

令和元年5月31日現在

機関番号：14101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06763

研究課題名(和文)糸状菌のセルラーゼ生産における新奇カーボカタボライト抑制機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of novel carbon catabolite repression of cellulase expression 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・助教

研究者番号：30800586

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：Aspergillus nidulansにおけるセルラーゼ遺伝子のカーボカタボライト抑制(CCR)は転写抑制因子CreAによる制御とcAMP依存性プロテインキナーゼ(PkaA)が関わる制御がある。CreA/PkaA依存的CCRを各遺伝子破壊株を用いて詳細に調べたところ、グルコースによるCCRはPkaAとCreAが、キシロースによるCCRはCreAが主に関与することが示された。また3種のGタンパク質サブユニットのうち、GanBがCCRに主要に働くことが明らかとなった。しかしこれら因子のCCRへの寄与の大きさは誘導物質や培養方法により異なり、極めて複雑に制御されていることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、PkaA及びGanBが既知の転写抑制因子CreAとは独立した経路でセルラーゼ遺伝子のカーボカタボライト抑制を制御すること、またこれらが誘導物質や抑制炭素源、培養方法によって関与の程度が異なることを明らかにした。この成果は糸状菌の多糖分解酵素遺伝子の発現制御メカニズムの解明の一助となるはずである。また糸状菌のセルラーゼは植物性バイオマスの利活用に役立つ酵素として極めて重要であるため、この成果が効率的なセルラーゼ生産技術の開発につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：In Aspergillus nidulans, carbon catabolite repression (CCR) of the cellulase genes is regulated by at least two pathways; transcriptional repressor CreA-dependent pathway and cAMP signaling pathway. Transcriptional analyses in deletion mutant of creA, protein kinase A gene (pkaA), and G genes revealed that CCR by hexose is independently regulated by CreA and the cAMP signaling pathway (PkaA and GanB), while CCR by pentose mainly depends on CreA. The degree of contribution of CreA, PkaA, or G in CCR differs depending on inducers, repressing carbon sources, and cultural conditions.

研究分野：応用微生物学

キーワード：Aspergillus nidulans セルラーゼ カーボカタボライト抑制 遺伝子発現制御

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多くの糸状菌由来の酵素が産業的に利用されており、中でもセルラーゼは植物性バイオマスの利活用に関与する酵素として重要性が高い。セルラーゼ遺伝子の発現は環境の状況に応じて厳密かつ複雑に制御されているため、この制御メカニズムの詳細を明らかにすることが出来れば効率的な酵素生産法の開発につながると期待できる。

モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* では細胞膜上でトランセプター(トランスポーターとレセプターの機能を併せ持つ)によりセルロース由来のセロビオースの存在を感知すると転写活性化因子 CltB と広域転写因子 McmA が協調的に下流のセルラーゼ遺伝子の転写を誘導する (1, 2)。一方でセルロースが十分に分解されてグルコースが生成するとカーボンカタボライト抑制 (CCR)機構が働き、セルラーゼ遺伝子の転写抑制が起こる。糸状菌の CCR は転写抑制因子 CreA が主要因子として働くことが古くから知られており、アミラーゼ遺伝子は CreA の欠損によりグルコースによる抑制が解除される。しかし、セルラーゼの CCR は CreA の欠損だけでは完全な脱抑制が起こらない。このことより、CreA 非依存的 CCR 経路の存在が考えられていたが、その実態は不明であった。我々は近年、プロテインキナーゼ破壊株ライブラリーを用いたスクリーニングの結果、プロテインキナーゼ A (PkaA) がセルラーゼの CCR に重要であることを見出した。pkaA 破壊株では寒天培地においてアミラーゼの CCR にはほぼ影響がみられないものの、グルコースとセルロース共存下でセルラーゼを生産していたことから、セルラーゼの CCR には PkaA が優勢に働いていることが示唆された。PkaA は G protein-coupled receptor (GPCR) によるグルコースの感知、三量体 G タンパク質による cAMP 合成酵素の活性化、cAMP による PkaA の制御サブユニット PkaR の解離により活性化すると考えられている。G タンパク質 α サブユニットは 3 種類有しており、いずれのものが CCR に関与するのかを調べるため、各遺伝子破壊株を作出したところ、ganB 破壊株で顕著に CCR 解除が起こることを見出した。しかし、PkaA 及び GanB が関与する CCR 機構の詳細は明らかでなく、このメカニズムを解明することは学術的に意義があるだけでなく、植物性バイオマスの利活用に向けたセルラーゼ生産制御系の確立という応用にも役立つと考えられた。

