

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：23803

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14380

研究課題名（和文）糸状菌におけるグルコースキナーゼによる酵素タンパク質生産制御機構の解析

研究課題名（英文）Analysis of the regulatory mechanism of hydrolase production by glucose kinase in filamentous fungi

研究代表者

田中 瑞己（Tanaka, Mizuki）

静岡県立大学・食品栄養科学部・助教

研究者番号：70803344

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：麹菌はアミラーゼをはじめとする加水分解酵素を大量に生産することから、清酒・味噌・醤油などの醸造などに利用されている。麹菌のアミラーゼ遺伝子の発現は、マルトースによって誘導されるが、グルコースが存在するとカーボンカタボライト抑制によって抑制されることが知られている。本研究では、グルコースキナーゼであるヘキソキナーゼとグルコキナーゼがグルコースによるアミラーゼ生産誘導やカーボンカタボライト抑制に関与していることを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

麹菌をはじめとする糸状菌が分泌する糖質加水分解酵素は、食品製造などに使われる産業用酵素として広く用いられている。カーボンカタボライト抑制は、これらの糖質加水分解酵素の生産量が減少する主要な原因となっている。本研究によって得られて知見は、糸状菌におけるグルコースキナーゼの加水分解酵素遺伝子発現への関与を初めて明らかとしたものであり、大きな学術的意義がある。また、糸状菌における加水分解酵素の生産量を増加させることにも繋がることから、社会的意義も大きい。

研究成果の概要（英文）：Since koji mold *Aspergillus oryzae* produces a large amount of hydrolytic enzymes such as amylase, it is used for brewing Japanese traditional fermented foods, such as sake, miso, and soy sauce. It is known that the expression of amylolytic genes in *A. oryzae* is induced by maltose, but is suppressed by carbon catabolite repression in the presence of glucose. In this study, we found that the glucose kinases, hexokinase and glucokinase, are involved in both glucose-induced amylase production and carbon catabolite repression.

研究分野：応用微生物学

キーワード：麹菌 カーボンカタボライト抑制 ヘキソキナーゼ グルコキナーゼ 糸状菌 酵素生産

1. 研究開始当初の背景

麹菌はアミラーゼをはじめとする酵素タンパク質を高生産する糸状菌であり、清酒・味噌・醤油などの醸造に用いられている。麹菌におけるアミラーゼの遺伝子発現制御機構については、マルトーストランスポーターによって菌体内に取り込まれたマルトースがイソマルトースに変換され、イソマルトースによってアミラーゼ遺伝子の発現を制御する転写因子 (AmyR) の核移行が誘導されるモデルが提唱されている。一方で、アミラーゼ遺伝子の発現は、グルコースが存在するとカーボンカタボライト抑制 (CCR) によって強く抑制される。興味深いことに、AmyR の核移行はグルコースでも誘導され、CCR を制御する転写因子 (CreA) を破壊するとグルコースを炭素源としてもアミラーゼ遺伝子の発現が誘導されることが明らかになった。これらの結果は、グルコース存在時にはアミラーゼ遺伝子の発現誘導と抑制が同時に起きていることを示している。AmyR の直接の活性化基質はイソマルトースであると考えられ、グルコースによる AmyR 活性化の分子機構と生理学的意義については全く不明である。グルコースアナログを用いた解析により、アミラーゼ遺伝子の発現と CCR は、生体内でリン酸化される 2-デオキシ-グルコースによって誘導されるのに対し、リン酸化されない 6-デオキシ-グルコースでは誘導されないことが明らかになった。このことから、アミラーゼ遺伝子の発現誘導と CCR にはいずれも、グルコースのリン酸化が関与していると考えられた。

