

糸状菌における G タンパク質/cAMP シグナル伝達経路を介した 多糖分解酵素遺伝子の抑制機構の解析

國武 絵美

三重大学大学院 生物資源学研究科

研究成果

Aspergillus nidulans のセルラーゼ・ヘミセルラーゼのカーボンカタボライト抑制 (CCR) には、転写抑制因子 CreA とは独立して cAMP シグナリング経路が関与することを示した。それぞれの CCR への寄与の大きさは培養条件 (培養方法、誘導物質・抑制性炭素源) により異なるため、極めて複雑な制御メカニズムが存在すると考えられる。

研究の目的

糸状菌のセルラーゼ・ヘミセルラーゼはバイオマス利活用にとって重要な産業用酵素であり、生産性の向上が強く望まれている。これらの酵素遺伝子の発現はその基質由来の糖により誘導されるため、これらの酵素生産にはセルロース系バイオマス由来の基質を炭素源とした培地が利用される。しかし、誘導物質の分解産物である単糖はカーボンカタボライト抑制 (CCR) を引き起こす。従って、酵素生産性の向上は CCR を誘発すると考えられ、CCR の解除株の育種が重要となる。モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* では、CCR には転写抑制因子 CreA が関与することが古くから知られているが、我々は CreA とは独立して cAMP 依存性プロテインキナーゼ (PkaA) を介したシグナル伝達経路が主なセルラーゼ遺伝子の CCR 機構であることを発見した。また PkaA の上流因子である三量体 G タンパク質の α サブユニット ($G\alpha$) 3 種類のうち CCR に関与する主要なものが GanB であることを特定した。本研究では、セルラーゼやヘミセルラーゼの G タンパク質/cAMP シグナル伝達経路が関与する CCR と CreA による CCR を詳細に解析し、CCR 完全解除株を育種するための基盤情報を取得することを目的とした。

方法

これまでに作出していた *creA*、*pkaA*、 $G\alpha$ 遺伝子 (*ganA*、*ganB*、*fadA*) 破壊株に加え、*creA/pkaA*、*creA/ganB* 二重破壊株を新たに作出した (それぞれ $\Delta creA$ 、 $\Delta pkaA$ 、 $\Delta ganA$ 、 $\Delta ganB$ 、 $\Delta fadA$ 、 $\Delta creA/pkaA$ 、 $\Delta creA/ganB$ とする)。セルラーゼ生産性はカルボキシメチルセルロース (CMC) に様々な単糖を加えた寒天固体培地でのプレートアッセイ、あるいはボールミル処理セルロース (BMC) にグルコースを抑制糖として加えた液体培養上清のザイモグラフィにより評価した。また、転写解析においてはセロビオース又は BMC を誘導物質、2-deoxyglucose (2DG) 及び様々な単糖

を抑制物質として培養した菌体から取得した mRNA を用い、リアルタイム PCR により行った。キシラナーゼとマンナーゼ生産性解析ではキシロース及びローカストビーンガムを誘導物質として培養し、その培養上清中の酵素活性を Azo-xylan 及び Azo-carob galactomannan を基質として測定した。また、ザイモグラフィによる評価も行った。転写解析に用いた培養ではキシロースと β -マンノビオースを誘導物質とした。

結果

寒天培地におけるセルラーゼの CCR は $\Delta creA$ ではなく $\Delta pkaA$ と $\Delta ganB$ で解除されることから、セルラーゼの CCR は cAMP シグナリングが主要経路であると考えられた。CreA と PkaA/GanB の関係性を明確にするため、 $\Delta creA/\Delta pkaA$ 、 $\Delta creA/\Delta ganB$ についても解析したところ、単独破壊株よりも高いセルラーゼ生産性を示した (図 1)。これより部分的に CreA が関与すること、CreA と cAMP シグナリングが別経路で CCR に関与することを明らかにした。BMC とグルコースを用いた液体培養によるセルラーゼ生産性とセルラーゼ遺伝子発現を解析したところ、寒天培地での結果とは異なり、 $\Delta pkaA$ や $\Delta ganB$ ではなく $\Delta creA$ で脱抑制が見られた。 $\Delta creA/\Delta pkaA$ 、 $\Delta creA/\Delta ganB$ では $\Delta creA$ よりも早い段階からセルラーゼの発現が見られた。セロビオースを誘導物質に用いた転写解析では、2DG による CCR は $\Delta creA$ 、 $\Delta pkaA$ 、 $\Delta ganB$ でいずれの株でも部分的に解除され、 $\Delta creA/\Delta pkaA$ ではより強い脱抑制が見られた (図 2)。以上より、培養条件により CreA、PkaA、GanB の影響力が異なるが、CreA と PkaA/GanB がそれぞれ独立した経路で CCR を制御していることが示された。セルラーゼはグルコース以外の糖によっても抑制される。グルコースに加えてフルクトース、マンノース、キシロースについて調べた結果、ヘキソース存在下での CCR は $\Delta creA$ 、 $\Delta pkaA$ の両方で部分的に解除されるが、キシロースによる CCR は $\Delta creA$ で完全に解除された (図 2)。 $\Delta ganB$ ではいずれの条件においても $\Delta pkaA$ よりも高い脱抑制率を示していたことから、GanB は PkaA の活性制御だけでない別の CCR 制御も担っている可能性がある。

