

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20380048

研究課題名(和文)

転写因子群の協調と競合によるバイオマス分解酵素の生産制御

研究課題名(英文)

Regulation of biomass-degrading enzymes via interaction of transcription factors

研究代表者：

小林 哲夫 (KOBAYASGI TETSUO)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：20170334

研究成果の概要(和文)：

バイオマス分解酵素の生産に関する転写因子の解析を行い以下の成果を挙げた。1) *A. oryzae* マンナン、セルロース分解酵素の生産制御に関わる ManR ならびに *A. nidulans* のセルロース分解酵素の生産制御に関わる CelR の同定、2) DNA マイクロアレイによる AraR、ManR 制御下遺伝子の同定、3) XlnR の D-キシロース依存的かつ可逆的リン酸化の発見、4) XlnR と AraR により協調的に制御される遺伝子ならびに競合的に制御される遺伝子の同定、5) 広域転写因子 McmA のセルラーゼ生産制御への関与の証明。

研究成果の概要(英文)：

Researches on transcription factors involved in production of biomass-degrading enzymes led to 1) identification of ManR and CelR that regulate production of mannolytic and cellulolytic enzymes in *A. oryzae* and cellulolytic enzymes in *A. nidulans*, respectively, 2) identification of target genes of AraR and ManR, 3) discovery of D-xylose-dependent reversible phosphorylation of XlnR, 4) identification of genes cooperatively regulated and those competitively regulated by XlnR and AraR, and 5) elucidation of involvement of McmA in cellulase regulation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
2009年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
総計	11,400,000	3,420,000	14,820,000

研究分野：微生物学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：菌類、発現制御、バイオマス、応用微生物、遺伝子

1. 研究開始当初の背景

石油資源の枯渇や地球温暖化の問題を抱える現代社会において、植物性バイオマスの有効利用は早期に実現すべき課題である。しかし、性急なバイオエタノールの実用化は、エネルギー需要と食糧需要との競合を生み出し、食糧と競合しない農産廃棄物や木質などの効率的糖化技術の開発に目が向けられている。糖化技術には酸糖化と酵素糖化がある。前者は、低コストで大規模な実用化に最

も近いが使用済みの酸の処理に問題を抱え、後者は、環境負荷は少ないが酵素をいかに低コストで生産するか課題がある。

デンプンや油分などの食糧として利用される貯蔵性成分を除くと、植物性バイオマスの大半を占めるのは細胞壁多糖である。細胞壁多糖の主成分はセルロースであり、これを取り巻くように、様々な修飾基を持ち化学的構造が複雑なペクチン、ヘミセルロース(キシランやグルコマンナン)、非多糖成分であ

るリグニンが存在する。細胞壁は、これらの高分子が物理的に複雑に絡まった構造を持ち、しかも、物理的構造や化学的構成成分は種や組織により異なっている。このような複雑な細胞壁を効率的に酵素糖化するには、第一に、すべての成分を分解するための極めて多種に上る酵素が必要であり、第二に、対象バイオマスの物理・化学的構造に応じた、適切な酵素組成が必要である。研究代表者らの先行研究では、セルラーゼに加えて、キシラン、ペクチン、さらに植物種によってはマンナン分解酵素群の添加を行えば、生の樹皮薄片のかなりの部分を前処理無しで分解できることが認められ、生の植物性バイオマスの効率的酵素糖化の実現には、これら分解酵素群の極めて低コストでの大量生産が必須であると考えられた。

