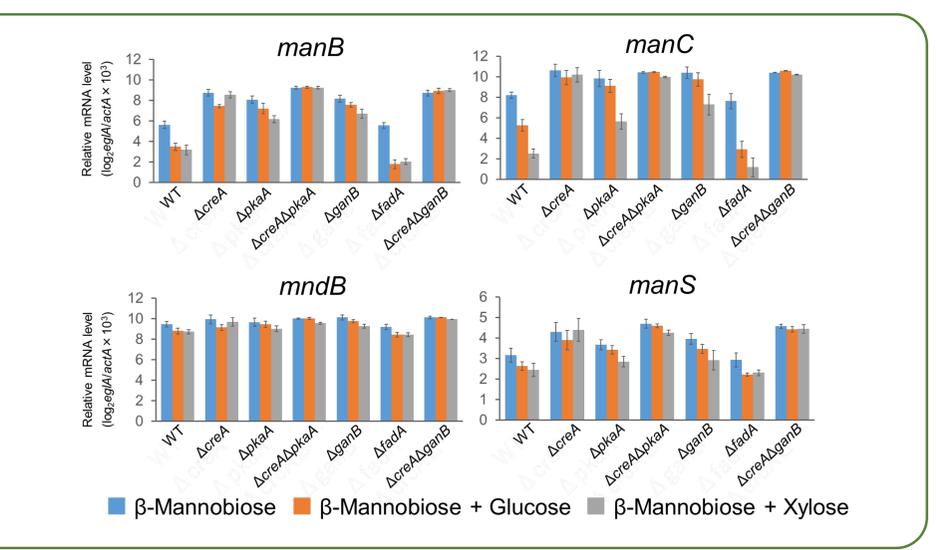
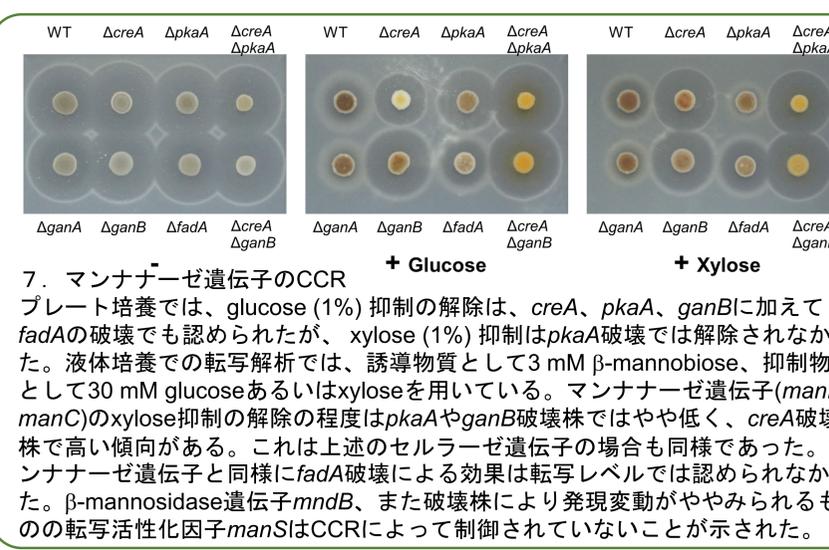
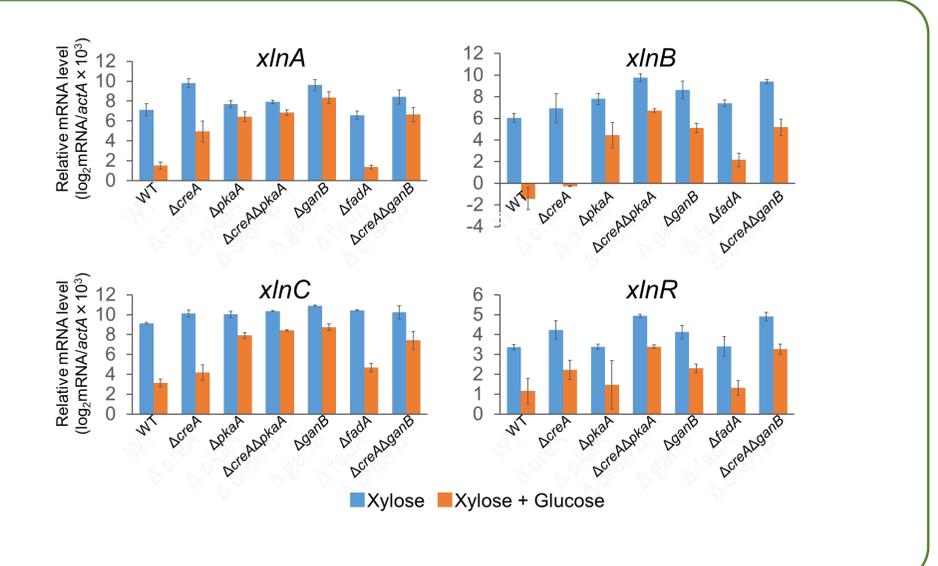
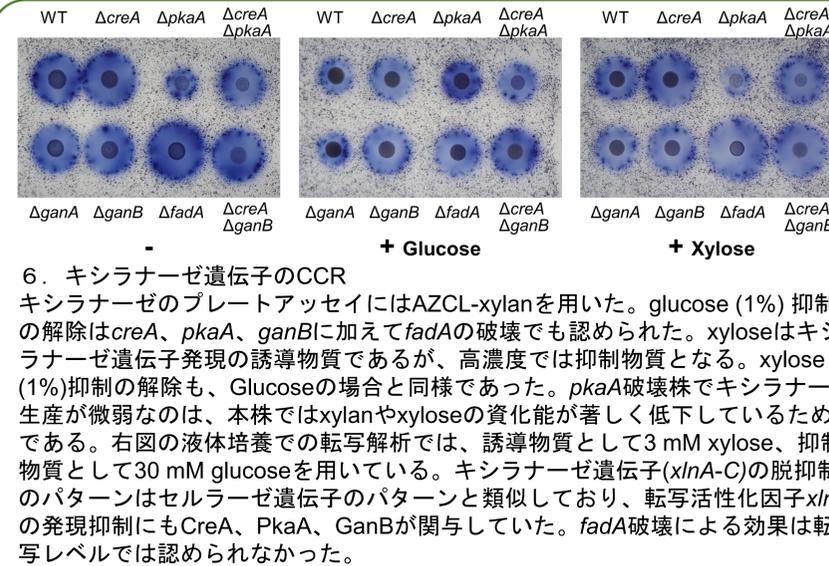
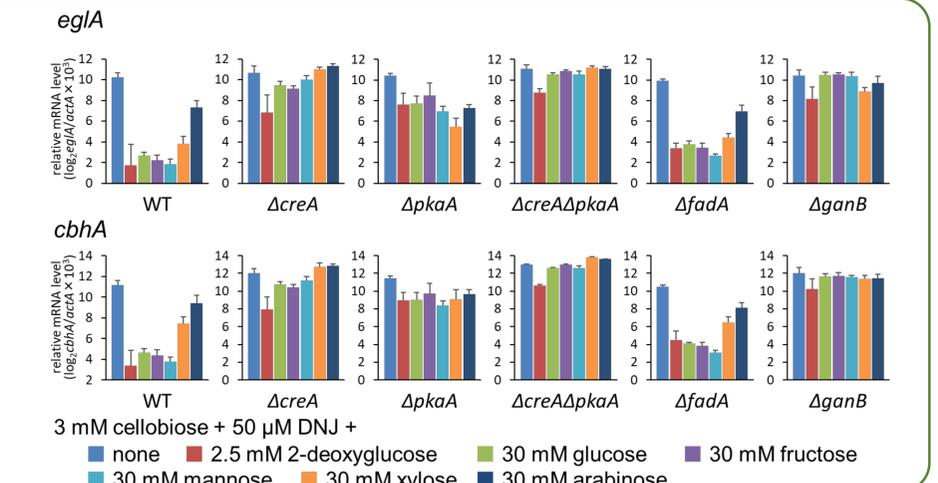
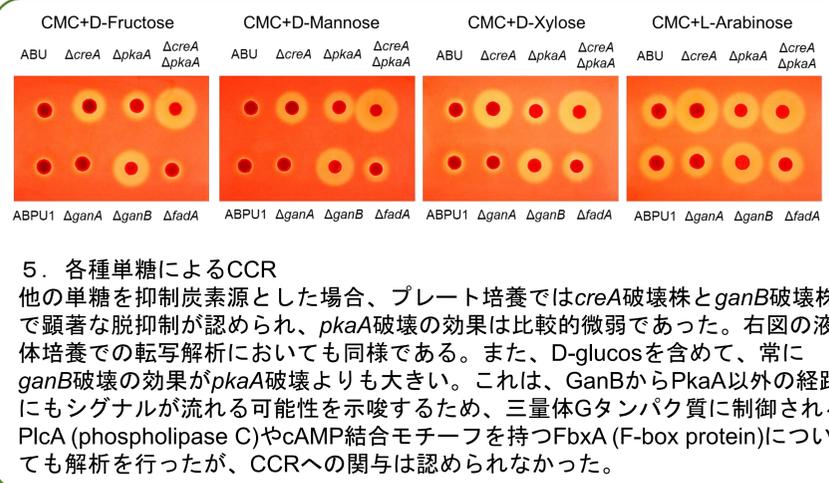
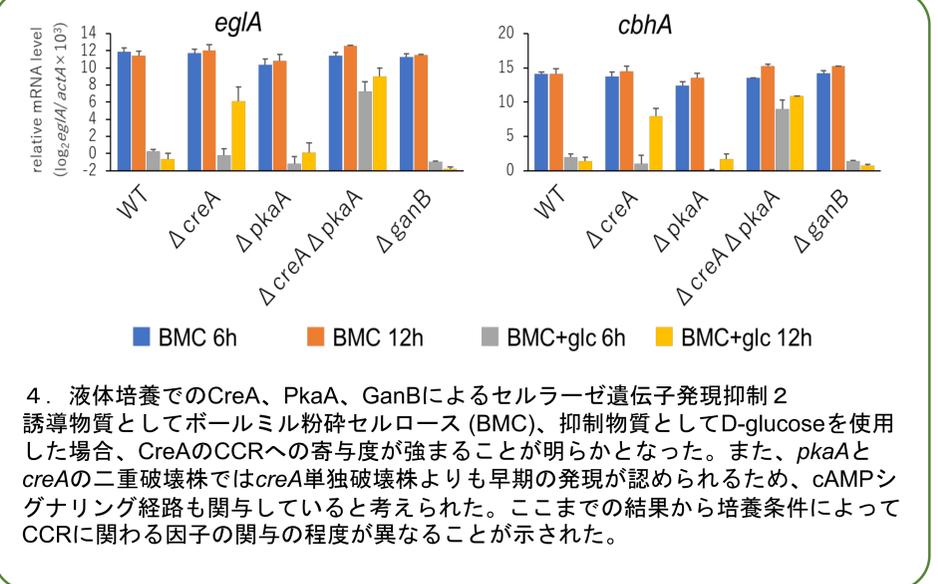
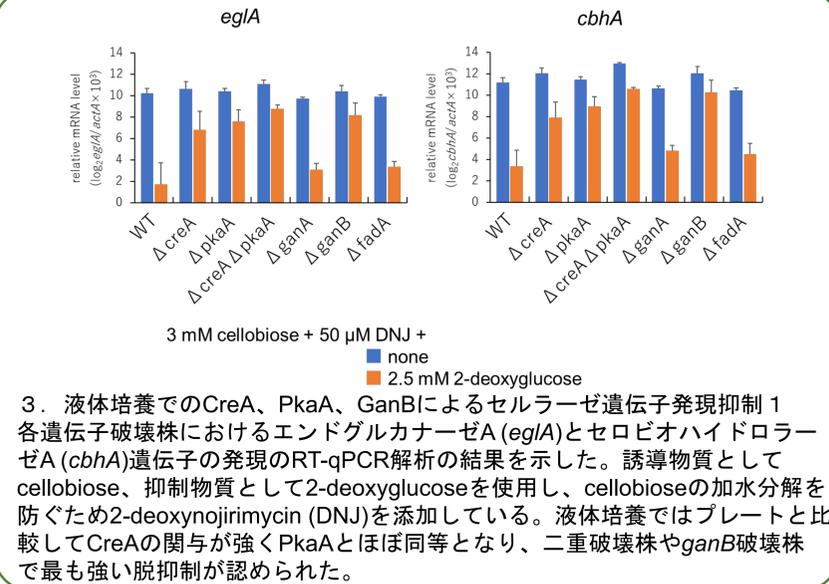
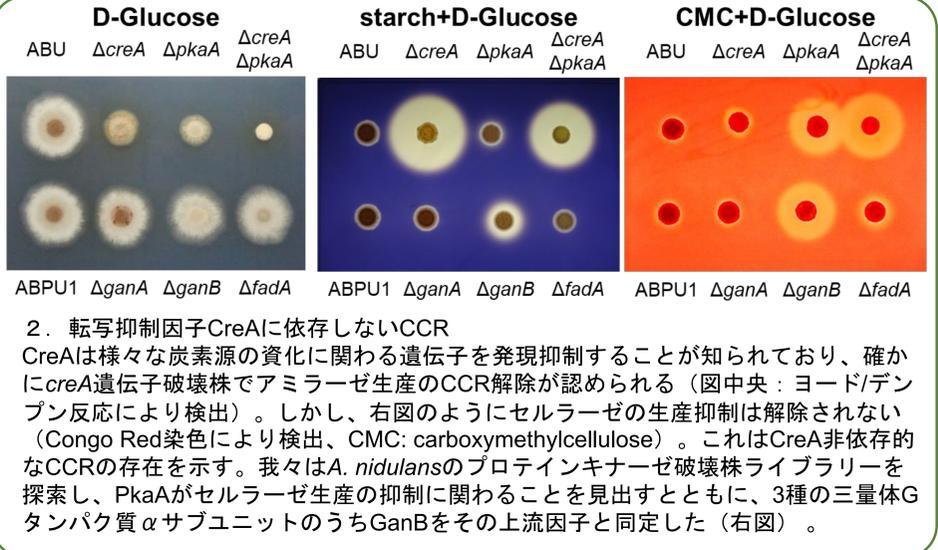
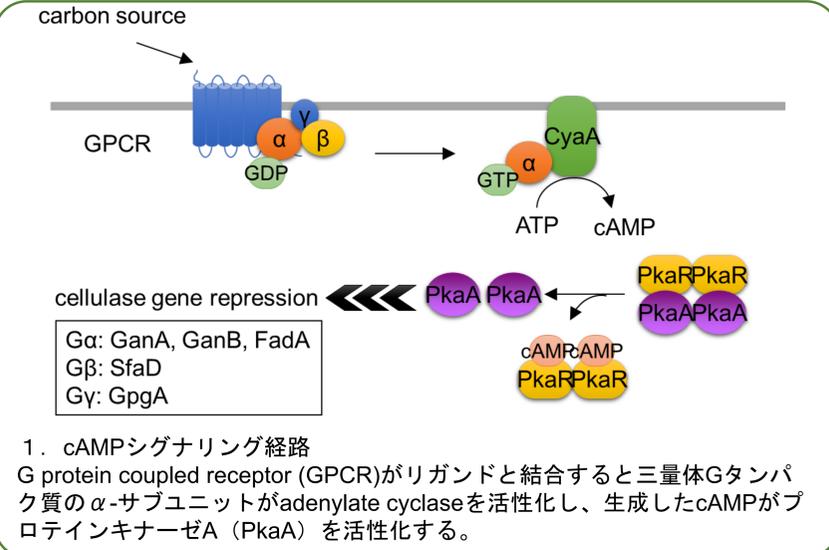


