

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02125

研究課題名(和文)糸状菌多糖分解酵素遺伝子の転写抑制に関わる情報伝達ネットワークの解明

研究課題名(英文)Elucidation of signal transduction network related to repression of genes for polysaccharide degrading enzymes in filamentous fungi

研究代表者

小林 哲夫 (Kobayashi, Tetsuo)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：20170334

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：糸状菌における多糖分解酵素の生産は一般にカーボカタボライト抑制(CCR)の制御下にある。Aspergillus nidulansではCCRに関わる因子として転写抑制因子CreAやcAMPシグナリングの構成因子であるPkaAやGanB、脱ユビキチン化酵素CreBなどが知られている。そこで、これらの因子間のかかわりについて検討するため、各因子の遺伝子の単独、ならびに多重破壊株を用い、各種酵素遺伝子の発現解析を行った。その結果、CreA、cAMPシグナリング、CreBは独立に機能していることが明らかとなった。また、cAMPシグナリングのPkaAの下流因子の有力候補を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糸状菌由来の多糖分解酵素は市場性の高い有用酵素であり、食品、繊維などの産業で幅広く利用されている。さらに、バイオマス有効利用の観点から近年需要が高まっている。そこで酵素価格を低く抑える必要があるが、そのネックとなる原因の一つがカーボカタボライト抑制による生産量の低下である。本研究では複数の独立した経路がCCRに関わることを示し、多重破壊株を用いた効率的酵素生産法確率のための基盤情報を提供した。

研究成果の概要(英文)：Production of polysaccharide degrading enzymes in filamentous fungi is generally under regulation of carbon catabolite repression (CCR), however, sensitivity to CCR differs depending on the enzyme type. Strength of CCR also differs depending on the repressing carbon source. Thus, the production is finely regulated. CCR is mediated by the transcription factor CreA as well as by PkaA and GanB in Aspergillus nidulans. The deubiquitinase CreB is also required for CCR. To further understand mechanisms of CCR, we compared the effects of creA deletion with deletion of pkaA and ganB genes as well as creB. This study revealed that PkaA and GanB participate in CreA-independent CCR and that contribution of CreA, PkaA, and GanB in CCR differs depending on the inducers, repressing carbon sources, the enzyme types and culture conditions. It also revealed that CreB functions independently of GanB. In addition, we identified a promising candidate of PkaA substrate that regulates CCR.

研究分野：応用微生物学

キーワード：カーボカタボライト抑制 Aspergillus nidulans 多糖分解酵素 転写制御

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

微生物は一般的にカーボンカタボライト抑制 (carbon catabolite repression, CCR) というシステムを持っており、これにより容易に代謝できる炭素源の存在下では、ほかの炭素源の資化が抑制される。糸状菌の CCR システムを構成する因子として最初に同定されたのは、*Aspergillus nidulans* の転写抑制因子 CreA であり、その後ほかの糸状菌においても本因子のオルソログが CCR に関わることが報告された。CreA が転写抑制するのは多数の炭素源代謝に関わる遺伝子であり、その中には産業上重要なアミラーゼ、セルラーゼ、キシラナーゼ、マンナーゼなどの多糖分解酵素も含まれる。CreA の活性は細胞質と核の間の移動により制御されており、抑制炭素源の存在下では核に局在するが、非存在下では核から排出されて分解される。この核からの排出にはプロテインキナーゼの SnfA や SchA が関与している。また、cAMP 依存性プロテインキナーゼ PkaA も SnfA の機能を阻害することにより CreA の核局在を制御すると考えられていた。

CreA 依存的システムが CCR の唯一のシステムではない。脱ユビキチン化酵素 CreB やこれと相互作用する CreC をコードする遺伝子の機能欠損で CCR からの脱抑制が起こり、これらは当初は CreA の安定性を制御すると考えられていた。しかし、最近の報告では CreA のユビキチン化が見られないことや、*creB* の変異や破壊が CreA の安定性に影響を与えないこと、*creA* と *creB* の二重破壊株で単独破壊株より高いアミラーゼ、キシラナーゼ、 β -グルコシダーゼ生産が見られることなどから、CreA と CreB は独立して CCR に関与すると考えられている。*creB* や *creC* 変異のサプレッサー変異株から同定されたアレスチン様タンパク質 CreD とユビキチン化酵素 HulA も CCR に関わっていることが報告されている。一方、我々は PkaA が CreA とは独立して CCR に関わることを見出していた。