多糖の分解酵素群を同時に高生産するためには、転写活性化因子を標的とした分子育種が効率的である。研究代表者らは、麹菌 *Aspergillus oryzae* におけるキシラナーゼ遺伝子の転写活性化因子 XlnR を同定し、*A. oryzae* のゲノム情報に基づく DNA マイクロアレイ解析により、XlnR 高発現が 35 種のキシラン、セルロース分解酵素遺伝子の高発現を引き起こすことを明らかにしていた。その中には、キシランの側鎖や修飾基の分解に関与する全ての酵素遺伝子が含まれており、多糖分解の効率化には、転写活性化因子を標的とした分子育種が有効であると考えられた。この手法を応用すれば、様々な多糖分解酵素群を効率的に生産できると考えられる。しかし、研究当初、ペクチンやグルコマンナン分解酵素群の転写活性化因子 (PecR, ManR)、XlnR 非依存性のセルラーゼ誘導に関与する転写因子 (CelR) は未同定であった。一方、研究代表者らは多糖分解酵素生産の制御メカニズムの複雑さも明らかにしつつあった。例えば、Hap 複合体や McmA などの広域転写因子もセルラーゼ遺伝子の発現に関与するし、キシランやペクチンの側鎖として存在するアラビナンの分解に関与する転写活性化因子 AraR は、キシラナーゼ遺伝子 *xynG2* の発現を負に制御する。さらに、XlnR の下流には 2 種の未知転写制御因子 TcxA, TcxB も存在していた。自然界において糸状菌は、XlnR, AraR, CelR, TcxA, TcxB, PecR, ManR, Hap 複合体、McmA などの直接的、間接的な協調と競合により、存在する植物性バイオマスの物理的・化学的構造に応じて、適切な分解酵素群を生産していると考えられ、従って、細胞壁分解酵素群の低コスト大量生産の実現には、PecR, ManR, CelR の同定と転写制御の全体像の理解が必須であると結論した。

2. 研究の目的

本研究では、糸状菌における植物細胞壁分解酵素群の転写制御因子を同定し、同定されたそれぞれの転写因子について、支配下の分解酵素群を明らかにするとともに、転写因子間の競合的相互作用や転写因子の階層構造に関する解析を行い、糸状菌による細胞壁分解を転写制御の観点から総合的に理解することを目的とした。

具体的には、1) セルロース、ペクチン、グルコマンナン分解酵素遺伝子群の転写活性化因子 (CelR, PecR, ManR) の同定、2) CelR, PecR, ManR, AraR 制御下の分解酵素群の同定、3) XlnR, AraR による転写活性化の分子機構解明、4) XlnR と AraR の競合によるキシラナーゼ遺伝子の転写制御メカニズムの解明、5) XlnR を頂点とし TcxA, TcxB を介した階層的転写制御メカニズムの解明、6) 広域転写因子 McmA と CelR によるセルラーゼ遺伝子の競合的転写制御メカニズムの実証、を目標とした。

3. 研究の方法

目標項目の 1)、2) は野田産業科学技術研究所との共同研究である。1) については、分解酵素のプレートアッセイを検出法として、*A. oryzae* の転写因子破壊株ライブラリーのスクリーニングを行い、2) では DNA マイクロアレイ解析を行った。3) に関しては、転写因子をタグで標識し、誘導、非誘導条件下での動態を免疫学的手法により追跡した。4) では、XlnR, AraR 破壊株における遺伝子発現を定量的 RT-PCR により解析、5) では、TcxA, TcxB の発現を半定量的 RT-PCR で確認するとともに、これらの破壊株の作製とそのバイオマス資化能への影響を解析した。6) については McmA のセルラーゼ生産への関わりを、セルラーゼ生産、定量的 RT-PCR を指標として確認するとともに、EMSA による DNA 結合配列の決定を行った。

4. 研究成果

1) マンナン分解酵素遺伝子、セルラーゼ分解酵素遺伝子の転写活性化因子 ManR, CelR の同定 (野田産業科学技術研究所との共同研究)

A. oryzae 転写因子破壊株ライブラリーのスクリーニングの結果、グルコマンナンを単一炭素源とする培地でマンナナーゼ非生産株が同定された。この破壊株はセルラーゼ生産能にも欠損が見られた。破壊されている遺伝子は Zn(II)₂Cys₆ 型の転写因子をコードしており、ManR と命名された。

