

## 論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 李 諾 (リ ヌオ)

論 文 題 目

Functional analysis of MADS box protein McmA, a combinatorial transcription factor involved in cellulase production as well as other multiple cellular functions

(セルラーゼ生産や様々な細胞機能に関わる MADS box コンビナトリアル転写因子 McmA の機能解析)

### 論文審査担当者

主査	名古屋大学教授	小林	哲夫
委員	名古屋大学教授	中野	秀雄
委員	名古屋大学准教授	藤田	祐一
委員	名古屋大学准教授	木村	眞
委員	名古屋大学助教	金丸	京子

植物性バイオマスの石油代替資源としての利活用は二酸化炭素排出量削減のために喫緊の課題であり、効率的活用と環境負荷軽減の観点から構成成分であるセルロース、ヘミセルロースの酵素糖化が望まれている。糸状菌は多種多様な多糖加水分解酵素を有し、タンパク質生産能にも優れるため、バイオマス分解酵素生産に適した産業微生物として期待される。しかし、分解酵素の生産制御機構の詳細は未知の部分が多く、これを解明できれば分解酵素の効率的生産法の開発などを通して、バイオマスの有効利用に貢献できると考えられる。本論文では、セルロースならびにマンナンの分解酵素群の生産誘導機構の理解を目的とし、糸状菌 *Aspergillus nidulans* においてこれら多糖の分解酵素の生産を正に制御する *McmA* と *ClrB*、また本論文で新たに発見された *ManS* の3種の転写因子を対象として、標的遺伝子群の転写解析および標的プロモーターへの DNA 結合解析を行い、これら転写因子による協調や競合により標的遺伝子群が複雑に制御されていることを明らかにした。また、*MADS box* タンパク質である *McmA* は多様な細胞機能に関わると推定されることから、本因子の新たな標的遺伝子の探索を行い、プロテアーゼ生産、有性生殖、無性生殖への関わりを明らかにした。以下にその概要を述べる。

*A. nidulans* のセルラーゼ生産誘導には転写因子 *McmA* と *ClrB* が関与しており、*ClrB* は全ての主要セルラーゼ遺伝子と一部のヘミセルラーゼ遺伝子のセルロースに応答した発現に必須である。そこで、*McmA* 変異株を用い、*ClrB* 依存的発現を示す7種のセルロース分解酵素遺伝子と1種のマンナン分解酵素遺伝子について、セロビオースに応答した発現誘導における *McmA* 依存性を解析し、セルロース分解酵素遺伝子の5種が高い依存性、2種が弱い依存性を示すのに対し、マンナン分解酵素遺伝子は非依存的に発現することを明らかにした。この原因を探るため、高い *McmA* 依存性を示す2種のセルロース分解酵素遺伝子 (*eglA*, *eglB*) と非依存的発現を示すマンナン分解酵素遺伝子 (*mndB*) のプロモーター領域を用いた DNA 結合解析を行い、*eglA* と *eglB* プロモーターへの *ClrB* の結合には *McmA* が必要であること、*mndB* プロモーターには *ClrB* が単独で結合することを明らかにするとともに、それぞれの結合配列を CCGN<sub>2</sub>CCN<sub>6</sub>GG、CGGN<sub>8</sub>CCG と同定した。さらに、前者の配列では *ClrB* が *McmA* の存在と CCG 配列を認識して結合することを証明した。*McmA*、*ClrB* ともに多くの糸状菌に保存された因子であるが、協調的な DNA 結合の証明や *ClrB* 単独の結合配列の決定は初めての例となる。

麹菌 *A. oryzae* では *ClrB* オルソログの *ManR* がセルロース分解酵素とマンナン分解酵素の生産に必須であることが明らかとなっている。しかし、*A. nidulans* ではマンナン分解酵素生産への *ClrB* の寄与は小さく、そのパラログの *ManS* が主要因子であることを見出した。*clrB* 破壊株、*manS* 破壊株、および二重破壊株を用いて、セロビオースとマンノビオース誘導条件下でのマンナン分解酵素遺伝子の発現を6種

(*manB*, *manC*, *manE*, *manF*, *man134A*, *mndB*) の遺伝子について解析を行い、遺伝子によって ClrB と ManS による制御様式が異なることを明らかにした。すなわち、*manC* と *manE* はマンノビオースに応答して ManS 単独で制御され、*manF* と *man134A* はこれらに類似するが ClrB により部分的に発現抑制される。*manB* は両者を高レベルの発現に必要とし、*mndB* はそれぞれにより独立に制御される。DNA 結合解析によりこの複雑な制御の分子機構の解明を試み、ClrB と ManS が CGGN<sub>8-9</sub>CCG という共通の配列に結合するが周辺配列によって親和性が異なること、ヘテロダイマー形成が起こりその際にはこれと異なる配列に結合することなどを明らかにし、さらに ClrB はセロビオースとマンノビオースに両方とも応答するのに対して、ManS はマンノビオースのみに応答することも見出した。

McmA が属する MADS box タンパク質ファミリーは様々な細胞機能に関わる広域転写因子とされている。そこで、セルラーゼ生産制御以外の McmA の機能を明らかにするため、McmA 変異株を用いて RNA sequencing による網羅的転写解析を行い、プロテアーゼ遺伝子、有性生殖や無性生殖に関わる転写因子遺伝子が McmA に制御されることを見出した。実際に、McmA 変異株ではプロテアーゼ生産の消失や有性生殖器官の欠損、無性生殖の指標となる分生子形成の低下が起こることを確認するとともに、それぞれの表現型の発現に適した条件下での転写解析により、RNA sequencing の結果が正しいことを確認した。これは MADS box タンパク質がプロテアーゼ生産に関わることを見出した初めての例であり、また、*Aspergillus* 属では有性・無性生殖に関わることを示した初めての例となる。

本研究では、糸状菌における植物性バイオマスの分解代謝に中心的な役割を果たす転写因子 McmA、ClrB、ManS について上記の学術的新知見を提供し、セルロース、マンナン分解に関与する遺伝子群の複雑な転写制御について詳細に理解することを可能にした。応用微生物学の視点では、本論文の成果は醸造、発酵、酵素産業にとって極めて有用な知見を与えるものであり、将来的には転写因子を標的とした分子育種による効率的酵素生産法の開発につながると考えられる。植物性バイオマスの酵素糖化では酵素の生産コストが課題となっているが、本成果を応用することによりこの課題の解決につながる可能性がある。学位審査委員会は本論文について審査し、本論文が博士の学位を授与するに十分な価値があると認め、合格と判定した。