2. 研究の目的

これまでに糸状菌における CCR に関して数多くの報告があるが、ほとんどがグルコースを代表的な抑制炭素源として用いている。しかし、ほかにも多くの炭素源が CCR を引き起こし、その程度は抑制炭素源の種類や標的遺伝子によって変化する。なぜ、このようなことが起こるかについては、CCR に関する知見が十分でないため明らかでない。我々は、PkaA が明らかに CreA とは独立して CCR に関わることを見出したため、本研究では cAMP シグナリングと CreA による CCR との違いや CreB との関係について、複数の抑制炭素源や複数の多糖分解酵素を対象として検討し、CCR のメカニズムの全体像の把握に寄与することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) CCR 関連因子の遺伝子破壊 *A. nidulans* ABPU1 株 (*biA1 pyrG89; wA3; argB2; pyroA4*) を親株として遺伝子破壊を行った。遺伝子破壊用のプラスミド作製は以下のように行った。まず、候補遺伝子の構造遺伝子部分の上流約 1 kb と下流約 1 kb、およびマーカー遺伝子を KOD Fx Neo DNA ポリメラーゼをもちいて PCR で増幅し、これらを制限酵素で 1カ所切断した pBluescript II KS(+) と混合し、GeneArt Seamless Cloning and Assembly あるいは In-Fusion HD Cloning Kit で処理した。これを用いて *E. coli* XL1-Blue あるいは DH5 α を形質転換して、破壊カセットを持つプラスミド (破壊用プラスミド) を得た。破壊カセットは上流断片と下流断片の間にマーカー遺伝子が挿入された構造を持っている。ただし、*pkaA* 破壊株については従来の制限酵素とリガーゼを用いた方法で破壊用プラスミドを得た。マーカー遺伝子としては *A. nidulans* の *pyroA* あるいは *A. oryzae* の *pyrG* 遺伝子を用いた。

破壊用プラスミドを制限酵素で一カ所切断し、これをプロトプラスト法により *A. nidulans* に導入した。ピリドキシン要求性あるいはウリジン要求性が回復した形質転換株の中から、相同組み換えにより標的遺伝子が破壊された株を PCR により選択し、最終的にサザンブロッティングにより目的部位以外に破壊カセットの挿入がないことを確認した。なお、*creA/pkaA* 二重破壊株、および *ganA*, *ganB*, *fadA* 破壊株の作製にはマーカーリサイクリング法を用いた。マーカーリサイクリング用に特別に設計した破壊株カセットは、上流、*AopyrG*, 上流、下流と順次連結した構造を有している。これを用いてウリジン要求性の回復により第一段階の破壊株を取得し、フルオロオロチン酸耐性を指標として二つの上流配列間の相同組み換えで *AopyrG* が脱落した破壊株を取得した。*creA/ganB* 二重破壊株は、このように作製した *ganB* 遺伝子破壊株を親株とし、*AopyrG* をマーカーとして *creA* 遺伝子を破壊することによって作製した。

(2) プレートアッセイ 多糖と抑制炭素源を含む最少寒天培地に各菌株の分生子懸濁液 (分生子数 10^4) をスポットし、37℃ で 3 日間培養した。抑制炭素源の濃度は 1% とした。また、コロニーの巨大化を防ぐために 0.1% の TritonX-100 を培地に添加した。アミラーゼでは 1% デンプンを用い、培養後にデンプンの分解をヨードデンプン反応により検出した。セルラーゼでは、多糖として 1% のカルボキシメチルセルロース (carboxymethyl cellulose, CMC) を用い、培養後にプレートを 0.1% のコンゴレッド (Congo Red) で染色、その後 0.8 M NaCl 溶液で脱色し、

CMC 分解の指標となるハローを可視化した。キシラナーゼでは、0.05% AZCL-キシランを用い誘導物質として 10 mM キシロースを添加した。AZCL-キシランの分解により青色のハローとしてキシラナーゼ活性が可視化される。マンナーゼでは、ガラクトマンナンを主成分とする locust bean gum を 0.5% の濃度で用い、培養後にエタノールを重層して高分子の多糖を沈殿させることにより、マンナーゼ活性を可視化した。なお、プロテアーゼでは 1% のカゼインプレートを用いて 37 °C で 5 日間培養し、不溶性のカゼインの分解消失を指標として活性を検出した。