A. oryzae はセルラーゼ生産能がもともと微弱であり、ManR 破壊の影響が見にくい。そこで *A. nidulans* における ManR オルソログ遺伝子を破壊し、そのマンナナーゼ、セル

ラーゼ生産に与える影響を解析したところ、*A. nidulans* においてはセルラーゼ生産能の完全な消失が見られるのに対し、マンナナーゼ生産性には大きな変化は観察されなかった。以上の結果は、*A. oryzae* においては ManR と CelR は同一の因子であり、*A. nidulans* においてはこれが CelR として機能することを示唆している。おそらく、*A. nidulans* はマンナナーゼ遺伝子の転写活性化因子を別に有していると考えられる。

この状況は XlnR 相同因子についても認められる。XlnR 相同因子は *A. oryzae* では AraR のみであるが、*A. nidulans* や *A. niger* では GalA というもう一種の転写因子が存在する。GalA はガラクトース資化に関与するが、*A. oryzae* におけるガラクトース資化は AraR が制御するという予備的なデータを得ている。また、*A. oryzae* や *A. niger* にはプロテアーゼ生産を制御する PrtR (*A. niger* では PrtT) が存在するが、*A. nidulans* には存在しない。これらの事実は、転写因子の応用を目指す際には、種間の違いを十分に考慮する必要があることを示している。

なお、当初目標とした PecR の同定には至らなかった。

2) AraR, ManR 制御下の分解酵素群の同定 (野田産業科学技術研究所との共同研究)

A. oryzae AraR 制御下遺伝子の同定においては、DNA マイクロアレイにより、L-アラビノースにより 5 倍以上誘導される遺伝子 386 遺伝子と AraR の破壊により発現量が 1/5 以下に低下する遺伝子 182 遺伝子を同定し、この積集合を求めた。その結果 55 遺伝子が同定された。この中には L-アラビノース代謝に関与する L-arabinose reductase、L-arabinitol dehydrogenase、L-xylulose reductase などが含まれていたため、この DNA マイクロアレイの結果は信頼に値すると思われる。55 遺伝子の内訳はグリコシドヒドロラーゼ (GH) 遺伝子が 16 種、トランスporter 遺伝子が 7 種、代謝系遺伝子が 16 種、機能未知が 16 種であった。GH16 種には、アラビナンの分解に関与する 3 種だけでなく、ヘミセルロースからの D-ガラクトースや L-ラムノースの遊離に関与するグリコシダーゼが含まれており、AraR がヘミセルロースの修飾糖の加水分解に関与することが示唆される。また、代謝系遺伝子の中にはガラクトース代謝に関与する遺伝子が含まれており、AraR が L-アラビノース代謝だけでなく、D-ガラクトース代謝にも関与することが示唆された。

A. oryzae ManR 制御下遺伝子の同定においては、DNA マイクロアレイにより、グルコマンナン存在下における野生株と ManR

破壊株、野生株と ManR 高発現株の比較を行った。その積集合から上位 20 位以内に、マンナン分解に関与するマンナナーゼ遺伝子 2 種、マンノシダーゼ遺伝子 2 種が含まれており、また、プレートアッセイの結果と一致して、セルロース分解に関与するセロビオヒドロラーゼ遺伝子 1 種、β-グルコシダーゼ遺伝子 1 種が含まれていた。同様な検討をカルボキシメチルセルロースを炭素源として用いて行ったところ、上記分解酵素に加えてエンドグルカナーゼ遺伝子 1 種、セロビオヒドロラーゼ遺伝子 2 種がさらに検出された。ここで同定されたエンドグルカナーゼ遺伝子は、XlnR 制御とされたエンドグルカナーゼ遺伝子とは異なるものである。一方、セロビオヒドロラーゼ遺伝子、β-グルコシダーゼ遺伝子は XlnR 制御下のものと一致した。

3) XlnR, AraR による転写活性化の分子機構解明

XlnR と AraR は相同因子であり、異なる遺伝子の転写活性化に関与するため DNA 結合ドメインの相同性は比較的低い、それ以外の部分の相同性はかなり高い。従って、類似のメカニズムにより制御されていると考えられる。

