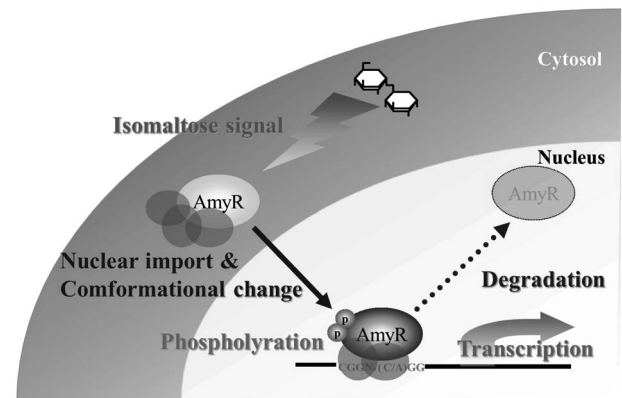


図1 AmyRによる転写制御機構のモデル

らかではないが、非誘導条件下の AmyR は DNA 結合能を持たないことが明らかとなっており、また、タグ融合 AmyR を精製すると Hsp70 が共精製される。そのため、AmyR はシャペロンと複合体として存在し、これによりアミラーゼ非誘導条件下では核移行シグナルを含む DNA 結合ドメインがマスクされているのではないかと考えている。また、誘導条件下でリン酸化されることや安定性が低下して分解されることなどが見出されている。従って、誘導物質存在下での AmyR の経時的細胞内動態は核移行、被リン酸化、転写活性化、分解となる (図1)。

## 1-2. キシラナーゼ

キシラナーゼ遺伝子の転写誘導を制御する XlnR も AmyR と同じ  $Zn(II)_2Cys_6$  型の転写因子である。*A. oryzae* における XlnR の標的遺伝子はキシラン・セルロースの完全分解に必要な全ての酵素遺伝子、ペントース代謝系遺伝子、トランスポーター遺伝子などを含む数十遺伝子にのぼる。ただし、後述するようにセルラーゼ遺伝子に関しては XlnR の寄与は小さい。

XlnR の結合配列は GGCTAA とその類似配列とされてきた。しかし、XlnR の標的のペントース代謝系遺伝子プロモーターでの詳細な DNA 結合解析によると CGGNTAAW がモノマーとしての結合コンセンサスである。ペントース代謝系遺伝子は XlnR のパラログ AraR によっても制御されており、その結合配列は CGGDTAAW と XlnR と極めて類似している。ペントース代謝系遺伝子では両者とも結合する配列がほとんどであり、その結合は競合的である。また、どちらも D-キシロースと L-アラビノースに応答して転写を活性化する。後者には D-キシロースの混入が認められるため確定的にはいえないが、DNA 結合や誘導物質応答性という点では両者の機能分化はごくわずかに思える。しかし、AraR に制御されないキシラナーゼ遺伝子では XlnR は TTAGSCTAA にダイマーとして結合することが明らかとなった。当初提唱された GGCTAA はこの配列の一部である。遺伝子重複の結果生じたと考えられる AraR と

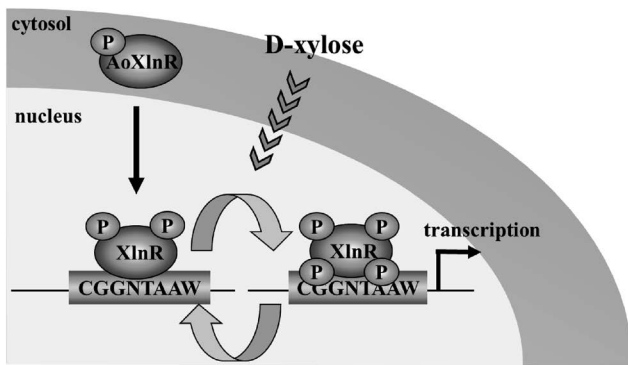


図2 XlnRによる転写制御機構のモデル

XlnRはDNA結合ドメインをわずかに変えることにより機能分化し、特異的標的遺伝子とともに共通の標的遺伝子を持つようになったと考えられる。

XlnRは常に核に局在し、誘導物質キシロースに反応してリン酸化され誘導物質除去により脱リン酸化される。AmyRのように誘導物質存在下で安定性が低下することはない。また、D-キシロース非存在下・存在下いずれにおいても、XlnRのDNA結合活性が検出されている。従って、XlnRは常に標的配列に結合しており、その活性は可逆的リン酸化により制御されていると考えられる(図2)。実際に推定リン酸化部位のアニン置換体はリン酸化を受けず転写活性化能を持たない。

### 1.3. セルラーゼ, マンナーゼ

セルラーゼ遺伝子の転写誘導もやはり $Zn(II)_2Cys_6$ 型のClrB/ManRという転写因子により制御される。ClrBは*A. nidulans*, ManRは*A. oryzae*での呼称であり、両者はオルソログである。ClrB/ManRはセルラーゼ遺伝子だけでなくマンナーゼ遺伝子の制御にも関わっている。しかし、ManRはマンナーゼ生産に必須であるのに対し、ClrBは必須ではない。この点については後述する。