(3) セルラーゼのザイモグラフィー 培養上清を 0.1% CMC を含有したゲルを用いた native-PAGE に供し、プレートアッセイと同様にコンゴレッド染色を行って活性バンドを可視化した。

(4) 酵素活性測定 前培養した菌体を誘導物質、抑制物質を含む最少培地に植菌し、37 °C で 6 時間および 12 時間培養後の培養上清の酵素活性を測定した。キシラナーゼでは誘導物質として 1% キシロース、抑制物質として 1% グルコースを用い、マンナーゼでは誘導物質として 0.5% locust bean gum、抑制物質として 1% グルコースを用いた。活性測定の基質としてはキシラナーゼでは 0.5% Azo-Xylan、マンナーゼでは 0.5% Azo-Carob Galactomannan を用い、50 mM コハク酸緩衝液 (pH 5.5) 中 40 °C で反応させた。1 単位の活性を 595 nm の吸光度を一分間に 0.1 上昇させる酵素量と定義した。

(5) 転写解析 前培養した *A. nidulans* の菌体をフィルターろ過により集菌し、炭素源を含まない最少培地でよく洗浄した後、湿重量 0.4 g の菌体を最少培地 40 mL に懸濁し、37 °C で本培養した。その後フィルターろ過で菌体を回収し、液体窒素で凍結した。凍結菌体を凍結破砕器具 SK-ミルを用いて粉砕し、TRIzol reagent を用いて total RNA を抽出した。転写解析は RT-qPCR により行った。内部標準遺伝子は actin 遺伝子 (*actA*) とし、定量対象遺伝子の *actA* に対する相対量を算出した。

4. 研究成果

(1) cAMP シグナリング経路による CreA 非依存的な CCR の発見 *creA* 遺伝子破壊株ではプレート培養においてアミラーゼ生産のグルコース抑制は解除されるものの、セルラーゼ生産は解除されない。このような違いは CreA に依存しない CCR システムの存在を示している。我々はセルラーゼ遺伝子の CCR に関わるプロテインキナーゼが存在するのではないかと考え、プロテインキナーゼ遺伝子破壊株ライブラリーを探索したところ、*pkaA* 破壊株においてセルラーゼ生産抑制が大きく解除されることを見出した。興味深いことに、*pkaA* 破壊株では *creA* 破壊株とは逆にアミラーゼ生産抑制は解除されないのに対し、セルラーゼ生産抑制は大きく解除された。PkaA は CreA の核局在を部分的に制御すると報告されていたが、この結果は CreA と PkaA が独立して CCR に関与することを示している。*pkaA* と *creA* の二重破壊株では、*pkaA* 破壊株と比較してセルラーゼ生産の指標であるハローの直径が大きくなっているため、弱いながら CreA もセルラーゼの CCR に関与していると示唆された。

cAMP 合成酵素であるアデニル酸シクラーゼ (*CyaA*) の活性は三量体 G タンパク質により制御されている。そこで、三量体 G タンパク質の α サブユニット ($G\alpha$) をコードする 3 種の遺伝子、*ganA*、*ganB*、*fadA* の CCR への関与を解析したところ、アミラーゼ生産抑制は *pkaA* 破壊株と同様にいずれの破壊でもほとんど解除されなかったが、セルラーゼ生産抑制の明らかな解除が *ganB* 破壊株で認められた。すなわち、グルコース存在下で GanB が *CyaA* を活性化して cAMP が生成し、その結果、PkaA が調節サブユニットの PkaR から解離して活性化するとセルラーゼの CCR が引き起こされると考えられた。

