

称号及び氏名	博士（応用生命科学）	國武 絵美
学位授与の日付	平成24年3月31日	
論文名	<i>Aspergillus aculeatus</i> におけるセルラーゼ・ヘミセルラーゼ遺伝子の発現制御機構に関する分子生物学的研究	
論文審査委員	主査	川口 剛司
	副査	片岡 道彦
	副査	小泉 望

論文要旨

緒言

糸状菌の多くのセルラーゼ・ヘミセルラーゼ遺伝子の発現は、セルロースやヘミセルロースの存在によって誘導される。これまでにこれら酵素遺伝子発現を誘導する因子の一つとして、*Aspergillus* 属において転写活性化因子 **XlnR** が同定されている。本研究室では多種のセルロース・ヘミセルロースを生産する糸状菌 *Aspergillus aculeatus* no. **F-50** をモデルに用いて、セルラーゼ・ヘミセルラーゼ遺伝子発現制御機構の解明を目指しており、これまで **XlnR** の機能解析を行ってきた。その中で、**FIII-avicelase** 遺伝子 (*cbhI*), **FII-carboxymethyl cellulase** 遺伝子 (*cmc2*) の発現は *xlnR* 破壊株において顕著な変化が見られず、本菌には未同定の **XlnR** 非依存的なセルラーゼ遺伝子発現誘導経路が存在することを見出した。近年、糸状菌ゲノム情報の解読に伴い、新奇制御因子を同定する手法は逆遺伝学的解析及び網羅的遺伝子発現解析が主流になっている。しかしこのアプローチでは、研究対象が既知因子のオルソログや遺伝子発現量の変動する因子に限定的になる傾向にある。そこで本研究では、この未同定経路を介したセルラーゼ遺伝子発現制御機構を解明することを目的として、転写因子だけでなくシグナル伝達などに関わる因子を含めた網羅的なスクリーニングを可能にする系を開発し、それにより取得した新奇因子の機能解析を行った。本研究は学術的に意義があるとともに、得られた知見を利用した糸状菌セルラーゼ酵素群の大量生産システムの開発につながり、

近年注目されている植物バイオマスの有効利用に応用することが期待できる。

従来、遺伝学的手法により新奇遺伝子を同定する場合、変異源処理によって目的の表現型を示す変異株を取得し、それを相補する遺伝子を特定することで行われてきた。しかし、多核体の糸状菌では厳しい変異処理条件を必要とするため他の遺伝子への変異の導入が危惧される。また、目的の変異株が取得されても、形質転換効率が低い糸状菌では相補遺伝子のクローニングが容易ではない。そこで私は一遺伝子座への変異導入と変異点の特定の両方が一度に可能となる *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation (AMT) を利用した T-DNA タギング法に着目した。第1章では新奇制御因子を単離する手法として *A. aculeatus* における AMT を確立した。第2章では *cbhI* の発現が低下した株をポジティブスクリーニングできるシステムを構築し、AMT により構築したランダム変異ライブラリから *cbhI* 発現制御因子欠損株のスクリーニングを行った。そして T-DNA 配列をもとに単離株の変異遺伝子を同定した。第3章では第2章で同定した遺伝子の破壊株及び高発現株の解析により、その遺伝子産物が XlnR 依存的・非依存的なセルラーゼ遺伝子両方のセルロース性基質に応答する転写活性化因子として機能することを示した。