*A. nidulans*のセルラーゼ遺伝子の発現制御ではClrBに加えてMADS-boxタンパク質McmAも重要である。McmAは広域転写因子であり、本因子変異株ではセルラーゼに加えてプロテアーゼ生産の低下、有性生殖の欠損、分生子形成の低下などが見られる。ClrB標的遺伝子とMcmA標的遺伝子の積集合をとると発現量の高いセルラーゼ遺伝子7種の全てが含まれる。

セルラーゼ遺伝子の転写誘導に関わるシスエレメントは $CCGN_2CCN_6GG$ 及びその類似配列であり、McmAはダイマーとして $CCN_6GG$ に結合する。ClrBの結合はMcmA依存적であり、かつCCG tripletを必要とする。DNA上のClrB/McmA複合体はClrBモノマーとMcmAダイマーから構成される。一方、ClrB標的遺伝子の一つである $\beta$ -マンノシダーゼ遺伝子*mndB*の発現はMcmAにはほとんど依存しない。この遺伝子ではClrBはダイマーとしてプロモーター上の $CGGN_8CCG$ にMcmA非依存的に結合する。従って、*mndB*はClrBの活性化が起これば発現するが、セルラーゼ遺伝子の発現にはこれに加えてMcmAの活性化も必要ということになる。

マンナーゼ遺伝子の転写誘導において*A. oryzae* ManRは必須因子、しかし*A. nidulans* ClrBの関与はわずかにすぎない。実は*A. nidulans*ではClrBパラログのManS(仮称)が主要な転写因子として機能している。これら因子間では誘導物質応答性で明らかな機能分化が見られ、ManRとClrBはマンノビオ

ースとセロビオースに反応して標的遺伝子の発現を引き起こすのに対し、ManSはマンノビオースにしか応答しない。なお、*A. oryzae*はManSに相当するClrB/ManR相同因子を持たない。

### 2. 多糖分解酵素遺伝子発現のカーボンカタボライト抑制

*A. nidulans*におけるセルラーゼ遺伝子の発現は、誘導物質以外の調べた限りのあらゆる単糖、糖アルコール、さらには多糖によって抑制される。カーボンカタボライト抑制(CCR)に関わる転写抑制因子としてCreAが古くから知られている。しかし、*A. nidulans* アミラーゼ遺伝子のCCRがCreA変異で完全に解除されるのに対し、セルラーゼ遺伝子のCCRは十分に解除されない。これはCreAに依存しないCCRの存在を意味しており演者にとって長年の謎であったが、最近になってcAMPシグナリングが関与していることが見出された。プロテインキナーゼA遺伝子(*phaA*)破壊株ではアミラーゼ遺伝子のCCR解除は微弱だが、セルラーゼ遺伝子のCCRは大幅に解除されるのである。PkaAの上流の $G\alpha$ (三量体Gタンパク質のサブユニット)をコードする*ganB*破壊によっても同様なCCRの解除が起こる。CreA, PkaA, GanBのCCRへの寄与の程度は、分化を伴うプレート培養と伴わない液体培養で異なり、さらには抑制炭素源の種類で異なるため、環境条件を感知した極めて精緻で複雑なCCRメカニズムが存在すると思われる。このメカニズムにより糸状菌は環境条件と自身の生育状況に応じて最も適切な組成の多糖分解酵素や糖質資化系酵素を生産しているのではないかと考えている。

おわりに

自然環境での糸状菌の主たる炭素源は植物由来の多糖であり、貯蔵多糖のデンプンやグルコマンナンなどを除くとこれらは植物細胞壁成分として共存している。糸状菌は存在する炭素源の種類を認識して誘導システムと抑制システムを同時に駆動し、資化の優先順位を決めているはずである。本研究で対象とした転写誘導を担う因子はいずれも多糖分解酵素の生産制御という類似の役割を持ち、しかも全て $Zn(II)_2Cys_6$ 型の真菌特異的転写因子である。それにもかかわらず、分子レベルでの制御メカニズムが大きく異なることには驚きを禁じ得ない。また、CCRのメカニズムが予想を超えてはるかに複雑であることも驚きである。おそらく、この複雑さが資化順位を決めるための糖質のランキングに必要なのであろう。演者らの研究成果がこの分野での今後の基礎および応用研究の進展に寄与し、さらには産業利用に発展してくれることを期待してやまない。

謝辞 演者は東京大学の別府輝彦先生の主宰する醱酵学研究室で研究者の道を歩むことを志しました。私の研究に対する姿勢は当時形成されたものであり、現在に至るまで折にふれて叱咤激励のお言葉をくださる別府先生には感謝に堪えません。また当時直接私をご指導くださいました魚住武司先生、故堀之内末治先生に深く感謝いたします。その後お世話になりました理化学研究所の故堀越弘毅先生からは研究者としての気概を学びました。研究者は個としてあるという姿勢を貫く生き様に感銘を受けました。

最後になりましたが、本研究は1995年に名古屋大学で塚越規弘先生の下で開始し、先生の研究を引き継いで現在まで続けてきたものです。深く感謝いたしますとともに、この研究を支えてくださいました共同研究者の方々、研究員、学生諸君に深く御礼いたします。