タグとして c-myc を融合した XlnR を用いて、誘導、非誘導条件下における XlnR の動態を Western blotting により解析した結果、D-キシロースによる誘導条件下において、XlnR が何らかの修飾を受けており、また、この修飾は可逆的で D-キシロースの除去により修飾基が除去されることが明らかとなった。転写因子の修飾基としてリン酸化の可能性を検証するため、Phosphate-affinity SDS-PAGE により解析した結果、XlnR は非誘導条件下においてレベルの異なるリン酸化を受けたタンパク質の混合物として存在し、D-キシロース添加により速やかに付加的なリン酸化を受けることが明らかとなった (図 1)。図には示さないが D-キシロースを

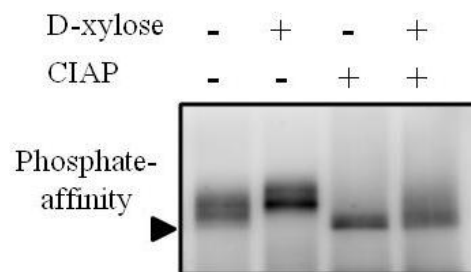


図1 XlnRのリン酸基修飾

除去すると、XlnR のリン酸化は非誘導条件下のレベルに低下した。XlnR 制御下遺伝子の転写は付加的リン酸化に遅れて検出された。従って、付加的リン酸化を受けた XlnR

が転写活性化を行っていることになる。

付加的リン酸化の役割については、核移行制御、DNA 結合の制御、DNA 上でのコアクティベーターとの相互作用の制御などが考えられる。GFP 融合 XlnR を用いた検討では、少なくとも核移行には関与しない、すなわち、D-キシロースの有無に関わらず XlnR は常に核に存在するというデータを有していたが、この融合 XlnR は制御下遺伝子の転写活性化能が低下していたため、信頼性に多少問題があった。そこで、誘導、非誘導条件下における XlnR の DNA 結合能を Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) により解析したところ、D-キシロースの有無により DNA 結合能に変化がないこと、すなわち、DNA 結合能は付加的リン酸化の影響を受けないことが明らかとなった。さらに、クロマチン免疫沈降 (ChIP) により解析したところ、XlnR は誘導、非誘導いずれの条件下においても DNA に結合していることが示された。従って、XlnR は常に DNA 上においてリン酸化により活性の制御がなされていると考えられる (図 2)。このリン酸化がどのような役割を有しているかは今後の検討課題であるが、例えばコアクティベーターとの相互作用に関与するなどの可能性がある。

なお、AraR に関しては下記に述べるように DNA 結合配列の決定を行った。

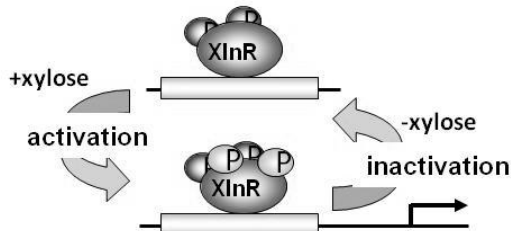


図2 XlnRの活性制御モデル

4) XlnR と AraR の協調と競合

AraR 破壊株において、XlnR 制御下遺伝子である *xynG2* 遺伝子産物が L-アラビノース誘導により大量生産されるという現象が観察されていた。これはいくつかの点で不思議な現象である。すなわち、XlnR が L-アラビノースをセンスするかという問題、AraR は XlnR と競合して *xynG2* 発現に負に働くかという問題、XlnR 制御下の分泌酵素は 35 種存在する中、なぜ XynG2 のみが高発現するかという問題などが生じた。

XlnR 破壊株、AraR 破壊株、XlnR/AraR 二重破壊株を用いて、複数の制御下遺伝子について解析した結果、破壊の影響は遺伝子によって異なることが明らかとなった。なお、解析対象とした遺伝子はいずれも二重破壊株ではほとんど発現しなかったため、これら