(2) cAMP シグナリングを介したセルラーゼ遺伝子発現のグルコース抑制 cAMP シグナリングがセルラーゼ生産の抑制に関与することが明らかとなったが、定量性に乏しいプレートアッセイの結果であるため、液体培養でのセルラーゼ遺伝子の CCR について RT-qPCR を用いて定量的に解析した。セルラーゼ遺伝子発現の誘導物質としてはセロピオースを用い、その分解を抑えるために β -グルコシダーゼ阻害剤の 2-デオキシノジリマイシン (DNJ) を添加してある。また、抑制物質としてはグルコースアナログの 2-デオキシグルコースを用いた。誘導物質、抑制物質添加から 90 分後のエンドグルカナーゼ A 遺伝子 (*eglA*) とセロピオヒドロラーゼ A 遺伝子 (*cbhA*) を解析対象の遺伝子とした。その結果、プレートアッセイと異なり、両遺伝子とも *creA* 破壊株で明らかな脱抑制が観察された。アクチン遺伝子 (*actA*) で標準化した相対転写量に換算すると、*eglA* の抑制条件下の転写量は *creA* 破壊株で親株 (WT) の 34 倍、*cbhA* では 24 倍である。しかし、非抑制条件の転写量と比べると例えば *eglA* で 14 分の 1、*cbhA* で 18 分の 1 に過ぎなかった。一方、*pkaA* 破壊株では *eglA* の抑制条件下の転写量は (WT) の 59 倍、*cbhA* では 50 倍と脱抑制の程度は *creA* 破壊株より大きい。非抑制条件と比較するとそれぞれ 7 分の 1 と 5 分の 1 であり、こちらも部分的脱抑制に過ぎなかった。プレートアッセイの結果と比較して考えると、以上の結果は培養条件の違いによって CreA と PkaA の CCR への関与の程度が変わってくる可能性を示している。二重破壊株における抑制条件下の *eglA* 転写量は親株 (WT) の 135 倍、*ganB* 破壊株では 89 倍であり、*cbhA* はそれぞれ 155 倍と 123 倍であった。しかし、

いずれの破壊株においても完全な脱抑制は見られず、最も脱抑制の程度が大きい二重破壊株でも抑制条件の転写量はどちらの遺伝子についても非抑制条件の3分の1程度にとどまった。これはほかにも独立してCCRを引き起こすシステムが存在することを示唆している。

誘導物質をボールミル粉碎セルロース (Ball Milled Cellulose; BMC)、抑制物質をグルコースとして、液体培養でのエンドグルカナーゼ生産と *eglA*, *cbhA* 発現を解析したところ、プレート培養と大きく異なり、セルラーゼ生産への各破壊の影響はほぼ逆となった。すなわち、非抑制条件下では対象株 ABU と各破壊株の間に大きな違いはないが、抑制条件下においては *creA* 破壊株で遅延しながらも *EglA*, *EglB* の生産が認められた。これに対し *pkaA* 破壊株と *ganB* 破壊株では生産は認められなかった。一方、*creA* と *pkaA* の二重破壊株では抑制条件での *EglA* と *EglB* の生産が単独破壊株より早まったため、両者は協調的かつ独立して生産抑制に関与していることは確認された。転写解析の結果も全く同様である。この結果は、プレート培養や液体培養という違いだけでなく、誘導物質の違いによっても CreA と PkaA の関与の程度が異なることを示している。セロピオースと BMC という誘導物質間での決定的な違いは、前者は直接の誘導物質であるのに対して、後者はセルロースが分解されないと誘導物質セロピオースが生成しないという点にある。セルロースからのセロピオース生成速度について各破壊株間で比較すれば、CreA による CCR と cAMP シグナリングによる CCR の違いの一端が明らかになると考えられる。

(3) グルコース以外の抑制単糖によるセルラーゼ遺伝子発現抑制 そもそも CCR とは炭素源のランキングに働くシステムであり、グルコース以外の様々な炭素源が抑制を引き起こすが、その程度は抑制炭素源の種類により異なる。そこで、*creA*, *pkaA*, *ganA*, *ganB*, *fadA* の破壊が各種単糖存在下での生育と CCR に与える影響をプレートアッセイにより解析した。まず親株の ABPU1 ではフルクトース、マンノース、キシロースが強い抑制、ガラクトースとアラビノースが弱い抑制を引き起こした。フルクトースとマンノース抑制は *creA* と *pkaA* 破壊株でわずかに、二重破壊株で大きく解除され、*ganB* 破壊株ではその中間となった。キシロースとアラビノース抑制からの CCR 解除は *pkaA* 破壊よりも *creA* 破壊で大きく、キシロースの場合では *ganB* 破壊株は中間的であった。これはペントースによる抑制では CreA の役割が非常に大きいことを示唆している。

