

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26850058

研究課題名(和文)糸状菌アクレモニウム・セルロリティカスの糖化酵素遺伝子の発現制御機構の解析

研究課題名(英文)Expression mechanism of cellulase and hemicellulase genes in the fungus
Talaromyces cellulolyticus (formerly Acremonium cellulolyticus)

研究代表者

藤井 達也 (FUJII, Tatsuya)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・機能化学研究部門・主任研究員

研究者番号：10613549

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、糸状菌Talaromyces cellulolyticus(旧称Acremonium cellulolyticus)の糖化酵素遺伝子の発現機構に着目し、(1)他の糸状菌で糖化酵素遺伝子を制御することが知られている転写因子の解析、(2)新規な転写因子の検索およびその機能解析、を試みた。その結果、tacA遺伝子やtctA遺伝子、Hap complex遺伝子などが本菌の糖化酵素遺伝子の発現に寄与することを見出した。また、新規な転写因子の単離には至らなかったが、その過程で、相同組み換え能が飛躍的に向上した株の取得や、糖化酵素遺伝子の発現に重要なプロモーター領域の特定といった成果を得た。

研究成果の概要(英文)：The expression mechanism of cellulase and xylanase genes in the filamentous fungus Talaromyces cellulolyticus (formerly Acremonium cellulolyticus) was investigated by (i) analyzing the transcriptional factors genes which showed homology with those in other filamentous fungi, (ii) screening of the novel transcriptional factors.

We found that tacA, tctA, and Hap complex genes contribute to expression of cellulase and xylanase genes. Although the novel transcriptional factors have not been obtained, the strain which has high homologous recombination efficiency and the important promoter regions for cellulase gene expression were isolated.

研究分野：応用微生物学

キーワード：糖化酵素 転写因子 セルラーゼ タラロマイセス・セルロリティカス アクレモニウム・セルロリティカス

1. 研究開始当初の背景

セルロース系バイオマスを原料として有用物質を生産する際には、バイオマス中のセルロースやヘミセルロースといった多糖類を加水分解し、生成した単糖を直接の基質として用いることが多い。多糖類を分解する方法として、微生物が生産する糖化酵素(セルラーゼ・ヘミセルラーゼ)を利用する酵素糖化法が挙げられる。酵素糖化を実施するためには、優秀な糖化酵素生産菌の開発が重要であり、そのターゲットとして糸状菌が注目されている。1982年に、通商産業省工業技術院(現産業技術総合研究所)によって、東北地方の土壌から糸状菌 *Talaromyces cellulolyticus* (旧称 *Acremonium cellulolyticus*) が単離された。本菌の生産する糖化酵素は、代表的な糖化酵素生産菌として知られる糸状菌 *Trichoderma reesei* と同様に各種のセルラーゼ・ヘミセルラーゼを含み、種々のバイオマスからグルコースやキシロースなどの単糖を得ることができる。

現在に至るまで、国内・国外共に、糖化酵素生産菌として *Tr. reesei* の研究開発が最も盛んに行われており、*Tr. reesei* 由来の酵素製剤が数多く販売されている。*Ta. cellulolyticus* に関しては、Meiji Seika ファルマ株式会社より「アクレモニウムセルラーゼ」として酵素製剤が販売されているものの、本菌の研究開発は *Tr. reesei* のそれと比較して進んでいるとは言い難い。一方で、本菌が生産する各種糖化酵素を *Tr. reesei* のそれと比較したところ、本菌の糖化酵素群は *Tr. reesei* のそれよりもバイオマスの糖化能が高いという報告¹⁾や耐熱性が高いという報告²⁾があることから、本菌が *Tr. reesei* よりも優れている可能性が示唆されている。このことから、研究開発を進展させることにより、ジャパン発の本菌が世界を代表する糖化酵素生産菌へと成長していくことが期待される。

