

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450110

研究課題名(和文)糸状菌セルロース誘導制御因子 ClbR の作用機序解析

研究課題名(英文)Functional analysis of ClbR controlling cellulose responsive inductin 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(系)・講師

研究者番号：80405357

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：糸状菌におけるセルロース系バイオマス分解酵素遺伝子の発現は、様々なタンパク質により調節されている。我々は、転写因子ClbRとその相互作用因子ClbR2が遺伝子の発現を調節していることだけでなく、タンパク質リン酸化酵素やタンパク質脱リン酸化酵素など新たなタンパク質がセルロースに应答した遺伝子発現調節に関わっていることを見出した。本研究成果は、産業有用酵素の高生産株の創製に向けた基盤となるものである。

研究成果の概要(英文)：The expression of cellulose-degrading enzyme genes are controlled by various regulators in filamentous fungi. We have identified that transcription factor, ClbR, interacts with its paralog, ClbR2, and which regulate the expression of the gene encoding transcription factor, ClrB (ManR). Expressed ClrB appears to induce the expression of cellulase and xylanase genes. We revealed that protein kinase and protein phosphatase control the cellulose responsive gene expression. Further analysis enabled to isolate another 2 cellulose-utilization deficient mutants.

研究分野：応用微生物

キーワード：Aspergillus aculeatus セルラーゼ遺伝子 発現制御

1. 研究開始当初の背景

糸状菌 *Aspergillus* 属におけるセルラーゼ・キシラナーゼ遺伝子の発現誘導は、セルロースやキシランが分解されて遊離した単糖やオリゴ糖が菌体内に取り込まれることに始まり、最終的に活性化された経路特異的な転写因子が転写を亢進することにより起きる。申請者は、糖化力に優れたセルラーゼ生産菌 *A. aculeatus* における未同定のセルロース誘導機構を解明することを目的として、まず、研究開始当初唯一同定されていたセルロース・キシラン誘導を制御する転写因子 XlnR を介さず、セロピオース・セルロースにより発現が誘導されるセロピオヒドロラーゼ I 遺伝子 (*cbhI*) の発現様式を指標にしたポジティブスクリーニング系を構築して、制御因子を探索した。その結果同定した機能未知の Zn(II)₂Cys₆ 型転写因子様タンパク質は、XlnR 非依存的に *cbhI*, キシラナーゼ Ia 遺伝子 (*xynIa*) のセロピオース・セルロース誘導を正に制御する因子であることを証明し、これを cellobiose response regulator (ClbR) と命名した。興味深いことに *clbR* 遺伝子破壊株において、セロピオースに応答した *cbhI*, *xynIa* 遺伝子発現は約 8 割の減少にとどまったため、セロピオース誘導特異的な転写因子は他に存在すると推測された。一方、同時期に Coradetti らは、*Aspergillus nidulans* において Zn(II)₂Cys₆ 型転写因子 ClrB (ManR) が、セロピオース誘導を制御していることを明らかにし *Aspergillus* 属では ClrB (ManR) が XlnR 非依存的なセロピオース誘導を制御する特異的な転写因子であると考えられた。

研究当初、*clbR* 破壊により発現量が落ちた遺伝子でも、*clbR* 高発現により発現量が増加するもの、変化の無いもの、或いは低下する遺伝子にわかれたことから、ClbR は他の因子と協調的にセルロースに反応した遺伝子発現誘導を調節しているものと仮定した。そこで、ClbR が ClrB を介したセルロース誘導経路にどのように関与しているのか、または ClbR の相互作用因子 (仮称 FactorB) を含めた ClbR 作用機序を解明することを目的とした。

2. 研究の目的

糸状菌におけるセルラーゼ遺伝子発現誘導機構を解明することを目的として、新規転写因子 ClbR の作用機序解析と新たなセルラーゼ遺伝子発現制御調節因子を同定することを目的とした。

