

博士論文

糸状菌 *Trichoderma reesei* における  
セルラーゼ転写制御機構を活用した菌株改良に関する研究

令和元年 (2019 年) 6 月

長岡技術科学大学大学院 工学研究科  
生物統合工学専攻

平沢 大樹

指導教官： 小笠原 渉

## 目次

<b>第 1 章 序論</b> .....	5
1.1. 背景 .....	6
1.2. セルロースおよびヘミセルロースとその分解酵素 .....	9
1.2.1. セルロースとセルラーゼ .....	9
1.2.2. ヘミセルロースとヘミセルラーゼ .....	10
1.3. セルラーゼ・ヘミセルラーゼ高生産糸状菌 <i>Trichoderma reesei</i> .....	12
1.4. <i>T. reesei</i> におけるセルラーゼ・ヘミセルラーゼの遺伝子発現制御 .....	14
1.4.1. セルラーゼ・ヘミセルラーゼの誘導物質 .....	14
1.4.2. <i>T. reesei</i> におけるセルラーゼ・ヘミセルラーゼ遺伝子の転写調節因子 .....	15
1.4.3. セルラーゼ・ヘミセルラーゼ遺伝子特異的転写調節因子 .....	19
1.4.4. セルラーゼ・ヘミセルラーゼ遺伝子上流領域の解析 .....	21
1.5. <i>T. reesei</i> の工業用菌株の作出 .....	27
1.5.1. 突然変異導入による菌株改良 .....	27
1.5.2. 遺伝子組換えによる菌株改良 .....	30
1.6. 環境応答性のセルラーゼ生産制御機構 .....	34
1.6.1. シグナル伝達機構 .....	34
1.6.2. pH .....	35
1.6.3. 窒素 .....	37
1.7. 目的 .....	40
<b>第 2 章 <i>xyn3</i> プロモーターを利用した炭素源応答メカニズムの解析およびその応用による工業用糖化酵素生産菌株の造成</b> .....	41
2.1. 緒言 .....	42
2.2. 実験操作 .....	43
2.2.1. 菌株と培養条件 .....	43
2.2.2. プロモーター解析のための GUS レポーターカセットの構築 .....	43
2.2.3. <i>aabgII</i> 発現カセットの構築 .....	45
2.2.4. <i>xyn3</i> 改変プロモーターを含む発現カセットの形質転換およびサザン解析 .....	47
2.2.5. 無細胞抽出液の調製と GUS 活性測定 .....	47

2.2.6.	生化学的分析.....	47
2.2.7.	実バイオマスの糖化試験.....	48
2.2.8.	統計分析.....	49
2.3.	実験結果.....	49
2.3.1.	<i>xyn3</i> 改変プロモーターの誘導能の評価.....	49
2.3.2.	2RBox プロモーターの制御下での <i>A. aculeatus bglI</i> の発現.....	52
2.3.3.	2RBox プロモーター制御下の <i>A. aculeatus bglI</i> の転写.....	55
2.3.4.	QM9414 における 2RBox プロモーターの制御下での AaBGLI の発現.....	58
2.4.	考察.....	61
<b>第 3 章</b>	<b><i>T. reesei</i> の pH 応答に関する研究.....</b>	<b>65</b>
3.1.	緒言.....	66
3.2.	実験操作.....	67
3.2.1.	<i>T. reesei</i> 変異株と培養条件.....	67
3.2.2.	遺伝子破壊プラスミドの構築.....	67
3.2.3.	<i>T. reesei</i> の形質転換.....	75
3.2.4.	生化学的分析.....	75
3.2.5.	実バイオマスの糖化試験.....	77
3.2.6.	ゲノム DNA シークエンスおよびバイオインフォマティクス解析.....	77
3.3.	実験結果.....	78
3.3.1.	異なる培養 pH における変異株間のセルラーゼ、キシラナーゼの生産パターン 78	
3.3.2.	<i>T. reesei</i> におけるセルラーゼ生産への pH シグナル伝達経路の影響.....	81
3.3.3.	種々の日本型変異株における pH 依存的セルラーゼ生産性.....	87
3.3.4.	QM9414 と N-25 間の比較ゲノム解析.....	88
3.3.5.	QM9414 と N-25 間の SNP 遺伝子の破壊の影響.....	91
3.3.6.	工業用糖化酵素生産菌株における培養 pH の変更による酵素組成改変.....	95
3.4.	考察.....	97
<b>第 4 章</b>	<b><i>T. reesei</i> の窒素源応答に関する研究.....</b>	<b>102</b>
4.1.	緒言.....	103

4.2.	実験操作.....	104
4.2.1.	<i>T. reesei</i> 菌株と培養条件 .....	104
4.2.2.	マルチプルアラインメントおよび系統樹解析.....	104
4.2.3.	プラスミド構築および形質転換.....	105
4.2.4.	生化学的分析.....	108
4.2.5.	Electrophoretic mobility shift assay (EMSA).....	109
4.3.	実験結果.....	110
4.3.1.	<i>T. reesei</i> における種々の窒素源に応答したセルラーゼ生産性.....	110
4.3.2.	Mycelia transfer method を用いた窒素源に対するセルラーゼ生産性 .....	112
4.3.3.	窒素源に対するセルラーゼ遺伝子の発現解析.....	114
4.3.4.	<i>T. reesei</i> における様々な窒素源に応答したセルラーゼ遺伝子の転写.....	116
4.3.5.	<i>T. reesei</i> における AreA ホモログの同定 .....	117
4.3.6.	窒素源資化能に対する <i>areI</i> 破壊の影響 .....	119
4.3.7.	窒素輸送体および代謝酵素をコードする遺伝子の発現への AreI の影響 .....	122
4.3.8.	AreI 破壊のセルラーゼ生産への影響 .....	124
4.3.9.	転写調節因子への AreI 破壊の影響 .....	126
4.3.10.	in vitro における <i>T. reesei</i> AreI のプロモーター結合解析 .....	128
4.3.11.	<i>T. reesei xyrl</i> プロモーターと AreIDBD の相互作用 .....	131
4.3.12.	in vivo における <i>xyrl</i> プロモーターへの AreI の相互作用の解析 .....	132
4.4.	考察.....	137
第5章	総括 .....	142
第6章	参考文献.....	145
第7章	本学位論文に含まれる公表論文.....	157
第8章	謝辞 .....	157

## 第1章 序論

### 1.1. 背景

バイオテクノロジーは、生命現象を産業や生活に活用する技術であり、生物の能力を利用および改良する技術である。また、今後数十年間において最も有望な先端技術の一つと言われている。生物そのものを利用する技術として、日本では古くから微生物を用いて酒や味噌、醤油といった発酵食品の製造を行ってきた。生物を改良・応用する技術としては、微生物の育種技術や大腸菌等における遺伝子組換え技術が主に存在し、これまでに多くの酵素や試薬、医薬品原料の製造が行われている。このようにバイオ産業は、日本において非常に重要である。近年、バイオ産業の成長は大きく、1986年に250億円であった市場規模が、2016年には3兆2929億円となったと推定されている(1)。2030年には国内で約15兆円、世界では1.6兆ドル(約180兆円)の市場になると考えられている(2)。そのため、日本は古来より利用してきた「発酵技術」を活かし、バイオ産業にて多くの市場を獲得していくことが、今後の発展において重要である。近年では、工業用供給原料や生分解性プラスチックなどの新しい素材の製造など食料以外の用途を改善する方法としてもバイオテクノロジーの利用に注目が集まっている。特に、バイオマス資源から多種多様な化成品を生産することはバイオリファイナリーと呼ばれ、理論的には石油由来物質のほぼ全てをバイオマス由来の物質で代替生産することができる (Fig. 1-1)(3)。

