

# 麹菌のアミラーゼ生産のグルコース依存的な抑制機構

田中 瑞己

## はじめに

麹菌 *Aspergillus oryzae* は、アミラーゼを大量に分泌生産する糸状菌であり、清酒・味噌・醤油などの醸造に用いられている。また、近年ではアミラーゼ遺伝子のプロモーターを用いて異種遺伝子を高発現させることで、異種のタンパク質や天然物の生産宿主としても利用されている。麹菌のアミラーゼ遺伝子の発現は、マルトースが菌体内に取り込まれ、転写因子 AmyR が核移行することで誘導される<sup>1)</sup>。一方、グルコースが存在する場合には、マルトースが存在していてもアミラーゼ遺伝子の発現は強く抑制される。これは、グルコースを優先的に資化するために他の炭素源資化に関わる遺伝子の発現を抑制するカーボンカタボライト抑制 (CCR) が起こるためである。糸状菌の CCR 制御機構についての研究は歴史が長く、1970年代に CCR 制御に関わる4個の主要な因子が同定された(表1)。しかし、これらの因子による CCR 制御の分子機構については長年の間ほとんど不明であった。本稿では、麹菌のアミラーゼ ( $\alpha$ -アミラーゼ) 生産をモデルとした最近の研究によって明らかとなった CCR 制御の分子機構について紹介する。

## 糸状菌における CCR 制御因子

糸状菌の CCR の制御因子は、モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* の遺伝学的解析によって同定された<sup>2-4)</sup>。最初に同定された CreA は、C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>型 DNA 結合ドメインを持つ転写因子であり、麹菌のアミラーゼ遺伝子のプロモーター領域に結合して転写を抑制する<sup>5)</sup>。CreA の DNA 結合ドメインは、出芽酵母の CCR 制御転写因子 Mig1 の DNA 結合ドメインと非常に高い相同性を有している。一方で、DNA 結合ドメイン以外の領域については、それほど相同性は高くない。

表1. 糸状菌における主要な CCR 制御因子

タンパク質名	機能
CreA	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> 型転写因子
CreB	脱ユビキチン化酵素
CreC	WD40 リピートタンパク質
CreD	アレスチン様タンパク質

CreA と同じスクリーニング方法により同定された CreB と CreC は、細胞内で複合体を形成することが示されている<sup>6)</sup>。CreB はユビキチンを特異的に分解するプロテアーゼであり<sup>7)</sup>、CreC はタンパク質との相互作用に関わる WD40 モチーフを後半部分に4個有するタンパク質である。

CreD は、*creB* 変異体の表現型を打ち消すサプレッサー変異の原因遺伝子として同定された。CreD は前半部分にアレスチン様ドメイン、後半部分にユビキチンリガーゼと相互作用する PxY モチーフを有するタンパク質であり、ユビキチンリガーゼと標的タンパク質とのアダプターとして機能すると推定された<sup>8)</sup>。

CreB と CreD がユビキチン修飾を制御する因子と推定されたことから、これらの因子が CreA のユビキチン修飾を制御し、CreA の安定性が変化することで CCR が制御されるというモデルが CreB や CreD を同定した Kelly らによって提唱された。しかし、このモデルの真偽を検証する実験結果は長年の間、示されてこなかった。

## CCR 解除によるアミラーゼの高生産化

筆者らは、麹菌のアミラーゼ生産に CCR が与える影響を調べるため、*creA* と *creB* の単独ならびに二重破壊株を作製した。その結果、*creA* と *creB* のいずれの破壊

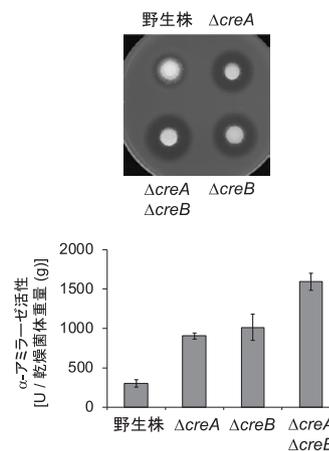


図1. *creA* および *creB* 破壊による CCR の解除 (文献9の一部を改変)。上段はグルコースを混合したデンプン培地で生育後のハロー形成、下段は5%マルトースを含む液体培地で48時間後のアミラーゼ活性を示す。