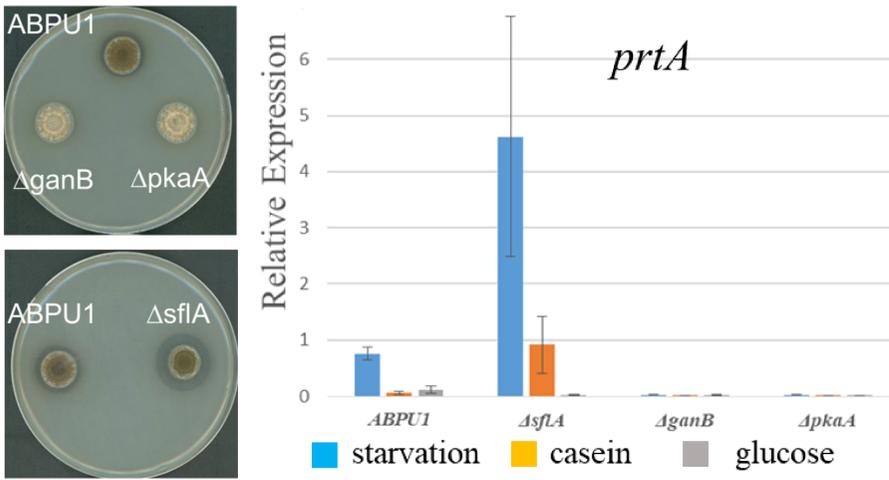
O-3 糸状菌における多糖資化の優先順位決定に関わるシグナル伝達・遺伝子発現制御機構の解明

小林 哲夫 (名古屋大学大学院生命農学研究科)

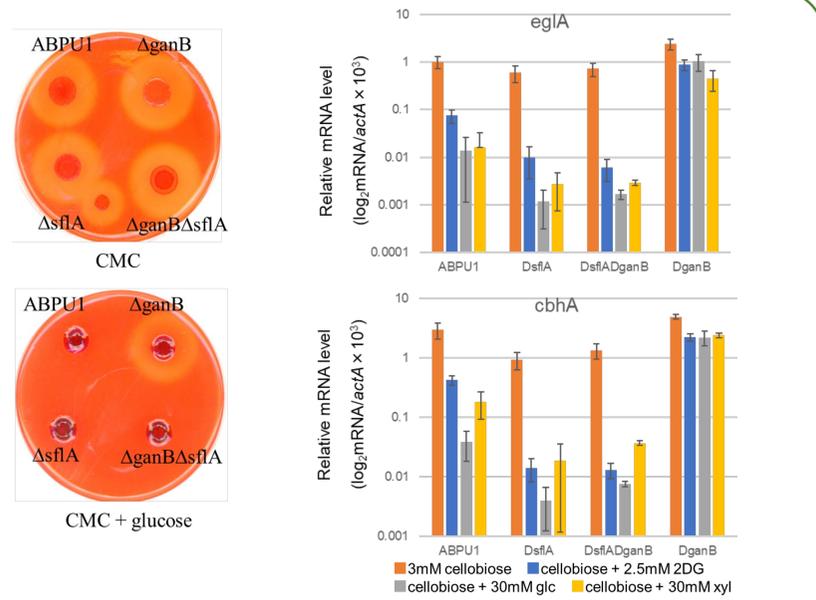
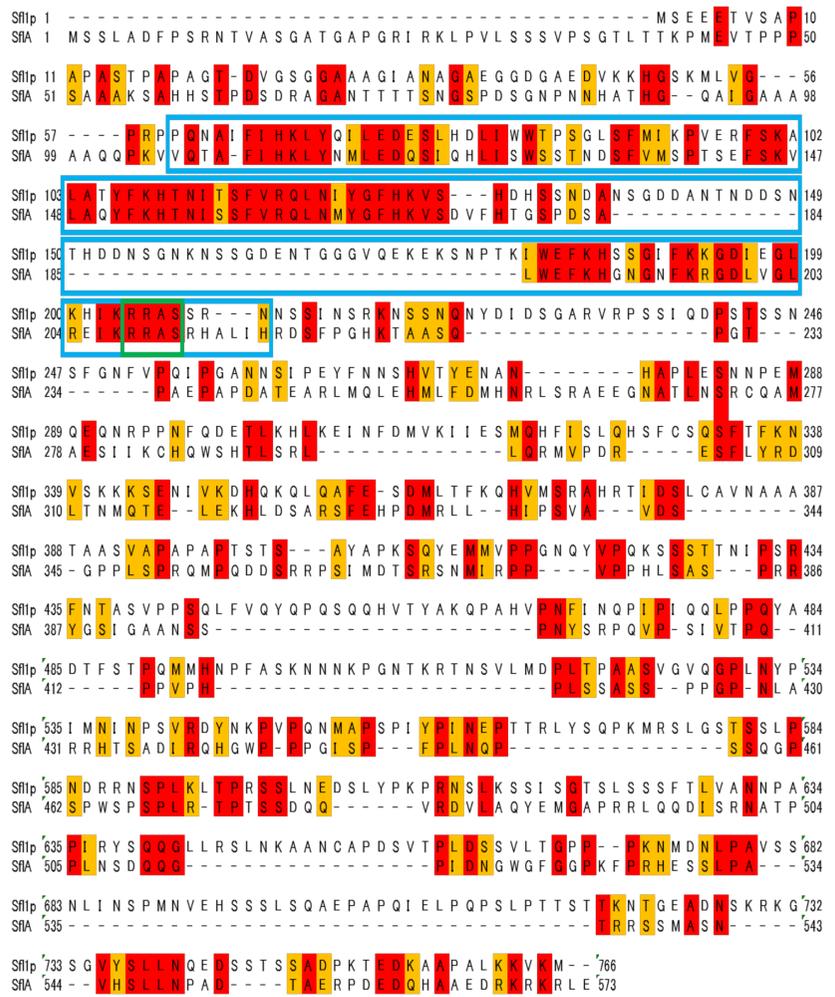
Introduction

糸状菌は多様な植物性多糖分解酵素遺伝子を有している。これら遺伝子の発現は基質により誘導され、易資化性糖質が共存するとカーボンカタボライト抑制 (CCR) により抑制される。Aspergillus属糸状菌のCCRには転写抑制因子CreAや脱ユビキチン化酵素複合体CreB/CreCが関与することが従来から知られていたが、我々は三量体Gタンパク質のα-サブユニット(GanB)やプロテインキナーゼA (PkaA)というcAMPシグナリング経路の構成因子がCreAとは独立してセルラーゼのCCRに関わることを見出した。