

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20780058

研究課題名（和文）糸状菌（ヘミ）セルラーゼ遺伝子発現制御因子の同定と機能解析

研究課題名（英文） Identification of regulators controlling cellulase and hemicellulase gene expression in filamentous fungi and its functional analysis.

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・助教

研究者番号：80405357

研究成果の概要（和文）：糸状菌 *Aspergillus aculeatus* の任意の遺伝子破壊株を網羅的に作出するために、効率のよいアグロバクテリウムを用いた本菌の形質転換法を確立した。作出した約1万5千株の形質転換体の中から、セルラーゼ遺伝子発現制御因子欠損株の候補として40株を選択した。転写因子様タンパク質の遺伝子破壊株において、セロビオヒドロラーゼ遺伝子発現誘導能が約1/5に低下している事を見出した。今後、同定された因子の機能解析を行うと共に、他の制御因子の同定・機能解析を行う計画である。

研究成果の概要（英文）：We report the successful *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation (AMT) of *Aspergillus aculeatus* for functional genomics. We isolated 40 transformants expected to be disruptants of the regulator(s) controlling cellulase gene expressions in *A. aculeatus* from 15,000 transformants obtained by AMT. Mutation of the *geneA* resulted in 5-fold reduction on cellobiohydrolase gene expression in transformant by comparing with that in host strain. Now, we are further analyzing the function of putative transcription factor identified in this study and seeking the other regulators.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：農学

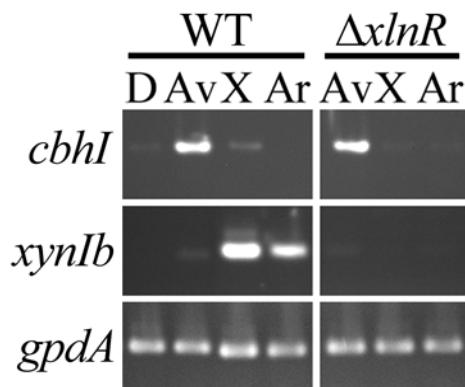
科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：*Aspergillus aculeatus*, (hemi)cellulase, gene regulation, *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, TAIL-PCR, Insertional mutagenesis

1. 研究開始当初の背景

A. aculeatus は、現在最強とも言われる *Trichoderma* 属が分泌するセルラーゼ剤と協調的にセルロースに作用し、グルコースにまで効率よく糖化する特長を持ったセルラーゼを分泌するだけでなく、種々のヘミセルラーゼも高生産する特徴を有している。これまでに、当研究室は精力的に本菌由来のセルラーゼ・ヘミセルラーゼに関する研究を行い酵素学的知見を得ただけでなく、植物性バイオマスの有効利用に向けた応用面に重点を置いた研究でも優れた成果を収めてきた。しかし、*A. aculeatus* のセルラーゼ・ヘミセルラーゼを工業的に利用するには生産量が低いため、実用化には至っていない。また、その遺伝子発現制御機構に関しては未解明な部分が多く、学術的にも興味深い。そこで、セルラーゼ・ヘミセルラーゼ遺伝子発現を制御している因子を同定し、その機能を解析するだけでなく、得られた知見を基盤として、酵素を安価に大量生産する系の構築する事を目的とした。

糸状菌におけるセルラーゼ・ヘミセルラーゼ遺伝子発現を制御する因子として、キシラナーゼ遺伝子群の転写活性化因子として同定された XlnR が唯一同定されていた。また、*Trichoderma reesei* では、XlnR ホモログ因子 (Xyr1) が全ての誘導型のセルラーゼ・ヘミセルラーゼ遺伝子の発現を統御していることが明らかとされていた。一方、申請者らは、*A. aculeatus* の *xlnR* 遺伝子破壊株 ($\Delta xlnR$) を用いた解析により、キシラナーゼ遺伝子 (*xyn1b*) のキシロース (X), アラビノース (Ar) による誘導は XlnR により制御されるものの、セロビオヒドロラーゼ遺伝子 (*cbh1*) のアビセル (Av) による誘導は、XlnR 非依存的に制御される事を見出した。この誘導は新奇なシグナル伝達系により制御されている知見を得ていた (図 1)。



