

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 27 日現在

機関番号：24403

研究種目：若手研究 B

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23780086

研究課題名（和文）糸状菌セルラーゼ遺伝子発現を誘導する新奇転写調節因子の同定と機能解析

研究課題名（英文）Identification and functional analysis of a novel transcription factor controlling the expression of cellulase genes in filamentous fungi

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）：糸状菌におけるセルラーゼ遺伝子発現制御を正に制御している新奇転写因子 ClbR (cellobiose response regulator) を同定し、ClbR がセロビオースやセルロースにตอบสนองした遺伝子発現を制御していることを明らかにした。ClbR は、常に核に局在し、類似した配列を有す ClbR2 タンパク質と協調的に作用することにより、遺伝子の発現を制御していた。また、ClbR を高発現することにより、持続的に制御下の酵素を高生産することを可能にした。

研究成果の概要（英文）：We revealed that ClbR, namely cellobiose response regulator, controlled the expression of cellulase and xylanase genes induced by cellobiose and cellulose in *Aspergillus aculeatus*. ClbR always locates in nuclei and cooperatively controls the gene expression with ClbR2, paralog of ClbR in *A. aculeatus*. Furthermore, we enabled to sustainable overproduction of cellulase and xylanase by overexpressing the *clbR* gene in *A. aculeatus*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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*, セルラーゼ遺伝子発現制御, セロビオース誘導, ClbR, アグロバクテリウム形質転換

1. 研究開始当初の背景

申請者らは、現在最強と言われている *Trichoderma* 属のセルラーゼ剤と強い相乗作用を示すセルラーゼを生産する菌株として *Aspergillus aculeatus* を土壤中より単離し、これまでにその生産するセルラーゼ系酵素が単糖生成力に優れている点を利用して、植物性バイオマスの有効利用を目指した研究で優れた成果を収めてきた。しかし、酵素生産量が低く実用化には至っていない。これまでに、糸状菌 *Aspergillus* において、発現量の

大きい遺伝子プロモーターを用いて目的の酵素遺伝子一種類を高発現させる技術は確立されてきた。しかし、基質特異性の異なる種々の酵素が大量に必要となるセルロース系バイオマスの完全酵素糖化には、任意の酵素を同時に大量生産する技術が必須である。そこで申請者はまず、糖質加水分解酵素遺伝子の発現制御に関わる因子を同定し、その機能を解明することで、遺伝子発現制御因子の機能を利用して合理的に種々の酵素を大量生産することにより、バイオマス完全酵素糖

化に必要な酵素を安価に供給する系を構築することを目指している。

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、糸状菌 *Aspergillus aculeatus* において、

(1) 申請者らが同定したセルラーゼ遺伝子発現を誘導する新奇転写因子 *CibR* の機能解析とその応用

(2) 新たなセルラーゼ遺伝子発現制御因子のスクリーニング・同定・機能解析

を遂行することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) セルラーゼ遺伝子発現を誘導する新奇転写因子 *CibR* の機能解析とその応用

申請者らが同定した転写因子 *CibR* の機能を遺伝学・分子生物学・生理学的に解析するため、

- ① 転写因子 *clbR* 遺伝子破壊株や *CibR* を構成的に高生産した株を作出し、それらの株における表現型観察と各種糖質加水分解酵素遺伝子の発現様式や酵素生産量の解析
- ② 転写制御因子 *CibR* の *in vitro* における DNA 結合領域の特定と *in vivo* での結合領域の機能解析
- ③ 誘導物質に応答した転写因子 *CibR* の局在性の解析
- ④ 転写因子 *CibR* の機能ドメイン解析を行った。

(2) 新たなセルラーゼ遺伝子発現制御因子のスクリーニング・同定・機能解析

A. aculeatus のゲノムサイズを 35 Mb、平均遺伝子長を 1.5 kb と推定すると、ゲノムの 90% 以上の遺伝子破壊株を作出するには、約 54,000 株の形質転換体が必要と算出される。そこでスクリーニング検体数

54,000 株を目安として、同一の制御因子が重複して単離されるまで新たな因子をスクリーニングする。また、これまでに転写因子 A 破壊株以外にもセルロース資化能欠損株を複数単離しており、これらの株における破壊遺伝子を同定し、その機能を詳細に解析することを目指した。