(1) 新奇転写制御因子 ClbR の相互作用因子の探索とその機能解析

FactorB (ClbR の相互作用因子 (仮称)) の機能解析

ClbR と FactorB の相互作用解析

ClbR と相互作用する因子の探索と機能解析

(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

3. 研究の方法

(1) 新奇転写制御因子 ClbR と FactorB を介したセルロース誘導の分子機構の解明

FactorB の機能解析

A. aculeatus factorB 遺伝子破壊株や高発現株において、種々の糖に反応した各種セルロース系バイオマス分解酵素遺伝子の発現量をノーザンブロット法や定量 PCR 法を用いて解析し、FactorB が制御する遺伝子を特定するとともに、FactorB を介した遺伝子発現を誘導する糖を特定する。

ClbR と FactorB の相互作用解析

リコンビナント c-Myc-tagged ClbR と HA-tagged FactorB を調製し、共免疫沈降法により両因子の *in vitro* における相互作用を解析する。また、両因子を用いて Electrophoresis mobility shift assay (EMSA) を行い、ClbR と FactorB が協調的に遺伝子プロモータ領域に結合する可能性を検証する。また、*in vivo* においても ClbR と FactorB の DNA 結合領域及び相互作用を解析するために、GFP-ClbR と HA-FactorB 融合タンパク質を共発現する株を作出する。この株を誘導・非誘導両条件下で培養した際の両タンパク質の DNA への結合領域と協調的な DNA への結合を解析するた

めに,Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay 及び Re-ChIP assay を行う。

CibR と相互作用する因子の探索と機能解析

clbR 高発現株において, CibR 制御下にある *xynIa* の発現は亢進したが, *cbhI* 発現量に変化はなく, CibR を介した遺伝子発現は複雑に制御されていることが示唆された。CibR はそれら遺伝子発現を異なる因子と協調的に調節している可能性があり, 継続して CibR 相互作用因子を Yeast Two-Hybrid 法や ii) の研究により探索する。また, CibR-FactorB 複合体が XlnR や CtrB など, 経路特異的転写因子と相互作用していることを検証するために, 各種融合タンパク質を糸状菌内で発現し, ChIP assay や Re-ChIP assay により各因子間の相互作用を解析する。

(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

新奇転写因子 CibR を同定した方法を用いて, さらなる因子の探索を行う。まず, アグロバクテリウム形質転換法を用いて, 1 コピーの transfer DNA (T-DNA) を *A. aculeatus* 染色体の任意の遺伝子座に導入し, 網羅的に遺伝子破壊株を作出する。

その形質転換の宿主には, セロピオヒドロラーゼ I 遺伝子プロモータ (*Pcbh*) の制御下でオロチジン-5'-リン酸脱炭酸酵素 (*pyrG*) を発現する株 (*Pcbh-pyrG*) を用いる。この場合, *cbhI* 発現誘導経路, 或いはピリミジン生合成経路を欠損した株が, 5-フルオロオロチン酸 (5-FOA) 含有培地で生育可能になる。次に, 取得した 5-FOA 耐性株から, セルロース培地でのみ生育が低下する株を選択することにより, ピリミジン生合成経路の欠損株を除外する。更に, 単離株の形質を解析するとともに, T-DNA 周辺配列を Thermal Asymmetric Interlaced-PCR (TAIL-PCR) 法, または Inverse PCR 法により増幅後, 増幅断片の配列を解読し, *A. aculeatus* ドラフトゲノム配列情報を基に破壊遺伝子を特定する。最後に, 特定した遺伝子の破壊株を相同組換えにより改めて

作出し, その表現系とセルロース系バイオマス分解酵素遺伝子の発現様式を解析することにより, 因子の機能を同定する。より詳細な因子の機能解析は, 推定アミノ酸配列から類推される機能を参考にして, 順次解析する。また, 既に複数のセルロース資化能欠損株が取得できているため, 欠損遺伝子の同定とそれら因子の機能解析を同時に遂行する。