本研究ではこの新機構について詳細に解析し、多糖資化の優先順位決定についてのさらなる理解を目指した。

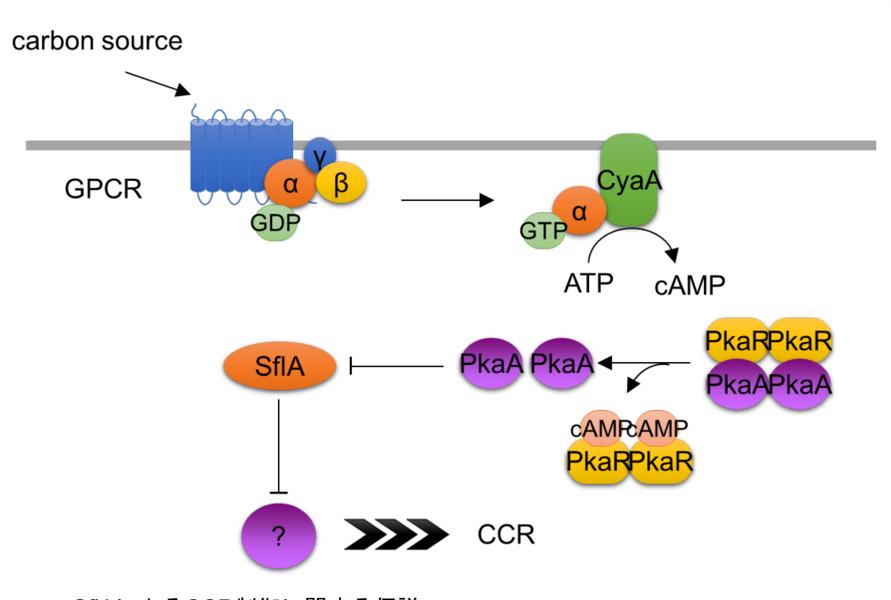




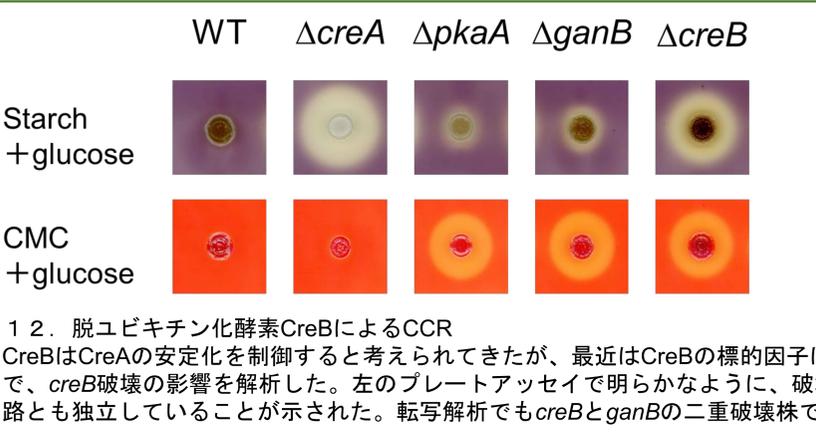
8. cAMPシグナリングによるプロテアーゼ遺伝子の発現制御
CCRに関わるPkaAの標的因子を同定するため、出芽酵母で報告されているPKA基質のホモログの遺伝子破壊を行う過程で、プロテアーゼ生産にも着目した。*A. nidulans*のプロテアーゼ遺伝子 $prtA$ は飢餓により発現誘導されるが、その発現がGanBにより正に制御されることが報告されている。