の転写因子のみによって制御されていると考えられる。単一遺伝子の破壊では、その影響はおおまかに 3 種に分類された。一方の転写因子のみに依存する遺伝子、両転写因子が協調的に働く遺伝子、ならびに競合的に働く遺伝子である。

これらの結果を十分に理解するには AraR の結合配列の同定が必須であると考えられたため、AraR 制御であることが最も明確な L-arabinose reductase 遺伝子のプロモーターを対象とし、EMSA により結合領域の解析を行い、上流-379 までに 2 カ所結合配列が存在することを明らかにした。AraR 制御の他の遺伝子との比較から、結合配列候補としては CGGN(T/A)AA が考えられる (図 3)。

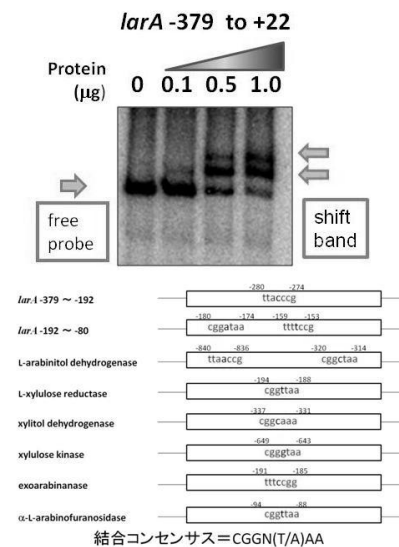


図3 AraR結合配列の同定

5) XlnR を頂点とし TcxA、TcxB を介した階層的転写制御メカニズムの解明

DNA マイクロアレイ解析の結果、XlnR 制御下の遺伝子候補として転写因子をコードする二つの遺伝子 (*tcxA*, *tcxB*) が同定された。これは XlnR を頂点とした階層的転写制御メカニズムの存在を示唆している。DNA マイクロアレイ解析では確認とは言えないため、半定量的 RT-PCR により確認したところ、*tcxA* は XlnR 制御ではないことが示される一方で、*tcxB* は部分的ながら XlnR 依存性が認められた。そこで、これら遺伝子の破壊株の解析を試みた。その結果、*tcxA* 破壊株は多糖の分解性や糖の資化性において野生株との差異は認められなかった。一方、*tcxB* 破壊株の取得はできなかった。これは *tcxB* が必須遺伝子であることを示唆している。

6) 広域転写因子 McmA によるセルラーゼ遺伝子の制御メカニズム

A. nidulans のエンドグルカナーゼ A 遺伝子 (*eglA*) プロモーターの転写活性化配列に

は出芽酵母 *Mcm1p* の結合コンセンサスが存在しているため、オルソログである *McmA* の関与を疑い、*McmA* 変異株を作製した。本変異株の詳細な解析を行ったところ、セルラーゼ生産能の低下が見られ、Real time PCR において、*eglA*、*eglB*、*cbhA*、*cbhC* などのセルラーゼ遺伝子の発現量が大幅に低下していた。また、*eglA* プロモーター断片をプローブとした EMSA により、*McmA* が予測した配列に結合することを確認した。しかし、その DNA 結合親和性は低く、また結合コンセンサスを持たない DNA 断片にも僅かながら結合した。*Mcm1p* は単独ではなく、他の転写因子と複合体を形成して機能することが知られており、おそらく *CelR* との相互作用により結合配列に対する親和性が向上すると考えられる。上記のように *A. nidulans* の *CelR* が同定されたため、今後 *McmA* との相互作用解析を行う予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

① Noguchi Y, Tanaka H, Kanamaru K, Kato M, Kobayashi T (2011) Xylose triggers reversible phosphorylation of XlnR, the fungal transcriptional activator of xylanolytic and cellulolytic genes in *Aspergillus oryzae*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 75: 953-959. (査読有)

② Noguchi Y, Sano M, Kanamaru K, Ko T, Takeuchi M, Kato M, Kobayashi T (2009) Genes regulated by AoXlnR, the xylanolytic and cellulolytic transcriptional regulator, in *Aspergillus oryzae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 85: 141-54. (査読有)