【図 1】半定量的 RT-PCR 法を用いたセロビオヒドロラーゼ遺伝子 (*cbh1*) とキシラナーゼ Ib 遺伝子 (*xyn1b*) の発現量解析。WT, wild type strain; $\Delta xlnR$, *xlnR* 破壊株; *gpdA*, グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子; D, 1% グルコース; Av, 1% アビセル; X, 1% キシロース; Ar, 1% アラビノース

2. 研究の目的

本研究は、当研究室で単離された糸状菌 *Aspergillus aculeatus* における XlnR 非依存的な新奇セルラーゼ・ヘミセルラーゼ遺伝子発現制御機構を分子レベルで解明する事を目的とし、本課題ではまず、『遺伝子タギング法を用いてその発現制御に関わる因子を同定し、その機能を解析する』事を目的とした。

3. 研究の方法

(1) アグロバクテリウムを介した

A. aculeatus 形質転換法の構築

ハイグロマイシン耐性遺伝子を T-DNA 内に持つバイナリーベクター pBIG2RHPH2 を用いて *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 株を形質転換した。得られたアグロバクテリウムを用いて *A. aculeatus* を形質転換するための条件を検討した。決定した方法を用いて *A. aculeatus* を形質転換し、T-DNA 挿入により遺伝子が破壊された形質転換体を網羅的に作出した。形質転換は、*cbh1* プロモーターの制御下でピリミジン合成に関わるオロチジンリン酸脱炭酸酵素 (*pyrG*) を発現する株を宿主とした。

(2) セルラーゼ・ヘミセルラーゼ遺伝子破壊株の単離

ウリジンの毒性アナログであるフルオロオロチン酸 (FOA) 含有培地上では、PyrG タンパク質が機能する株は生育できないが、PyrG タンパク質の機能が損なわれるか、*pyrG* 遺伝子が発現しなくなった株は生育可能となる。宿主には上述の *cbh1* プロモーター制御下で発現する *pyrG* 遺伝子を少なくとも 2 コピー有しているものを用いることにより、レポータ遺伝子の破壊ではなく、*cbh1* 遺伝子発現制御機構の欠損により、FOA 耐性を獲得した株を選択する確率を上昇させた。すなわち、アグロバクテリウムを介した形質転換により得られる株をハイグロマイシン耐性を指標に選択し、次に、FOA 耐性を示す株を選択する。その中から、セルロースを単一炭素源とする培地で生育が低下した株を

選択し、セルラーゼ・ヘミセルラーゼ欠損変異株の候補とした。

(3) 遺伝子発現産物の定量

遺伝子発現量の解析は、半定量的 RT-PCR 法、或いは、リアルタイム PCR 法を用いて行った。

4. 研究成果

(1) アグロバクテリウムによる *A. aculeatus* 形質転換系の構築

A. aculeatus 野生株の 1×10^7 個の胞子とアグロバクテリウム 5×10^8 個を $200 \mu\text{M}$ アセトシリンゴンを含む感染誘導液体培地で 48 時間共培養後、ハイグロマイシンを含む培地で形質転換体を選択した。得られた 90% 以上の形質転換体において T-DNA は、染色体の 1 座位に挿入されていることが明らかになり、T-DNA 挿入による網羅的な遺伝子破壊株の作出に適した形質転換条件を決定できた。

一方、*A. aculeatus* ウリジン要求性株を宿主とした場合には、アグロバクテリウムによる形質転換効率が、野生株の場合の約 1/4 に低下した。これはウリジン要求性株の発芽効率が悪いためであると推測された。そこで、予め *A. aculeatus* ウリジン要求性株の 1×10^7 個の胞子を 24 時間最少培地にて培養し、発芽させた胞子とアグロバクテリウム 5×10^8 個を $200 \mu\text{M}$ アセトシリンゴンを含む感染誘導培地で 36 時間共培養後、ハイグロマイシンを含む培地で形質転換体を選択した結果、形質転換効率が改善された。アグロバクテリウム形質転換法の効率は、宿主に用いる株の生理的条件等に左右される事が報告されており、今回我々が行ったように、株ごとに形質転換条件を至適化すれば、網羅的に遺伝子破壊株を作出する事も可能である事が示された。