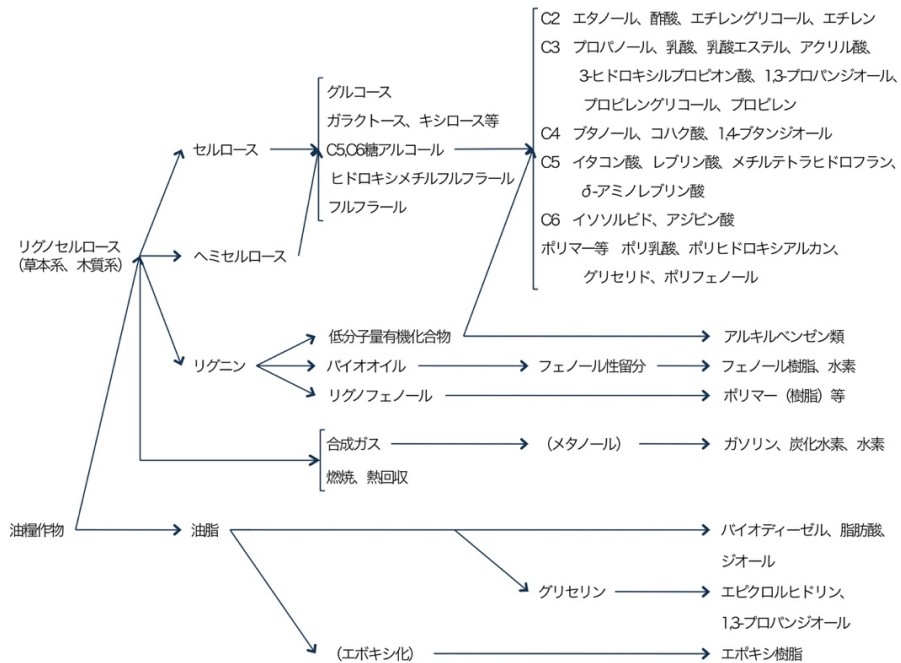


Fig. 1-1 リグノセルロースのバイオリファイナリーの全体像

バイオ燃料技術革新協議会「バイオ燃料技術革新計画」より引用

セルロース系バイオマスは、植物細胞壁の構成成分として地球上で最も豊富に存在し、セルロースとヘミセルロース、リグニンの3成分から構成される。セルロース系バイオマスは直接燃焼することでエネルギーとしての利用できるとともに化学的、生物学的手法により様々な化成品へと変換することが可能である。さらに、バイオマス由来の原料を使用することにより生じる二酸化炭素は、光合成によって再び植物組織内に固定されるため環境負荷を与えない。セルロースおよびヘミセルロースは加水分解することによってグルコースやキシロースといった糖を得ることができる。これら糖を原料に様々な機能を持つ微生物により発酵することで種々の化成品原料を得ることが可能である。特に、*Saccharomyces cerevisiae*のようなエタノール生産酵母を用いて発酵することで得られるエタノールは液体燃料として利用が可能であり、化石燃料の代替エネルギーとして大いに期待されている。また、生産された糖は食料としても活用することが可能である。しかし、セルロース系バイオマスは、3種類の構成成分が複雑に絡み合った状態で存在しており、さらにセルロースが結晶構造をとるため非常に分解性が低く、糖化が困難であることが知られている。これまでにセルロース系バイオマスの糖化には、強力な酸にて加水分解を行う酸糖化法とセルロース分解酵素(セルラーゼ)およびヘミセルロース分解酵素(ヘミセルラーゼ)を用いた酵素糖化法の2種類が存在し、工業規模での利用が検討されてきた。酸糖化法は第二次世界大戦以前から検討されており、現在では成熟した技術として工業規模での運用が行われている。しかしながら、設備や硫酸と糖の分離に莫大なコストおよびエネルギーが必要であること、大量の酸を利用するため環境負荷が大きいことが問題となっている。これに対し、酵素糖化法は比較的温和な条件下で糖化を行うことができ、環境に配慮した方法として実用化が望まれている。しかし、セルロース系バイオマスは難分解性であることから、大量のセルラーゼ、ヘミセルラーゼが必要である。この酵素生産が採算性の面でボトルネックとなっており、技術的な進歩が期待されている(4)。近年、アメリカではバイオエタノールなどの次世代型バイオ燃料の技術開発および事業化がエネルギー省(DOE)および農業省(USDA)の強力な支援により行われている。2015年の時点で約30事業が進行しており、いくつかの事業は工業化を目指した検討段階まで進んでいる。日本においては、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)により新エネルギーの技術開発が支援されており、特に2020年までに微生物の生産するセルラーゼ・ヘミセルラーゼを利用したバイオエタノール生産技術の実用化を目指し研究が行われている。

セルラーゼおよびヘミセルラーゼを生産する生物は生物界に広く存在しており、その分布も微生物から昆虫に至るまで多岐にわたる。自然界では、様々な真菌や細菌がエネルギーや炭素源を得るため、セルロース系バイオマスを分解している。その中でも糸状菌はセルロース、ヘミセルロースの完全分解に必要な複数の酵素を大量に生産すること

が知られている。そのため、酵素糖化によるバイオリファイナリーの実用化のために糸状菌を用いた酵素生産技術の開発が期待されているが、生産量および糖化能の問題から実用化に至っていない。



## 1.2. セルロースおよびヘミセルロースとその分解酵素

再生可能資源としてのセルロース系バイオマスの利用を確立するためには、微生物によるセルラーゼ生産およびセルロース系バイオマスの6糖、5糖のような単糖への酵素的加水分解の技術的発展が必要である。セルロース系バイオマスは、セルロース、ヘミセルロースおよびリグニンの3種類の構成成分が複雑に絡み合った状態で存在している(Fig. 1-2)。効率的な糖化を行うためには、様々な前処理法によるリグニンの除去、またはリグニンおよびヘミセルロースの除去を行う必要がある。

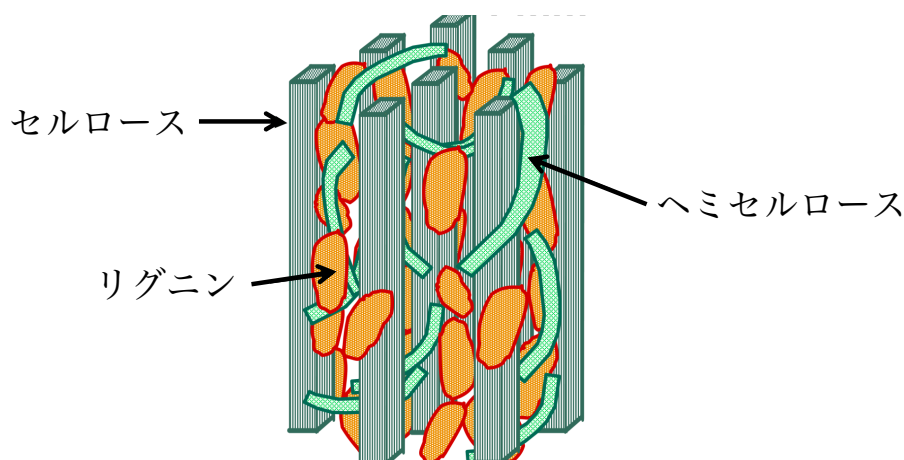


Fig. 1-2 セルロース系バイオマスの構造

### 1.2.1. セルロースとセルラーゼ

セルロースはグルコース同士が $\beta$ -1,4-グリコシド結合した分岐のない直鎖状のホモ多糖であり、植物細胞壁構成成分の35-50%を占める。セルロースは天然状態では多数の鎖が自発的に水素結合することでマイクロフィブリルを形成した結晶構造として存在しているが、一部は結合力が弱く非晶状態として存在している(Fig. 1-3)。セルラーゼはセルロース鎖の $\beta$ -1,4-グリコシド結合を切断する酵素の総称であり、切断様式からセロビオヒドロラーゼ(Cellobiohydrolase: CBH、E.C.3.2.1.91)とエンドグルカナーゼ(Endoglucanase: EGL、E.C.3.2.1.4)、 $\beta$ -グルコシダーゼ( $\beta$ -glucosidase: BGL、E.C.3.2.1.21)に分類されている。CBHはセルロース鎖の非還元末端あるいは還元末端から二糖単位で切断して、セロビオースを遊離するエキソ型の酵素であり、EGLはセルロース鎖(非晶領域)を切断するエンド型の酵素である。一般的に、糸状菌をはじめとした微生物は複数のCBHとEGLを生産することが知られており、お互いの酵素が協調的に作用することで結晶性セルロースを効率的にセロビオースをはじめとするセロオリゴ糖へと分解する(Fig. 1-3)。また、溶解性多糖モノオキシゲナーゼ(lytic polysaccharide monooxygenase: LPMO、E.C.3.2.1.4)はEGLが切

断することのできない結晶領域部分に作用することができ、CBH の作用可能な領域を増加させる。セロオリゴ糖は BGL によってグルコースにまで分解される。

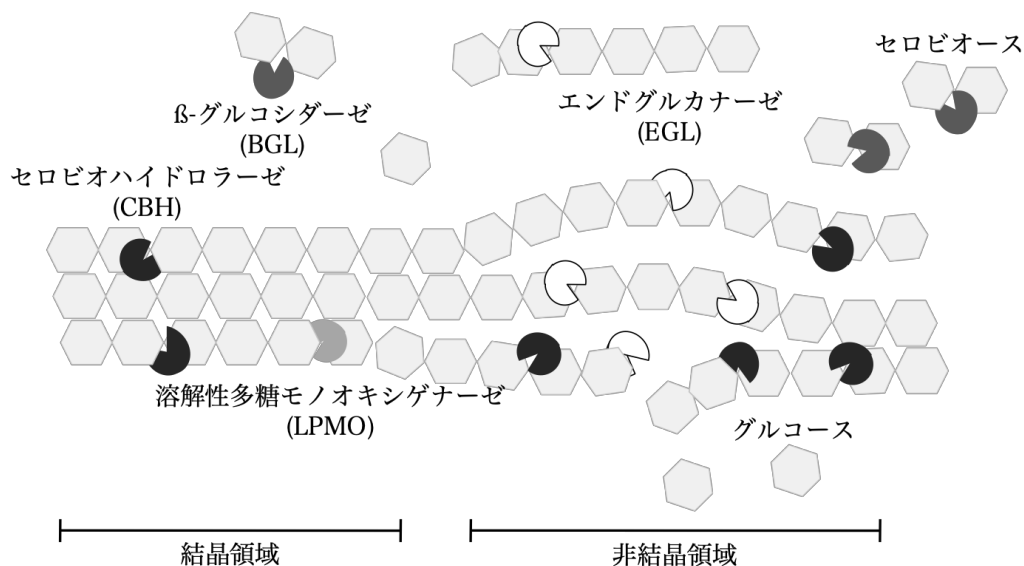


Fig. 1-3 セルラーゼによる効率的なセルロース鎖の分解

### 1.2.2. ヘミセルロースとヘミセルラーゼ

ヘミセルロースとはキシロース、アラビノース、マンノースなどの様々な糖より構成されるヘテロ多糖の総称であり、キシラン、キシログルカン、グルコマンナン、ガラクトマンナン、アラビノガラクタンなどがこれに分類される。ヘミセルロースは植物細胞壁構成成分の 20-35%を占めており、セルロースについて豊富な構成要素である。それぞれのヘミセルロース成分の含有量と組成は由来する植物によって様々であるが、キシランが主要な構成成分である。

キシランはキシロース同士が $\beta$ -1,4 結合した主鎖に L-アラビノース、D-ガラクトース、グルクロン酸、フェルラ酸、アセチル基などが側鎖として結合した複雑なヘテロ多糖である。分岐した構造をとるため結晶性を示さず、酵素分解はセルロースに比べて容易である。キシランの完全分解は、ヘミセルラーゼと総称される一連の酵素群によって行われる。キシラナーゼ(Endo-1,4- $\beta$ -xylanase: XYN, E.C.3.2.1.8)は、キシラン主鎖のキシロース間に存在する $\beta$ -1,4-グリコシド結合をランダムに切断するエンド型の酵素であり、この作用によってキシロオリゴ糖が生成される。 $\beta$ -キシロシダーゼ( $\beta$ -D-xylosidase: BXL, E.C.3.2.1.37)は長鎖のキシロオリゴ糖やキシロビオースを非還元末端から単糖単位で切断する酵素であり、これら 2 種類の酵素によってキシラン主鎖は D-キシロースまで分解される。また、キシラン側鎖は $\alpha$ -L-アラビノフラノシダーゼ( $\alpha$ -L-arabinofuranosidase: ABF、

E.C.3.2.1.55)、 $\alpha$ -D-グルクロニダーゼ( $\alpha$ -D-glucuronidase : GLR、E.C.3.2.1.139)、アセチルキシランエステラーゼ(Acetylxylanestrerase: AXE、E.C.3.1.1.72)、フェルラ酸エステラーゼ(Ferulic acid esterase: E.C.3.1.1.73)、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ( $\beta$ -Galactosidase: BGA、E.C.3.2.1.23)などによって分解される。キシランナーゼと側鎖を分解する酵素の間には相乗効果が認められるため、微生物は多種多様なヘミセルラーゼを生産することで効率的にキシランを分解していると考えられている。

