今日の話題

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誘導機構の解明 転写装置工学による酵素生産性改善に向けて

糸状菌は、古来よりわが国の醗酵産業において重用されてきた有用な微生物である。これは糸状菌が、種々の基質特異性を有する酵素を分泌生産する能力に長けていることに加えて、それら酵素の生産性を改善するための分子育種が可能であったことが理由として挙げられる。従来その分子育種は、物理・化学的変異処理による親株染色体DNAへのランダム変異導入により行われてきた。この方法により大量に分泌生産されるようになった酵素が産業利用されてきた歴史から、その有用性を疑う余地はない。しかし、ランダム変異導入では、糸状菌の菌糸が多核であるために致死率99%以上という条件で変異原処理する必要がある、望まれざる変異が潜在する場合が多い。また、さまざまな糖が複雑に絡み合った構造を有するセルロース系バイオマスの分解に必要な酵素の生産など、種々の基質特異性を有する特定の酵素を包括的に高生産することは難しい。今後、これらの問題を回避して抜本的に特定酵素の生産量を向上させるには、それら酵素遺伝子の発現を調節している因子を同定し、その機能を改変することにより生産量を改善する方法（転写装置工学）を確立することが合理的であると考えられる。本稿では、糸状菌が分泌生産する産業有用酵素であるセルロース系バイオマス分解酵素の生産性改善を目指した基礎研究に焦点を絞り、それら酵素遺伝子の発現を調節している新奇制御因子の同定とその機能解析について紹介する。

糸状菌におけるセルラーゼ・ヘミセルラーゼ遺伝子の発現誘導は、構成的に生産されている微量の酵素が高分

子化合物であるセルロース系バイオマスを加水分解し、生じた低分子の糖が菌体内に取り込まれ、転写を活性化することにより起きると考えられている。その発現誘導を制御する因子として初めて同定されたのは、真菌に特有のZn(II)₂Cys₆ DNA結合モチーフを有する転写因子XlnRである⁽¹⁾。この因子は、キシラナーゼ遺伝子発現能欠損株を単離し、その形質を相補する遺伝子をクローニングする遺伝学的手法により1998年に*Aspergillus niger*において同定された。*A. niger* XlnRは、キシランに応答したキシラナーゼやセルラーゼ遺伝子発現誘導だけでなく、キシロース代謝にかかわる酵素遺伝子の発現誘導も制御していた。また、*Trichoderma reesei* では、Xyr1 (XlnRホモログ) がセルロース・キシランに応答したセルラーゼ・ヘミセルラーゼ遺伝子の発現誘導を統御しているとの報告があり、一つの転写因子が多種の遺伝子の発現誘導を制御していることが明らかにされた。一方、*Aspergillus* 属、*Neurospora* 属、*Fusarium* 属では、XlnRを介さないセルロース誘導経路の存在が報告されるなど、糸状菌におけるセルラーゼ・ヘミセルラーゼおよび糖の代謝にかかわる酵素遺伝子発現誘導機構は、一様ではないと考えられた。つまり、転写装置工学の手法を用いて研究対象菌株における酵素生産性を改善するには、それぞれの株において制御機構を解明する必要があると言える。

近年、この多様な制御機構を解明する方法は、ポストゲノム研究の進展と、糸状菌における高効率の遺伝子ターゲティング法の確立により、遺伝子破壊株を作出し

てその形質を網羅的に解析する逆遺伝学的方法が主流になってきた。これにより *Neurospora crassa* では、セルロース誘導を制御する転写因子、CLR-1とCLR-2が⁽²⁾、*Aspergillus oryzae* では、 β -マンナン分解にかかわる酵素遺伝子の発現を誘導する転写因子 ManR が⁽³⁾、*T. reesei* においては、種々の変異株の比較ゲノム解析から、 β -グルコシダーゼの発現を正に制御する転写因子 BglR が新たに同定されるなど⁽⁴⁾、ポストゲノム研究が、未知遺伝子の機能解明に要する時間を飛躍的に短縮し、種々の経路特異的制御因子の同定を可能にした。しかし、その強力な研究ツールを手に入れるには、それ相応の時間と研究費が必要となり、独自に土壌から単離したセラーゼ生産糸状菌 *Aspergillus aculeatus* を研究対象としている筆者にとって、そのパワフルツールは高嶺の花である。

そこで筆者らは、*A. aculeatus* が一倍体であり、分生子が単核であることを利用して、遺伝学的方法によってセルロース誘導機構の制御にかかわる因子を同定することを計画した。それにはまず、ランダム変異導入による望まれざる変異が潜在する問題を解決することに加えて、形質転換効率の低さから職人芸とも言える糸状菌における遺伝子のショットガンクローニングのステップを回避する必要があった。その解決法としては、アグロバクテリウム形質転換法を用いて *A. aculeatus* T-DNA 挿入変異株ライブラリを構築することが有効であった。本法の利点として、T-DNA 挿入により破壊された遺伝子は、Inverse PCR 法や Thermal asymmetric interlaced PCR 法により T-DNA 周辺配列を増幅後、シーケンス解析によって特定できること、また、逆遺伝学的手法では見落とされがちな既知因子の未知機能や、トランスクリプトーム解析では見逃される翻訳後修飾により活性が調節される因子などが検索対象となることが挙げられる。アグロバクテリウム形質転換法は、アセトシリゴン濃度、アグロバクテリウム感染温度・時間、糸状菌の胞子とバクテリアのそれぞれの濃度とそれぞれの比率を検討することで至適化され、T-DNA が *A. aculeatus* 染色体の任意の遺伝子座に主に1コピーで挿入される条件が確立された⁽⁵⁾。一方、この方法の難点は、*A. aculeatus* のゲノムサイズを 35 Mb、遺伝子の平均鎖長を 1.5 kb と仮定すると、*A. aculeatus* の 90% の遺伝子を T-DNA 挿入により破壊するには、約 54,000 株の形質転換体をスクリーニングする必要があることである。実際は、致死