でもCCRが解除され、5%のマルトースを炭素源とした培地でのアミラーゼ生産量が野生株の4倍以上に増加した(図1)<sup>9)</sup>。一方、二重破壊株においてはアミラーゼ生産量がさらに増加し、野生株の7倍以上に達した(図1)<sup>9)</sup>。アミラーゼ遺伝子の転写量を調べると、野生株と比較して*creB*破壊株では約2倍に増加していたのに対し、*creA*破壊株と二重破壊株では約7倍に増加していた<sup>9)</sup>。これらの結果から、*creB*破壊によるアミラーゼ生産量の増加には、CreA依存性のCCRが解除される以外の要因も関与しており、CreBの機能は従来考えられていたものよりも複雑である可能性が示された。なお、アミラーゼ以外にも、キシラナーゼやβ-グルコシダーゼの生産量が*creA*と*creB*の二重破壊によって増加することが明らかになっている<sup>10)</sup>。

### 転写因子CreAの分解制御機構

CCRがCreAの安定性の変化によって制御されているかを調べるため、N末端にFLAGタグを融合したCreAを発現させた株を作製し、炭素源の変化が細胞内のCreA量に与える影響について解析した。フルクトースを炭素源とした培地で培養後に、マルトースを炭素源とした培地に菌体を移すと、40分後には菌体内のCreA量が著しく減少した<sup>11)</sup>。一方、グルコースを炭素源とした培地に菌体を移した場合にはCreA量の減少は見られなかった<sup>11)</sup>。FLAGタグ融合CreAの発現を抑制した後にグルコースやマルトースを添加してCreAの半減期を調べた結果、グルコース添加後の半減期が25分であるのに対し、マルトース添加後の半減期は11分であった(図2)<sup>11)</sup>。GFPを融合したCreAの局在を調べた結果、グルコース添加後にはほとんどが核内に局在しているのに対し、マルトース添加後には核内の蛍光がほとんど消失した<sup>11)</sup>。一方、CreAのC末端領域近傍に予測された核排出シグナルに変異を導入すると、マルトース添加後にも核内に蛍

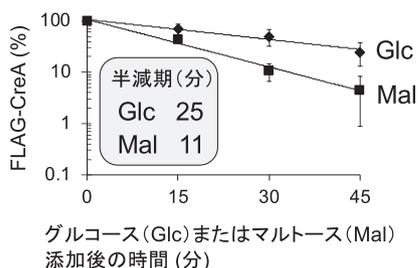


図2. FLAGタグ融合CreAの安定性(文献11の図を一部改変)。FLAG-CreAの発現を抑制してからグルコースまたはマルトースを添加し、ウェスタン解析で検出したFLAG-CreA量をプロットした結果を示す。

光が観察され、半減期が33分となった<sup>11)</sup>。以上の結果から、CreAはアミラーゼの生産条件では核内から細胞質に移行して分解され、グルコース存在下では核内に留まって安定化されることが示された。

CreBやCreDがCreAの安定性変化に関わっているかを調べるため、それぞれの破壊株でFLAGタグ融合CreAを発現させた結果、*creB*破壊株と*creC*破壊株においては炭素源によらず、野生株と比較してCreA量が著しく減少した<sup>11)</sup>。一方、*creD*破壊株ではCreAの量や安定性に野生株と大きな違いは見られなかった<sup>11)</sup>。CreAのユビキチン修飾の有無や、*creB*および*creC*破壊によるCreA量の減少の原因については明らかとなっておらず、より詳細な解析が必要である。なお、*A. nidulans*における共免疫沈降実験によりCreAとCreBの相互作用が検出されなかったことから、Kellyらの研究グループは現在ではCreBによるCreA脱ユビキチン化の可能性を否定する立場に転じている<sup>12)</sup>。

以上の実験はすべて、N末端にFLAGタグを融合したCreAを用いて行ったが、C末端にFLAGタグを融合した場合にはN末端に融合した場合と比較して分解の遅延が観察された<sup>11)</sup>。そこで、CreAのC末端領域に分解に関わる領域がある可能性を検証するため、C末端を欠失させたCreAを発現させて安定性を調べた。その結果、C末端から20アミノ酸を欠失させた場合には影響は見られなかったが、C末端から40アミノ酸を欠失させることでCreAの安定性が著しく高くなり、半減期は炭素源によらず約90分となった(図3)<sup>11)</sup>。このことから、CreAのC末端から20-40アミノ酸の領域がCreAの分解において非常に重要であることが示唆された。現段階ではCreAが安定化する分子機構は不明であるが、この領域にはプロリンが多く含まれており、分解に関わる因子がこの領域に結合する可能性が考えられる。