[学会発表] (計 12 件)

① 渥美元規, 野口祐司, 小川真弘, 金丸京子, 加藤雅士, 小山泰二, 小林哲夫, 麴菌におけるペントース代謝系とその制御、日本農芸化学会 2011 年度大会、2011 年 3 月 (震災のため講演中止となったが要旨集の出版をもって発表済みの取り扱い)、京都

② 石川周平, 野口祐司, 金丸京子, 加藤雅士, 小林哲夫, 麴菌転写因子 XlnR の誘導物質依存的な修飾とその生理的意義、日本農芸化学会 2011 年度大会、2011 年 3 月 (同上)、京都

③ 山川陽平, 遠藤良知, 金丸京子, 加藤雅士, 小林哲夫, Aspergillus nidulansにおけるセルラーゼ遺伝子の転写制御、日本農芸化学会 2011 年度大会、2011 年 3 月 (同上)、京都

④ 山川陽平, 遠藤良知, 金丸京子, 加藤雅士, 小林哲夫, Aspergillus nidulansにおけるセルラーゼ遺伝子の発現制御機構、第 10 回糸状菌分子生物学コンファレンス、2010 年 11 月、広島

⑤ Kobayashi T, Transcriptional regulation of genes involved in hemicellulose and cellulose utilization in *Aspergillus oryzae*. Special Interest Group Meeting at 9th International Mycological Congress, 2010 年 8 月, Edinburgh, UK

⑥ Kobayashi T, Noguchi Y, Atsumi M, Ogawa M, Kanamaru K, Koyama Y, Pentose catabolism and its regulation in *Aspergillus oryzae*, 2010 年 8 月, Edinburgh, UK

⑦ 小川真弘, 高橋 理, 町田雅之, 小林哲夫, 小山泰二, 麴菌マンナン加水分解酵素群転写制御因子はセルラーゼ遺伝子群も制御する、日本農芸化学会 2010 年度大会、2010 年 3 月、東京

⑧ 渥美元規, 野口祐二, 金丸京子, 加藤雅士, 小林哲夫, 麴菌におけるペントース代謝、第 9 回糸状菌分子生物学コンファレンス、2009 年 11 月、東京

⑨ Noguchi Y, Kanamaru K, Kato M, Kobayashi T, Post translational modification of AoXlnR, a key transcriptional regulator of biomass-degrading enzymes in *Aspergillus oryzae*. 25th Fungal Genetics Conference at Asilomar, 2009 年 3 月, Asilomar, USA

⑩ 小川真弘, 戸田智美, 徳岡昌文, 高橋 理, 小林哲夫, 町田雅之, 小山泰二, 麴菌マンナンゼ転写制御因子 manR のスクリーニングと機能解析、日本農芸化学会 2009 年度大会、2009 年 3 月、福岡

⑪ 金田貴詳, 小川真弘, 野口祐司, 金丸京子, 加藤雅士, 小山泰二, 小林哲夫, DNA マイクロアレイによる AoXlnR2 制御下遺伝子群の網羅的同定、第 8 回糸状菌分子生物学コンファレンス、2008 年 11 月、金沢

⑫ 野口祐二, 金丸京子, 加藤雅士, 小林哲夫, 糸状菌転写因子 AoXlnR の翻訳後修飾、第 60 回日本生物工学会大会、2008 年 8 月、仙台

[図書] (計 1 件)

① Kobayashi T, Kato M (2010). *Transcriptional Regulation in Aspergillus. Aspergillus: Molecular Biology and Genomics*. M. Machida and K. Gomi. Norfolk, Caister Academic Press, 85-114.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 哲夫 (KOBAYASHI TETSUO)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授
研究者番号：20170334

(2) 研究分担者

加藤 雅士 (KATO MASASHI)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・准教授
(転出のため 2009 年度まで)
研究者番号：70242849
金丸 京子 (KANAMARU KYOKO)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・助教
研究者番号：00420365

(3) 連携研究者 なし
()

研究者番号：