4. 研究成果

(1) 新奇転写制御因子 CibR の相互作用因子の探索とその機能解析

FactorB の機能解析

Yeast two hybrid 法, FactorB の遺伝子破壊および高発現株における各種酵素遺伝子の発現量解析から, FactorB と称した CibR の相互作用因子は CibR と 42% の相同性を有すパラログ (CibR2 と命名) であることが判明した。CibR と CibR2 は, 協調的に転写因子 CtrB の発現を制御してセルロースに応答した遺伝子の発現を調節していることを明らかにした。CibR 高発現によりセルロースに応答した遺伝子発現は亢進するものがある一方で, CibR2 高発現により発現量に変動は見られなかったことから, CibR のタンパク質量が遺伝子発現のボトルネックであることが示唆された。

CibR と FactorB (CibR2) の相互作用解

マルトース結合タンパク質と CibR (MalE-CibR) および CibR2 融合タンパク質 (MalE-CibR2) を用いたゲルシフトアッセイを行い, MalE-CibR は単独で結合しうるプロモーターと, MalE-CibR2 と協調的に結合するプロモーターの二種類あることを明らかにした。興味深いことに, CibR 高発現株において発現量が亢進したキシラナーゼ Ia (*xynIa*) 遺伝子プロモーターには, MalE-CibR が単独で結合し, 発現量が変動しなかった ManR 遺伝子プロモーターには MalE-CibR と MalE-CibR2 が協調的に結合していることが示された。以上の結果を得て, *in vivo* における CibR と CibR2 の相互作用を解析している段階であるが, リコンビナントタンパク質の検出に成功していない。これまでに, CibR が炭素源にかかわらず常に核に局在して

とが判明したため、現在は、核画分を調整してタンパク質の検出を試みるとともに、Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) により相互作用解析を行う段階である。

ClbR と相互作用する因子の探索と機能解析

Yeast two hybrid screening により、ClbR と ClbR2 だけでなく、*Neurospora crassa* でセルラーゼ遺伝子の制御因子として同定された Clr-1 オルソログ (ClrA) と ClbR が相互作用していることが示唆された。また、同様の探索により、ClbR と 24% の相同性を有す Clr3 が、ホモダイマーを形成するだけでなく、他のセルロース誘導制御因子と相互作用することが示唆された (未発表データ)。今後、BiFC により各因子の *in vivo* における相互作用を解析する計画である。

(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、構築した *A. aculeatus* T-DNA 挿入変異株ライブラリから、セルロース資化能欠損株を単離し、変異遺伝子を同定した。同定した遺伝子の破壊株および相補株を作成し、その影響を定量的に評価した結果、dipeptidyl peptidase IV (DppIV), Serine-arginine protein kinase F (SprkF), protein phosphatase (未発表データ) がセルロースに応答した遺伝子発現制御の初期段階に関与していることを明らかにした。以上の結果は、既知因子の未知機能を明らかにした点で新規である。

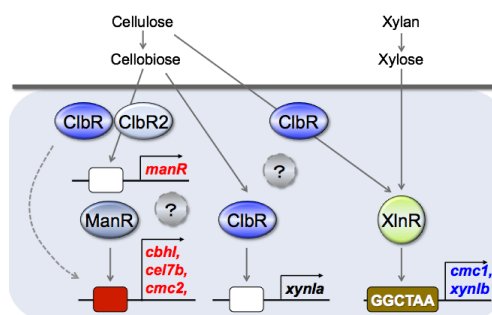
DppIV は、大腸菌から人まで広く保存されたペプチダーゼである。人の DppIV は、glucagon like protein 1 (GLP1, ペプチドホルモン) を分解することにより、血糖値を調節する重要な役割を担っている。しかし、その他の生物における生理学的な知見は少ないのが現状である。我々は、糸状菌 *Aspergillus* において DppIV が酸化ストレス応答に関与していることを明らかにし、現在 DppIV の基質を探索している段階である。

また、現在解析中ではあるが、新たな制御因子欠損株の単離にも成功しており、本研究が、セルロース系バイオマス分解酵素群の発

現制御の解明に繋がるものと確信している。

次の図は、これまでに明らかにされた制御機構の一端を示したものである。

セルロース系バイオマス分解酵素遺伝子の制御機構



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 4 件)

Kunitake E, Kawamura A, Tani S, Takenaka S, Ogasawara W, Sumitani J, Kawaguchi T.