第1章 *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation の確立

A. aculeatus のゲノムサイズを 35 Mb, 平均遺伝子長を 1.5 kb と仮定すると, *A. aculeatus* の遺伝子の 90% を破壊するためには 54,000 株の変異株を作出する必要があることから, AMT を利用して網羅的に遺伝子破壊を行うには高い形質転換効率が必要である。また, 変異点の特定を容易にするためには挿入された T-DNA のコピー数, T-DNA 及び宿主ゲノム配列の欠失の有無, 形質転換体の安定性などの T-DNA 挿入パターンが重要なポイントとなる。本章ではこれらを考慮して *A. aculeatus* と *A. tumefaciens* の共培養における細胞比や濃度, *A. tumefaciens* の感染誘導剤である acetosyringone の濃度, 共培養時間, 培地組成, 及び形質転換に用いる *A. aculeatus* の細胞形態 (孢子・プロトプラスト・出芽孢子) の影響について調べ, 得られた形質転換体の T-DNA 挿入パターンをサザンブロット法により解析した。その結果, 形質転換効率が高いほど, T-DNA が複数のローカスに挿入されていたり, T-DNA に付随して長い vector backbone が挿入されたりすることがわかり, T-DNA 周辺ゲノム配列の取得が困難となる確率も高くなることが判明した。そこで AMT 法を最適化した結果, 100 ml の液体誘導培地中で *A. aculeatus* と *A. tumefaciens* を 1:50 の比で 48 時間共培養することに決定した。この方法によって 10⁷ 孢子当たり約 200 形質転換体を得ることが可能となるとともに, 90% の形質転換体で T-DNA がシングルローカスへ挿入され, vector backbone の挿入頻度も他条件と比較して低かった。さらに挿入された T-DNA やゲノム配列の大規模な欠失は生じておらず, 挿入された T-DNA は安定してゲノム上に保持されていたことから, TAIL-PCR 又は inverse-PCR により挿入座位を容易に特

定することができた。

これまでに得られた **11,000** 形質転換体のうち、**2** 株のアルビノ変異株 **ALB1**, **ALB2** が単離された。**ALB1** の変異点を挿入された **T-DNA** 配列を基に決定したところ、メラニン形成に関わる **polyketide synthase (pksP)** 遺伝子のプロモーター領域に約 **1 kb** の欠失を伴って **T-DNA** が挿入されていたことが判明した。**pksP** 遺伝子を **ALB1**, **ALB2** に導入することで黒色胞子の形成が回復し、表現型と遺伝子型が一致したことから、**AMT** は **T-DNA** タギング法として有用なツールとなることが実証された。

第2章 新奇セルラーゼ遺伝子発現活性化因子の同定

確立した **T-DNA** タギング法を利用して、**cbhI** 遺伝子発現を活性化する因子の同定を試みた。*Aspergillus nidulans* orotidine 5'-phosphate decarboxylase 遺伝子 (**pyrG**) を **cbhI** プロモーター制御下で発現する株を宿主とし **AMT** を行った。通常 **pyrG** が発現する株ではオロチン酸の毒性アナログである **5-fluoroorotic acid (5-FOA)** に感受性となるが、**cbhI** 発現を活性化する因子に変異が導入されると誘導条件下でも耐性を示し、目的の変異株をポジティブスクリーニングすることが可能となる。推定約 **15,000** 株の **T-DNA** 挿入形質転換体の中から、小麦フスマを単一炭素源とした最少培地に **5-FOA** を添加した培地で旺盛に生育した株を選抜した。そのうちアビセル、アルカリ膨潤セルロースを単一炭素源とした最少培地上での生育が著しく低下した **5** 株を選び、さらに **RT-PCR** による解析の結果 **cbhI** の発現が低下する株 (**S4-22**) を単離した。**S4-22** 株のセロビオース誘導時における **cbhI** 転写量を定量的 **RT-PCR** により解析したところ、宿主の約 **20%** にまで減少していたことが明らかとなった。サザンブロット解析、**inverse-PCR** 法及びシーケンス解析により **S4-22** 株の変異点を解析したところ、**Zn(II)2Cys6** 型 **DNA** 結合ドメインを持つ推定転写因子をコードする遺伝子の翻訳開始点から **52 nt** 下流に、約 **1.4 kb** のゲノム **DNA** の欠失をともなって **T-DNA** が挿入されていたことが判明した。セロビオース誘導時のセルラーゼ遺伝子の発現に関与することが示唆されることから、この因子を **cellobiose response regulator (ClbR)** と命名した。