(2) T-DNA 挿入部位の解析

T-DNA に特異的なプライマーと任意の配列に結合する縮重プライマーを用いて TAIL-PCR を行い、T-DNA が 1 コピー挿入されている株からは、ほぼ全ての T-DNA 周辺配列を増幅して塩基配列を特定する事が出来た。一方、T-DNA だけでなく、ベクター配列や T-DNA が複数コピー導入されている場合には、inverse-PCR により、効率よく T-DNA 周辺配列を増幅できることが明らかになった。

(3) 遺伝子破壊株における遺伝子タギング法

の有効性の検証

硝酸還元酵素遺伝子破壊株は、塩素酸に耐性を示す。この原理を用いれば、形質転換マーカであるハイグロマイシンと塩素酸を含む培地上で生育できる形質転換体を単離する事により、破壊株の表現系から破壊遺伝子を遺伝子タギング法で同定可能であることを実験的に立証できると想定した。しかし、ハイグロマイシン存在下では、塩素酸耐性の選択圧が低下し、候補株を効率的に取得する事が出来なかった。

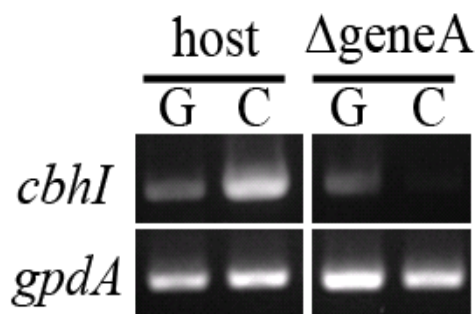
一方、形質転換条件を検討している過程で、通常は黒い胞子を作る形質転換体の中に白色の胞子を形成する株が 2 株 (*Aaalb1*, *Aaalb2* と命名) 出現した。これらの株を用いて形質転換体の表現系が T-DNA 挿入によって破壊された遺伝子の機能欠損に起因しているかを検証できると考え、*Aaalb1* 及び *Aaalb2* をモデルとして解析した。TAIL-PCR により *Aaalb1* 染色体上の T-DNA 周辺配列を増幅し、得られた DNA 断片の配列を解読した結果、*A. nidulans* の色素生産に関わる polyketide synthase 遺伝子に相同な遺伝子 (*AapksP* と命名) が破壊されていることが明らかとなった。そこで、*AapksP* 全長とその周辺配列を含む DNA 断片をカビの形質転換用ベクターにサブクローニングし、得られたプラスミドを用いて、*Aaalb1* 及び *Aaalb2* 株を形質転換した。両株において、得られた形質転換体のほぼ全てが黒色の胞子を形成したのに対して、*AapksP* を有さないベクターのみで *Aaalb1* と *Aaalb2* 株を形質転換した場合には、白色を形成する形質転換体しか得られなかった。以上の結果より、アグロバクテリウム形質転換法を用いた遺伝子破壊株の作出とその解析は、未知遺伝子の機能解析に応用可能であることが証明された。

現在(1) - (3) までの結果を論文として纏め、投稿する準備を進めている。

(4) セルラーゼ・ヘミセルラーゼ遺伝子発現制御因子の同定

3-(2) 研究方法に既述したように、*cbhI* 遺伝子プロモーター制御下で *pyrG* 遺伝子を発現するレポーター遺伝子を有す株を宿主として、アグロバクテリウムを介した形質転換法を用いて網羅的に遺伝子破壊株を作出した。ハイグロマイシン耐性を示した約 15,000 株の形質転換体から、FOA 耐性株を示した 40 株を単離した。得られた形質転換体の変異点を同定するために、各株から染色体 DNA を抽出し、サザンブロッティング解析を行い T-DNA のコピー数を解析するとともに、TAIL-PCR 法或いは inverse-PCR 法により T-DNA 周辺配列を増幅後、シーケンス解析により挿入箇所を特定した。その結果、真