GanBやPkaAの活性化が単糖により引き起こされると考えられる我々の結果から考えるとGanB関与の飢餓誘導は奇異であるが、実際に左上の写真のように $ganB$ だけでなく $pkaA$ 破壊株でもカゼインプレート上でハローを形成しない。そこで出芽酵母におけるプロテインキナーゼA (PKA) の基質の一つであるSfl1pのホモログ遺伝子破壊株でプレートアッセイを行ったところ、プロテアーゼ生産性の向上が認められ、転写解析でも破壊株での転写量の上昇が確認された。このホモログを我々はSflAと命名した。
Sfl1pは出芽酵母の凝集を制御する転写抑制因子でPKAによりリン酸化されるとDNAから解離し脱抑制が起こる。右図にSfl1pとSflAのアライメントを示したが、両者の相同性はそれほど高いとは言えない。しかし、青で囲ったDNA結合ドメインと緑で囲ったPKAリン酸化部位は極めて類似している。また、最近イモチ病菌ではPKA破壊株のサプレッサー変異としてSfl1pホモログ遺伝子が同定されている。



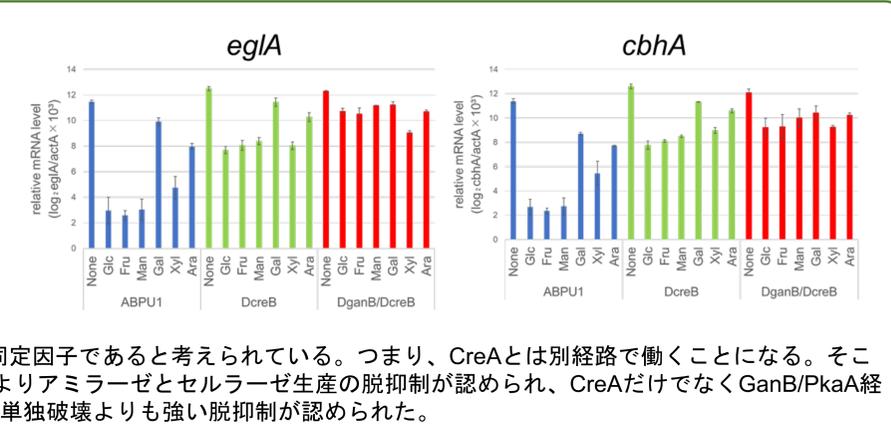
