

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2010～2013

課題番号：22248007

研究課題名(和文)糸状菌のバイオマス分解酵素生産制御機構と代謝経路の包括的解明

研究課題名(英文)Comprehensive analyses of regulatory mechanisms associated with hydrolytic enzyme production and metabolic pathway involved in biomass degradation in filamentous fungi

研究代表者

五味 勝也(Gomi, Katsuya)

東北大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：60302197

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 36,000,000円、(間接経費) 10,800,000円

研究成果の概要(和文)：(1) 転写因子AmyRの誘導基質特異的な核移行と不安定性の一方で、MaIRの構成的核局在および誘導基質存在下での安定性を明らかにした。AmyRとシャペロンであるHsp70およびHsp90との複合体形成を明らかにした。(2) マルトーストランスポーターMaIPのグルコース存在下におけるエンドサイトーシス依存的な分解に関わる制御マシナリーとしてユビキチンリガーゼHulAとアレスチン様タンパク質CreDの関与を明らかにした。(3) DNAマイクロアレイによる標的遺伝子の網羅的同定、候補遺伝子産物の発現と基質特異性の解析などを通して、麹菌におけるペントース代謝系酵素遺伝子を全て同定した。

研究成果の概要(英文)：(1) Transcription factor AmyR was localized to nucleus and significantly unstable in the presence of inducer, but MaIR showed constitutive nuclear localization and stability irrespective of carbon sources. AmyR was associated with chaperons Hsp70 and Hsp90. (2) Maltose transporter MaIP was targeted to the vacuole after addition of glucose. Both HECT ubiquitin ligase HulA and arrestin-like protein CreD are required for glucose-induced endocytosis of MaIP. In addition, pull-down analysis using CreD-3FLAG and WW domains of HulA fused to GST indicated that CreD could interact with HulA via WW domains. (3) Comprehensive screening of genes involved in pentose metabolism was performed by transcriptome analysis, and enzymatic properties of candidate gene products were analyzed, which resulted in the complete elucidation of the pentose metabolic pathway in *Aspergillus oryzae*.

研究分野：遺伝子発現制御

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：糸状菌 バイオマス 転写制御 トランスポーター エンドサイトーシス 細胞内局在 ペントース代謝 転写因子

1. 研究開始当初の背景

糸状菌は多種類のバイオマス分解酵素を生産する能力を有しており、糸状菌由来の酵素はその有用性から酵素産業で大きな市場を占めている。バイオマスの分解により生成する多種多様な低分子は、ほとんど全て糸状菌のエネルギー源となる。これは、酵母と一線を画す糸状菌の特性であり、酵母がグルメであるのに対し糸状菌は悪食であると言われる所以でもある。多種多様な低分子を利用する糸状菌の能力は、高度に発達したバイオマス分解酵素の生産機構と基質代謝経路の存在を示唆するものであり、近年の糸状菌ゲノム情報の整備によりその輪郭が見えるようになった。ゲノム情報によると、糸状菌は極めて多数のバイオマス分解酵素遺伝子を有しており、例えば、麹菌のグリコシルヒドロラーゼ遺伝子は 200 遺伝子を超える。その構成から、自然界のほとんど全ての多糖、オリゴ糖を完全に単糖まで分解できると考えられる。

これまで申請者らは、*Aspergillus* 属糸状菌のバイオマス分解酵素遺伝子の発現制御機構の解明を目指し、数々の転写因子を解析してきた。すなわち、デンプン分解に関与する AmyR と MalR、キシラン分解に関与する XlnR をはじめとし、アラピナン分解 (AraR)、セルロース分解 (AcaK、McmA)、マンナン分解 (ManR)、タンパク質分解 (PrtR) などの転写因子である。これら転写因子の機能ならびに発現解析から、分解酵素の生産は転写因子のタンパク質レベルでの活性化を介して誘導されることが示唆されている。また、転写因子活性化には高分子分解の結果生じる低分子の誘導基質の細胞内取込みが重要であり、例えばアミラーゼ生産にはマルトーストランスポーターが必要であることが明らかになっている。トランスポーターや低分子の分解物の代謝系遺伝子はバイオマス分解酵素生産を制御する転写因子の制御下にあることが期待されるが、実際 XlnR についてはキシローストランスポーター候補とキシロース代謝系遺伝子すべてがその制御下に存在していた。これは AraR についても同様であり、アラピノーストランスポーター候補遺伝子、既知のアラピノース代謝系遺伝子、アラピノース代謝に必要なが未同定のアラピノースレダクターゼ、L-キシロースレダクターゼ遺伝子候補が制御下に存在していた。

