

令和 6 年 5 月 16 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K15731

研究課題名（和文）糸状菌転写因子ClrBとMcmAの協調によるセルラーゼ遺伝子発現誘導の分子機構

研究課題名（英文）Molecular mechanisms of cellulase gene induction by cooperation of transcription factors ClrB and McmA in filamentous fungi

研究代表者

國武 絵美（Kunitake, Emi）

三重大学・生物資源学研究科・准教授

研究者番号：30800586

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、*Aspergillus nidulans*においてセルラーゼ遺伝子の転写誘導メカニズムの解明を目的として、転写因子ClrBの活性化機構、ClrBと協調作用を示す転写因子McmAとの相互作用、またClrBとそのパラログによるセルラーゼ・マンナーゼ遺伝子発現制御について解析した。その結果、ClrBはセロビオース依存的に核移行することを明らかにし、核内でMcmAと相互作用することを示唆する結果を得た。また、ClrBの核移行制御や安定性に関わる領域を特定した。さらにin vitro解析においてClrBとそのパラログが同時に結合するDNA配列を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究においてモデル糸状菌*Aspergillus nidulans*のセルラーゼの生産制御メカニズムの一端を明らかにし、糸状菌の炭素源資化に関して学術的意義のある成果を得た。また、植物細胞壁分解酵素は植物バイオマスの分解に資する酵素として市場価値が高く、糸状菌はそれら酵素の供給源として注目されていることから、本研究成果は効率的な酵素生産方法の技術開発においても重要な基盤情報となると考えている。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to elucidate the mechanisms of transcriptional induction of cellulase genes in *Aspergillus nidulans*. We analyzed the activation mechanism of the cellulase gene-specific transcriptional activator ClrB, interaction between ClrB and McmA, a transcription factor that cooperatively regulates cellulase genes, and regulation of cellulase and mannanase gene expression by ClrB and its paralog. The results showed that ClrB translocates into the nucleus in a cellobiose-dependent manner, and suggested that ClrB interacts with McmA in the nucleus. We also determined the regions involved in the regulation of nuclear localization and stability of ClrB. Furthermore, DNA sequences to which ClrB and its paralog bind simultaneously were found by in vitro analysis.

研究分野：応用微生物学

キーワード：糸状菌 *Aspergillus nidulans* 遺伝子発現制御 転写因子 セルラーゼ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

糸状菌はセルロース系バイオマス分解酵素の主要な供給源であり、産業利用における酵素生産コストの低減化に向けて、その生産制御機構の解明が重要である。セルラーゼ遺伝子の発現は培地中にセルロース由来の低分子糖が存在するときに誘導されるが、その分子機構の詳細については不明な点が多く残されている。先行研究において、モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* において、セルラーゼ遺伝子の転写活性化には $Zn(II)_2Cys_6$ 型転写因子 ClrB が必須であり、また、MADS-box 転写因子 McmA との協調作用が重要であることを明らかにした¹⁾。ClrB は構成的に高発現させてもセルロース性物質非存在下ではセルラーゼの生産を誘導しないことから²⁾、ClrB の活性が誘導物質によって制御されていると推測している。また、過去の研究により *A. nidulans* には ClrB にはパラログ ManS が存在し、マンナーゼ遺伝子の主要転写活性化因子として機能することを明らかにしている。一方で、ClrB も部分的にマンナーゼの発現に関与することや、ManS が ClrB 依存的な遺伝子発現を抑制することあるいはその逆の現象も見出されており、ManS と ClrB 間に協調・競合作用が存在していることが示唆されていた。

以上のように、セルラーゼ(およびマンナーゼ)遺伝子の転写誘導には複数の転写因子が関与しており、それらの作用メカニズムを明らかにすることは学術的にも応用的観点からも重要な課題である。

1) Li N, et al., *Mol Microbiol.* 102:810–826 (2016)

2) Coradetti ST, et al., *Microbiologyopen* 2:595–609 (2013)