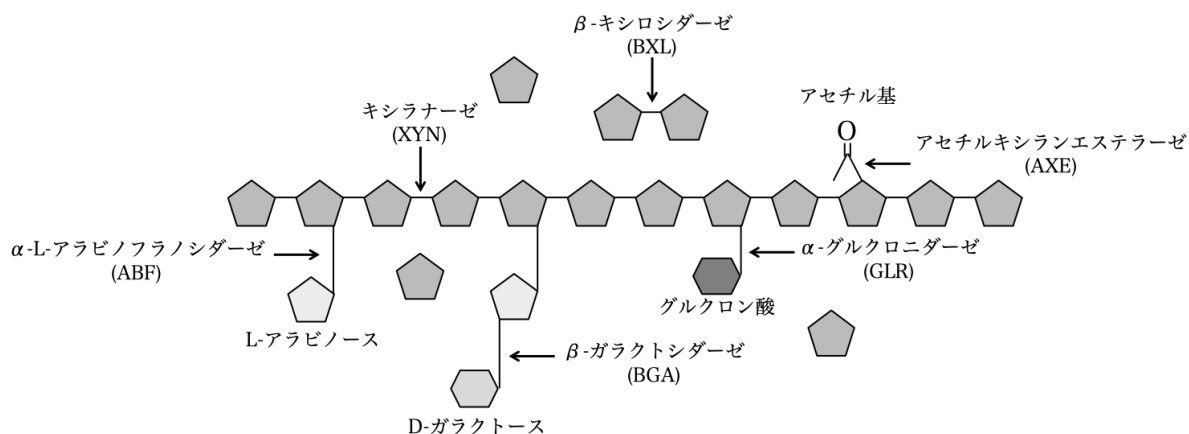


Fig. 1-4 ヘミセルラーゼによるヘミセルロースの分解様式

### 1.3. セルラーゼ・ヘミセルラーゼ高生産糸状菌 *Trichoderma reesei*

*Trichoderma reesei* (完全世代:*Hypocrea jecorina*)は多細胞性の軟腐朽糸状菌であり、第二次世界大戦時にテントやリュックサック、コットン繊維の高分解能を持つ菌として南太平洋、ソロモン島にて単離された。*T. reesei*は、効率的にセルラーゼ、ヘミセルラーゼを生産することが可能な微生物の1種であり、*T. reesei*による酵素分泌は工業的に広く興味を持たれている(5)。*T. reesei*のゲノム中には、数多くの糖質関連酵素(Carbohydrate-Active enZymes: CAZy)が保存されており、糖質加水分解酵素が201遺伝子、炭水化物エステラーゼが22遺伝子、LPMOが5遺伝子存在する(6)。*T. reesei*は少なくとも2種類のCBH(CBHI、CBHII)、5種類のEG(EGI~EGIII、EGV、EGVI)、2種類のLPMO(EGIV、EGVII)および1種類のBGL(BGLI)を分泌生産する(7-17)(Table 1-1)。これらの酵素群が相乗的に作用し、セルロース鎖の分解を効率的に行う。また、*T. reesei*により分泌されるキシラン分解性酵素は少なくとも5種類のエンドキシラーナーゼ(XYNI~XYNV)および1種類のβ-キシロシダーゼ(BXLI)が分泌される(18-22)。

Table 1-1 *T. reesei*における主なセルラーゼ・ヘミセルラーゼ

Protein ID*	タンパク質名	GHファミリー**	酵素名
123989	CBHI	GH7	cellobiohydrolase
72567	CBHII	GH6	cellobiohydrolase
76672	BGLI	GH3	β-glucosidase
120749	BGLII	GH1	β-glucosidase
122081	EGI	GH7	endo-β-1,4-glucanase
120312	EGII	GH5	endo-β-1,4-glucanase
123232	EGIII	GH12	endo-β-1,4-glucanase
49976	EGV	GH45	endo-β-1,4-glucanase
121127	BXLI	GH3	β-xylosidase
74223	XYNI	GH11	endo-β-1,4-xylanase
123818	XYNII	GH11	endo-β-1,4-xylanase
120229	XYNIII	GH10	endo-β-1,4-xylanase

\* *T. reesei*ゲノムデータベース(<https://genome.jgi.doe.gov/Trire2/Trire2.home.html>)における識別番号

\*\* GHファミリー(Glycosyl Hydrolase Family):糖質加水分解酵素ファミリー

*T. reesei*の産業用菌株は、産業規模の培養において 100 g/L 以上のセルロース分解酵素を生産することが可能である(23)。さらに、*T. reesei* は、工業用セルラーゼの供給源として、「培養することが容易かつ安価であること」、「酵素生産条件下で抗生物質や毒物を生産せず、人間の健康に害を与えない安全な生物であること」および「生産された細胞外タンパク質の大部分は、セルラーゼおよびヘミセルラーゼであること(CBHI: 約 60%、CBHII: 25%、エンドグルカナーゼ: 15%)(24)」が利点として挙げられる。

#### 1.4. *T. reesei*におけるセルラーゼ・ヘミセルラーゼの遺伝子発現制御

##### 1.4.1. セルラーゼ・ヘミセルラーゼの誘導物質

糸状菌はセルロース、ヘミセルロースを含む種々の炭素源に応答してセルラーゼ、ヘミセルラーゼの生産が誘導される。セルラーゼ、ヘミセルラーゼの遺伝子の発現は複雑に制御されており、転写レベルでの調節が行われている。*T. reesei*においても、セルラーゼおよびヘミセルラーゼは細胞外に唯一の炭素源としてセルロースやキシランが存在する際に誘導生産される(Fig. 1-5)。一方で、グルコースやフルクトースなどの代謝が容易な炭素源の存在下では炭素源異化抑制によりセルラーゼ、ヘミセルラーゼの生産は誘導されない。セルロースは不溶性の高分子ポリマーであるため、誘導物質として菌体内に直接取り込まれることはない。そのため、セルロースから生じる低分子の誘導体が細胞内に取り込まれ、誘導物質として機能すると考えられている。これまでに様々な研究グループによってセルラーゼおよびヘミセルラーゼの誘導物質の探索が行われ、セルロース、セロビオースまたはその糖転移産物であるソフォロース、ラクトースがセルラーゼの誘導物質として働くことが報告されている(25, 26)。さらに、ラミナリビオースや $\delta$ -セロビオノラクトンなども誘導物質として機能することが報告されている(27)。中でもソフォロースは最も強力な誘導能を示し、その強力な誘導能から *T. reesei*におけるセルラーゼ誘導の最終的な誘導物質であると考えられている。しかしながら、単糖であるにもかかわらず L-ソルボースが誘導物質として働くことが明らかとなっており、その誘導能はソフォロースと同等である(28)。そのため、セルラーゼの真の誘導物質は何かという議論に対していまだ明確な答えは出ていない。一方で、*T. reesei*のセルラーゼ遺伝子はどの誘導物質を用いた場合でも同調して発現していることから、遺伝子の転写が共通の誘導発現機構によって制御されていると推定されている(27)。

ヘミセルラーゼの誘導はセルラーゼとは異なり、それぞれのヘミセルラーゼによって炭素源に対する応答が異なっている(22, 29)。キシラナーゼの生産はセルラーゼの誘導物質で誘導されるだけでなく、キシロースやキシロビオースによって誘導される。*xyn1*がD-キシロースによって誘導されるのに対して、*xyn2*はセルロース、ソフォロースおよびキシロビオースによって誘導される(30)。また、*xyn3*はキシロースなどのキシラン系の誘導物質ではなく、セルロース、セロビオースおよびソフォロース等のセルラーゼ誘導物質によってのみ誘導される(31)。

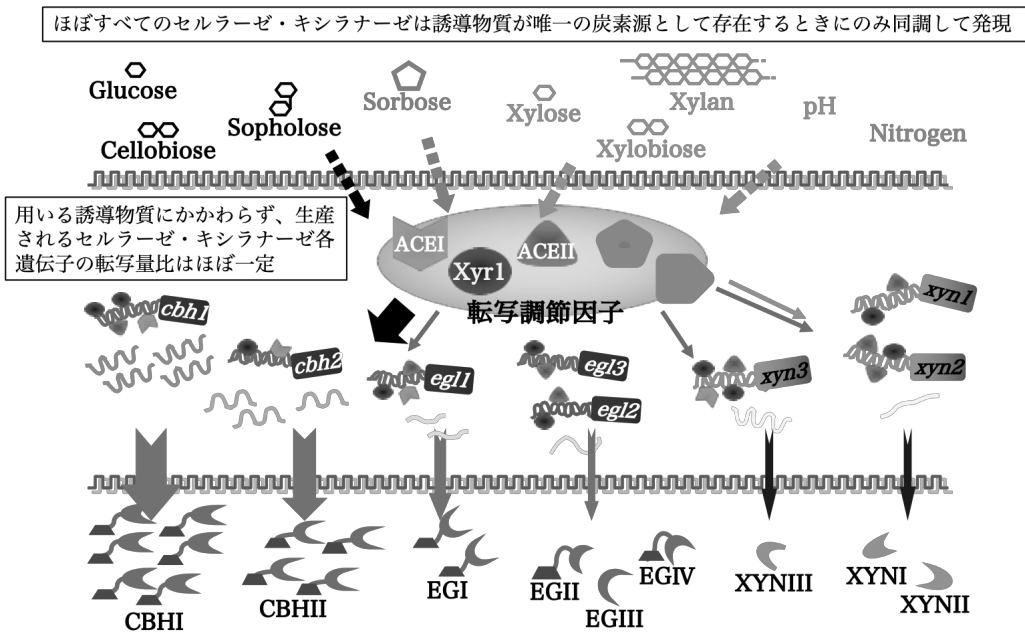


Fig. 1-5 *T. reesei*におけるセルラーゼ・キシラナーゼの誘導発現モデル

#### 1.4.2. *T. reesei*におけるセルラーゼ・ヘミセルラーゼ遺伝子の転写調節因子

*T. reesei*のセルラーゼ・ヘミセルラーゼの発現は複数の転写調節因子によって転写レベルで複雑に制御されていることが明らかとなっている(Fig. 1-6)。近年、セルラーゼ遺伝子の誘導および抑制に関与する転写調節因子が単離されてきており、各転写調節因子の特異的なシス配列が同定され、セルラーゼ、ヘミセルラーゼの誘導生産における役割が明らかにされつつある(Fig. 1-6, Table 1-2)。