4. 研究成果

(1) セルラーゼ遺伝子発現を誘導する新奇転写因子 *CibR* の機能解析とその応用

本課題において新奇転写因子様タンパク質 Cellobiose response regulator, *CibR* が、セルロースやセロビオースに応答した *cbhl* (セロビオヒドロラーゼ I 遺伝子), *cmc1, 2* (カルボキシメチルセルラーゼ 1, 2 遺伝子), および *xyn1a, 1b* (キシラナーゼ Ia, Ib 遺伝子) の発現誘導を正に制御していることを①の遺伝学的解析により明らかにした (図 1 参照)。興味深いことに、*cbhl, cmc2* と *cmc1, xyn1b* の各遺伝子の発現誘導は、*XlnR* を介していない経路と *XlnR* を介した経路の異なる経路を介して遺伝子発現が制御されているにもかかわらず、*CibR* はその両方の遺伝子の発現を制御していた。

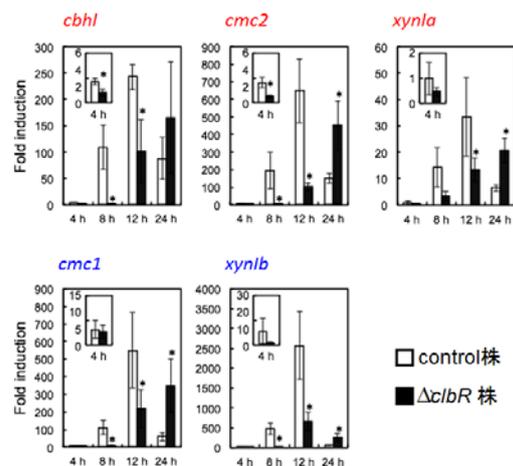


図1. *CibR* 破壊株 ($\Delta cibR$) とコントロール株における各遺伝子発現量をリアルタイムPCR法を用いて定量した。コントロール株における誘導4時間後の発現量を1とした。*cbhl*, セロビオヒドロラーゼ I 遺伝子; *cel7b*, セロビオヒドロラーゼ 7b 遺伝子; *cmc1* and 2: カルボキシメチルセルラーゼ 1 and 2 遺伝子; *xyn1a* and *1b*, キシラナーゼ Ia and Ib 遺伝子

②の解析においては、MalE-CIbR 融合タンパク質を用いて *in vitro* における CIbR 結合領域を特定することを試みたが、CIbR の DNA への特異的な結合を検出することはできなかった。この原因は、CIbR が XInR など他の転写因子と相互作用して協調的に遺伝子の発現を制御していることに起因していることが想定された。そこで、CIbR の相互作用因子を Yeast two hybrid 法を用いて探索した結果、CIbR の相互作用因子として、XInR 等の既知の制御因子ではなく、CIbR と相同性を 42% 有す機能未同定のパラログ因子、CIbR2 を同定した。CIbR と CIbR2 の単独及び二重遺伝子破壊株を作出し、それらの株におけるセルラーゼ、キシラナーゼ遺伝子の発現様式を定量的に解析した結果、CIbR は CIbR2 と協調的に遺伝子の発現誘導を正に制御していることを遺伝学的に明らかにした(図2参照)。また、その相互作用に必要な CIbR の領域を Yeast two hybrid 法を用いて限定している段階である。