第3章 ClbR の機能解析

S4-22 株に見られた **cbhI** 発現の低下が **clbR** の欠失に起因することを証明するため、改めて作出した **clbR** 破壊株におけるセルラーゼ遺伝子発現量を定量的に解析した。セロビオース誘導時の **cbhI** の転写はコントロール株の **20%** にまでに減少し、その相補株では転写量が宿主株と同程度まで回復した。この結果から、**S4-22** 株に見られた現象は **T-DNA** の挿入により **clbR** が破壊された影響であることが示された。

clbR 破壊株において、アビセル誘導時には **cbhI**, **cmc2** はセロビオースと同様に転写の減少が見られ、また、**XlnR** 依存的に転写が活性化される **FI-carboxymethyl**

cellulase 遺伝子 (*cmc1*) と F1b-xylanase 遺伝子 (*xyn1b*) の転写も減少することが明らかとなった。一方でキシロース・アラビノース誘導における *cmc1*, *xyn1b* の転写に影響は見られなかった。すなわち, **ClbR** はセルロース性基質に応答してセルラーゼ遺伝子の転写を活性化することが判明した。

clbR を translation elongation factor 1 α 遺伝子 (*tef1*) プロモーターにより高発現させた株 (**OEclbR**) を小麦フスマを炭素源とした完全培地で生育させた場合のセルラーゼ・キシラナーゼの酵素活性を経時的に測定した。その結果, **OEclbR** 株では持続的な活性の上昇が見られ, 培養 6 日目にコントロールと比較してセルラーゼ活性が 2 倍, キシラナーゼ活性が 6 倍となった。この結果からも **ClbR** がセルロース性基質に応答したセルラーゼ・ヘミセルラーゼ遺伝子発現を正に制御することが明らかとなった。

総括

本研究では, **AMT** 及び *pyrG* レポーターシステムを利用したセルラーゼ遺伝子発現制御因子のスクリーニングにより, 新奇転写活性化因子 **ClbR** を同定することに成功した。**ClbR** は **XlnR** 非依存的に発現が制御される遺伝子のみならず, **XlnR** 依存的な遺伝子のセルロース性基質に応答した転写活性化に関与していることが明らかとなり, セルラーゼ遺伝子発現は複数の転写活性化因子が密接に関与していることが示唆された。今後は **ClbR** のセルロース性基質に応答した活性化機構や **ClbR** と **XlnR**, 及び他の制御因子との関連を明らかにし, セルラーゼ遺伝子発現制御機構をより詳細に解明していくことが望まれる。本研究の成果は条件特異的に調節される遺伝子発現応答の基礎学的研究の進展に貢献するものであり, またセルラーゼの大量生産系の構築を目指した産業分野への応用が期待される。

審査結果の要旨

糸状菌において植物性バイオマス分解に関わる酵素はセルロースやヘミセルロースによって誘導されるが, これまでに様々な糸状菌からそれらの遺伝子発現調節に関わる転写因子が単離されている。その中で, *Aspergillus* 属で最初に発見された正に制御する転写因子 **XlnR** は広範囲のセルラーゼ・ヘミセルラーゼ遺伝子を同時に調節していることが示されている。多様なセルラーゼ・ヘミセルラーゼを分泌生産する有用糸状菌 *A. aculeatus* を対象として **XlnR** ホモログの機能解析を行っていた過程で, *xlnR* 遺伝子を破壊しても *cbhI*, *cmc2* 遺伝子の発現挙動が顕著に変化しないことを見だし, 本菌には **XlnR** を介さない遺伝子発現誘導機構が存在すると考えられた。この **XlnR** 非依存的な調節機構は未だ知られていないものであり, 本研究はそれに関わる因子の取得と

その機能を解析することによって、糸状菌における新奇な遺伝子発現制御機構を解明することを目的として行われた。

最近、糸状菌における遺伝子発現制御機構に関する研究は国内外で広く行われている。それらは、すでにゲノム配列が明らかになった菌株を対象とし、DNA 結合モチーフを持つ転写因子と思われる遺伝子の網羅的破壊によるオーム・オミクス解析という逆遺伝学的手法が主流となっているが、*A. aculeatus* は研究開始当時にはまだゲノム配列が明らかになっていなかった。一方、糸状菌の形質転換効率は非常に低いために変異体を作製しその変異を相補する遺伝子をショットガンクローニングするという方法は現実的ではない。本研究では、これらの困難を克服するために、*Agrobacterium tumefaciens* T-DNA のランダム挿入による遺伝子破壊ライブラリの構築、さらに目的の変異体を優先的に選択するためのトリックといった極めて戦略的な方法を計画し、それによって全く新しい転写因子の取得および機能解析につなげたものである。