セロピオースを誘導物質、各種単糖を抑制物質として転写解析を行った結果もプレートアッセイと類似しており、グルコース、フルクトース、マンノースは強い抑制物質で、これらに比べてキシロースは弱く、アラビノースはより弱いことが示された。*creA* 破壊株ではキシロースとアラビノースによる抑制は完全に解除され、グルコース、フルクトース、マンノースの抑制は部分的解除にとどまった。*pkaA* 破壊株ではいずれの単糖の場合も部分的解除で、二重破壊株では全てについてほぼ完全に解除された。興味深いのは *ganB* 破壊株で、PkaA の上流因子と考えられるにも関わらずいずれの抑制単糖でも *pkaA* 破壊株を超える脱抑制を引き起こした。*ganB* 破壊株での脱抑制が *pkaA* 破壊株より強いという事実は、*pkaA* の上流でシグナル伝達経路が分岐している可能性を示している。

(4) キシラナーゼ遺伝子の CCR *creA*, *pkaA*, *ganB* の破壊がグルコースとキシロース存在下でのキシラナーゼの CCR に与える影響をプレートアッセイにより比較解析した。グルコース存在下では、全ての破壊株で脱抑制が認められた。1%キシロースを誘導物質とし、1%グルコースを抑制物質とした時の液体培養でのキシラナーゼ生産解析結果でも、いずれについても明瞭な脱抑制が認められた。*creA*, *pkaA*, *ganB* の破壊の効果はほぼ同等であり、*creA* と *pkaA* や *creA* と *ganB* の二重破壊株においてさらに高い生産性が見られた。転写解析では、エンドキシラナーゼをコードする *xlnA-C* 発現への各遺伝子破壊の影響は遺伝子ごとに異なり、*xlnA* は CreA と PkaA による協調的な制御、*xlnB* と *xlnC* は主として PkaA に制御されていると考えられた。*XlnR* はキシロースに応答したキシラナーゼ遺伝子誘導を担う転写因子であり、*xlnA* と *xlnB* の CCR は CreA 依存的な *xlnR* の転写抑制の結果であると報告されている。しかし、我々の実験条件では破壊株ごとに 2-4 倍程度の発現変動はあるものの、抑制条件での転写量はどの株においても非抑制条件の3分の1から4分の1であり、*creA* を含むいずれの破壊においても明瞭な *xlnR* 発現の脱抑制は認められなかった。

(5) マンナナーゼ遺伝子の CCR *creA*, *pkaA*, *ganB* の破壊がマンナナーゼ生産の CCR に与える影響をプレートアッセイにより解析した結果では、グルコース存在下では、全ての破壊株で明瞭な脱抑制が認められた。一方、キシロース存在下では *pkaA* 破壊株で脱抑制は認められず、むしろ親株 (ABPU1) よりも低い生産量となった。液体培養では、セルラーゼ生産と極めて類似したプロファイルとなった。すなわち、多糖のローカストビーンガム (LBG, ガラクトマンナンが主成分) を誘導物質、グルコースを抑制物質とした場合に、*creA* 破壊株で生産が遅延しながらも脱抑制が見られるが、*pkaA* や *ganB* の破壊では脱抑制効果はなく、*creA* と *pkaA* の二重破壊でグルコース存在下での生産が早期に起こるという点である。転写解析では、エンドマンナナーゼをコードする *manB* と *manC* のグルコース抑制には CreA と PkaA がセルラーゼと同様に独立的に関与し、キシロースによる抑制は CreA が主要因子で PkaA は補助的に働くと考えられる結果となった。これもセルラーゼ遺伝子の場合と類似している。

(6) CCR に関わる PkaA の標的因子 上記のように、実験条件や標的遺伝子によって CCR 関連各因子遺伝子の破壊の影響が異なる。これは CCR のシステム自体の複雑性に加えて、誘導物質や抑制物質の資化による濃度変化の影響も大きく受けているためと考えられる。しかし、後者は自然界で常に起こっていることであり、だからこそ複雑な CCR システムに至ったのだと考えざるを得ない。この複雑なシステムを理解するためには、制御系をしっかりと理解しなければならない。