遺伝子欠損株、栄養要求性株やターゲット遺伝子の破壊株とは無縁の表現系を示す株を除外すれば、解析すべき検体数を減らすことができるが、それでも膨大である。そこでさらに解析検体数を減らすために、目的の形質転換体 (XlnR 以外のセルロース誘導制御因子遺伝子が T-DNA 挿入により破壊された株) のみが選択培地 (5-フルオロオロチン酸 (5-FOA) 含有培地) 上で生育可能となるように、セルロース存在下で XlnR 以外の因子により発現が誘導されるセロビオヒドロラーゼ I 遺伝子 (*cbhI*) プロモータ制御下でオロチジンリン酸脱炭酸酵素遺伝子 (*pyrG*) を発現する株を形質転換の宿主に用いた。このレポータ遺伝子を有する株は、セルロース誘導条件下で *cbhI* プロモータを介して *pyrG* が発現すると、5-FOA が代謝されて毒性アナログが生成されるために 5-FOA 含有培地で生育することができない。一方、T-DNA 挿入により *cbhI* 発現制御因子が破壊された株では、*pyrG* の発現が低下して誘導条件下でも 5-FOA 含有培地で生育可能となることから、目的の変異株のみを選択することができる (図1)。これまでに、約 6,000 株の T-DNA 挿入変異株の中から約 200 株の 5-FOA 耐性株を取得し、それら 5-FOA 耐性株のセルロース資化能や *cbhI* 発現誘導能を解析することにより、機能未同定の Zn(II)₂Cys₆ DNA 結合モチーフを有する転写因子様タンパク質が同定された⁽⁶⁾。この因子について解析した結果、種々のセラーゼ・キシラナーゼ遺伝子のセロビオースやセルロースに応答した遺伝子発現を制御していたことから、cellobiose response regulator (ClbR) と命名した。興味深いことに ClbR は、*A. aculeatus* において XlnR 非依存的なセルロース誘導だけでなく、XlnR 依

図1 ■アグロバクテリウム形質転換法を用いたセラーゼ遺伝子発現制御因子のポジティブスクリーニング

アグロバクテリウムがT-DNAを宿主染色体に挿入した際、セラーゼ遺伝子発現制御因子 (例、ClbR) が破壊された場合に、形質転換体は5-フルオロオロチン酸含有培地で生育可能になる。Pcbl, *cbhI* プロモータ。

存的なセルロース誘導にも関与していた。また、*clbR* 高発現により遺伝子発現が亢進した遺伝子は、CibR 制御下の遺伝子でもごく一部であったことから、CibR が XlnR など複数の因子と協調的にセルロース誘導を制御している可能性が示唆された。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制御は多様な因子により制御されていると推測され、今後の解析が期待される。

以上、紹介した制御因子は偶然にもすべて転写因子に見られる Zn(II)₂Cys₆ DNA 結合モチーフを有している。では、糸状菌におけるセルラーゼ遺伝子発現誘導には多種の制御因子は存在せず、誘導物質が直接転写因子に作用して遺伝子の発現を誘導するのであろうか？ 麹菌 *A. oryzae* XlnR は、誘導物質であるキシロース存在下で複数箇所リン酸化されることが報告されているように⁽⁷⁾、タンパク質キナーゼなど、まだ同定されていないタンパク質が制御に関与していることは間違いなさそうである。筆者らが行った遺伝学的アプローチでは、*cbhI* プロモータの遺伝子発現誘導能が完全に消失する株しか選択されない可能性があった。しかし、*clbR* 破壊株において *cbhI* 遺伝子発現能が20%残存していたにもかかわらずその欠損株が取得できたことは、本スクリーニング法により転写因子以外のさまざまな制御因子が取得で

きることを示唆している。今後、多様なアプローチにより糸状菌における産業有用酵素の生産調節機構が解明され、転写装置工学などの応用研究への道が切り開かれると期待している。

- 1) N. M. Noël *et al.* : *Mol. Microbiol.*, **27**, 131 (1998).
- 2) S. T. Coradetti *et al.* : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 7379 (2012).
- 3) M. Ogawa *et al.* : *Fungal Genet. Biol.*, in press.
- 4) M. Nitta *et al.* : *Fungal Genet. Biol.*, **49**, 388 (2012).
- 5) E. Kunitake *et al.* : *AMB Express*, **1**, 46 (2011).
- 6) E. Kunitake *et al.* : *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **97**, 2017 (2013).
- 7) Y. Noguchi *et al.* : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**, 953 (2011).

(谷 修治, 大阪府立大学大学院生命環境科学研究科)

プロフィール

谷 修治 (Shuji TANI)

＜略歴＞2001年名古屋大学大学院生命農学研究科博士後期課程修了（農学博士）／2001～2005年カリフォルニア大学リバーサイド校博士研究員（Judelson Lab.）／2005年大阪府立大学大学院生命環境科学研究科助手／2007年同助教、現在に至る＜研究テーマと抱負＞微生物固有の生命現象を制御する分子機構の解明＜趣味＞家庭菜園（願望）