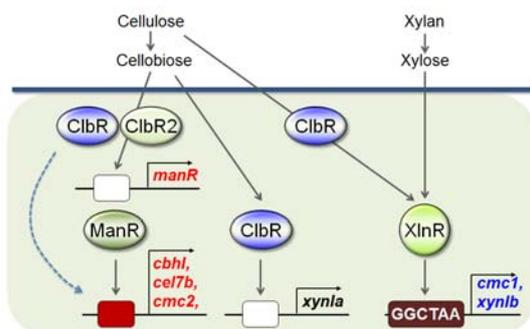


図2. 転写因子 ClbR と相互作用因子 ClbR2 の作用機序のモデル図。
manR, 転写活性化因子; *XInR*, 転写活性化因子; *cbhI*, セロビオヒドロラーゼ1 遺伝子; *cel7b*, セロビオヒドロラーゼ7b 遺伝子; *cmc1* and 2: カルボキシメチルセルラーゼ1 and 2 遺伝子; *xyn1a* and *1b*, キシラナーゼ1a and 1b 遺伝子

③の解析では、CIbR が誘導物質の有無にかかわらず常に核に局在していることを明らかにした。④の解析では、CIbR の C 末端側から順次欠失した CIbR を発現させその機能を解析した結果、CIbR の核が局在なくなるとその機能も失う領域を限定する領域が重なることが判明したが、その他の機能に関して

は今後更なる解析を行い、結果を明らかにする必要がある。

(2) 新たなセルラーゼ遺伝子発現制御因子のスクリーニング・同定・機能解析

我々は、*A. aculeatus* T-DNA 挿入変異株ライブラリーを構築し、その中からセルロース系バイオマス分解酵素の生産を調節する制御因子遺伝子の破壊候補株を約二万株の T-DNA 挿入変異株の中から探索した結果、推定のタンパク質翻訳後修飾因子の遺伝子破壊株 (2 株)、推定の転写制御に関わる因子の遺伝子破壊株 (2 株)、機能未同定遺伝子破壊株 (2 株) の計 6 株において、セルロース誘導能が減少していることを明らかにした。現在はこれら候補遺伝子の破壊株を改めて作出し、それら株におけるセルラーゼ・ヘミセルラーゼの遺伝子発現量を定量的に解析することにより、順次同定した因子の機能解析を進めている。

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)

【査読あり】

1. Emi Kunitake, Shuji Tani, Jun-ichi Sumitani, Takashi Kawaguchi. A novel transcriptional regulator, ClbR, controls the cellobiose- and cellulose-responsive induction of cellulose and xylanase genes regulated by two distinct signaling pathways in *Aspergillus aculeatus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 5:2017-2028.

2. Shuji Tani, Atsushi Tsuji, Emi Kunitake, Jun-ichi Sumitani, Takashi Kawaguchi. Reversible impairment of the *ku80* gene by a recyclable marker in *Aspergillus aculeatus*. *AMB Express*, 2013, 3:4

[学会発表] (計 5 件)

1. 谷修治. *Aspergillus aculeatus* セロビオース応答制御因子 ClbR の機能解析とその応用. 2013 年日本農芸化学大会. 2013 年 3 月 27 日

2. 川村彩乃, 國武絵美, 谷修治, 炭谷順一, 川口剛司. *Aspergillus aculeatus* セロビオース応答因子 ClbR とそのパラログ因子 ClbR2 の機能解析. 2013年に本農芸化学大会. 2013年3月26日
3. 谷修治, 國武絵美, 川村彩乃, 炭谷順一, 川口剛司. The effect of the *clbR* overexpression on cellulose degrading enzyme production in *Aspergillus aculeatus*. The 27th Fungal Genetics Conference at Asilomar. 2013年3月14日
4. 國武絵美, 谷修治, 炭谷順一, 川口剛司. ClbR and its paralog, ClbR2, regulate the expression of the cellulase genes in response to cellobiose in *Aspergillus aculeatus*. The 27th Fungal Genetics Conference at Asilomar. 2013年3月14日
5. 川村彩乃, 國武絵美, 谷修治, 炭谷順一, 川口剛司. *Aspergillus aculeatus* が生産するセルラーゼ酵素群のセクレトーム解析. 第26回セルラーゼ研究会, 2012年5月25日

〔図書〕(計1件)

谷修治. 「多様な因子が制御する糸状菌セルロース系バイオマス分解酵素遺伝子の発現制御機構の解明」公益社団法人 日本農芸化学会 化学と生物. 2013年4月

〔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