CCR に関わる PkaA の基質を同定するため、出芽酵母におけるプロテインキナーゼ A (PKA) の直接の基質とされるプロテインキナーゼである Yak1, Rim15 のホモログ (YakA, SrrB) や酵母の凝集に関わる遺伝子の転写抑制因子 Sfl1p ホモログ (SflA と命名) の遺伝子破壊株、グルコーストランスポーターの転写抑制因子 Rgt1 (必須遺伝子) ホモログ (AN1927) の高発現株などの解析を行ったが、いずれについても明確な CCR への関与は認められなかった。そこで、cAMP シグナリングで制御されると考えられる CCR 以外の表現型に着目した。プロテアーゼ生産である *A. nidulans* における主要菌体外プロテアーゼは PrtA だが、その遺伝子 *prtA* の発現は GanB により正に制御されると報告されている。再現性を取るためにプロテアーゼ生産に与える *ganB* 破壊と *pkaA* 破壊の影響を確認したところ、カゼインプレート上で親株 (ABPU1) ではプロテアーゼ生産を示すハローをわずかながら形成したが、確かに *ganB* 破壊株では消失し、さらには *pkaA* 破壊株でも消失していた。また、*sflA* 破壊株でのプロテアーゼ生産をプレートアッセイにより確認したところ、親株 (ABPU1) よりも生産性が向上していることが明らかとなった。*prtA* の発現解析を行ったところ、*ganB* と *pkaA* 破壊株ではほとんど発現が起こらないのに対し、*sflA* 破壊株では飢餓条件とカゼイン存在下で親株 (ABPU1) より発現量が大幅に増加していた。

出芽酵母の Sfl1p は PKA である Tpk2 によりリン酸化されると DNA 結合を失うと報告されている。SflA は Sfl1 との全体の相同性は低いがアミノ末端の DNA 結合ドメインは極めて相同性が高く、その直後に PKA のリン酸化部位と考えられる RRXS モチーフが存在する。SflA も同様な制御を受けていると仮定すると、PrtA によりリン酸化された SflA が DNA から解離し *prtA* の脱抑制が起こることになる。そこで、*ganB* と *sflA* の二重破壊株の表現型も検討することとした。プレートアッセイの結果、*sflA* の破壊はセルラーゼ生産や生産抑制に全く影響を与えなかったが、二重破壊では *ganB* 破壊株で認められていた CCR の解除が完全に消失した。転写解析においても、*ganB* 破壊株で脱抑制されていた *eglA* と *cbhA* の発現が、二重破壊株では再度 CCR の制御下となった。さらに、市販の PKA により大腸菌で生産した recombinant SflA が *in vitro* でリン酸化されることも示された。

以上の結果を総合して考えられるモデルとしては、抑制炭素源の非存在下では SflA により抑制されていた未知遺伝子が、存在下では PkaA によるリン酸化で SflA が不活性化して脱抑制が起こり、CCR が引き起こされるといえる。しかし、この未知遺伝子の産物は翻訳されれば活性を持つとは考えられない。*sflA* 破壊株や *sflA/ganB* 二重破壊株において抑制炭素源の非存在下におけるセルラーゼ遺伝子発現量低下は認められるとは言え、その低下の程度は 2 分の 1 から 3 分の 1 に過ぎないためである。未知遺伝子の産物が完全な活性を持つためには抑制炭素源の存在が必要であると考えられる。cAMP シグナリングによる CCR を理解するためにはこの未知の因子の同定が極めて重要であると考えられる。