このように申請者らは、糸状菌における多種類のバイオマス分解酵素生産に関わる転写因子やその代謝系を精力的に解析してきたが、それぞれの酵素生産の制御機構や分解産物の代謝経路の包括的な理解のためには、従来までのそれぞれを「点」とする解析による理解では不十分である。バイオマスの分解から基質低分子の取込み、そしてその代謝系までを一連のエネルギー代謝経路として捉え、さらに、その全体の制御機構を理解する

ことが必要と考え、本基盤研究を提案したものである。

2. 研究の目的

糸状菌の最大の特徴である高度に発達したバイオマスの分解・代謝系に関して、分解酵素生産制御の分子機構からバイオマス構成成分 (バイオマス分解産物) の代謝まで包括的に解明することを目的とし、麹菌 *Aspergillus oryzae* とモデル糸状菌の *A. nidulans* を対象に、各種バイオマス分解酵素生産に必要な誘導基質の細胞内取込み系の同定とカタボライト抑制下における分解制御機構の解明、分解酵素遺伝子の誘導発現に関わる転写因子の活性化機構の解明、酵素機能に基づくバイオマス由来低分子の代謝系酵素の同定を行う。その成果を基に、転写制御情報を含む詳細なバイオマス分解・代謝マップの構築につなげる。

3. 研究の方法

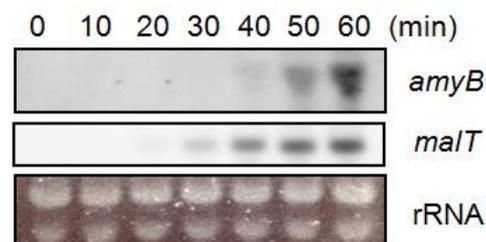
(1) 転写因子 AmyR および MalR について、シャペロン複合体形成と誘導基質との相互作用による転写活性化機構を解明する。(2) バイオマス構成成分トランスポーターのカタボライト抑制条件下におけるエンドサイトーシス経路による調節的分解機構を細胞生物学・生化学的手法を駆使して解析する。(3) バイオマス由来低分子のトランスポーター候補をトランスクリプトーム解析により探索し、その遺伝子の破壊ならびに取込み活性測定によって特異的なトランスポーターを同定する。(4) ヘミセルロース由来低分子 (ガラクトース、マンノース、ラムノース、グルクロン酸、ガラクツロン酸など) の代謝系遺伝子候補をトランスクリプトーム解析によって探索し、それらの酵素化学的諸性質の解析ならびに遺伝子破壊の影響を詳細に調べることにより詳細な代謝マップの構築を図る。

4. 研究成果

(1) デンプン分解酵素生産に関わる転写因子の活性化機構の解析

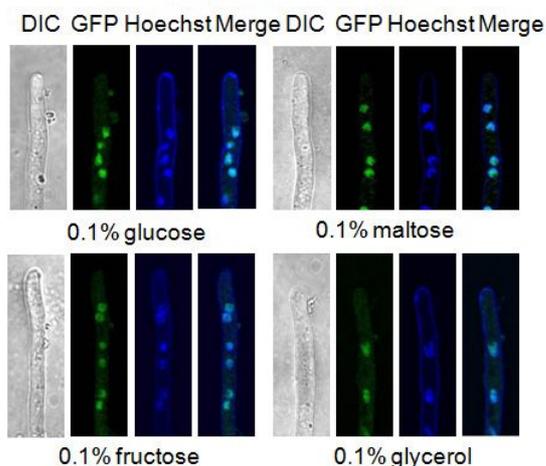
MalR はマルトーストランスポーター MalP の正の転写制御因子であり、MalP によって細胞内に取り込まれたマルトースが AmyR を活性化してアミラーゼ生産を誘導すると考えられることから、はじめに MalR 支配下の *malT* 遺伝子と AmyR 支配下の *amyB* 遺伝