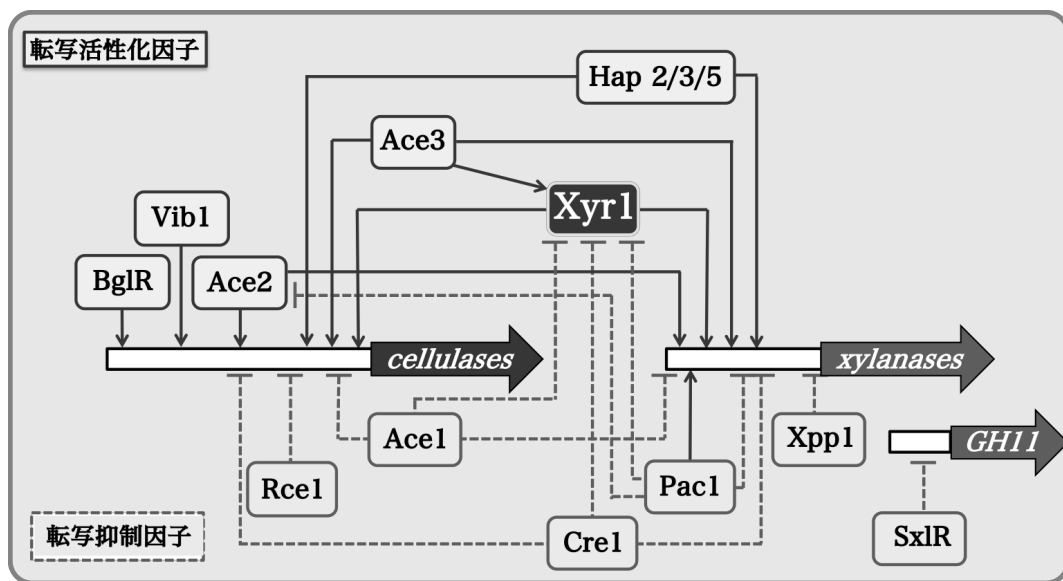


Fig. 1-6 *T. reesei*においてセルラーゼ・キシラナーゼ遺伝子の転写制御因子の制御モデル

Table 1-2 *T. reesei*において既知のセルラーゼ・キシラナーゼ遺伝子の転写制御因子

タンパク質名	Protein ID*	機能
Rce1	72611	セルラーゼ特異的転写抑制因子
Pac1	120698	pH 応答転写調節因子
Ace1	75418	転写抑制因子
Ace2	78445	転写活性化因子
Ace3	77513	必須な転写活性化因子
Cre1	120117	炭素源異化抑制因子
Hap2	124286	転写促進因子
Hap3	121080	転写促進因子
Hap5	62979	転写促進因子
BglR	52368	BGL 特異的転写活性化因子
Xyr1	122208	必須な転写活性化因子
Xpp1	122879	キシラナーゼ特異的転写抑制因子
SxlR	123881	GH11 キシラナーゼ特異的転写抑制因子
Vib1	54675	転写活性化因子

\* *T. reesei* ゲノムデータベース (<https://genome.jgi.doe.gov/Trire2/Trire2.home.html>) における識別番号

#### 1.4.2.1. セルラーゼ・ヘミセルラーゼ遺伝子の転写活性化因子

##### 1.4.2.1.1. Xyr1

Xyr1 は *Aspergillus niger* のキシラナーゼ遺伝子の転写活性化因子である XlnR の相同タンパク質として見いだされたセルラーゼ・キシラナーゼ遺伝子の転写活性化因子である(32)。*xyr1* の破壊は *cbh1* および *cbh2*, *egl1*, *xyn1*, *xyn2*, *bgl1*, *bxl1* の発現が欠損しセルラーゼ活性、キシラナーゼ活性が全く検出されない(33)。そのため、Xyr1 はセルロースおよびソフオロースを炭素源とした際の主要なセルラーゼ・キシラナーゼ遺伝子の転写活性化に必須の転写調節因子である。一方、キシロース、キシラン、キシロビオースを炭素源とした際に、Xyr1 はキシラナーゼ遺伝子の転写を活性化するが、セルラーゼ遺伝子の転写活性化を行わない(34)。このことから、Xyr1 は誘導物質応答性のセルラーゼ・キシラナーゼ生産調節の中心的な役割を担うと考えられている。Xyr1 はセルラーゼ、ヘミセルラーゼ遺伝子のプロモーター上に存在する 5'-GGCTAA-(N)10-TTAGCC-3'、5'-GGCTAT-(N)16-TTTGCC-3'、および 5'-GGGTAA-(N)12-CCAGCC-3'などの逆向き反復配列に 2 量体で機能している可能性が示唆されている(35)。しかし、単独で存在する 5'-GGCTAA-3'、



5'-GGCTAT-3'および 5'-GGCAA-3'にも結合することが報告されている(35)。xyl1 の転写はグルコース存在下で抑制される。セルロースやラクトース、ソフォロースでは、xyl1 の転写は顕著に上昇する。これらの炭素源で転写が増幅されると、Xyr1 の核内への局在化が行われ、それにともないセルラーゼ遺伝子の発現が増加する。この転写活性化には Xyr1 の de novo 合成と核移行が必須であることが明らかとなっている(36)。Xyr1 の核移行は Importinβである Kap8 が関与することが報告されている(37)。一方で、キシロース誘導条件などのヘミセルラーゼ生産時における Xyr1 はソフォロースほど劇的な核局在は観察されない。キシロース存在下ではキシラナーゼ遺伝子の転写量が増加するが、セルラーゼ遺伝子発現と異なり Xyr1 の de novo 合成が必要ではなく、Xyr1 の翻訳後修飾等による活性化がキシラナーゼ遺伝子発現に必要であると示唆されている(38)。

#### 1.4.2.1.2. Ace2

Ace2 は *S. cerevisiae* において構築された *T. reesei* の発現ライブラリーによるセルラーゼ転写活性化因子のスクリーニングにより、*cbh1* の上流領域に結合するタンパク質として見いだされた(39)。Ace2 は N 末端側に真菌特有の Zn<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub> 型の Zinc binuclear cluster domain を持ち、5'-GGCTAA-3'および 5'-GGGTAA-3'に結合する。*T. reesei* 特異的な転写調節因子であり、*T. reesei* の特異的なセルラーゼ生産能の一端を担っていると考えられる。Ace2 破壊株を用いた実験から、Ace2 はソフォロース誘導には関与しないが、セルロース誘導では *cbh1* および *cbh2*、*egl1*、*xyn2* の転写活性化を行うことが明らかとなっている。この現象よりセルロース誘導とソフォロース誘導のメカニズムは一部異なっている可能性が示唆されている。しかしながら、*cbh2* のソフォロース誘導における転写活性化に Ace2 が関与していることが示唆されており、Ace2 と誘導物質の関係は未だ不明である(40)。さらに、*ace2* 破壊株はセルロース存在下でセルラーゼの誘導は遅れるもののセルラーゼを全く生産できないわけではない。これらの点から、Ace2 は *T. reesei* のセルラーゼ誘導に必須な転写活性化因子とは考えられていない。

#### 1.4.2.1.3. Hap2/3/5 複合体

Hap2/3/5 複合体は真核生物で高く保存されている転写活性化タンパク質の複合体(CCAAT-box binding complex)のオルソログとして見出された(41)。微生物から哺乳類にいたるまでほとんどの生物から見出されており、糸状菌においても *Aspergillus* 属を中心に解析が進められている(42)。CCAAT 配列は真核生物において約 30%の遺伝子上流領域で見られる。さらに、調節される遺伝子の機能も多岐にわたっているため、広域的な転写活性化因子であると考えられている。*T. reesei* において、Hap2/3/5 複合体は *cbh2* および

*xyn2* プロモーター中の CCAAT 配列に結合し、遺伝子の転写を活性化する(43, 44)。CCAAT 配列への変異導入は、セルラーゼ遺伝子の誘導発現および基礎レベルでの発現を減少させることから、Hap2/3/5 複合体は他のセルラーゼ遺伝子の転写活性化因子と同調して機能すると考えられている。また、Hap2/3/5 複合体は *cbh2* の上流領域では誘導条件下で Ace2 とともにクロマチン構造を保ち、TATA-box 付近を開いた状態に保つことが明らかにされ、Ace2 と協調して機能することが推測されている(43-45)。

#### 1.4.2.1.4. Ace3

Xyr1 とは異なるセルラーゼ遺伝子の発現に必須な転写調節因子が Ace3 である(46)。Ace3 はリグノセルロースで発現誘導される転写制御因子のトランスクリプトーム解析によるスクリーニングから同定され、Xyr1 と同様に全てのセルラーゼ遺伝子および一部のキシラナーゼ遺伝子の転写に必須であることが明らかとなっている(46)。さらに、セルラーゼ・ヘミセルラーゼの転写だけでなく、*xyl1* の転写を制御することでセルラーゼの生産を制御していると示唆されている(46)。ゆえに、Ace3 はセルラーゼ生産制御機構の初期段階の調節に関与する転写調節因子であると考えられている。(46)。

#### 1.4.2.2. セルラーゼ・ヘミセルラーゼ遺伝子転写抑制因子

##### 1.4.2.2.1. Cre1

グルコースなどの容易に代謝できる炭素源が存在した場合、セルロースやキシランといった代謝が困難な炭素源の分解酵素遺伝子の転写は抑制される。このメカニズムは炭素源異化抑制と呼ばれ、Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub> タイプの Zn finger domain をもつ転写調節因子 Cre1 によって制御される(47, 48)。*cbh1* および *xyn1* のプロモーター解析の結果、Cre1 の結合配列は 5'-SYGGRG-3'であると推定されている(49, 50)。Cre1 の欠損はセルラーゼ遺伝子の発現量増加を引き起こす。この *cre1* 遺伝子が欠失している *T. reesei* Rut-C30 株はセルラーゼ高生産株となっている(51)。また、日本型変異株のセルラーゼ高生産株 PC-3-7 はゲノム中の *cre1* 遺伝子の Zinc finger domain をコードする領域に塩基置換が生じ、標的プロモーターへの結合能が低下している(52)。しかしながら、Cre1 の欠損による炭素源異化抑制の解除は、セルロースなどの誘導物質存在下でのみ起こる。また、*cbh2* 発現のグルコースによる転写抑制は Cre1 非依存的であると言われているが、*cbh2* プロモーターに Cre1 が結合することで *cbh2* の転写活性化領域 CAE 付近のヌクレオソームの位置を保持していることが示唆されている(45)。