10. SflAによるCCRの制御
プロテアーゼ生産に関する解析でSflAはGanBと逆の機能を持つことが示された。つまり、CCRでは遺伝子破壊しても脱抑制が起こらず、表現型は野生株と変わらないことになる。そこで、 $sflA$ と $ganB$ の二重破壊を行ったところ、プレートアッセイでも転写解析でも $ganB$ 破壊による脱抑制が消失した。



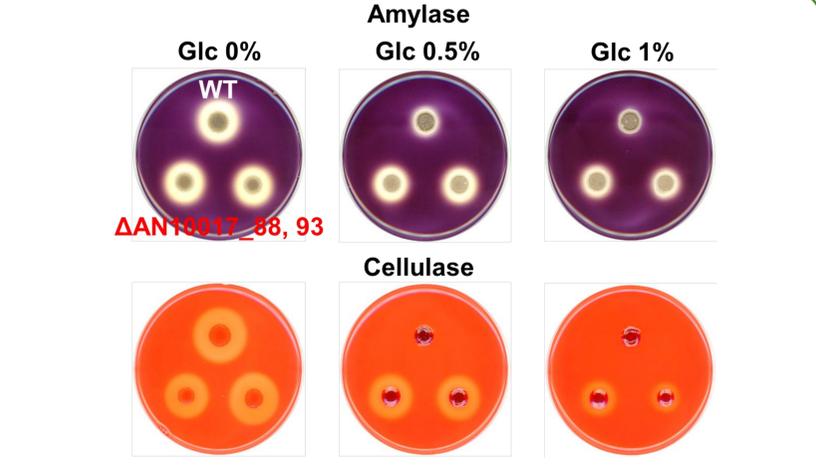
11. SflAによるCCR制御に関する仮説
Sfl1pとSflAのDNA結合ドメインとPKAリン酸化部位周辺の高い相同性を考慮すると、関与する生物現象が違うとはいえこれら因子の制御システムは類似していると考えられる。従って、SflAはCCRが不要の時に、CCRを正に制御する因子を遺伝子発現のレベルで抑制していると思われる。この因子の同定が次の課題である。



