

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05777

研究課題名(和文)糸状菌多糖分解酵素遺伝子発現誘導因子を介した情報伝達ネットワークの解明

研究課題名(英文) Analysis of signaling network controlling the expression of carbohydrate-degrading enzyme genes in filamentous fungi

研究代表者

谷 修治 (Tani, Shuji)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：80405357

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、セルラーゼ生産糸状菌 *Aspergillus aculeatus* における糖質加水分解酵素遺伝子の発現機構を解明することを目的とし、特に我々が同定した4種の新規制御因子(ClbR, Uge5, DppIV, SrpkF)の作用機序を解析した。これまでに転写因子ClbRが転写を活性化する部位の限定、UDP-glucose 4-epimerase活性を有すUge5がセルロース分解酵素だけでなくマンナン分解酵素の遺伝子発現制御に関わること、DppIVのジペプチジル活性がセルラーゼ遺伝子の発現制御に関わること、SrpkFの推定リン酸化ドメインの改変により酵素発現量が亢進されることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物細胞壁を構成する多糖を酵素により分解し、得られた糖から有用物質を生産する技術は、持続可能な社会基盤を構築することに資する技術として注目されている。この技術革新に向けて改善すべき課題の一つに酵素生産コストの削減があげられる。本研究でたんぱく質リン酸化酵素の機能を改変することで、酵素生産を誘導するための物質がない条件化でも酵素生産を促進することを可能にした。本研究成果は、酵素生産コスト削減に資するものである。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to elucidate the regulation mechanism of carbohydrate-degrading enzyme genes in *Aspergillus aculeatus*, especially to analyze the mode of action of four novel factors, ClbR, Uge5, DppIV, and SrpkF. The research was conducted in the following areas. We have restricted the domain in ClbR involved in the transcription activation. We revealed that Uge5, which has UDP-glucose 4-epimerase activity, is involved in the regulation of gene expression of mannanase as well as cellulolytic enzymes, that the dipeptidyl activity of DppIV is involved in the regulation of cellulase gene expression, and that the cellulase gene expression is regulated by the dipeptidyl activity of DppIV. We also found that modification of the putative phosphorylation domain of SrpkF enhanced the enzyme expression level in *A. aculeatus*.

研究分野：応用微生物学

キーワード：遺伝子発現制御 糸状菌 酵素生産

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

糸状菌における炭素源に応答した多糖分解酵素遺伝子群の発現は、グルコースなど資化しやすい糖が存在すると抑制される。このカーボンカタボライト抑制に関与する因子を破壊すると誘導条件下での各種酵素遺伝子の発現量は亢進するが、非誘導条件下での遺伝子発現量は変わらない。即ち、酵素遺伝子の発現誘導には、グルコースなど糖のない炭素源枯渇条件下でセルロースなどの誘導物質により遺伝子発現誘導経路が活性化されることが必須である。糸状菌における多糖分解酵素遺伝子群の発現誘導は、制御因子間の協調と競合により巧妙且つ複雑に制御されている。この遺伝子発現誘導機構は、分解しづらいセルロースを含む植物バイオマスを分解するために、必要以上に多糖酵素を生産してエネルギーを浪費しないための効率の良いシステムであると考えられる。しかし、植物バイオマスの完全酵素糖化に必要な多糖分解酵素の生産工場として糸状菌を利活用するためには、この巧妙な遺伝子発現誘導機構は大きな障壁となる。

申請者は、独自に構築した T-DNA 挿入変異株ライブラリから多糖分解酵素遺伝子の発現を制御する因子を探索し、新規制御因子を同定した。研究開発当初、転写因子 cellobiose response regulator (CibR)、Dipeptidyl peptidase IV (DppIV)、Serine-arginine protein kinase F (SrpKF) や UDP-glucose 4-epimerase (Uge5) が炭素源に応答した遺伝子発現制御に関与している事を見出していた。また、各因子の機能を多面的に解析する事で、SrpKF が塩ストレス応答、DppIV が酸化ストレス応答に関与している知見を得ていた。