Cre1 はグルコース存在下で分子内の 241 番目の Ser 残基がカゼインキナーゼ II like タンパク質によりリン酸化されることで活性化し、これにより DNA への結合が可能に

なる(53)。さらに、Cre1 のホモログである CreA (*Aspergillus* spp.)は炭素源に応じて CreB、CreC、CreD によってタンパク質レベルで制御されることが報告されている(54, 55)。*T. reesei*においても、CreB、CreC、CreD の相同物である Cre2、Cre3、Cre4 の存在が確認されており、*A. nidulans* と同様に Cre1 が制御されていることが考えられる。近年、*Neurospora crassa*において、Cre-1 の転写を抑制する転写調節因子 Vib-1 が発見され、炭素源異化抑制機構の解明が進んでおり、Cre-1 を中心とした複雑な機構の存在が示唆されている(56)。

#### 1.4.2.2.2. Ace1

Ace1 は Ace2 と同様に *cbh1* プロモーターに結合する転写調節因子として単離された(57)。Ace1 は 3 つの Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub> タイプ zinc finger domain を有しており、5'-AGGCA-3'に結合する。当初は *cbh1* プロモーターに結合する転写活性化因子として見つかったが、*T. reesei*における *ace1* の破壊によってセルロースやソフォロース存在下で *cbh1* および *cbh2*、*egl1*、*xyn1*、*xyn2* の転写量が増加したため、Ace1 は転写抑制因子と考えられている(58)。多くの糸状菌において、Ace1 に相同性を示す遺伝子が見出されており、広く保存されている因子である。しかしながら、その機能はセルラーゼ・ヘミセルラーゼ遺伝子の転写制御に限定されていない。*A. nidulans* における相同タンパク質 StzA は非生物的なストレスへの耐性タンパク質であり、*T. reesei* においても Ace1 はセルラーゼ・ヘミセルラーゼ遺伝子に特異的な転写調節因子ではないと考えられている(59)。

#### 1.4.3. セルラーゼ・ヘミセルラーゼ遺伝子特異的転写調節因子

これまでに発見されたセルラーゼ・キシラナーゼ遺伝子の転写調節因子は、セルラーゼ・キシラナーゼの発現を全体的に制御する因子であった。それに対して、特定のセルラーゼ、キシラナーゼを特異的に制御する転写調節因子の存在が近年明らかとなり、*T. reesei* においてもいくつかのセルラーゼ・ヘミセルラーゼ遺伝子特異的転写調節因子が報告されている。

##### 1.4.3.1. Xpp1

以前からその存在が予想されていたキシラナーゼ遺伝子の制御因子を見出すため、*xyn2* プロモーター中の抑制的なシス配列(5'-AGAA-3')に結合するタンパク質としてプルダウン法によって単離されたタンパク質が Xpp1 である(29, 60)。塩基性 helix-loop-helix 型の転写調節因子であり、*xyn2* プロモーター上でのターゲット配列は AGAA のリピート配列をもつパリンδροーム配列(*xyn1* プロモーターへの結合を含めて 5'-WCTAGW-3')である

(60)。 *xpp1* の破壊株や過剰発現株の比較解析から、Xpp1 は培養後期にキシラナーゼ遺伝子の発現を抑制している転写調節因子であり、セルラーゼ遺伝子の発現には関与していないことが明らかとなっている(60)。また、Xpp1 の発現はグルコースやキシロースといった容易に代謝が可能な炭素源によって活性化される(60)。

#### 1.4.3.2. SxlR

SxlR は sexual crossing approach を用いたバイオインフォマティクスによる遺伝子発現解析から見出された Zn<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub> 型の転写調節因子である(61)。SxlR はキシラナーゼ遺伝子特異的な転写抑制因子であり、セルラーゼ遺伝子の発現には関与していない。さらに、SxlR は GH11 キシラナーゼ遺伝子のプロモーターに直接的に結合しその発現を抑制する。GH10 や GH30 に属するキシラナーゼ遺伝子のプロモーター領域に対して結合能を持たないことから、GH11 キシラナーゼ特異的な転写抑制因子であることが明らかとなっている(61)。また、多くの糸状菌において SxlR のホモログが見出されることから、その機能は広く保存されたものであることが示唆されている。

#### 1.4.3.3. BglR

BglR は *T. reesei* 日本型変異株である PC-3-7 株の比較ゲノム解析より見出され、*bgl1* 以外のβ-グルコシダーゼ遺伝子に特異的な転写活性化因子である(62)。このことから、BglR は BGL の発現を活性化してグルコースの生産を促進し炭素源異化抑制を引き起こすことで、間接的にセルラーゼ生産を抑制すると考えられている。*N. crassa* における BglR のオルソログ Col-26 はグルコースのセンシングまたは代謝を調節する(56)。また、*N. crassa* では、Col-26 と相互作用してセルラーゼ発現の調節を行う Vib-1 が同定されており、Vib-1 はセルロース応答時にグルコース抑制因子 Cre-1 を介したカーボンカタボライト抑制や Col-26 を介したグルコースセンシングと代謝を調節する可能性が示唆されている。

#### 1.4.3.4. Rce1

Rce1 は、*S. cerevisiae* を用いた yeast one hybrid 法によって *cbh1* の上流領域に結合する転写調節因子として単離された(63)。Rce1 の破壊によってセルラーゼ活性は増加するが、キシラナーゼ活性に変化は見られない。それゆえに、Rce1 はセルラーゼ特異的な転写抑制因子と考えられている。Rce1 の抑制メカニズムは Cre1 のような炭素源異化抑制機構によるものではなく、Rce1 の DNA への結合が Xyr1 と競合しており、Xyr1 による転写活性化を阻害することで行われると考えられている。

#### 1.4.4. セルラーゼ・ヘミセルラーゼ遺伝子上流領域の解析

*T. reesei*におけるセルラーゼ・ヘミセルラーゼ遺伝子の誘導発現機構に関する研究は、種々の遺伝子の発現解析から上流領域の解析へと発展し、様々な転写調節因子の発見へと至ってきた。それぞれの転写調節因子がセルラーゼ・ヘミセルラーゼ遺伝子群へ与える影響に関する知見は破壊株を用いた解析より得られているが、実際にそれぞれの遺伝子の活性化にどの転写調節因子がどのように関与しているかということに関しては不明な点が多い。しかしながら、*in vitro*での転写調節因子の electrophoretic mobility shift assay (EMSA)解析、*in vivo*および *in vitro* フットプリント解析から推測される結合配列などの情報から、*cbh1* および *cbh2*, *egl3*, *xyn1*, *xyn2*, *xyn3* の誘導発現機構と転写調節因子の関係について知見が得られてきた。

##### 1.4.4.1. *cbh1* プロモーターの上流領域の解析

*cbh1* は *T. reesei* において最も高く発現しているセルラーゼ遺伝子であり、染色体中にシングルコピーで存在している。CBHI はセルラーゼ誘導条件下において分泌されるタンパク質の約 60% を占めている。これは *cbh1* プロモーターによる転写が非常に強力であることを示しており、セルラーゼ遺伝子の転写調節機構の理解とともに、有用タンパク質の大量生産という観点からも注目され、その転写調節機構の解明を目指した研究が行われている(Fig. 1-7)。*in vivo* における *cbh1* プロモーターの削除解析により、*cbh1* の発現に重要な領域が同定されており、開始コドンから -500 bp の領域が炭素源異化抑制を調節することおよび -720 bp の炭素源異化抑制因子 Cre1 の結合サイトの変異により脱抑制が生じることが明らかとなっている(51)。さらに、-700 bp 付近に 3 つの推定 Cre1 結合サイトが存在し、*in vitro* で異種発現された Cre1 が結合することが確認されている(49)。また、開始コドンより上流 -161 bp の領域がソフォロス誘導に重要なエレメントとして同定されている(49)。TATA box より -241 bp から -72 bp の 170 bp の領域がセルロースによる誘導に、開始コドンから -72 bp の領域が低レベルでの構成的発現に重要であることも報告されている(64)。また、one-hybrid system を用いた解析より、*cbh1* プロモーターに結合する因子として Ace1 および Ace2 が単離され、*in vitro* での結合解析が行われた(39, 57)。近年、同様の手法で Rce1 が新規のセルラーゼ特異的な転写抑制因子として同定された(63)。現在、これ以上の解析は行われておらず、*cbh1* プロモーターの強力な転写活性を決定している要因に関して有効な知見は得られていない。