Effects of *clbR* overexpression on enzyme production in *Aspergillus aculeatus* vary depending on the cellulosic biomass degrading enzyme species. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2015;79(3):488-95. 査読あり

doi: 10.1080/09168451.2014.982501.

Tani S, Kawaguchi T, Kobayashi T.

Complex regulation of hydrolytic enzyme genes for cellulosic biomass degradation in filamentous fungi. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2014 Jun;98(11):4829-37. 査読あり

doi: 10.1007/s00253-014-5707-6.

Suzuki K, Sumitani J, Nam YW, Nishimaki T, Tani S, Wakagi T, Kawaguchi T, Fushinobu S.

Crystal structures of glycoside hydrolase family 3 β -glucosidase 1 from *Aspergillus aculeatus*.

Biochem J. 2013 Jun 1;452(2):211-21. 査読あり

doi: 10.1042/BJ20130054.

Tani S, Tsuji A, Kunitake E, Sumitani J, Kawaguchi T.

Reversible impairment of the *ku80* gene by a

recyclable marker in *Aspergillus aculeatus*.
AMB Express. 2013 Jan 12;3(1):4. 査読あり
doi: 10.1186/2191-0855-3-4.

〔学会発表〕(計 9 件)

片山椋平、遊亀翔太、谷修治、炭谷順一、川口剛司. *Aspergillus aculeatus* セルロース資化能欠損株の表現型解析. 第15回糸状菌分子生物学コンファレンス, H27年11月19, 20日、ルミエール府中(東京都府中市)

谷修治、炭谷順一、川口剛司. 糸状菌におけるセルロース系バイオマス分解酵素遺伝子群の多様な制御機構. 第29回セルラーゼ研究会 H27年7月17, 18日、横浜テクノタワーホテル(神奈川県横浜市)

遊亀翔太、國武絵美、谷修治、炭谷順一、川口剛司. *Aspergillus aculeatus* dipeptidyl peptidase IV のストレス応答に関する解析. 2015年日本農芸化学会 H27年3月26-29日、岡山大学津島キャンパス(岡山県岡山市)

④ 遊亀翔太、國武絵美、谷修治、炭谷順一、川口剛司. *Aspergillus aculeatus* における dipeptidyl peptidase IV の機能解析. 第14回糸状菌分子生物学コンファレンス H26年11月15, 16日、東北大学川内北キャンパス(宮城県仙台市)

⑤ 谷修治. 古典遺伝学による制御因子の探索について 第2回糸状菌若手の会ワークショップ H26年11月14, 15日、岩沼屋(宮城県仙台市)

⑥ 谷修治、炭谷順一、川口剛司. Diverse regulation of hydrolytic enzyme genes for cellulosic biomass degradation in filamentous fungi –with central focus on *Aspergillus*. Mie Bioforum 2014. H26年11月18-21日、ネムホテル&リゾート(三重県志摩市)(国際学会・招待講演)

⑦ 藤原麻友美、谷修治、炭谷順一、川口剛司, 糸状菌 Cellobiose response regulator (ClbR) パラログの機能解析. H26年3月27-30日、明治大学生田キャンパス(神奈川県川崎市)

Tani S, Kunitake E, Sumitani J, Kawaguchi T. Functional analysis of ClbR and ClbR2 controlling the cellulosic biomass degrading enzyme gene expression in *Aspergillus aculeatus*.

The 12th European Conference on Fungal Genetics. H26年3月23-27日、(国際学会)(Seville, Spain)

遊亀翔太、國武絵美、谷修治、炭谷順一、川口剛司. *Aspergillus aculeatus* セルロース系バイオマス分解酵素遺伝子の発現制御因子の同定. 第13回糸状菌分子生物学コンファレンス H25年11月20, 21日、つくば国際会議場・文部科学省研究交流センター(茨城県つくば市)

〔図書〕(計 0 件)

該当なし

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

該当無し

取得状況(計 0 件)

該当無し

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.biosci.osakafu-u.ac.jp/shuji/>

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・講師
研究者番号: 80405357