図 1 *amyB* と *malT* の経時的発現解析



子のマルトース誘導後の経時的発現についてノーザン解析を行った(図1)。その結果、*amyR* の発現に先立って *malT* の発現が認められたことから、予想された通り、MalR 支配下の遺伝子の発現に引き続いて AmyR が活性化してアミラーゼ生産に至ることが示された。そこで、AmyR と MalR をそれぞれ GFP と融合させたタンパク質を発現させ、マルトース添加による経時的核移行過程を蛍光顕微鏡により観察し、マルトース添加後の MalR の核移行が AmyR に先行して起こるか調べた。興味深いことに、MalR は炭素源の如何にかかわらず常に核局在しているが(図2) AmyR はマルトースだけでなく、グルコースによっても核移行することが明らかとなった。MalR は構成的に核に局在していて、細胞内に取り込まれた僅かなマルトースによって速やかに活性化され、*malP* の発現を誘導することでマルトース取込みを促進し、AmyR の活性化に引き続いてアミラーゼ生産が盛んに進むというモデルが考えられた。

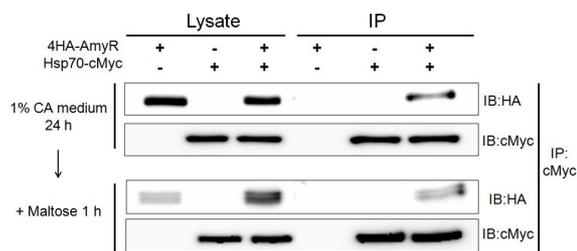
図2 MalRの構成的な核局在



また、タグ化した AmyR と MalR を用いてグルコースまたはマルトース存在下における安定性を調べたところ、興味深いことに、AmyR はいずれの糖においても不安定で速やかに分解されるのに対して、MalR は誘導基質であるマルトースが存在しても非常に安定であることが認められた。一方、酵母のマルトース資化遺伝子クラスターの転写因子 MAL63 では、HSP90 など 3 種類のシャペロンの複合体形成を経てマルトースによる転写活性化が起こることが最近判明した。AmyR 及び MalR は Zn finger motif の高い相同性と誘導基質がマルトースであるという点で MAL63 との類似性が高いことから、麹菌ゲノムから検索されたシャペロン複合体構成ホモログと AmyR 及び MalR との相互作用を調べたところ、Hsp70 および Hsp90 と AmyR が相互作用することが明らかとなった(図3)。

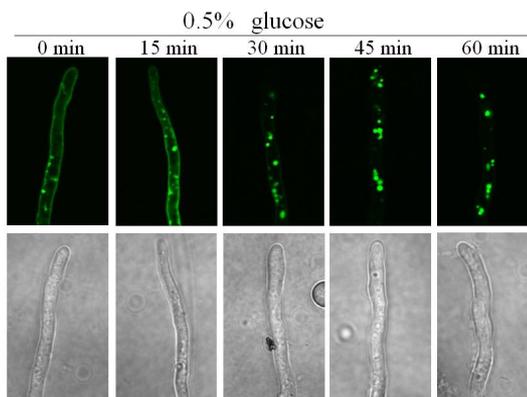
(2) マルトーストランスポーターのグルコース存在下における分解制御機構の解析

図3 AmyRとHsp70との共免疫沈降



誘導基質であるバイオマス由来低分子の取込みに関わるトランスポーターは一般的に転写レベルでカタボライト抑制を受けるだけでなく、タンパク質レベルでも分解制御を受けているものと予想される。そこで、現在のところ唯一機能が明らかになっている麹菌のマルトーストランスポーターMalP について、GFP との融合タンパク質を作製し、マルトースとグルコースの存在下での細胞表面における局在様式を蛍光顕微鏡で観察した。その結果、マルトース存在下では細胞膜に蛍光が認められたが、炭素源をグルコースに変換後は速やかに液胞へ移行することが観察され、MalP タンパク質はエンドサイトーシスによる細胞膜から液胞へ輸送されて分解が起こるものと考えられた(図4)。