2. 研究の目的

本研究では、*A. nidulans* においてセルラーゼ遺伝子の転写誘導メカニズムを解明するため、複数の転写因子による制御機構を明らかにすることを目的とした。特に、転写活性化を担う転写因子 ClrB と McmA の相互作用について示すことを目的とし、その一環として、ClrB の活性制御機構を明らかにするため、ClrB の細胞内局在性や機能ドメインの解析を行うことにした。また、ClrB と ManS による遺伝子発現制御に関する知見を得ることを目的として、ManS の活性制御機構の解明のために細胞内局在性を解析し、ManS と ClrB の DNA 結合様式についても解析した。

3. 研究の方法

(1) ClrB の細胞内局在性と安定性の解析

ClrB の細胞内局在性を明らかにするため、GFP 融合 ClrB (GFP-ClrB) を発現する株を作出した。*clrB* 自身のプロモーターでは GFP 蛍光を検出できなかったため、高発現かつアミンで制御可能な *A. oryzae* 由来 *thiA* プロモーターを使用して GFP-ClrB を発現させた。グリセロールを単一炭素源として前培養した菌体を炭素源を含まない最小培地、グルコースやセロビオースを炭素源として含む最小培地に移して経時的に培養し、その後蛍光顕微鏡観察を行った。また、GFP 抗体を用いてウェスタンブロット解析を行い、ClrB を検出した。

(2) ClrB の機能ドメイン解析

ClrB は N 末端側に存在する DNA 結合ドメイン内に推定核移行シグナル(NLS)が存在するので、該当の塩基性アミノ酸をアラニンに置換した GFP-ClrB を作出した。また、C 末端側および内部を欠失した様々な部分欠失体を作成した。研究の方法 3 - (1)と同様に蛍光顕微鏡観察とウェスタンブロット解析を行い、ClrB の機能に関わる領域を調べた。

(3) ClrB と McmA の相互作用解析

Yeast two hybrid 法 (Y2H) により、ClrB と McmA の相互作用について解析した。また Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) により *in vivo* における相互作用を検出するため、ClrB に YFP の C 末端側を、McmA に YFP の N 末端側を融合し (それぞれ YFPC-ClrB、YFPN-McmA とする)、これらを共発現する株を作出して蛍光顕微鏡観察を行った。さらに、GFP-ClrB あるいは FLAG タグと Strep タグを融合した ClrB と、V5 エピトープタグを融合した McmA を共発現させ、共免疫沈降法 (co-IP) を行い、その後ウェスタンブロット解析により ClrB と McmA の検出を行った。

(4) McmA との相互作用タンパク質の検出

V5 エピトープタグを付加した McmA を発現する株を用いて、V5 抗体を用いた免疫沈降を行った。SDS-PAGE により沈降物に含まれるタンパク質を検出した。

(5) ClrB と ManS によるセルラーゼ・マンナーゼ遺伝子発現制御

ManS の細胞内局在性を調べるため、*A. oryzae thiA* プロモーター制御下で mRFP を融合した ManS (mRFP-ManS) を発現する株を作出した。これをグリセロールを単一炭素源として前培養した後、炭素源を含まない最小培地、グルコース、セロビオース、マンノビオースをそれぞれ単一炭素源として用いた最小培地に移行し、蛍光顕微鏡を用いて mRFP-ManS の細胞内局在性を観察

した。また、大腸菌で発現させて精製した組換え ManS と ClrB を用いて Electrophoresis Mobility Shift Assay (EMSA)を行った。