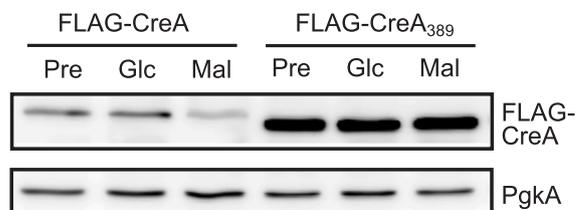


図3. C末端欠損によるCreAの安定化(文献11の図を一部改変)。前培養(Pre)後、グルコース(Glc)またはマルトース(Mal)を炭素源とした培地に移してからFLAG-CreA量を示す。C末端の40アミノ酸を欠損したCreA(FLAG-CreA<sub>389</sub>)は前培養時に量が増加しており、マルトース培地に移してもその量が減少しない。PgkAはコントロールとして検出した。分解に重要であると考えられる20アミノ酸の領域にはプロリンが多く含まれる。

### マルトーストランスポーターの分解機構

出芽酵母においては、環境変化によって不要となったトランスポーターはユビキチンリガーゼ Rsp5 によってユビキチン化され、エンドサイトーシスによって取り込まれる。その後、取り込まれたトランスポーターは液胞に輸送され、液胞内プロテアーゼにより分解される。Rsp5 は WW ドメインにおいて標的タンパク質の PxY モチーフと相互作用するが、多くのトランスポーターには PxY モチーフが存在せず、アレスチン様タンパク質がアダプターとして機能する。出芽酵母には 14 個のアレスチン様タンパク質が存在し、Rod1/Art4 はグルコース存在下におけるヘキソーストランスポーター (Hxt6) やモノカルボン酸トランスポーター (Jen1) のユビキチン化を制御している<sup>13,14</sup>。CreD は Rod1/Art4 と最も相同性が高いことから、グルコース存在下におけるトランスポーターのユビキチン化に関与している可能性が考えられた。麹菌の主要なマルトーストランスポーターである MalP に GFP を融合して蛍光を観察した結果、GFP 蛍光がグルコースの添加により細胞膜から消失し、液胞内に移行した<sup>15</sup>。この GFP-MalP の細胞膜から液胞への輸送は、エンドサイトーシス阻害剤の添加やユビキチンリガーゼ HulA (Rsp5 のオーソログ) の発現抑制により抑制されたことから、グルコースによって MalP のユビキチン依存的なエンドサイトーシスが誘導されることが明らかになった<sup>15</sup>。この MalP のエンドサイトーシスは、グルコースと同様にアミラーゼの CCR を誘導するマンノースや 2-デオキシグルコースの添加によっても誘導されたが、CCR を誘導しないキシロースや 3-O-メチルグルコースの添加では誘導されなかった<sup>15</sup>。このことから、麹菌はアミラーゼの生産を厳密に抑制するために、

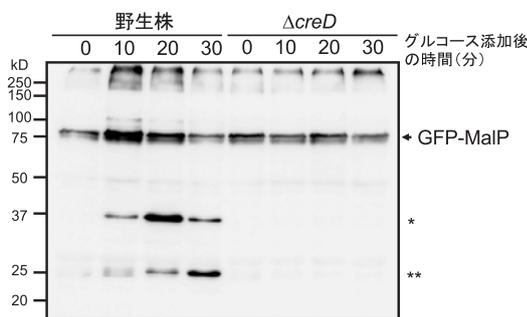


図4. *creD*破壊による GFP-MalP の安定化 (文献16の図を一部改変)。グルコースを添加後に抗 GFP 抗体を用いたウェスタン解析で GFP-MalP を検出した結果を示す。*creD* の破壊により分解中間産物 (\*) や最終分解産物である GFP (\*\*) が検出されなくなった。