12. 脱ユビキチン化酵素CreBによるCCR
CreBはCreAの安定性を制御すると考えられてきたが、最近CreBの標的因子は未同定因子であると考えられている。つまり、CreAとは別経路で働くことになる。そこで、 $creB$ 破壊の影響を解析した。左のプレートアッセイで明らかなように、破壊によりアミラーゼとセルラーゼ生産の脱抑制が認められ、CreAだけでなくGanB/PkaA経路とも独立していることが示された。転写解析でも $creB$ と $ganB$ の二重破壊株で $creB$ 単独破壊よりも強い脱抑制が認められた。



14. CreB破壊株におけるglucose消費の遅延
CreBのホモログは多くの生物でトランスポーターの安定性を制御している。そこで $creB$ 破壊株の培養上清の残存糖を解析したところ、xyloseは曖昧であったが、glucoseでは明らかな消費遅延が見られた。セルラーゼ誘導物質のcellobioseでは破壊株で分解が顕著であったため、 β -glucosidase阻害剤のDNJを添加したところ取り込み遅延は認められなかった。しかし、この程度のglucose取り込み遅延でCCR解除が起こるとは考えずらいいため、ほかにもCreB標的があると思われる。なお、出芽酵母と同様に、取り込まれたglucoseはhexokinaseやglucokinaseを介してCCRを引き起こすと考えられており、これら遺伝子の破壊でCCR解除が起こることも確認されている。



13. CreBと相互作用する因子
CreBは真核生物に幅広く保存された因子であり、ほとんどの生物でヘテロ三量体として機能するとされているが、*A. nidulans*ではCreCとのヘテロ二量体と考えられている。ゲノム上に存在するもう一つの相互作用因子の候補遺伝子を破壊したところ、上図の通りやはりアミラーゼとセルラーゼの脱抑制が起こったため、他生物と同様にヘテロ三量体であることが示唆された。

本研究では培養条件や誘導物質、抑制物質、さらには抑制される遺伝子の違いにより各種CCR関連因子の関与の程度が異なり、その結果として複雑な制御系が構築されていることを示唆する結果を得た。CCRの全体像を明らかにするにはまだ時間を要しそうであるが、cAMPシグナリングに関してはSflAの解析により新たな進展が見られると期待している。一方、応用という観点ではGanBとCreBに期待している。CreAやPkaAなどは遺伝子破壊で著しい生育障害が起こるが、GanBやCreBの遺伝子破壊による生育障害は軽微で、しかも幅広く多糖分解酵素遺伝子のCCR解除が起こるためである。我々の研究を契機としてCCRに関する基礎、応用研究がさらに発展することを期待したい。
最後になるが、本研究は三重大の國武絵美助教との共同で行ったものであることを付記するとともに、ご支援下さった発酵研究所に深く感謝したい。