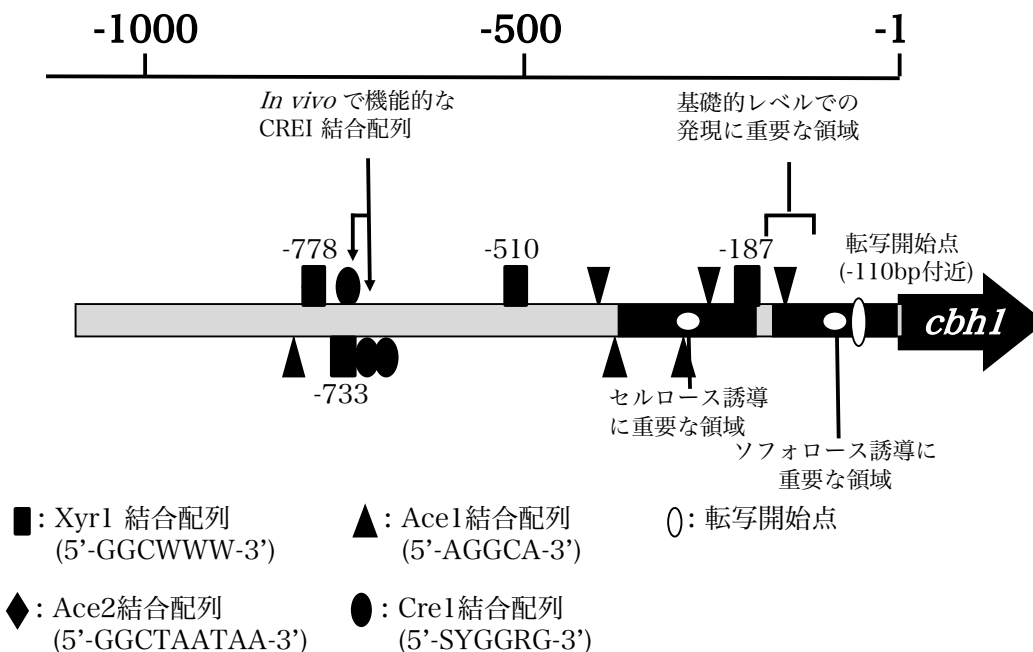


Fig. 1-7 *cbh1* 上流領域の発現制御モデル

#### 1.4.4.2. *cbh2* の上流領域の解析

*cbh2* は、セルラーゼ誘導条件下で 2 番目に発現している遺伝子である。それゆえに、*cbh2* プロモーターもセルラーゼ遺伝子の転写調節機構の理解のためのターゲットとして研究されている (Fig. 1-8)。初期の研究において、ゲルシフトアッセイを用いた解析より *cbh2* プロモーターの -361 bp から -170 bp の領域がソフォロース誘導に関与することが明らかとなっている (65)。さらに、*cbh2* の上流領域の削除解析およびによって発現に重要な配列 CAE (*cbh2* activating element) が特定された (65, 66)。この配列は 5'-ATTGGGTAATA-3' であり、Hap2/3/5 複合体および Ace2 が *in vitro* で結合することが示された (40, 41)。*cbh2* プロモーターは -222 bp の部分に 1 つの Cre1 結合サイトを保持するが、Cre1 による直接的な制御は受けていない (45)。さらに、*cbh2* 遺伝子破壊株ではセルラーゼ誘導におけるセルラーゼ遺伝子群の転写が行われなため、基礎レベルで微量に発現している CBHII がセルラーゼを分解し低分子の誘導物質の獲得に寄与していると考えられている (67, 68)。

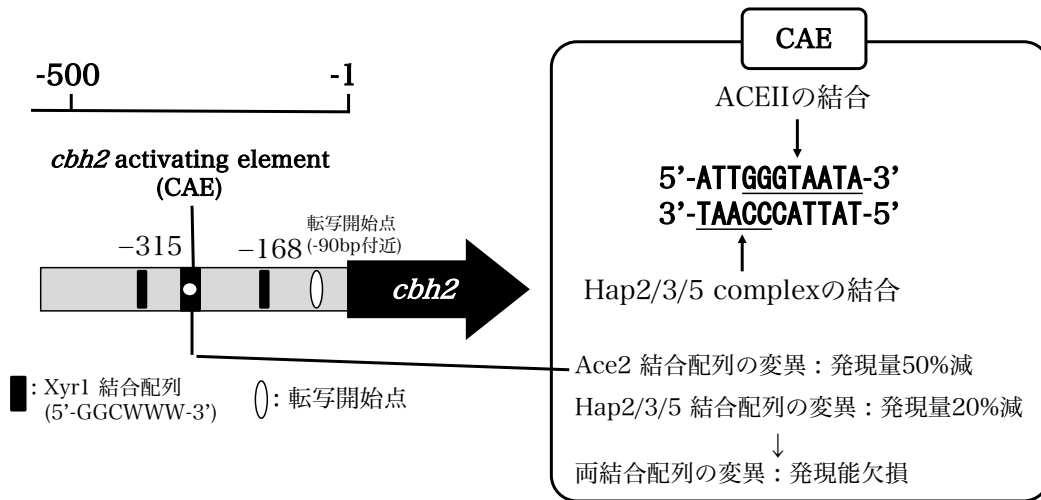


Fig. 1-8 *cbh2* 上流領域の発現制御モデル

#### 1.4.4.3. *egl3* の上流領域の解析

*egl3* は他のセルラーゼ遺伝子と共に誘導されるが、その発現レベルは *cbh1* mRNA の約 1% とかなり低い(28)。また、同じエンドグルカナーゼである *egl1* mRNA と比較しても、5% ほどしか発現していない。*egl3* の上流領域には、2 つの 5'-GGCTAA-3' モチーフおよび 6 つの CCAAT ボックス、2 つの Cre1 結合サイトがある(Fig. 1-9)。GUS ( $\beta$ -グルクロニダーゼ) レポーターシステムを利用したプロモーター削除解析より、-1,018 bp に存在する 5'-GGCTAT-3' および -979 bp に存在する 5'-GGCTAA-3' が *egl3* の誘導に重要であると明らかにされている(69)。さらに、-176 bp の 5'-GGCTAA-3' はわずかだが誘導に関与することも報告されている。これらの配列には、Xyr1 が結合することがゲルシフトアッセイにより確認されている。

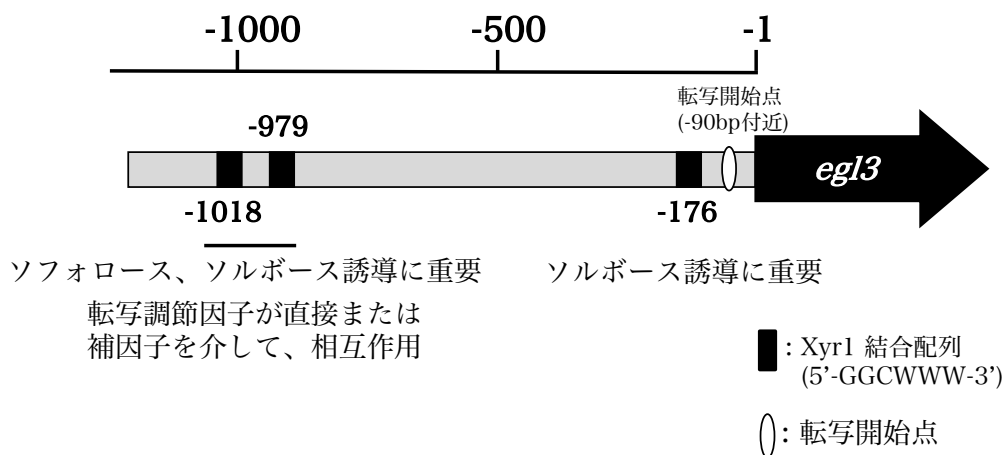


Fig. 1-9 *egl3* 上流領域の発現制御モデル

#### 1.4.4.4. キシラナーゼ上流領域の解析

3つの主要なキシラナーゼ遺伝子(*xyn1*~*xyn3*)の発現はセルラーゼ遺伝子の発現と異なり協調的な制御ではなく、それぞれの遺伝子で発現メカニズムが異なる(30, 31)。それぞれの転写制御メカニズムの詳細を解明するため、これら3つのキシラナーゼ遺伝子のプロモーター領域は広く研究されてきた。

##### 1.4.4.4.1. *xyn1*の上流領域の解析

*xyn1*の発現は、キシラン、D-キシロースおよびL-ソルボースにより誘導され、D-グルコースによって抑制される(50)。*xyn1*の5'-上流領域の解析から、*xyn1*の転写開始点から-321 bpから-534 bpの217 bpの領域がキシラン、キシロースでの*xyn1*発現の制御に必須であることが明らかとなっている(29, 49, 68)(Fig. 1-10)。この217 bpの詳細な削除解析より、CCAATボックス、2つのCreI結合サイトおよび10 bpのスペーサー配列を持つ5'-GGCTAA-3'モチーフ(Xyr1結合サイト)の繰り返し配列を含むシス配列が同定されている(70)。ゲルシフトアッセイにより、Ace2ではなくXyr1が両方の5'-GGCTAA-3'モチーフに相互作用できることが明らかとなり、*xyn1*発現の活性化のためにXyr1が繰り返し配列にホモダイマーとして結合することが提唱されている。さらに、5'-GGCTAA-3'モチーフの下流にAce1が特異的に結合することも証明され、*xyn1*の発現量が*ace1*破壊株で上昇することから*xyn1*はAce1によって転写抑制を受けていることが明らかとなっている(70)。これらの報告を元にXyr1とAce1の競合が*xyn1*の誘導に寄与していると推定されている(70)。また、Hap2/3/5複合体およびCreIのそれぞれのモチーフへの結合もゲルシフトアッセイにより証明されている。CreIの結合はプロモーター変異解析により解明されており、*xyn1*の発現はCreIによって直接的に制御されることが示されている(50)。

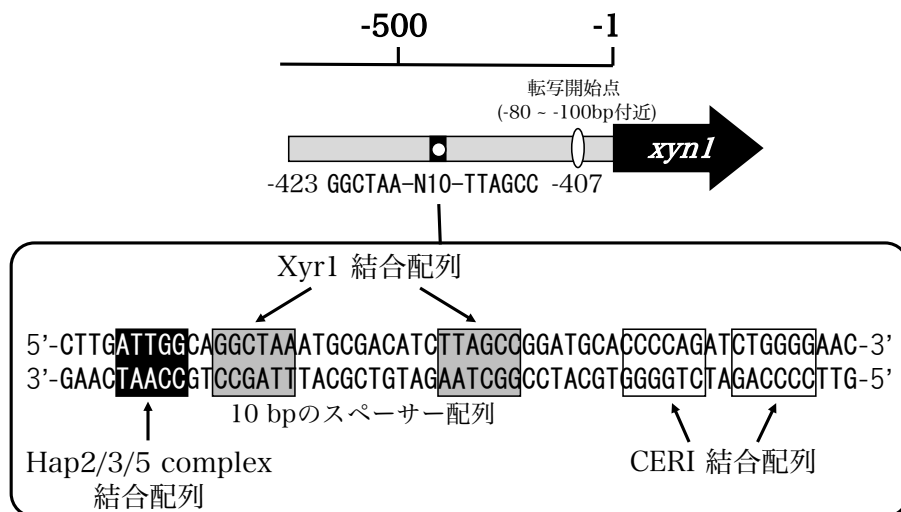


Fig. 1-10 *xyn1* 上流領域の発現制御モデル



#### 1.4.4.5. *xyn2*の上流領域の解析

*xyn2*の発現は部分的に構成的であり、キシロビオースおよびキシラン、セルロース、ソフォロースにより誘導される(44)。*xyn2*プロモーター中の開始コドンより-235 bp から-180 bp の 55 bp の領域が *xyn2*発現の制御に必須な全てのシス配列を含んでいると報告されている(30)(Fig. 1-11)。この領域は XAE (xylanase-activating element)と呼ばれ、XAE に存在する 5'-GGCTAA-(N)12-CCAGCC-3'には Ace2 が 2 量体で結合していることが in vitro の解析で明らかにされている(44)。この配列には Xyr1 も結合したため、Ace2 と Xyr1 の拮抗もしくは相互作用モデルが提唱されている。さらに、XAE の直上流に存在する 5'-AGAA-3'モチーフは誘導、抑制の両条件下で *xyn2*発現の抑制を調節することが示されている。この 5'-AGAA-3'モチーフには Xrp2 (xylanase repressor protein 2)が結合することが推測され、後の研究で Xpp1 (xylanase promoter-binding protein 1)として同定され、その機能解析が行われた(29, 60)。

