

糸状菌 *Aspergillus aculeatus* におけるセルラーゼ遺伝子発現制御機構の解析

谷 修治

(大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科)

研究の目的

Aspergillus aculeatus は糖化力に優れた多種のセルラーゼ・ヘミセルラーゼを分泌する特長を有している¹⁻³⁾。この特長をセルロース系バイオマスの酵素糖化に活用するために、*A. aculeatus* におけるセルラーゼ遺伝子発現制御機構を分子レベルで解明し、得られた知見を基盤としてセルラーゼの大量発現系を構築することを目指している。これまでに糸状菌におけるセルラーゼ・ヘミセルラーゼ遺伝子の転写活性化因子として、*Aspergillus* 属では唯一XlnRが同定されており、*Trichoderma* 属ではXlnRのホモログ因子Xyr1が、セルラーゼ・ヘミセルラーゼ遺伝子の発現誘導を統御していることが報告されている⁴⁾。一方我々は、XlnRに非依存的な新規セルラーゼ遺伝子発現制御経路が*A. aculeatus* に存在することを見出し (XlnR-independent pathway)、この経路によりセロビオヒドロラーゼI遺伝子 (*cbhI*) とカルボキシメチルセルラーゼ2遺伝子 (*cmc2*) が制御されていることを見出した。本課題では、*cbhI*遺伝子の発現様式を指標として、XlnR-independent pathwayに関わる生理的誘導物質とプロモーター上のシスエレメントを同定した。

方法

A. aculeatus の培養は最少培地を用いて全て 30°C で行った。RNA は、グルコースを単一炭素源とした最少培地にて 24 時間培養後、集菌、洗浄し、更に最少培地に種々の炭素源を添加した培地にて、3 時間培養した菌体より調製した。*cbhI* 遺伝子転写産物はリアルタイム PCR 法により定量した。*cbhI* プロモーターの機能解析は、種々の改変 *cbhI* プロモーターを GUS 遺伝子に融合したレポータープラスミドを *A. aculeatus* *sC* 座位にシングルコピーで導入した株を用いて行った。GUS 活性は pNP-glucuronide を用いて測定した。

結果

1) *A. aculeatus* *cbhI* 遺伝子の生理的誘導物質の同定

糸状菌セルラーゼ遺伝子の発現は、セルロースの加水分解産物やその糖転移反応生成物である二糖により誘導されると想定されている。そこで、グルコースがβ-結合した二糖に着目し、ソフォロース (β-1,2)、ラミナリビオース (β-1,3)、セロビオース (β-1,4)、ゲンチオビオース (β-1,6) の *cbhI* 遺伝子発現誘導能をリアルタイム PCR 法を用いて解析した。各二糖の直接的な影響を解析するために、グルコシダーゼ阻害剤であるノジリマイシンを培地に添加し、*cbhI* 発現を誘導した。その結果、セロビオースによる遺伝子発現誘導能が最も大きく、ラミナリビオースがその約 30%の誘導能を有していた

以外は、顕著な遺伝子発現誘導は観察されなかった。また、ラクトースも *cbhI* 遺伝子発現を誘導しなかったことから、 β -1,4 結合した二糖であるだけでなく、C4 の水酸基の立体配置が生理的誘導物質として機能するために重要であることが示唆された。

一方で、*A. aculeatus* が分泌する β -グルコシダーゼは活性が強く、ノジリマイシンを添加していない条件ではセロビオースが即座に加水分解され、誘導剤として機能しない。そこで、*cbhI* 遺伝子発現を誘導するのに十分なセロビオース濃度をノジリマイシン存在下で検討した結果、30 nM 以上のセロビオースが存在すれば *cbhI* 発現は誘導されることが示された。 β -グルコシダーゼのセロビオースに対する K_m 値は数百 μ M 以上であることから、低濃度のセロビオースが継続的に供給されればセルラーゼの発現は誘導されるものと推測された。