図4 MalPのグルコース存在下における液胞への移行

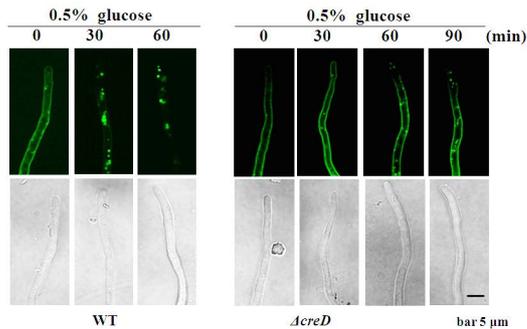


さらに、MalP のエンドサイトーシスに影響する炭素源について調べたところ、グルコースの他にマンノースとグルコースのアナログである 2-デオキシグルコースによって速やかに液胞への移行が観察された。他方で、キシロースやグルコースアナログの 6-デオキシグルコースや 3-メチルグルコースでは速やかな液胞への移行は観察されなかった。

出芽酵母では、膜トランスポーターが分解を受ける際にアレスチン様タンパク質がアダプターとして働き、ユビキチンリガーゼ Rsp5 が膜タンパク質をユビキチン化することによりエンドサイトーシス依存的な分解が生じることが知られている。麹菌をはじめとする *Aspergillus* では、グルコース抑制に関与する転写抑制因子のユビキチン化に関わるアレスチン様タンパク質として CreD が知られていることから、CreD が MalP のグルコース存在下でのエンドサイトーシスに関与

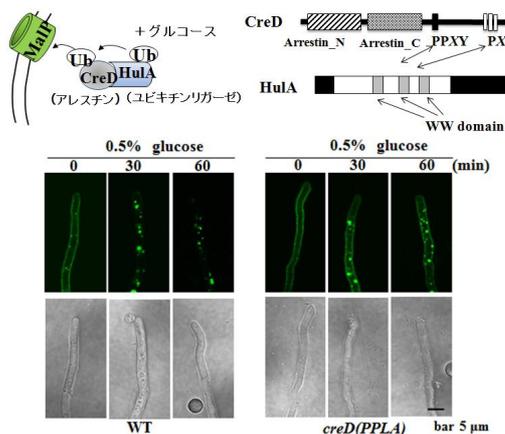
するかどうか、*creD* 破壊株を作製して解析した。その結果、図 5 に示すように、CreD を欠損することで MalP のエンドサイトーシス依存的な分解が抑制されることが明らかになった。

図 5 $\Delta creD$ 株におけるMalP-GFPの液胞への移行抑制



さらに、酵母 Rsp5 の麹菌オーソログ HulA の条件的抑制株においても、MalP のエンドサイトーシスが抑制されたことから、MalP はグルコース存在下で CreD を介して HulA によりユビキチン化を受け、エンドサイトーシスによって液胞に輸送されて分解されるものと考えられた。一方、酵母における Rsp5 と CreD オーソログの Rod1/Art4 に関する研究から、HulA が CreD を介してターゲットの膜タンパク質をユビキチン化するためには、CreD の PPXY モチーフと HulA の WW ドメインとの相互作用が必要と考えられた。そこで、CreD の PPXY モチーフの変異体を作製して MalP のエンドサイトーシスへの影響を調べたところ、CreD の変異体では MalP のエンドサイトーシスが抑制されることが分かった (図 6)。

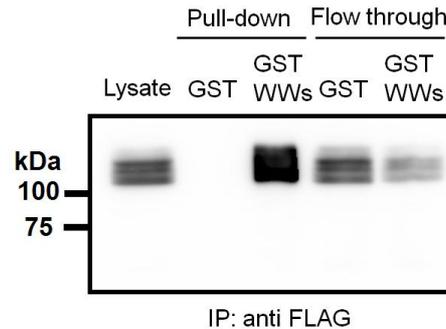
図 6 CreD変異体におけるMalPのエンドサイトーシス



一方、CreD と HulA の WW ドメインとの相互作用を調べるため、プルダウン解析を行った。大腸菌で生産した HulA に存在する 3 個の WW ドメインを含む領域と GST タンパク質との融合タンパク質 (GST-WWs) をグルタチオンセファロースビーズに結合させ、麹菌染色体上の *creD* 遺伝子の 3'-末端に 3FLAG タグ配列を融合させた株から調製した菌体内タンパク質抽出液と混合した。遠心