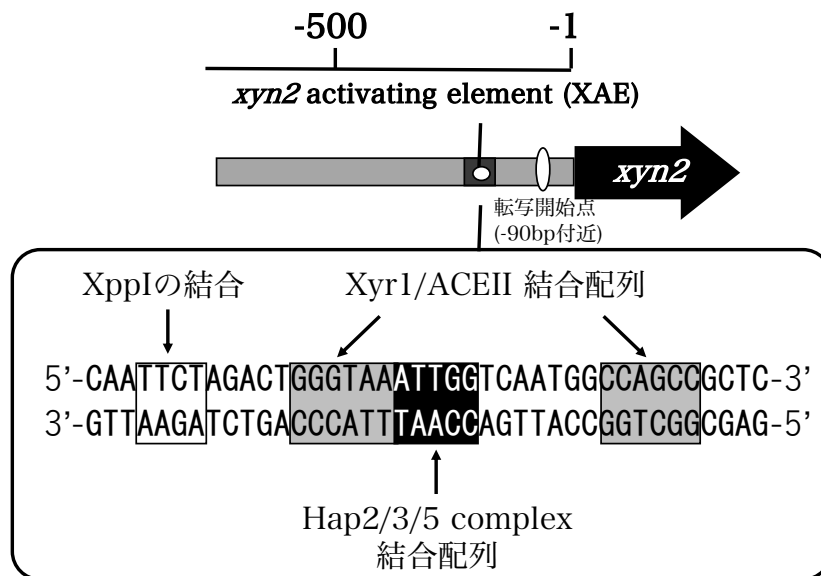


Fig. 1-11 *xyn2*上流領域の発現制御モデル

#### 1.4.4.6. *xyn3*の上流領域の解析

*xyn3*は3つめのキシラナーゼ遺伝子として、当研究室にて *T. reesei* PC-3-7株より同定された(21)。XYNI や XYNII は glycoside hydrolase (GH) family 11 に属するキシラナーゼだが、XYNIII は *T. reesei*ゲノム中で唯一 GH10 に属するキシラナーゼである。XYNIII は PC-3-7株の産出するキシラナーゼ活性のおよそ 25%に寄与することが示唆されている。*xyn3*はキシラナーゼをコードする遺伝子であるにも関わらず、セルロース、ソフォロースおよび L-ソルボースにより誘導され、D-キシロース、キシロオリゴ糖やキシラン

では誘導されない(31)。前述のとおり、*xyn1* および *xyn2* はセルロース系、キシラン系の基質両方で誘導される。一方で、*xyn1-3*の上流領域中の発現に必須なシス配列は非常に類似した構造を持つ(Fig. 1-10-12)。さらに、*T. reesei*の世界的標準株 QM9414 株では、PC-3-7 株と同様の *xyn3*の構造遺伝子および5'上流領域が QM9414 ゲノム中に保存されているにも関わらず、*xyn3*の転写が検出されない(31, 71)。このような特筆すべき特徴から、*xyn3*発現の制御メカニズムの解明を目指し、当研究室では *xyn3*の上流領域の解析を行ってきた。それにより、少なくとも2つの領域が炭素源依存的な発現に関与することが明らかとなっている(71)。さらに、開始コドンより-722 bp から-673 bp の50 bpの領域が、ソフォロースおよびソルボースでの誘導において *xyn3*発現の制御に重要な役割を持つことも明らかとなっている(72)。5'-GGCTAT-3'および5'-GGCAAA-3'がそれぞれ-700 bp と-673 bpの箇所にあり、この2つのモチーフは16 bpのスペーサー配列を持つ繰り返し配列として存在する。この領域は *in vivo*変異解析によって *xyn3*の発現に必須であることが同定されている(72)。また、*xyn3*の発現制御に関与するシス配列が-331 bp から-221 bpの領域でも同定されており、この領域に存在する5'-GGCTAT-3'および5'-GGCAAA-3'のモチーフがプロモーター活性に劇的な影響を与える。さらに、異種宿主発現させた Xyr1 のDNA結合ドメインを利用したゲルシフトアッセイより、同定されたシス配列が Xyr1 と相互作用できることが示されている。これらの報告から、PC-3-7における *xyn3*の発現は Xyr1 結合サイトとして機能する3つのシス配列により制御されると考えられている。

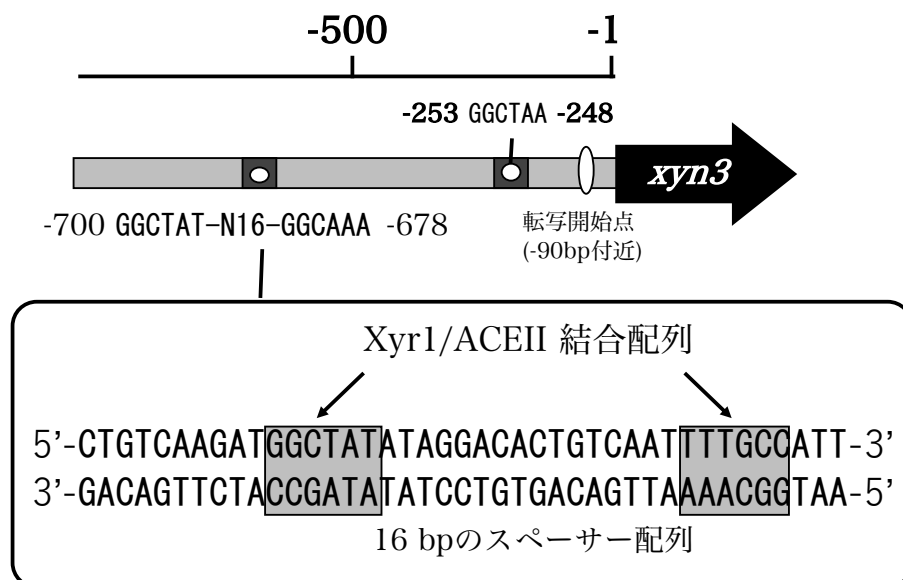


Fig. 1-12 *xyn3*上流領域の発現制御モデル

### 1.5. *T. reesei*の工業用菌株の作出

セルロース系バイオマスからの糖生産は大量の糖化酵素を必要であり、その酵素の生産にかかるコストがセルロース系バイオマスの工業利用を制限している。酵素生産にかかるコストを減少させるために、高い糖化能を有するセルラーゼを少量使用して効率的にセルロース系バイオマスを分解できることが望ましい。

先述のように、セルロース系バイオマスの糖化に最も適した酵素を生産する微生物は *T. reesei* である。しかしながら、*T. reesei* の生産する酵素を工業的に実用化するためには酵素の高機能化(高活性、振盪や熱への高耐性など)や大量生産化を行い、酵素コストを低減する必要がある。そのため、多くの企業、研究機関によって、よりバイオマスの糖化に適した酵素を生産できる *T. reesei* 菌株が作出されてきた。

#### 1.5.1. 突然変異導入による菌株改良

セルロース系バイオマスからの代替燃料生産への世界的な興味から、セルラーゼ生産や *T. reesei* の菌株改良は 1970-80 年代には大きく注目されていた(73)(Fig. 1-13)。変異原(N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン、紫外線光など)により微生物を処理することによる突然変異導入は望ましい表現型を持つ菌株を獲得するために広く利用されている手法である。この方法は *T. reesei* の菌株改良(セルラーゼ生産/活性の改善、異化抑制の減少、生成物阻害の緩和)において応用されてきた。

突然変異の成功は使用される選抜方法に強く依存する。Montenecourt と Eveleigh (74)はセルラーゼ生産菌株のための選抜方法を開発し、生育阻害剤とともに種々の基質によってセルラーゼ生産が改善された菌株の選抜を行った。事例としては、すべてのセルラーゼ生産が増強された変異株の選抜のため、酸膨潤セルロースを基質として選抜し、高活性を示す変異株の選抜のためには可溶性セルロースであるカルボキシメチルセルロース(CMC)を基質として使用しその分解活性で選抜されてきた。また、 $\beta$ -グルコシダーゼの生産が増強された変異株を選抜する方法はいくつか開発されている。エスクリンとクエン酸鉄アンモニウムを用いた選抜では、 $\beta$ -グルコシダーゼはエスクリンをグルコースとエスクレチンに分解し、エスクレチンはクエン酸鉄アンモニウムと反応し黒色を呈する。また、セロビオースと2-デオキシグルコースを用いた選抜では、 $\beta$ -グルコシダーゼを生産することができない菌株は毒性のある2-デオキシグルコースを代謝することで致死性を示す。脱異化抑制された変異株の選抜のためには、高濃度のグルコースのような抑制因子を用いて選抜を行う。2-デオキシグルコースの使用はとりわけ有用である。

*T. reesei* の突然変異の成功例は Mandel らによって報告され、野生株 QM6a に対し線状加速器による高エネルギー電子による変異導入後セルロース培地にて選抜を行ったも

のである。変異株 QM9123 は QM6a と比べ 2 倍のセルラーゼ生産を示す(75)。その後、さらなる変異導入により変異株 QM9414 が獲得され、3 倍以上のセルラーゼ生産を持つ(76)。また、異なる系統として QM6a に対する突然変異導入によりセルラーゼ高生産変異株 Rut-C30 が得られている(73)。Rut-C30 は QM6a と比べ 15-20 倍のセルラーゼ活性を示すことが報告されており、セルラーゼ高生産菌株として盛んに研究がなされている。