Tr. reesei では、全ゲノム情報や宿主ベクター系といった遺伝子組み換えのツールが整備されており、これらを利用した菌株育種や糖化酵素の生産機構などについて、分子レベルの解析が進められている。しかし、本菌の分子レベルでの解析は進んでいるとは言い難く、遺伝子組み換えの例も少ない。これは遺伝子組み換えツールが整備されていなかったことが最も大きな要因であり、特に形質転換の困難さが大きな問題であった。しかし最近、申請者らの研究により本菌の全ゲノム情報が取得され³⁾、さらに効率的な形質転換系が開発された⁴⁾。これにより、遺伝子組み換えを利用した菌株の分子育種や解析が容易に実現可能となったことから、本菌の解析の幅が飛躍的に広がった。

上述の通り、最近になってようやく遺伝子組み換えツールが整備されたため、本菌の糖化酵素遺伝子の発現機構について得られている知見は少ない。研究開始当初、各種転写

因子の遺伝子破壊株の解析により、*creA* 遺伝子が遺伝子発現を抑制すること、*xlnR* 遺伝子が遺伝子発現を一部誘導すること、*clbR* 遺伝子は遺伝子発現に関わらないことがそれぞれ見出されている。一方で、*Tr. reesei* では *xlnR* 遺伝子破壊株が糖化酵素を全く生産しないこと、*Aspergillus aculeatus* では *clbR* 遺伝子破壊株の酵素生産性が野生型株よりも低下することがそれぞれ見出されており、これらの菌と本菌では糖化酵素遺伝子の発現メカニズムが異なると考えられる。このことから、本菌には新規な発現メカニズムが存在する可能性が考えられ、これを明らかにできれば学術的な価値が高い。また、本菌は既に実用化された産業上重要な菌であるため、酵素生産性を改良できれば、産業利用に直接的に貢献できると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、(1)他の糸状菌で糖化酵素遺伝子を制御することが知られている転写因子を解析する、(2)新規な転写因子を検索し、その機能を解析することにより本菌の糖化酵素遺伝子の発現制御機構を解明し、得られた知見を糖化酵素生産の改善に役立てることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、*Ta. cellulolyticus* YP-4 株(ウラシル要求性変異株)を宿主とし、各種形質転換体を取得した。取得した各株を、セルロースを単一炭素源とする培地で培養し、得られた培養液・菌体を解析に供した。

各株の糖化酵素生産性は、単位培養液当たりのセルラーゼ・キシラナーゼ活性、および各糖化酵素遺伝子の発現量を測定することにより評価した。

新規な転写因子の探索は、以下のように行った。ピオチン標識された DNA 断片を、ストレプトアビジンで修飾した磁気ビーズに結合し、これを *Ta. cellulolyticus* の核タンパク質と反応させた。反応後、得られた溶出液を SDS-PAGE 法を用いて展開し、選抜したバンドを切り出し、LC-ESI-MSMS 解析に供することにより、タンパク質の同定を行った。

4. 研究成果

(1) 他の糸状菌で知られる転写因子の解析

全ゲノム情報から糖化酵素遺伝子の発現への関与が予測された推定転写因子遺伝子を7個選抜した。これらの遺伝子の遺伝子破壊株を作製し、糖化酵素(セルラーゼ、キシラナーゼ)の生産性を検討した。その結果、*tacA* 遺伝子および *tctA* 遺伝子破壊株の酵素生産性がコントロール株のそれよりも有意に

減少していた(図1)。 *tacA* および *tctA* がコードする推定アミノ酸配列は、それぞれ *Tr. reesei* の Ace1 および *Fusarium solani* の CtfB1 と相同性を示す。さらに、セルラーゼおよびキシラナーゼ遺伝子の発現量を検討したところ、これら遺伝子破壊株の発現量はコントロール株のそれよりも低下していた。以上の結果は他の糸状菌では報告されておらず、本菌特有の転写制御メカニズムの存在を示唆している。