第1章では、*A. tumefaciens* による形質転換法の最適化が行われた。本研究のツールとして、形質転換効率が高いこと、T-DNA タギングによる破壊された遺伝子を同定するために挿入部位が単一であること、宿主染色体に大規模な欠失が起こらないこと、形質転換体が遺伝的に安定していることが求められる。これらを満足するために様々な条件について検討した結果、*A. aculeatus* と *A. tumefaciens* の細胞比が 1:50、48 時間液体誘導培地中で共培養することに定めた。この条件で、 10^7 孢子あたり約 200 形質転換体を得ることが可能になり、90%以上の確率で T-DNA が単一部位に挿入され、T-DNA や宿主染色体に大規模な欠失は生じなかった。この過程で出現したアルビノ変異体の T-DNA 挿入部位を決定したところ、メラニン生合成に関わる *polyketide synthase* 遺伝子が破壊されていることが判明し、本方法の T-DNA タギング法としての有用性が実証された。

第2章では、遺伝子破壊ライブラリを構築するための宿主の作製およびライブラリの構築、さらに *cbhI* 遺伝子発現を活性化する因子の同定を行った。まず、*cbhI* プロモータ支配下で *A. nidulans* *orotidine 5'-phosphate decarboxylase* 遺伝子を発現する株を作製したところ、*cbhI* 発現抑制条件で 5-fluoroorotic acid (5-FOA) 耐性、誘導条件で感受性を示したことから、目的変異株のポジティブスクリーニングが可能な系を構築できた。この宿主によって構築した T-DNA ランダム挿入ライブラリから小麦フスマを単一炭素源としたときの 5-FOA を含む培地での生育を指標にスクリーニングした結果、最終的にセロビオース誘導条件下で *cbhI* の転写量が著しく低下した変異体の取得に成功した。本変異体では T-DNA が Zn(II)₂Cys₆ 型 DNA 結合モチーフを持つ転写因子と思われる遺伝子内に挿入されており、それがコードするタンパク質はこれまでに知られていない新奇なものであったことから *cellobiose response regulator* (ClbR) と命名した。

第3章では、ClbR の機能解析を行った。改めて作製した *clbR* 破壊株ではセロビオースおよび微結晶セルロースであるアビセル誘導時に *cbhI* の転写量は野生株の 20%に減

少し、同遺伝子で相補すると回復することから確かに変異体の表現型が **clbR** 欠損によることが確認された。一方、**XlnR** 制御下にある **cmc1**、**xyn1b** 遺伝子もアビセル誘導時に顕著に転写が減少するが、ヘミセルロースの構成糖であるキシロースやアラビノースによる誘導には影響しないという興味深い結果が得られた。これらから、**ClbR** はセルロースによる転写活性化経路特異的に関わっていると結論づけた。**clbR** を構成的に強発現させた株を作製した結果、小麦フスマを炭素源とした培地でセルラーゼ活性、キシラナーゼ活性がそれぞれ野生株の2倍、6倍に増加し、これは **ClbR** がセルラーゼ・ヘミセルラーゼ遺伝子群を正に制御していること示すことに加えてバイオマス分解酵素の大量生産という応用分野への可能性も示された。

以上、本研究は **A. aculeatus** に新たな転写活性化機構が存在することが示唆されたことに端を発して、それに関与する因子の取得を目指し独自のツールや方法の開発から実際に目的の転写因子の取得・機能解析まで一つのストーリーの中で戦略的に展開されたものである。取得に成功した転写因子は全く新奇なものであり、しかもセルロースだけに応答するという新たな経路の発見によって糸状菌の遺伝子発現制御機構に新しい概念を提唱するに至った。これらの成果は、糸状菌における分子遺伝学、分子生物学さらには応用微生物学の分野に大きく貢献するものであり、最終試験の結果とあわせて博士（応用生命科学）の学位を授与することを適当と認める。