4. 研究成果

(1) ClrB の細胞内局在性と安定性の解析

GFP-ClrB を発現する株は野生株と同等のセルラーゼ生産性を示した。この株を用いて、ClrB の細胞内局在性を解析した結果、グルコースやグリセロールなどを炭素源とした培地では GFP-ClrB は細胞質に存在したが、セロピオースを炭素源とした培地では培地交換後 10 分程度で核に移行した。セロピオースとグルコースが共存してもセロピオース単独の際と同様の挙動を示したことから、セロピオースに応答した核移行制御が存在することが示された。経時的に GFP-ClrB を観察したところ、グルコースでは GFP-ClrB の挙動に変化はなかったが、セロピオースでは 1 時間後には蛍光シグナルが弱まり、かつ細胞全体に広がることが分かった。ウェスタンブロッティングにより GFP-ClrB を検出すると、グルコースでは一定のシグナル強度があった一方で、セロピオースでは 1 時間後からシグナルが失われていくことが明らかとなった。以上より、ClrB のセロピオース依存的な分解機構が存在することが示唆された。

(2) ClrB の機能ドメイン解析

変異解析により、N 末端側に存在する推定核移行シグナルが機能することを明らかにした。C 末端部分を切除すると転写活性化能が失われ、さらに常に核に局在するようになった。また、C 末端欠失体はセロピオースで培養しても安定的に存在した。以上より、ClrB の C 末端領域に転写活性化と核移行制御、安定性に関わるドメインが存在することが明らかとなった。

(3) ClrB と McmA の相互作用解析

Y2H: これまで、大腸菌で作製した組換え ClrB と McmA を用いた共免疫沈降法では相互作用を検出できていなかった。大腸菌では全長の ClrB を発現させることが困難だったため、今回 Yeast two hybrid 法を使って酵母菌体内での全長 ClrB と McmA の相互作用の検出を試みた。しかし、明確な相互作用を示すレポーター遺伝子の発現を確認することが出来ず、あったとしても非常に微弱であった。セルラーゼ遺伝子プロモーター上に存在するセルロース応答エレメントには ClrB モノマーと McmA ダイマーが結合すると考えられており、本手法ではこれらの相互作用を示すことは困難である可能性が高いと考えられた。

BiFC: YFPC-ClrB と YFPN-McmA を共発現する株を用いて蛍光顕微鏡観察を行った結果、YFP 蛍光が核において見られた。

co-IP: McmA に対して免疫沈降を行った後 ClrB を検出するためのウェスタンブロット解析を行ったが、ClrB は検出されなかった。同様に ClrB に対して免疫沈降を行った後のウェスタンブロット解析でも McmA は検出されず、本項で行った方法では ClrB と McmA の相互作用を示すことが出来なかった。

ClrB はセロピオースに反応して核移行するが (研究成果 4 - (1))、McmA は常に核に局在することが過去に明らかになっている。今回の結果と合わせると ClrB と McmA は核内の DNA 上で相互作用していると推測される。これを明らかにするためクロマチン免疫沈降を試みたが、達成には至らなかった。また、の YFPC-ClrB/YFPN-McmA 共発現株が 1 株しか単離できず、使用した菌株も予期せぬ表現型を示していた。そのため、引き続き解析を継続して ClrB と McmA が相互作用することを確固たるものとし、両者による協調制御機構の解明を目指す。

(4) McmA との相互作用タンパク質の検出

MADS-box タンパク質は相互作用する転写因子を変えて、様々な生物学的機能に関与する。そこで、McmA と相互作用する新たな因子を探索することを目的として、本研究を実施した。V5-McmA を用いた免疫沈降により、相互作用すると考えられるタンパク質が検出された。

(5) ClrB と ManS によるセルラーゼ・マンナーゼ遺伝子発現制御

mRFP-ManS 発現株を用いた解析により、ManS は ClrB とは異なり、常に核に局在していることが示唆された。これより、ManS の機能調節は、*manS* 遺伝子の転写制御や、局在性の変化以外の転写後調節によると考えられる。

ClrB と ManS はマンナーゼ遺伝子の発現を協調的に制御あるいは抑制的に働く。そこで、マンノピオース存在下での GFP-ClrB の細胞内局在を調べたところ、GFP-ClrB はセロピオースと同様に核移行することが明らかとなった。これは、ClrB がマンナン性基質存在下でマンナーゼの発現制御に関与することと合致し、ClrB と ManS が同時に働く可能性が支持された。