2. 研究の目的

cAMP シグナリング経路が関与する CreA 非依存的 CCR に関する情報は乏しい。そこで CreA, PkaA, G α 遺伝子破壊株を用いて詳細な転写解析を行うことにより、各因子が関わる CCR の違いを明確にする。また PkaA がセルラーゼの発現を誘導あるいは抑制する糖の認識を制御することにより CCR に関与している可能性が考えられる。そこでセロビオースの感知と取り込みを担うセロビオーストランセプターの挙動やグルコーストランスポーターの発現を解析する。

3. 研究の方法

(1) 実験開始当初は creA 変異株を使用していたが、CreA の機能を明確にするため creA 破壊株($\Delta creA$)を作出した。PkaA 依存的、GanB 依存的 CCR と CreA 依存的 CCR の差異を検証するため、creA/pkaA 及び creA/ganB 二重破壊株($\Delta creA/\Delta pkaA$, $\Delta creA/\Delta ganB$)を作出し、既に作製済みであった pkaA 破壊株($\Delta pkaA$)並びに各 G 遺伝子破壊株($\Delta ganA$, $\Delta ganB$, $\Delta fadA$)と合わせてセルラーゼ生産性と遺伝子発現解析を行った。プレートアッセイによるセルラーゼの生産性の解析は、各遺伝子破壊株をカルボキシメチルセルロース (CMC) と様々な単糖を炭素源とした寒天最少培地で生育させ、コンゴレッド染色によりセルロース分解性を検出することにより行った。遺伝子発現解析については、前培養した菌体を誘導物質(セロビオース又はボールミルセルロース(BMC))と様々な単糖を含む培地に移して培養し、回収した菌体を用いて定量的 RT-PCR を行った。BMC を用いた培養での培養上清は CMC とコンゴレッド染色を利用したザイモグラフィに供することで液体培養におけるセルラーゼ生産性を検出した。

(2) セロビオーストランセプター CltB の C 末端側に緑色蛍光タンパク質(GFP)を融合した CltB-GFP を構成的発現プロモーターである *Aspergillus oryzae* 由来 tef1 プロモーターを用いて *A. nidulans* で発現させた。さらにこの株の pkaA を破壊した株を作製した。CltB の局在性を解析するため、前培養後の菌糸をグルコースとセロビオースを炭素源とした最少培地で誘導し、蛍光顕微鏡による観察を行った。また、 $\Delta pkaA$ における 5 種のグルコーストランスポーター遺伝子の発現を定量的 RT-PCR により解析した。

4. 研究成果

(1) CreA, PkaA, G タンパク質 α サブユニット遺伝子破壊株のセルラーゼ発現解析

各遺伝子破壊株におけるセルラーゼ生産性をプレートアッセイにより調べた。その結果、グルコース存在下において $\Delta creA$ はセルラーゼ生産性を示さず、 $\Delta pkaA$ でセルラーゼ生産を示した。 $\Delta ganB$ 及び $\Delta creA/\Delta pkaA$, $\Delta creA/\Delta ganB$ では $\Delta pkaA$ よりも高いセルラーゼ生産が認められた。フルクトース、マンノース存在下では $\Delta creA$ と $\Delta pkaA$ は同等のセルラーゼ生産を示し、 $\Delta ganB$, $\Delta creA/\Delta pkaA$, $\Delta creA/\Delta ganB$ はさらに強いセルラーゼ生産性を示した。一方、キシロースとアラビノースを添加したところ、 $\Delta creA$, $\Delta creA/\Delta pkaA$, $\Delta ganB$ 及び $\Delta creA/\Delta ganB$ でセルラーゼを生産し、 $\Delta fadA$ でもわずかな脱抑制が見られた。 $\Delta pkaA$ ではヘキソース添加時のようなセルラーゼ生産は見られなかった。(図 1)

セロビオースを誘導物質、2-デオキシグルコースを抑制炭素源として培養した際のセルラーゼ遺伝子の転写解析を行ったところ、 $\Delta creA$ 、 $\Delta pkaA$ で脱抑制が認められた。 $\Delta creA/\Delta pkaA$ 、 $\Delta ganB$ 、 $\Delta creA/\Delta ganB$ ではさらに高い遺伝子発現量を示し、強く脱抑制されていることが明らかになった。グルコース、フルクトース、マンノース使用時も2-デオキシグルコースと類似した結果を得た。一方、キシロース、アラビノースによる抑制は $\Delta creA$ でほぼ完全に脱抑制されており、 $\Delta pkaA$ ではほぼ脱抑制は認められなかった。