モデル真核生物である出芽酵母では、グルコースのリン酸化を担う主要なヘキソキナーゼ (Hxk2) がグルコース濃度に応じて核内と細胞質の間を行き来しており、CCR を制御する転写因子 (Mig1) と結合することで、Mig1 の細胞内局在や DNA 結合の制御に関わっていることが明らかとされている。そのため、グルコースキナーゼが麹菌において AmyR や CreA の細胞内局在や DNA 結合を制御している可能性が考えられた。しかし、糸状菌のグルコースキナーゼについてはほとんど解析が行われておらず、遺伝子発現制御への関与は不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、麹菌のグルコースキナーゼのアミラーゼ遺伝子発現誘導と CCR への関与を明らかにし、グルコース存在時におけるアミラーゼ遺伝子発現制御の詳細な分子機構を明らかとすることを目的とした。

3. 研究の方法

麹菌にはグルコースキナーゼとして 2 つのヘキソキナーゼ (HxkA, HxkB) と 1 つのグルコキナーゼ (Gika) オーソログが存在しており、*hxkA* と *glkA* については発現が認められた。そこで、これらの遺伝子破壊株を作製し、*HxkA* と *Gika* のアミラーゼ発現誘導および CCR への関与を解析した。

4. 研究成果

(1) グルコースキナーゼの CCR への関与

麹菌において *hxkA* と *glkA* の遺伝子破壊株を作成したところ、*hxkA* 破壊株では分生子形成が著しく阻害され、フルクトースを炭素源とした培地では生育が著しく抑制された。一方、*glkA* 破壊株では生育への影響は観察されなかった (図 1)。このことから、*HxkA* と *Gika* の細胞内での機能が著しく異なることが示唆された。CCR を制御する転写因子 CreA は、グルコース存在下では安定であり、アミラーゼ生産条件であるマルトース存在下では不安定化することが明らかとなっている。グルコースキナーゼ破壊株において FLAG タグを融合した CreA を発現させ、グリセロールを炭素源とした培地で前培養した後にグルコースまたはマルトースを炭素源とした培地に移し、細胞内の CreA 存在量をウェスタン解析により比較した。その結果、*glkA* 破壊株ではグルコース培地においても CreA の存在量が著しく減少したのに対し、*hxkA* 破壊株では野生株と比較して大きな違いは見られなかった (図 2)。このことから、*Gika* は CreA の安定化に関与しているのに対し、*HxkA* は関与していないことが示唆された。

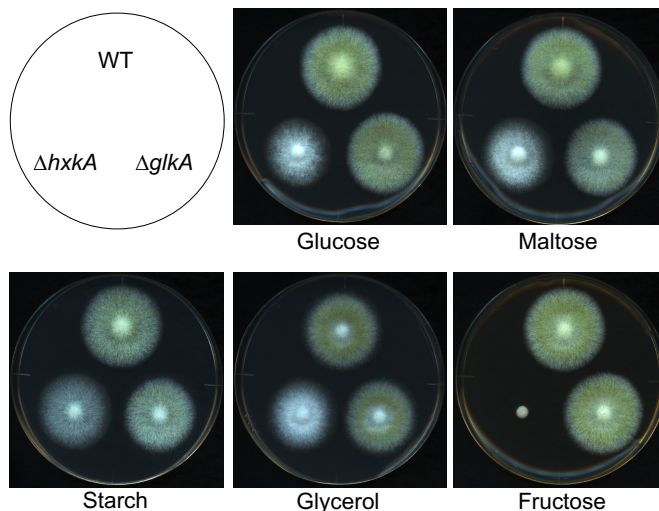


図1 グルコースキナーゼ破壊株の生育比較

麹菌のアミラーゼ遺伝子発現には、マルトーストランスポーター (MalP) によるマルトース取り込みが必要である。グルコースが存在すると、細胞膜上の MalP がユビキチン化され、エンドサイトーシス依存的に液胞に輸送されて分解されることが明らかとなっている。hxA 破壊株と glkA 破壊株において GFP 融合 MalP を発現させ、グルコース添加後の融合タンパク質および分解産物を抗 GFP 抗体によるウェスタン解析で検出した。その結果、glkA 破壊株では分解中間産物や遊離 GFP のシグナルがほとんど検出されず、GFP-MalP の分解が著しく抑制されていた。一方、hxA 破壊株では野生株と同様に GFP-MalP が速やかに分解されていた (図 3)。このことから、GlkA はグルコースによって引き起こされる MalP エンドサイトーシスの誘導に必要であるのに対し、HxA はこのエンドサイトーシスに必要でないことが示唆された。