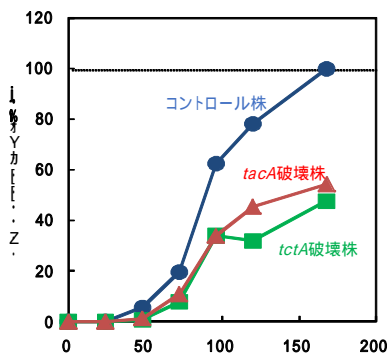


図1 *tacA* および *tctA* 遺伝子破壊株の酵素生産性

また、広範な遺伝子の発現を制御することが知られる Hap complex 遺伝子(*hapB* 遺伝子) および *areA* 遺伝子のホモログ遺伝子を本菌の全ゲノム情報から見出した。これらの遺伝子の遺伝子破壊株を作製し、各表現型を解析した。まず初めに、これらの株の各種培地での生育を観察したところ、 *hapB* 遺伝子破壊株の生育はコントロール株と変わらなかったのに対し、 *areA* 遺伝子破壊株の生育は明らかにコントロール株より悪かった。次に、各株のセルラーゼ・キシラナーゼ生産性を測定したところ、両株ともコントロール株よりも低かった。一方、各種糖化酵素遺伝子の発現は、 *hapB* 遺伝子破壊株ではコントロール株よりも低かったが、 *areA* 遺伝子破壊株では大きな差がなかった。以上の結果から、本菌の Hap complex 遺伝子は糖化酵素生産に直接的に寄与していると考えられるが、 *areA* 遺伝子は菌体の生育に寄与し、糖化酵素遺伝子の発現に直接的には関与していないと考えられた。

本研究により、新たに複数の転写因子が本菌の糖化酵素の発現に寄与することが明らかとなった。今後、これらの転写因子を改良することにより、本菌の酵素生産性の向上が見込まれる。

(2) 新規な転写因子の検索

本研究では、まず初めに本菌の糖化酵素遺伝子のプロモーター領域のうち、転写に重要な領域を特定することを試みた。代表的な糖化酵素であるエンドグルカナーゼ I をコードする *cel7B* 遺伝子のプロモーター領域(約

1200 bp) をクローニングし、これに β -glucuronidase (GUS) 遺伝子を連結したレポーター解析を試みた。ところが、構築した各種遺伝子カセットが本菌のゲノム中にランダムに複数導入されるという問題が確認され、これを解決する必要があった。

DNA ligase IV をコードする *ligD* 遺伝子の発現を抑制すると、相同組み換え効率が上昇するという報告がある⁵⁾。そこで、文献⁶⁾を参照し、 *ligD* 遺伝子を破壊し、その後生育マーカー遺伝子をリサイクルする技術を構築した(図2)。この技術により取得した株(YDLP 株)は、YP-4 株と比較して相同組み換えの効率が飛躍的に上昇(27% → 97%)していた。

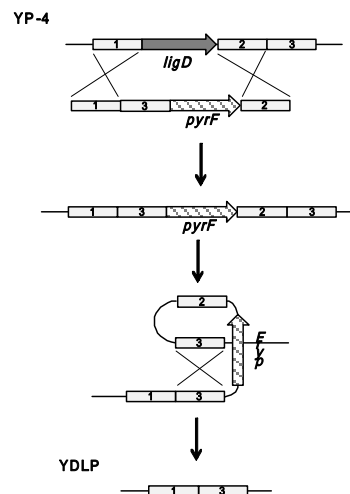


図2 *ligD* の破壊および *pyrF* マーカー遺伝子のリサイクル

次に、YPLD 株を宿主とし、上記のレポーター解析に用いる各種遺伝子カセットを導入したところ、すべてゲノム中の同じ箇所に導入されていた。取得した各株をセルラーゼ生産条件下で培養し、細胞内の GUS 活性を測定した(図3)。その結果、 *cel7B* プロモーターの-912 から-612 領域(特に-812 から-712 領域)が転写に重要なことが明らかとなった。