セルロース(BMC)を誘導物質として用いた液体培養では、 $\Delta pkaA$ 及び $\Delta ganB$ はグルコース存在下ではセルラーゼを生産しなかった。一方で $\Delta creA$ では誘導後 12 時間でセルラーゼの生産が確認され、 $\Delta creA/\Delta pkaA$ 、 $\Delta creA/\Delta ganB$ では 6 時間の時点で検出された。転写解析によっても同様の結果が得られた。(図 2)

以上より、PkaA は CreA とは異なる CCR 経路を制御し、その上流因子として主に GanB が関与することが明らかとなった。また、PkaA 依存的 CCR はヘキソースに応答し、ペントースによる CCR は CreA が主に働くことが見出された。しかし、プレートアッセイにより観察された顕著な PkaA 依存的 CCR は培養方法や誘導物質の種類によりその程度が異なったことより、炭素源の利用と分化が密接に関係していることが推測される。

$\Delta pkaA$ と $\Delta ganB$ を比較すると、後者の方がより強く脱抑制を引き起こしたことから、G タン

パク質からのシグナルが PkaA 以外の因子を活性化し、未知の CCR を引き起こす可能性が考えられた。そこで G タンパク質の標的因子候補としてホスホリパーゼ C の一つとされている PlcA の遺伝子破壊株を作出し、プレートアッセイによりセルラーゼの CCR を解析した。しかし、グルコース存在下でのセルラーゼ生産は観察されなかった。プレートアッセイでは $\Delta pkaA$ の強い脱抑制により *plcA* 欠損の影響が見られない可能性があることを考慮すると、液体培養による転写解析や *pkaA*、*creA* との多重遺伝子破壊株を用いて解析していく必要がある。

(2) 糖トランスポーターの解析

PkaA 依存的な CCR に関わる因子として、セルラーゼ発現の誘導物質であるセロビオースの感知や取り込みを担うトランスポーターが考えられる。培養上清中のセロビオース量を定性的にはあるが経時的に調べた結果、 $\Delta pkaA$ でより早い段階で消費されることが判明した。セロビオースの感知と取り込みに関与していると考えられているトランスポーター CltB が特にセロビオースによる生育やセルロースを用いたセルラーゼ発現に重要であることが報告されているため、CltB の同在性や安定性が PkaA の有無により影響するのかどうかを解析した(1)。以前の研究により、*cltB* はセロビオースにより誘導されること、また *cltB* プロモーターで GFP 融合 CltB を発現させた際に蛍光強度が弱く顕微鏡による局在性観察が困難であることが分かっている。そこで、発現量による影響なく CltB の挙動を観察することを目的として、強力な構成的発現プロモーターである *tefl* プロモーターを用いて CltB-GFP 融合体を発現させた。グルコース、セロビオースを単一炭素源とした培地では CltB-GFP は細胞膜及び液胞と思われる細胞小器官に存在しており、培養条件や $\Delta pkaA$ の付与による大きな違いは認められなかった。構成的高発現させたことによる影響を否定できないため、プロモーターの変更や細胞分画とウェスタンプロット等による解析を行う必要があると考えている。また、予備実験の段階ではあるが、タンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミドを添加した場合に非添加時と比較して細胞小器官のシグナルの増加がみられ、これは $\Delta pkaA$ 株において抑制される傾向にあることが観察され