菌類に特徴的にみられる C₆Zn(II)タイプの DNA 結合タンパク質様の因子に相同性の高い遺伝子 A が破壊された株が 2 株単離されたことが明らかとなった。重複して遺伝子 A 破壊株が単離されたことは、それがセルラーゼ遺伝子発現制御に関与していることを示唆している。そこで、半定量的 RT-PCR 法を用いて宿主と遺伝子 A 破壊株におけるセロビオヒドロラーゼ遺伝子 (*cbhI*) の転写産物量を解析した。図 2 に示すように、セロビオースによる *cbhI* 発現の誘導は、遺伝子 A 破壊により著しく低下していた。更に、リアルタイム PCR 法を用いて *cbhI* 転写産物量を定量したところ、遺伝子 A 破壊株においてセロビオースに反応した遺伝子発現能が 1/5 以下に低下していることが明らかになった。現在、相同組換えにより遺伝子 A 破壊株を再度作出し、同様の解析をすることにより、遺伝子 A の機能を確定すると共に、今後、相同性から推測される遺伝子 A の機能について解析する計画である。また、他のセルラーゼ遺伝子発現制御因子欠損候補株についても同様の解析を行い、新奇制御因子の同定と機能解析を行う計画である。



【図 2】半定量的 RT-PCR 法を用いたセロビオヒドロラーゼ遺伝子 (*cbhI*) の発現量解析。host, host strain; Δ geneA, 今回同定された遺伝子破壊株; *gpdA*, グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子; G, 1% グルコース; C, 0.1% セロビオース

以上、当初計画した実験計画を円滑に遂行し、新奇セルラーゼ・ヘミセルラーゼ遺伝子発現制御因子の有力な候補を取得するに至った。

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 2 件)

【査読無】

(1) S. Tani, J. Sumitani, and T. Kawaguchi. (2009) Physiological inducer and *cis*-elements required for the cellobiohydrolase I gene

induction via XlnR-independent pathway in *Aspergillus aculeatus*. *Biootechnology of Lignocellulose Degradation, Biomass Utilization, and Biorefinery*. pp467-470

【査読無】

(2) Emi Kunitake, Shuji Tani, Jun-ichi Sumitani, and Takashi Kawaguchi. (2009) Development of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation system for random insertional mutagenesis in *Aspergillus aculeatus*. *Biochemistry of Lignocellulose Degradation, Biomass Utilization, and Biorefinery*. pp521-526.

〔学会発表〕(計 4 件)

(1) 國武絵美, 谷修治, 炭谷順一, 川口剛司, *Aspergillus aculeatus* におけるアグロバクテリウム形質転換法を利用した遺伝子タギング法の確立、2010年度日本農芸化学会、2010年3月28日、東京大学駒場キャンパス

(2) 國武絵美, 谷修治, 炭谷順一, 川口剛司, *Aspergillus aculeatus* における網羅的遺伝子破壊株の作出を目的としたアグロバクテリウム形質転換法の開発、セルラーゼ研究会、2008年7月28日、茨城県土浦市 株式会社花王研修所

(3) Shuji Tani, Jun-ichi Sumitani, Takashi Kawaguchi. Physiological inducer and *cis*-element required for the cellobiohydrolase I gene induction via XlnR-independent pathway in *Aspergillus aculeatus*. *Mie Bioforum 2008*, 2008年9月5日、三重県 志摩スペイン村

(4) Emi Kunitake, Shuji Tani, Jun-ichi Sumitani, and Takashi Kawaguchi. Development of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation system for random insertional mutagenesis in *Aspergillus aculeatus*. *Mie Bioforum 2008*, 2008年9月4日、三重県 志摩スペイン村

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.biochem.osakafu-u.ac.jp/~shuji/index.html>

6. 研究組織

(1) 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・助教
研究者番号：80405357