2) *cbhI* 遺伝子発現誘導に必要なシスエレメントの同定

cbhI 遺伝子のプロモーター領域を順次欠損したプロモーターと部位特異的変異を導入した改変プロモーターの機能をGUSをレポーターとして解析し、*cbhI* 遺伝子の発現誘導に必要なシスエレメントを同定した。GUS活性は、改変プロモーターを有すレポータープラスミドを *A. aculeatus* のATPスルフリラーゼ遺伝子座に1コピー導入した株を用いて測定した。まず、翻訳開始点の上流-657 のプロモーター領域をGUSに融合させた場合、*cbhI* 遺伝子の誘導基質であるアビセルに応答したGUS生産が観察され、非誘導炭素源であるアラビノースを用いた場合の45倍の発現が観察された。この発現は、-469までの欠失では影響を受けなかったが、順次-192まで欠失した結果、遺伝子発現量が減少するとともに、発現様式が構成的になり誘導能は消失した。そこで、遺伝子発現誘導能に影響のみられた-469 ~ -192の領域に着目して共通配列を検索した結果、共通配列を含む領域が3カ所見出された。これらの領域に単独、二つずつ、全ての組み合わせで部位特異的変異を導入してその遺伝子発現誘導能を解析した結果、全てに変異を導入した場合にのみ誘導能が完全に消失することが明らかとなった。*cbhI* プロモーター上に見いだされた共通配列と、*cbhI* 遺伝子と同様の発現様式を示す *A. aculeatus cmc2* 遺伝子プロモーター配列を比較することにより、共通配列CCGN₂CCN₇Gが見出された。この配列は、遠藤ら⁵⁾ によって報告された *A. nidulans* エンドグルカナーゼA 遺伝子の発現誘導に必要なシスエレメントCeRE (CCGN₂CN₂TN₄GGA) と類似しており、同様のファクターにより認識されると推測された。

今回の一連のプロモーターの機能解析により、既知の CeRE 配列とは 3 塩基異なる配列でも発現誘導に関わることが明らかとなった。今後、得られた知見を基に XlnR-independent pathway に関わる制御因子を単離するためのスクリーニング系を構築する。

結論

Aspergillus aculeatus cbhI 遺伝子の発現は、XlnR-independent signaling pathway (新規なセルラーゼ遺伝子発現誘導経路) により制御されている。この発現誘導経路は、セルロースの加水分解により生成されるセロビオースにより誘導されることが明らか

になった。一方で、本菌は強力な β -グルコシダーゼ活性を有していることから、当初申請者は、生成されたセロビオースは即座に加水分解され誘導物質として機能しないと予想していたが、30 nM以上のセロビオースが存在すれば*cbhI* 遺伝子発現誘導が観察されたことから、低濃度のセロビオースが継続的に供給されれば、*cbhI* 遺伝子発現は誘導されると推測された。セロビオースからのシグナルはプロモーター上の共通配列 CCGN₂CCN₇Gに伝達され、遺伝子発現誘導に至ることが明らかになった。

文献

- 1) Montenecourt, B. S., *Trichoderma reesei* cellulases. *Trends Biotechnol.* **1**, 156-161 (1983)
- 2) Béguin, P., Molecular biology of cellulose degradation. *Annu. Rev. Microbiol.* **44**, 219-248 (1990)
- 3) Murao, S., Kanamoto, J., and Arai, M., Isolation and identification of a cellulolytic enzyme producing microorganism. *J. Ferment. Technol.*, **57**, 151-156 (1979)
- 4) Stricher, A. R., Grosstessner-Hain, K., Würleitner, E., and Mach, R. L., Xyr1 (xylanase regulator 1) regulates both the hydrolytic enzyme system and D-xylose metabolism in *Hypocrea jecorina*. *Eukaryotic Cell*, **5**, 2128-2137 (2006)
- 5) Endo, Y., Yokoyama, M., Morimoto, M., Shirai, K., Chikamatsu, G., Kato, N., Tsukagoshi, N., Kato, M., and Kobayashi, T. Novel promoter sequence required for inductive expression of the *Aspergillus nidulans* endoglucanase gene *eglA*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **72**, 312-320 (2008)