によりビーズを回収し、FLAG 抗体を用いたウェスタン解析に供することで CreD-3FLAG が回収されているかを調べたところ、GST-WWs と CreD-3FLAG を混合した場合において CreD-3FLAG がビーズ画分に回収されたことから、HulA の WW ドメインと CreD が結合することが示された (図 7)。

図 7 CreDとHulA WWドメインとの相互作用



(3) バイオマス由来低分子に特異的なトランスポーターの同定

麹菌においては、すでにセルロース分解やアラビナン分解に関与する酵素遺伝子の発現制御に関わる転写因子 XlnR と AraR の高発現株のトランスクリプトーム解析により、それぞれ数個のトランスポーター遺伝子の発現上昇が認められている。そこで、これらのトランスポーター遺伝子破壊株を作製して、キシロースとアラビノースを単一炭素源とする培地上での生育を観察し、生育の低下が認められる破壊株を選択したが、明確な生育低下は認められなかった。これは、複数のトランスポーターが存在しているか、または一般的に高発現しているグルコーストランスポーターがキシロースなどの単糖に対しても低親和性ながら基質として取り込む活性を有しているためではないかと考えられた。そこで、これらのトランスポーターを酵母で高発現させ、培地中の各種基質の取込み活性を測定することにより、取込み活性を示すトランスポーターを特定することを試みているところである。一方、最近大腸菌におけるキシローストランスポーターの結晶構造解析結果をもとに、トランスクリプトーム解析で候補にあがったトランスポーターからキシロースとの結合に重要なアミノ酸の保存されているトランスポーターを絞り込むことができた。

(4) トランスクリプトーム解析によるヘミセルロース分解・代謝系遺伝子の推定

D-キシロースと L-アラビノースは植物細胞壁を構成するヘミセルロースの主要構成五単糖であり、炭素源として多くの糸状菌に利用されている。麹菌においては、これらペントースの代謝は転写因子 XlnR とそのホモログである AraR により制御されている。そこで、これら因子の制御下遺伝子の DNA マイクロアレイ解析による同定、ペントース代謝系を構成する候補遺伝子の抽出、大腸菌を

宿主とした候補遺伝子産物の発現と基質特異性の解析などを通して、麹菌におけるペントース代謝経路の構築を行った。その結果、D-キシロースは D-キシロースリダクターゼ (XyrA) による 1 段階、L-アラビノースは L-アラビノースリダクターゼ (LarA)、L-アラビニトールデヒドロゲナーゼ (LadA)、L-キシロースリダクターゼ (LxrA) の 3 段階の酸化還元反応によりキシリトールに変換され、キシリトールは キシリトールデヒドロゲナーゼ (XdhA) により D-キシロースへと変換されると経路が解明できた。さらに、本経路を構成する全遺伝子について破壊株を作製し、構築した代謝経路の検証を行ったところ、D-キシロースと L-アラビノース代謝の初発反応は XyrA と LarA のいずれかが存在すれば可能であること、LadA は L-アラビニトールの変換に必須であることなどが明らかとなった。一方、*lxrA* や *xdhA* の単独破壊株は D-キシロース、L-アラビノースの資化が可能であることから、バイパス経路あるいは酵素の重複が存在すると考えられた。

さらに、本経路を構成する遺伝子ならびに新規候補遺伝子の単独破壊および多重破壊株を作製することにより、ペントース代謝の全体像を明らかにすることを目的とした。*Aspergillus nidulans* が有する Lxr 活性の測定結果から、NADPH 依存型の LxrA に加えて NADH 依存型の酵素の存在が示唆されていた。そこで、NADH 依存型 Lxr の候補遺伝子 (*lxrB*) 破壊株、*lxrA/lxrB* 二重破壊株を新たに作製し、L-アラビニトール資化能を検討した。先に報告したとおり *lxrA* 破壊では資化能の部分的欠損が起こる。一方、*lxrB* 単独破壊株では資化能に大きな影響は観察されず、二重破壊株ではほぼ消失した。すなわち、L-キシロースからキシリトールへの変換は NADPH と NADH 依存型 Lxr の両者が担うことが示唆された。また、キシリトールデヒドロゲナーゼに関しては、*xdhA* のホモログとして *xdhB* が存在していたため、これらの二重破壊株を作製しキシリトール資化能を検討した。しかし、キシリトール資化は二重破壊株でも可能であったことから、他の酵素もこの反応に関与する可能性が示唆された。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 16 件)