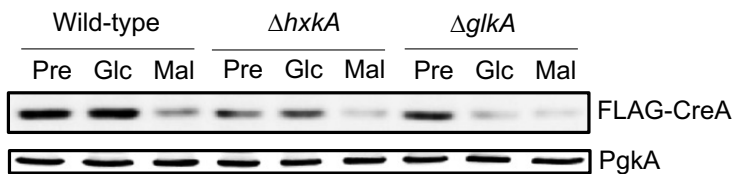


図2 グルコースキナーゼ破壊株におけるFLAGタグ融合CreAのウェスタン解析

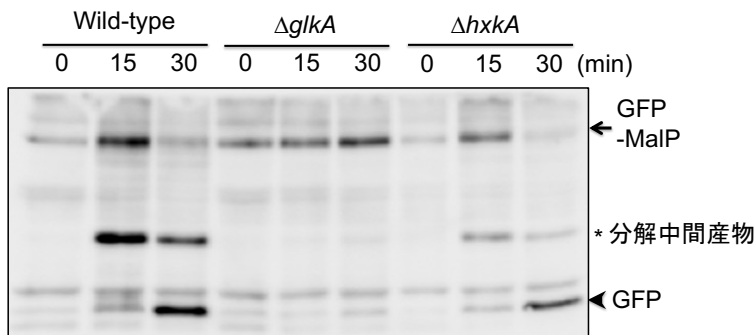


図3 グルコースキナーゼ破壊株におけるGFP融合MalPのウェスタン解析

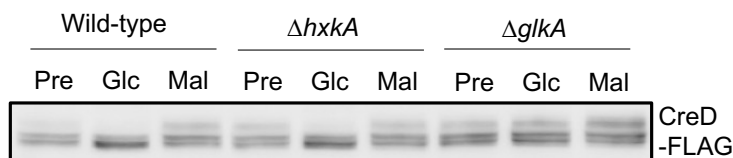


図4 グルコースキナーゼ破壊株におけるFLAGタグ融合CreDのウェスタン解析

アレクチン様タンパク質

CreD は、MalP のユビキチン化に必要であり、グルコースが存在すると速やかに脱リン酸化されることが明らかとなっている。hxA 破壊株と glkA 破壊株において FLAG タグ融合 CreD を検出した結果、glkA の破壊によって CreD の脱リン酸化が著しく抑制されていることが明らかとなった (図 4)。

以上の結果から、麹菌のグルコース存在条件下におけるアミラーゼ遺伝子の発現抑制には、GlkA が中心的な役割を担っていることが示唆された。

(2) グルコースキナーゼのα-アミラーゼ発現誘導への関与

グルコースによるα-アミラーゼ遺伝子発現誘導におけるグルコースキナーゼの関与を調べるため、creA との二重破壊株を作製し、YPD 培地におけるα-アミラーゼ生産を調べた。その結果、hxA と creA の二重破壊株では、creA の単独破壊株よりもα-アミラーゼの生産量が低下した。一方、glkA と creA の二重破壊株では、creA の単独破壊株よりもα-アミラーゼの生産量が増加した。このことから、グルコースによるα-アミラーゼ遺伝子発現誘導には、GlkA ではなく HxA が関与していることが示唆された。