(7) 脱コピキチン化酵素 CreB と CCR 変異や破壊によって CCR が解除されると報告されている遺伝子の一つに脱コピキチン化酵素をコードする *creB* がある。当初 CreB は脱コピキチン化により CreA を安定化するとモデルが提唱されていたが、近年 CreA と CreB は独立して CCR に関わることが示された。各種多糖分解酵素への関与を俯瞰的に見ようとする我々に類似した研究が見当たらなかったため、*creB* 破壊株についても解析を行った。グルコースを抑制炭素源としたプレートアッセイの結果、*creB* 破壊株ではアミラーゼとセルラーゼ生産の抑制解除が起こった。これは *creA*, *pkaA*, *ganB* の破壊株では認められなかった表現型である。これにより、CreA と CreB が独立して CCR に関わることが確認されるとともに、CreB が PkaA や GanB とともに独立して機能することが明らかとなった。さらに転写解析では、*creB* と *ganB* の二重破壊株で特にヘキソースによる転写抑制が相加的に解除されることも認められた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kunitake, E. Li, Y. Uchida, R. Nohara, T. Asano, K. Hattori, A. Kimura, T. Kanamaru, K. Kimura, M. Kobayashi, T.	4. 巻 65
2. 論文標題 CreA-independent carbon catabolite repression of cellulase genes by trimeric G-protein and protein kinase A in <i>Aspergillus nidulans</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Current Genetics	6. 最初と最後の頁 941-952
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00294-019-00944-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 國武絵美, 木村哲哉, 小林哲夫
2. 発表標題 <i>Aspergillus nidulans</i> におけるヘミセルラーゼ遺伝子のカーボンカタボライト抑制機構
3. 学会等名 第19回糸状菌分子生物学コンファレンス
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上條順也, 木村哲哉, 小林哲夫, 國武絵美
2. 発表標題 <i>Aspergillus nidulans</i> における出芽酵母Rgt1類似因子のカーボンカタボライト抑制への関与
3. 学会等名 第19回糸状菌分子生物学コンファレンス
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柴山智洋, 浅野圭祐, 金丸京子, 木村真, 國武絵, 小林哲夫
2. 発表標題 糸状菌 <i>Aspergillus nidulans</i> におけるプロテアーゼの生産制御
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 國武給美, 木村哲哉, 小林哲夫
2. 発表標題 Aspergillus nidulansにおけるcAMPシグナリング関連因子のヘミセルラーゼ発現抑制への関与
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 國武 給美、柴山 智洋、土谷 結衣、花井 優大、中村 真也、木村 哲哉、木村 真、小林 哲夫
2. 発表標題 糸状菌Aspergillus nidulansにおける カーボンカタボライト抑制に関わる 新奇転写因子
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 國武 給美
2. 発表標題 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
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 國武 給美 , 柴山 智洋 , 土谷 結衣 , 花井 優大 , 中村 真也2 , 木村 哲哉 , 木村 真2 , 小林 哲夫
2. 発表標題 糸状菌 Aspergillus nidulans におけるカーボンカタボ ライト抑制に関わる新奇転写因子
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 國武 絵美、木村 哲哉、小林 哲夫
2. 発表標題 Aspergillus nidulansにおけるcAMPシグナリング関連因子のヘミセルラーゼ発現抑制への関与
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 柴山 智洋、浅野 圭祐、金丸 京子、木村 真、國武 絵美、小林 哲夫
2. 発表標題 糸状菌Aspergillus nidulansにおけるプロテアーゼの生産制御
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 國武 絵美、木村 哲哉、小林 哲夫
2. 発表標題 Aspergillus属糸状菌における多糖分解酵素遺伝子の発現制御メカニズム
3. 学会等名 第19回糸状菌分子生物学コンファレンス
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上條順也、木村哲哉、小林哲夫、國武絵美
2. 発表標題 Aspergillus nidulansにおける出芽酵母Rgt1類似因子のカーボンカタボライト抑制への関与
3. 学会等名 第19回糸状菌分子生物学コンファレンス
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 玉城彰悟, 李 諾, 國武絵美, 金丸京子, 木村 真, 小林哲夫
2. 発表標題 糸状菌 <i>Aspergillus nidulans</i> におけるマンナーゼ解酵素遺伝子群の転写因子 ManS の DNA 結合特性
3. 学会等名 第18回糸状菌分子生物学コンファレンス
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 玉城彰悟, 李 諾, 國武絵美, 金丸京子, 木村 真, 小林哲夫
2. 発表標題 糸状菌 <i>Aspergillus nidulans</i> におけるマンナーゼ遺伝子の発現制御機構
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林哲夫
2. 発表標題 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
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 E. Kunitake, Y. Li, R. Uchida, T. Nohara, K. Asano, A. Hattori, T. Kimura, K. Kanamaru, M. Kimura, T. Kobayashi
2. 発表標題 Carbon catabolite repression of cellulase genes via protein kinase A pathway in <i>Aspergillus nidulans</i>
3. 学会等名 30th Fungal Genetics Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	國武 絵美 (Kunitake Emi) (30800586)	三重大学・生物資源学研究所・助教 (14101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------