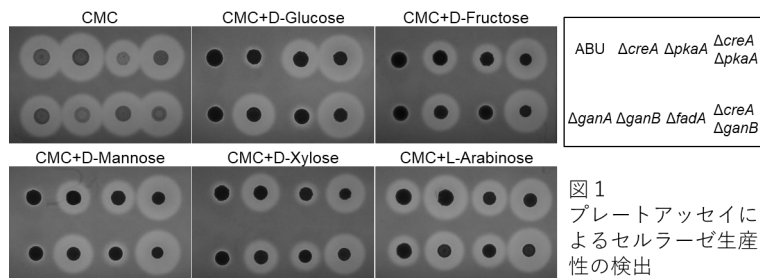


図 1 プレートアッセイによるセルラーゼ生産性の検出

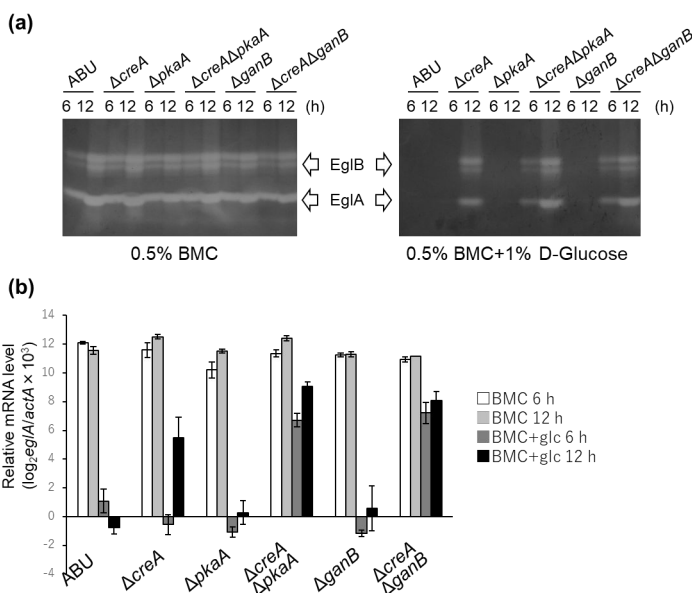


図 2 BMC を誘導物質とした場合のセルラーゼ発現

- (a) 培養上清のセルラーゼ生産性の検出
(b) セルラーゼ遺伝子 (*eglA*) の転写解析

ている。再現実験を実施し、PkaA が CltB の安定性に寄与している可能性が認められれば、より詳細な解析を進めていく。

抑制炭素源であるグルコースの消費速度が CCR に影響を及ぼすと考えられるため、グルコーストランスポーターの解析に着手した。グルコースの消費は PkaA の欠損により減少する(3)。この原因を調べるため 5 種のヘキソーストランスポーターの発現を調べた結果、 $\Delta pkaA$ において *hxtC* の転写量が顕著に低下することが明らかとなった (4)。

<参考文献>

(1) Thaila Fernanda dos Reis, Pollyne Borborema Almeida de Lima, Nádia Skorupa Parachin, Fabiana Bombonato Mingossi, Juliana Velasco de Castro Oliveira, Laure Nicolas Annick Ries, Gustavo Henrique Goldman, Identification and characterization of putative xylose and cellobiose transporters in *Aspergillus nidulans*, *Biotechnol Biofuels* 9:204, 2016

(2) Nuo Li, Emi Kunitake, Miki Aoyama, Masahiro Ogawa, Kyoko Kanamaru, Makoto Kimura, Yasuji Koyama, Tetsuo Kobayashi, McmA-dependent and -independent regulatory systems governing expression of ClrB-regulated cellulase and hemicellulase genes in *Aspergillus nidulans*, *Molecular Microbiology* 102(5):810-826, 2016

(3) Leandro José de Assis, Laure Nicolas Annick Ries, Marcela Savoldi, Thaila Fernanda dos Reis, Neil Andrew Brown and Gustavo Henrique Goldman, *Aspergillus nidulans* protein kinase A plays an important role in cellulase production, *Biotechnology for Biofuels* 8:213, 2015

(4) Thaila Fernanda dos Reis, João Filipe Menino, Vinícius Leite Pedro Bom, Neil Andrew Brown, Ana Cristina Colabardini, Marcela Savoldi, Maria Helena S. Goldman, Fernando Rodrigues, Gustavo Henrique Goldman, Identification of Glucose Transporters in *Aspergillus nidulans*, *PLoS One*. 8(11): e81412, 2013

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Emi Kunitake, Yi Li, Ryota Uchida, Takehiro Nohara, Keisuke Asano, Asato Hattori, Tetsuya Kimura, Kyoko Kanamaru, Makoto Kimura, Tetsuo Kobayashi, CreA-independent carbon catabolite repression of cellulase genes by trimeric G-protein and protein kinase A in *Aspergillus nidulans*, *Current Genetics*, 査読有, in press, 2019

DOI: 10.1007/s00294-019-00944-4

〔学会発表〕(計3件)

Emi Kunitake, Yi Li, Ryota Uchida, Takehiro Nohara, Keisuke Asano, Asato Hattori, Tetsuya Kimura, Kyoko Kanamaru, Makoto Kimura, and Tetsuo Kobayashi, Carbon catabolite repression of cellulase genes via protein kinase A pathway in *Aspergillus nidulans*, 30th Fungal Genetics Conference, 2019

國武絵美, 李怡, 金丸京子, 木村真, 木村哲哉, 小林哲夫, *Aspergillus nidulans* おける G タンパク質 α サブユニットを介したセルラーゼ生産抑制, 日本農芸化学会 2018 年度大会, 2018 年

國武絵美, 李怡, 金丸京子, 木村真, 木村哲哉, 小林哲夫, *Aspergillus nidulans* における cAMP 依存性プロテインキナーゼ PkaA を介したセルラーゼ生産抑制機構, 第 17 回糸状菌分子生物学コンファレンス, 2017 年

〔図書〕(計0件)

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。