キシラナーゼとマンナーゼについても同様に発現解析を行った。キシラナーゼ

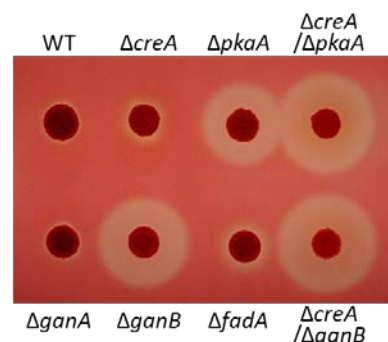


図 1 セルラーゼプレートアッセイの結果。CMC とグルコースを含む寒天培地で培養後、コンゴレッドで染色した。クリアゾーンは CMC が分解された領域を示す。

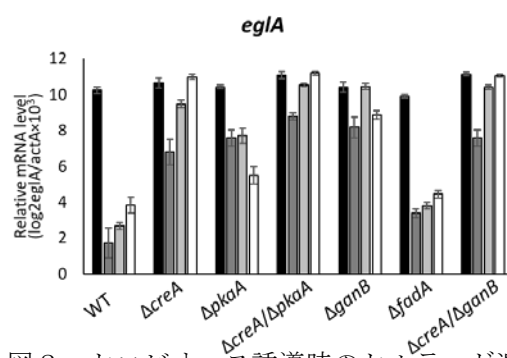


図 2 セロビオース誘導時のセルラーゼ遺伝子 *eglA* の転写解析。セロビオースのみ (黒)、セロビオース + 2DG (濃灰)、セロビオース + グルコース (薄灰)、セロビオース + キシロース (白) を炭素源として培養した結果を示す。転写産物量は *actA* に対して標準化した。

キシラナーゼとマンナーゼについても同様に発現解析を行った。キシラナーゼ

に関しては CreA、PkaA、GanB、FadA 依存的な CCR が確認されたが、CreA あるいは cAMP シグナリング因子の制御の強さは遺伝子により異なっていた。マンナーゼはセルラーゼと同様に培養方法により各因子の寄与の程度が異なっていたが、CreA が主体であり GanB/PkaA は補佐的に CCR に関与していることが示唆された。

ganB 欠損が CCR に与える影響が *pkaA* 欠損より大きかったことを受け、Gα から分岐する PkaA 以外の因子として cNMP 結合ドメインを持つ FbxA に着目した。*fbxA* 破壊株 ($\Delta fbxA$) 及び FbxAcNMP 結合ドメイン欠損株 (*fbxA* Δ CNBD) を作出した。しかし、セルラーゼ、キシラナーゼ、マンナーゼのいずれの生産性においても重大な影響は見られなかった。

結論

A. nidulans のセルラーゼ・ヘミセルラーゼの CCR には CreA と PkaA、GanB、FadA が関わる cAMP シグナリング経路の両方が関与する。また、培養条件によりこれら因子の働きの強度が変動する¹⁾。FbxA はキシラナーゼの発現に関与することが報告されているが²⁾、セルラーゼへの明確な影響は観察されなかった。*creA* や *pkaA* の破壊株は著しい生育低下を示すが、*ganB* 破壊株は生育低下をほとんど示さず CCR 解除の程度も大きいため、産業的酵素生産に適していると考えられる。今後は CreB や CreC を始めとした他の CCR 関連因子の遺伝子破壊との組み合わせにより、生育に大きな影響がなくあらゆる培養条件に対応可能な CCR 解除株の作出が重要であると考えられる。

文献

- 1) Kunitake, E. et. al. (2019) CreA-independent carbon catabolite repression of cellulase genes by trimeric G-protein and protein kinase A in *Aspergillus nidulans*. *Curr. Genet.* **65**: 941-952
- 2) Colabardini, A. C. et al. (2012) Molecular characterization of the *Aspergillus nidulans* *fbxA* encoding an F-box protein involved in xylanase induction. *Fungal Genet. Biol.* **49**: 130-140.