### 2. 研究の目的

本研究では、

- i) 申請者が新たに同定した多糖分解酵素遺伝子の発現制御因子とその相互作用因子が構築する情報伝達ネットワークを解明する事
- ii) 制御因子の機能改変による酵素高生産技術開発に向けた分子基盤を構築する事を目的とした。

### 3. 研究の方法

i) 転写因子 CibR による選択的遺伝子発現制御機構の解明：セルロース存在下で遺伝子発現を誘導する因子として CibR が同定された。CibR の部分欠失タンパク質を作出し、CibR の機能発現に関わるドメインを限定する。

ii) Uge5 が関与する選択的遺伝子発現制御機構の解明：*uge5* 遺伝子の破壊により、転写因子 ManR を介したセルロースに応答した遺伝子発現量は低下した。Uge5 の反応産物に着目し、反応産物量と遺伝子発現量との関連を定量的に解析する。また、転写因子 ManR を介した選択的遺伝子発現制御に、ManR と相互作用する未同定の転写因子が関与していると想定している。ManR と同様にガラクトマンナンとセルロース資化に関わる酵素遺伝子の発現を制御する因子を同定し、その機能を解析する。

iii) DppIV の機能解析：DppIV によるセルラーゼ誘導及び酸化ストレス応答に、ジペプチジルペプチダーゼ活性が必要か検証する。野生型ならびに触媒残基を改変した変異型リコンビナント DppIV を大腸菌、あるいは酵母を宿主に発現し、合成基質を用いて活性を測定する。次に、野生型および変異型 DppIV を発現する *A. aculeatus* を作製し、各株におけるセルラーゼ遺伝子発現能と酸化ストレス応答能を定量的に評価する。また、DppIV が関与する情報伝達経路を限

定するため、コントロール株、*dppIV* 破壊株、*dppIV* 高発現株における遺伝子発現量を RNA-seq により網羅的に解析する。

iv) SrpkF の機能解析: *srpkF* 破壊株 ( $\Delta srpkF$ ) では、転写因子 ManR を介したセルロースにตอบสนองした遺伝子発現量が低下する。予備実験により、SrpkF は異なる 2 種の転写因子 ManR と XlnR を介した選択的遺伝子発現を制御する事が示唆された。*A. aculeatus* を種々の炭素源を用いて培養し、ManR と XlnR により制御される酵素遺伝子発現に与える SrpkF 破壊や SrpkF 高発現の影響を定量的に評価する。また、SrpkF-C 末端部分欠損株は塩ストレス感受性を示す。SrpkF が関与する炭素源応答経路および塩ストレス応答経路を限定する。

#### 4 . 研究成果

- i) 転写因子 ClbR のドメイン解析を行い、C 末端部分に転写活性化に関わる領域があることを見出した。
- ii) Uge5 がセロビオース、マンノビオース、キシロースにตอบสนองした遺伝子発現制御に関与していることを見出した。また、Uge5 が関わる遺伝子発現を制御する因子として転写因子様タンパク質を新たに同定した。この因子は、セルロースにตอบสนองした遺伝子発現の主要制御因子である ManR と同一経路で作用していることを遺伝学的解析から明らかにした。また、Uge5 の反応産物が酵素遺伝子発現に抑制的に作用することが示唆された。今後、反応産物の作用機序を解明する計画である。
- iii) Dipeptidyl peptidase IV (DppIV) がセルロースにตอบสนองした糖質加水分解酵素の遺伝子発現と酸化ストレス応答に関与しており、その応答に DppIV のペプチダーゼ活性が寄与していることが示唆された。現時点では、DppIV の基質の同定には至っておらず、また、これまでに糸状菌において知られている酸化ストレス応答経路に DppIV が関与しているデータも得られていない。DppIV が未知の応答経路を介して遺伝子発現を制御していることも念頭におき、引き続き研究を継続する必要がある。
- iv) Serine-arginine protein kinase F (SrpkF) が、セルロースにตอบสนองした遺伝子発現および胞子形成と菌糸伸長の制御に関わることを発見した。SrpkF の推定リン酸化部位を改変した SrpkF を発現する株では、誘導物質がなくても酵素遺伝子の発現が亢進されることを見出した。また、改変 SrpkF 高発現株ではグルコース抑制が一部解除されており、10mM グルコース添加条件下でも遺伝子の発現が抑制されなかった(図 1)。この抑制解除が非誘導条件下における酵素遺伝子発現の亢進に寄与しているものと考えられた。以上の成果は、糖質加水分解酵素の大量生産系構築につながる知見である。