松浦優佳 他：麹菌マルトースパーミアーゼ分解におけるユビキチン化マシナリーの作用機構、2014 年度日本農芸化学学会大会、2014 年 3 月 29 日、川崎市

五味勝也 他：Involvement of ubiquitination machinery in endocytic degradation of maltose transporter (MalP) in *Aspergillus oryzae*, 12th

European Conference on Fungal Genetics, 2014 年 3 月 24 日、スペイン・セビリヤ

松浦優佳 他：麹菌マルトースパーミアーゼ分解における HECT ユビキチンリガーゼ HulA の関与、第 13 回糸状菌分子生物学コンファレンス、2013 年 11 月 20 日、つくば市

鈴木空太 他：麹菌の転写因子 AmyR と MalR の翻訳後修飾と安定性、第 13 回糸状菌分子生物学コンファレンス、2013 年 11 月 20 日、つくば市

鈴木空太 他：麹菌のアミラーゼ生産に関与する転写因子の翻訳後修飾、第 65 回日本生物工学会大会、2013 年 9 月 18 日、広島市

井上泰宏 他：麹菌ペントース代謝経路の遺伝子破壊による検証と新規遺伝子による補完、2013 年度日本農芸化学学会大会、2013 年 3 月 26 日、仙台市

平本哲也 他：麹菌アレスチン様タンパク質 CreD のマルトースパーミアーゼのエンドサイトーシスへの影響、2013 年度日本農芸化学学会大会、2013 年 3 月 25 日、仙台市

鈴木空太 他：麹菌 *A. oryzae* デンプン分解酵素生産に関与する転写因子の細胞内局在解析、第 12 回糸状菌分子生物学コンファレンス、2012 年 11 月 12 日、名古屋市

平本哲也 他：麹菌グルコース抑制遺伝子変異株における MalP のエンドサイトーシスへの影響、第 12 回糸状菌分子生物学コンファレンス、2012 年 11 月 12 日、名古屋市

鈴木空太 他：麹菌の AmyR と MalR の細胞内局在と制御下遺伝子の発現解析、2012 年度日本農芸化学学会東北支部大会、2012 年 10 月 6 日、弘前市

五味勝也 他：Subcellular localization of maltose permease (MalP) in response to carbon sources in *Aspergillus oryzae*, 11th European Conference on Fungal Genetics, 2012 年 3 月 31 日、ドイツ・マールブルク

平本哲也 他：麹菌のグルコース抑制遺伝子変異株におけるマルトースパーミアーゼのエンドサイトーシス、2012 年度日本農芸化学学会大会、2012 年 3 月 25 日、京都市

渥美 元規 他：*Aspergillus oryzae* におけるペントース代謝、2012 年度日本農芸化学学会大会、2012 年 3 月 25 日、京都市

平本哲也 他：麹菌マルトースパーミアーゼの各種炭素源による細胞内局在変化、第 11 回糸状菌分子生物学コンファレンス、2011 年 11 月 16 日、東京

平本哲也 他：麹菌のマルトースパーミアーゼのエンドサイトーシスに及ぼす炭素源の影響、第 63 回日本生物工学会大会、2011 年 9 月 26 日、東京

渥美 元規 他：麹菌におけるペントース代謝系とその制御、2011 年度日本農芸化学学会大会、2011 年 3 月 26 日、京都市

〔図書〕(計 2 件)

小林哲夫、五味勝也:(公財)日本醸造協

会、「改訂版 分子麹菌学」,「*Aspergillus* 属におけるアミラーゼ生産の制御メカニズム」, 2012, p. 60-70

五味勝也、小林哲夫：(公財)日本醸造協会、「清酒酵母・麴の研究～2000年代の研究～」,「麹菌のデンプン分解酵素生産制御の分子機構」、印刷中

〔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

五味 勝也 (GOMI, KATSUYA)
東北大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号：60302197

(2) 研究分担者

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

(3) 連携研究者

新谷 尚弘 (SHINTANI, TAKAHIRO)
東北大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号：70374973

加藤 雅士 (KATO, MASASHI)
名城大学・農学部・教授
研究者番号：70242849