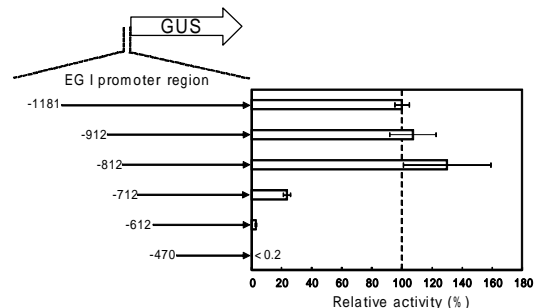


図3 セルラーゼプロモーター領域を用いたレポーター解析

次に、上記の-912 から-612 領域に結合する新規な転写因子を見出すことを試みた。本領域を 50 bp ずつ分割し、それぞれに結合する

核タンパク質を探索した。その結果、各領域に特異的な結合タンパク質のバンドを計 12 種類確認した。しかし、これらを LC-ESI-MS-MS 解析により同定した結果、遺伝子発現に寄与すると考えられるものは得られなかった。

本研究では、新規な転写因子を見出すことはできなかったが、その過程で YDLP 株の作製に成功した。これは、本菌の遺伝子組み換え技術が飛躍的に進歩したことを意味し、今後の様々な解析に応用されると期待される。さらに、レポーター解析により、本菌の糖化酵素遺伝子の発現に重要な情報が得られた。今後、本菌の糖化酵素遺伝子の発現メカニズムが更に明らかとなることが期待される。

【引用文献】

- 1) Fujii et al., *Biotechnol Biofuels*. 2009, 1;2(1):24.
- 2) Yamanobe et al., *Agri Biol Chem*. 1987, 51(12):3207-3213
- 3) Fujii et al., *Biotechnol Biofuels*. 2015, *Genome Announc.*, 26, 3.
- 4) Fujii et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 2012, 76, 245-249.
- 5) Hayata et al., 2014, *Appl. Biochem. Biotechnol*. 174, 1697-1704.
- 6) Tani et al., 2013, *AMB Express*. 3(1), 4.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Tatsuya Fujii, Hiroyuki Inoue, Kazuhiko Ishikawa, Tamotsu Hoshino., Deletion analysis of GH7 endoglucanase gene (*cel7B*) promoter region in a *Talaromyces cellulolyticus* *ligD*-disrupted strain (2017), *Appl. Biochem. Biotechnol.* 査読有、In press.

Tatsuya Fujii, Hiroyuki Inoue, Kazuhiko Ishikawa., Decreased cellulase and xylanase production in the fungus *Talaromyces cellulolyticus* by disruption of *tacA* and *tctA* genes, encoding putative zinc finger transcriptional factor., (2015), *Appl. Biochem. Biotechnol.* 査読有、vol. 175, 3218-3229. doi: 10.1007/s12010-015-1497-2.

Tatsuya Fujii, Hiroyuki Inoue, Masahiro Watanabe, Kazuhiko Ishikawa., Genetic and Protein Engineering of Cellulase Producing Fungi *Talaromyces cellulolyticus* (Formerly *Acremonium cellulolyticus*)., (2015), *Lignocellulose Degradation and Biorefinery* (Proceedings of MIE Bioforum 2014), 査読無、183-190.

〔学会発表〕(計 3 件)

藤井達也、井上宏之、石川一彦、星野保、

糸状菌 *Talaromyces cellulolyticus* の糖化酵素遺伝子の発現機構の解析、日本農芸化学会、2017/03/18、京都女子大学(京都府・京都市)

Tatsuya Fujii, Strain improvement of *Streptomyces* sp. for polyketide production, JBEI Fuel Synthesis Group Meeting, 2017/02/08, Emeryville (USA)

Tatsuya Fujii, Hiroyuki Inoue, Masahiro Watanabe, Kazuhiko Ishikawa., Genetic and Protein Engineering of Cellulase Producing Fungi *Talaromyces cellulolyticus* (Formerly *Acremonium cellulolyticus*), MIE Bioforum, 2014/11/19, 合歡の郷(三重県・志摩市)[依頼講演]

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)
取得状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等：該当なし

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

藤井 達也 (FUJII, Tatsuya)
国立研究開発法人産業技術総合研究所・機能化学研究部門・主任研究員
研究者番号：10613549