ClrB と ManS の協調制御に関して、DNA 結合の点から明らかにするため EMSA を行った。まず、ManS の結合配列を明らかにするため、マンナーゼ遺伝子 *manB*, *manC*, *manE* のプロモーターを用いて解析し、特定の配列を同定した。次に、ClrB と ManS に協調的に制御される *manB* と *manC* において ClrB と ManS 両方を用いた EMSA を行い、CGG/CCG が集合する配列に 2 つの転写因子が結合することを見出した。今後は ClrB と ManS が競合的に働くと考えられる遺伝子についても解析を進め、ClrB と ManS の関係性についての詳細を明らかにしていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 Kunitake Emi, Uchida Ryota, Asano Keisuke, Kanamaru Kyoko, Kimura Makoto, Kimura Tetsuya, Kobayashi Tetsuo	4. 巻 12
2. 論文標題 cAMP signaling factors regulate carbon catabolite repression of hemicellulase genes in <i>Aspergillus nidulans</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 AMB Express	6. 最初と最後の頁 126
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13568-022-01467-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 國武 絵美	4. 巻 62
2. 論文標題 糸状菌におけるセルロース・ヘミセルロース分解酵素遺伝子の発現制御機構	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 化学と生物	6. 最初と最後の頁 246-252
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1271/kagakutoseibutsu.62.246	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12件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Haruno Watanabe, Nuo Li, Kyoko Kanamaru, Makoto Kimura, Tetsuya Kimura, Tetsuo Kobayashi, Emi Kunitake
2. 発表標題 Transcription factor ManS regulates mannanase gene expression in <i>Aspergillus nidulans</i>
3. 学会等名 32nd Fungal Genetics Conference（国際学会）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 深田文香、内田祐衣、木村哲哉、國武絵美
2. 発表標題 <i>Aspergillus nidulans</i> におけるセルラーゼ遺伝子特異的転写因子ClrBの機能ドメイン解析
3. 学会等名 第22回糸状菌分子生物学コンファレンス
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 深田文香、内田祐衣、木村哲哉、國武絵美
2. 発表標題 Aspergillus nidulans におけるセルラーゼ遺伝子の転写活性化因子ClrB の細胞内局在解析
3. 学会等名 2023年度日本農芸化学会 中部・関西支部合同大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 千原菜緒, 國武絵美, 三宅英雄
2. 発表標題 微生物熱測定法における定量的MIC の算出と固体培養における微生物増殖過程の評価
3. 学会等名 2023年度日本農芸化学会 中部・関西支部合同大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 千原菜緒, 國武絵美, 三宅英雄
2. 発表標題 熱測定法による麹菌の固体培養における増殖過程の評価とポリフェノール類存在下での大腸菌増殖抑制効果の定量的解析
3. 学会等名 第59回熱測定討論会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 竹内束沙、西村しおり、國武絵美、木村哲哉
2. 発表標題 嫌気性細菌Clostridium paraputrificumのピルビン酸代謝経路の遺伝学的解析とバイオ水素ガス生産への応用
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 南部秀斗、南川香奈江、國武絵美、木村哲哉
2. 発表標題 嫌気性細菌 <i>Clostridium paraputrificum</i> の酸化還元電位をモニターするグローバル転写制御因子Rexの機能解析とバイオリファイナリーへの応用
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中野群士、瀬古樹、吳暁君、出口絵梨佳、國武絵美、木村哲哉
2. 発表標題 嫌気性細菌 <i>Clostridium paraputrificum</i> M21のキチン分解酵素遺伝子群の機能解析と発現制御
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西村 しおり、竹内 束沙、國武 絵美、木村 哲哉
2. 発表標題 <i>Clostridium paraputrificum</i> のピルビン酸ギ酸リアーゼ遺伝子の解析と水素ガス生産への応用
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 國武絵美、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 <i>Aspergillus nidulans</i> 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（招待講演）
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 日本農芸化学会中部支部第188回例会（招待講演）
4. 発表年 2020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