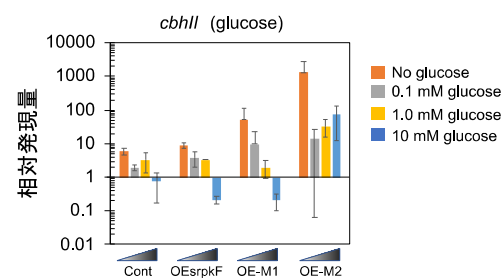


図1. 改変SrpkF高発現株における遺伝子発現量の定量。Cont, コントロール株; OEsrpkF, *srpkF*高発現株; OE-M1, 改変SrpkF高発現株1; OE-M2, 改変SrpkF高発現株2。OE-M1とOE-M2の変異は異なる。0.5 mM mannobiose 存在下で遺伝子の発現を誘導するとともに、示した濃度のグルコースを添加した場合の *cbhII* 発現量を定量した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Katayama Ryohei, Kobayashi Natsumi, Kawaguchi Takashi, Tani Shuji	4. 巻 68
2. 論文標題 Serine-arginine protein kinase-like protein, SrpKF, stimulates both cellobiose-responsive and d-xylose-responsive signaling pathways in <i>Aspergillus aculeatus</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Genetics	6. 最初と最後の頁 143 ~ 152
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00294-021-01207-x	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 Yoshimura Yuko, Tani Shuji, Fujiwara Maki, Nakamura Makoto, Sumitani Jun-ichi, Kawaguchi Takashi	4. 巻 131
2. 論文標題 Biogenic manganese oxides combined with 1-hydroxybenzotriazol and an Mn(II)-oxidizing enzyme from Pleosporales sp. Mn1 oxidize 3,4-dimethoxytoluene to yield 3,4-dimethoxybenzaldehyde	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 475 ~ 482
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2020.12.014	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 Tsumura Ryosuke, Sawada Kazumi, Kunitake Emi, Sumitani Jun-ichi, Kawaguchi Takashi, Tani Shuji	4. 巻 105
2. 論文標題 A component of the septation initiation network complex, AaSepM, is involved in multiple cellulose-responsive signaling pathways in <i>Aspergillus aculeatus</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Applied Microbiology and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 1535 ~ 1546
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00253-021-11110-7	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 源健太郎, 小林夏実, 谷修治, 炭谷順一, 川口剛司
2. 発表標題 Elucidation of the morphogenetic mechanism of <i>Aspergillus aculeatus</i> serine-arginine protein kinase-like protein, SrpKF
3. 学会等名 糸状菌分子生物学研究会若手の会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 澤田 和美, 津村亮介, 炭谷 順一, 谷 修治, 川口 剛司
2. 発表標題 Aspergillus aculeatus SepMを介したセルラーゼ遺伝子発現制御機構の解明
3. 学会等名 セルラーゼ研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 角谷 朝香, 炭谷 順一, 谷 修治, 川口 剛司
2. 発表標題 Aspergillus aculeatus における ManR を介した選択的遺伝子発現制御に関わる転写因子の探索
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 小林夏実, 片山涼介, 炭谷順一, 谷修治, 川口剛司
2. 発表標題 SprkF participates in the early phase of induction in response to cellulosic carbon sources in Aspergillus aculeatus
3. 学会等名 Asian Mycology Congress 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 澤田 和美, 津村亮介, 炭谷 順一, 谷 修治, 川口 剛司
2. 発表標題 Aspergillus aculeatus SepMの形態形成およびcell wall integrity 経路への関与
3. 学会等名 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 谷 修治, 角谷 朝香, 炭谷 順一, 川口 剛司
2. 発表標題 糸状菌 <i>Aspergillus aculeatus</i> における uge5 破壊はカーボンカタボライト抑制を解除する
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

TANI@OMU <a href="https://www.omu.ac.jp/agri/shuji_j/">https://www.omu.ac.jp/agri/shuji_j/</a>
---

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