MalP をエンドサイトーシス依存的に分解し、誘導基質であるマルトースの取り込みを抑制している可能性が考えられた。さらに、CreD は HulA と相互作用しており、*creD* の破壊により GFP-MalP の液胞への輸送と分解が抑制されたことから、CreD が HulA と MalP のアダプターとして働き、MalP の分解を制御していることが明らかになった (図4)<sup>16</sup>。なお、出芽酵母の Rod1/Art4 は Jen1 の C 末端領域に存在するヒスチジン-イソロイシン-グルタミン酸 (HIE) 配列を認識するが<sup>17</sup>、MalP の N 末端領域にも HIE 配列が存在し、この配列が MalP のエンドサイトーシスに必要であることを示唆する実験結果がこれまで得られている。

### CreD の翻訳後修飾の CCR 制御への関与

グリセロールを炭素源とした培地で培養し、CreD をウェスタン解析により検出すると、リン酸化型 CreD と非リン酸化型 CreD の両方が検出された<sup>16</sup>。この菌体をグルコース培地に移すと、速やかに脱リン酸化され、10 分以内にリン酸化型 CreD のシグナルが消失した<sup>16</sup>。出芽酵母の Rod1/Art4 は、グルコースが枯渇すると cAMP キナーゼである Snf1 によりリン酸化され、高濃度のグルコースが存在すると PP1 フォスファターゼにより脱リン酸化される<sup>14</sup>。CreD のアミノ酸配列中には Snf1 の認識配列と一致するセリン残基が 2 個存在し、両方をアラニンに置換することでリン酸化型のシグナルが検出されなくなったことから、この 2 個のセリン残基がリン酸化部位であることが示唆された<sup>16</sup>。野生株において CreD のリン酸化部位をアラニンおよびリン酸化状態を模倣するグルタミン酸に置換しても、アミラーゼの生産や MalP のエンドサイトーシスへの大きな影響は見られなかった<sup>16</sup>。一方、*creB* 破壊株において CreD のリン酸化部位をグルタミン酸に置換すると CCR の解除が抑制され、アラニンに置換すると対照的にアミラーゼの生産が促進された (図5)<sup>16</sup>。このことから、CreD は MalP

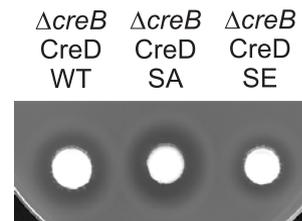


図5. CreD のリン酸化部位への変異導入による CCR への影響 (文献16の図を一部改変)。*creB* 破壊株において CreD のリン酸化部位をアラニン (SA) およびグルタミン酸 (SE) に置換した変異株をグルコース混合デンプン培地で生育させた結果を示す。



- 4) Kelly, J. M. and Hynes, M. J.: *Mol. Gen. Genet.*, **156**, 87 (1977).
- 5) Kato, M. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **60**, 1776 (1996).
- 6) Lockington, R. A. and Kelly, J. M.: *Mol. Microbiol.*, **43**, 1173 (2002).
- 7) Lockington, R. A. and Kelly, J. M.: *Mol. Microbiol.*, **40**, 1311 (2001).
- 8) Boase, N. A. and Kelly, J. M.: *Mol. Microbiol.*, **53**, 929 (2004).
- 9) Ichinose, S. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **98**, 335 (2014).
- 10) Ichinose, S. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **125**, 141 (2018).
- 11) Tanaka, M. *et al.*: *Mol. Microbiol.*, **110**, 176 (2018).
- 12) Alam, M. A. *et al.*: *Curr. Genet.*, **203**, 335 (2017).
- 13) Nikko, E. and Pelham, H. R. B.: *Traffic*, **10**, 1856 (2009).
- 14) Becuwe, M. *et al.*: *J. Cell Biol.*, **196**, 247 (2012).
- 15) Hiramoto, T. *et al.*: *Fungal Genet. Biol.*, **82**, 136 (2015).
- 16) Tanaka, M. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **83**, e00592 (2017).
- 17) Fujita, S. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **293**, 10926 (2018).
- 18) Ahuatzi, D. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **282**, 4485 (2007).
- 19) Vega, M. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **291**, 7267 (2016).
- 20) Fleck, C. B. and Brock, M.: *Eukaryot. Cell*, **9**, 1120 (2010).
- 21) 田中瑞己ら: 日本生物工学会大会講演要旨集, p. 125 (2019).
- 22) Tomimoto, K. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **84**, 198 (2020).