(3) アミラーゼの細胞壁吸着へのグルコースキナーゼの関与

麹菌が培地中に分泌したα-アミラーゼの一部は、麹菌の細胞壁に吸着されることが知られている。アミラーゼは細胞壁の構成多糖であるキチンに吸着し、同じく細胞壁の構成多糖であるα-1,3-グルカンによってキチンへのアミラーゼの吸着が阻害されることが示唆されている。hxA 破壊株と glkA 破壊株において YPD 培地におけるα-アミラーゼの生産量を調べた結果、hxA 破壊株では野生株や glkA 破壊株と比較して細胞壁に吸着されているα-アミラーゼの割合が著しく増加しており、分泌されたα-アミラーゼの 90%以上が細胞壁に吸着されていることが示された (図 5)。さらに、細胞壁構成多糖の1つであるβ-1,3-グルカンに吸着するコンゴレッドに対する感受性を調べた結果、hxA 破壊株は野生株よりも強い感受性を示した。これらの結果から、hxA 破壊株では細胞壁に含まれるα-1,3-グルカンの量が減少し、キチンやβ-

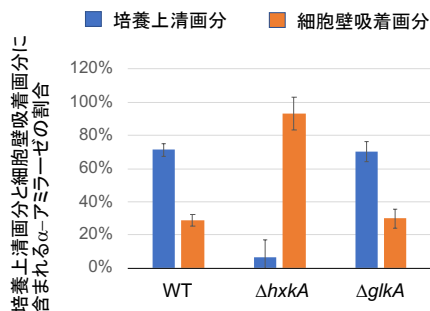


図5 グルコースキナーゼ破壊株における培養上清画分と細胞壁吸着画分に含まれるα-アミラーゼの割合

1,3-グルカンの露出量が増加している可能性が示唆された。 α -1,3-グルカンの合成には、グルコース-6リン酸が必要であると予想されることから、*hxA* の破壊によってグルコース-6リン酸の生成量が減少している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Mizuki Tanaka, Katsuya Gomi	4. 巻 12
2. 論文標題 Induction and repression of hydrolase genes in <i>Aspergillus oryzae</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Front. Microbiol.	6. 最初と最後の頁 677603
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2021.677603	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 田中瑞己	4. 巻 225
2. 論文標題 麹菌が生産する加水分解酵素とその遺伝子発現制御機構	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FFIジャーナル	6. 最初と最後の頁 160-168
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 田中瑞己	4. 巻 98
2. 論文標題 麹菌のアミラーゼ生産のグルコース依存的な抑制機構	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 生物工学会誌	6. 最初と最後の頁 186～190
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 Tanaka Mizuki, Ichinose Sakurako, Shintani Takahiro, Gomi Katsuya	4. 巻 110
2. 論文標題 Nuclear export-dependent degradation of the carbon catabolite repressor CreA is regulated by a region located near the C-terminus in <i>Aspergillus oryzae</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Microbiology	6. 最初と最後の頁 176～190
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/mmi.14072	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7件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 田中瑞己
2. 発表標題 黄麹菌における加水分解酵素遺伝子の発現制御機構
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中 瑞己、藤田 翔貴、河原崎 泰昌、新谷 尚弘、五味 勝也
2. 発表標題 麹菌におけるカーボンカタボライト抑制を制御する脱コピキチン化酵素CreBによるアレスチン様タンパク質CreDの発現制御
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 田中瑞己
2. 発表標題 グルコースによる麹菌アミラーゼ生産抑制におけるグルコキナーゼの関与
3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中瑞己
2. 発表標題 麹菌のグルコース依存的アミラーゼ生産抑制におけるグルコキナーゼの関与
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 田中瑞己
2. 発表標題 麹菌のカーボンカタボライト抑制制御に関わるアレスチン様タンパク質CreDの発現量制御機構
3. 学会等名 日本農芸化学会大会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中瑞己
2. 発表標題 グルコースによる麹菌アミラーゼ生産の抑制機構
3. 学会等名 第70回日本生物工学会大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tanaka Mizuki、Ichinose Sakurako、Kawarasaki Yasuaki、Shintani Takahiro、Gomi Katsuya
2. 発表標題 The 20 amino acid region located near the C-terminus of carbon catabolite regulator CreA is critical for rapid degradation of CreA in <i>Aspergillus oryzae</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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------