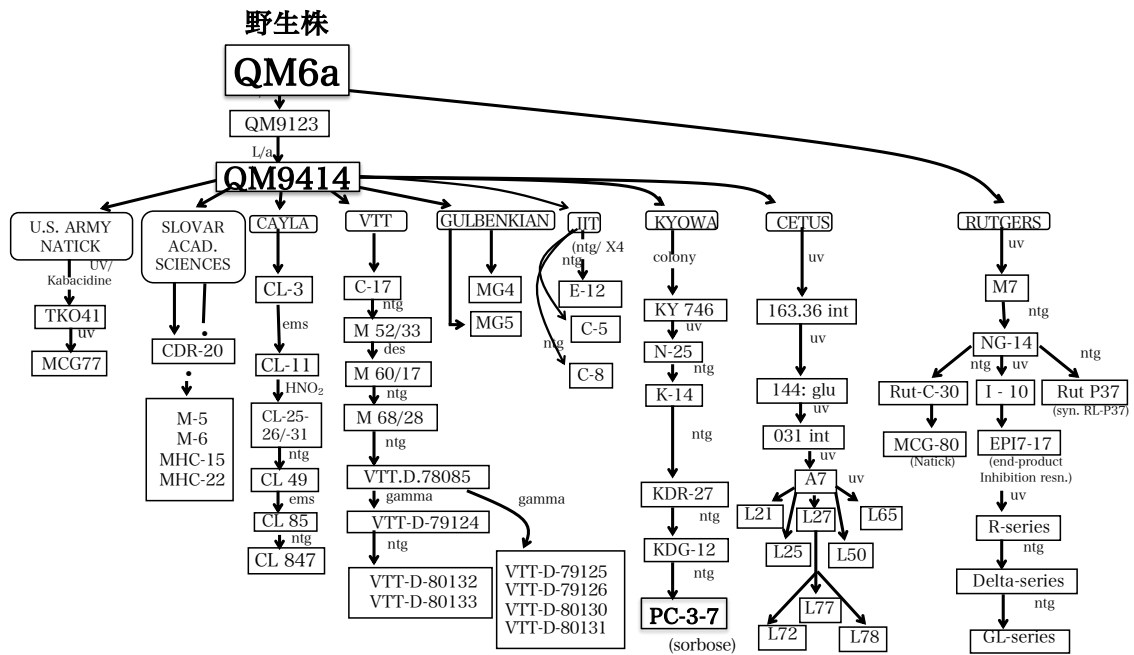


Fig. 1-13 *T. reesei* QM6a 株の変異株系統樹

L/A: 線形加速器、colony: シングルコロニーアイソレーション、uv: 紫外線照射、ntg: N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン、EMS: エチルメタンサルホン酸、HNO<sub>2</sub>: 亜硝酸、DES: ジエチル硫酸、gamma: ガンマ線

日本においても、新燃料油開発技術研究組合(Research Association for Petroleum Alternatives Development: RAPAD)において菌株改良が行われてきた(Fig. 1-14)。PC-3-7 株は QM9414 株から 5 段階の突然変異導入により獲得された菌株で、種々の炭素源でのセルラーゼ生産能が向上している(77)。ソフォロースによる誘導では、QM9414 の 2 倍以上ものセルラーゼ活性を示す(28)。QM9414 株と比較すると、PC-3-7 株は微結晶セルロースやソフォロースだけでなく、バガスやホエー、ソルボース、セロピオースでの高いセルラーゼ誘導能も獲得している(62, 77)。しかしながら、これらの高生産変異株を用いても結晶性セルロースを完全分解するためには酵素量および分解効率が不十分である。さらに、*T. reesei* の炭素源の利用効率から考えて、これ以上のタンパク質生産量の向上は困難とされ

ている。今後、産業利用に最適な *T. reesei* 株を造成するためには、*T. reesei* が生産するセルラーゼ・ヘミセルラーゼ成分の構成比の改変や異種由来高活性セルラーゼの *T. reesei* での発現など分子生物学的な改良が必要であり、セルロース分解に重要な酵素の機能および *T. reesei* のセルラーゼ生産機構の全容を明らかにすることが必須である。

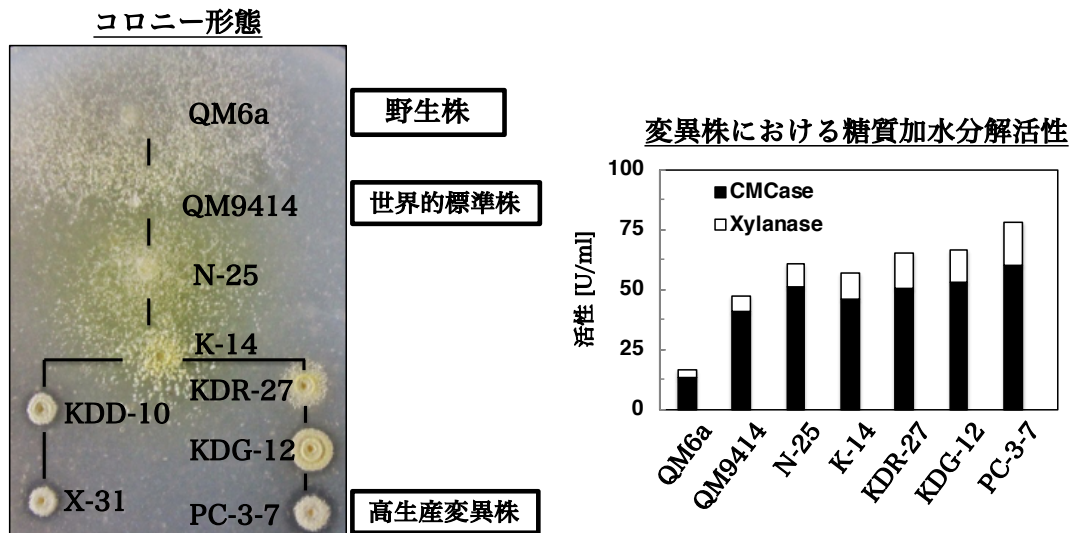


Fig. 1-14 日本型変異株のコロニー形態およびその糖質加水分解活性

これまでに、セルラーゼ生産の向上に寄与するゲノム中の変異点を解明するため、比較ゲノム解析が多くの変異株で実行されてきた。特に、Rut-C30 株の解析が進んでおり、野生株 QM6a の全ゲノム配列との比較ゲノム解析が行われた。その結果、既に報告されていた炭素源異化抑制に関与する *cre1* の部分的欠損(78)やタンパク質の糖鎖付加に関与する *gls2α* 遺伝子のフレームシフト変異(79)の他にトランスポーターや転写調節因子、一次代謝に関与する酵素など 29 遺伝子を含む 85 kb に及ぶ欠損が見出されている(80)。また、233 個の一塩基多型(Single Nucleotide Polymorphism: SNP)や 15 か所の小さな欠損・挿入、総長 100 kb におよぶ 18 か所の大規模な欠損も同定された(81)。本研究室では、日本で造成されてきた *T. reesei* セルラーゼ高生産変異株の系統樹変異株を保有しており、QM9414、N-25、K-14、KDG-12、PC-3-7、PCD-10、CDU-11 について次世代シーケンサー SOLiD を用いてゲノム配列を解読している。SNP に着目すると、野生株 QM6a から CDU-11 まで 2000 以上の SNP 候補が見いだされた。このうち、3 リード以上カバーされ、かつ塩基置換率が 66% より高いものを SNP としたとき、SNP は CDU-11 株において 443 箇所に見出されている。そのうち、遺伝子中のアミノ酸に変異をもたらす SNP に着目すると、76 遺伝子中に SNP が生じている。今日までに、*cre1* および *bglr*、*bgl2* に生じた変異が PC-3-7 のセ

ルラーゼ生産性の向上に寄与することが示されている(62, 82, 83)。 *cre1* 遺伝子の変異は Cre1 の DNA 結合能を劇的に弱化させる。そのためにグルコースによるセルラーゼ発現の抑制を一部解除している(82)。 *bgl2* は菌体内 BGL をコードしており、BGLII は高濃度のセロビオース条件で、ソフォロースを生産する糖転移活性を示すことが知られている(12)。変異型 BGLII では加水分解活性は極めて低下していたものの、糖転移活性を有していることが示唆されている(83)。また、SNP を野生型に戻した PC-3-7 株(PCW*bgl2* 株)と *bgl2* 遺伝子を破壊した PC-3-7 株(PC $\Delta$ *bgl2* 株)において、セルラーゼ遺伝子の発現量は PC-3-7 株 > PCW*bgl2* 株 > PC $\Delta$ *bgl2* 株の順で高発現していることが明らかとなっている(83)。このことから、BGLII に生じた SNP (PC-3-7 株)は、何らかのセルラーゼ誘導物質の生産能を向上させる変異であることが示唆されている。 *bglr* は $\beta$ -グルコシダーゼ特異的な転写活性化因子をコードし、セロビオースでのセルラーゼ生産に影響を与える(62)。これらの研究から、BglR の変異は BGL 活性の低下を引き起こし、それにより炭素源異化抑制を回避していると考えられている。しかしながら、これらの変異遺伝子の影響だけでは、日本型変異株の特徴を説明することはできない。これらの分子生物学的な解析を進めることで、 *T. reesei* のセルラーゼ生産メカニズムを生理学的に明らかにでき、さらにはセルラーゼ高生産に有効な遺伝子のみを利用してさらなる強力なセルラーゼ高生産株の造成が可能となると考えられる。

#### 1.5.2. 遺伝子組換えによる菌株改良

突然変異導入では選抜方法により目的の表現型を示す変異株を獲得できる確率を高めることはできるが、確実に取得できるわけではない。一方で、遺伝子組換え技術は、目的とした表現型を持つ菌株の作出においてより正確な手法として期待される。それゆえに、遺伝子組換えによる異種由来の高機能酵素の導入や酵素比率の改変が今後の *T. reesei* セルラーゼにおけるセルロース性バイオマスの糖化のために最適であると考えられる。

*T. reesei* において、最も強い発現能を持つプロモーターである *cbh1* プロモーターが異種タンパク質発現のためによく使用される(84–88)。しかしながら、*cbh1* プロモーターの利用においていくつかの制限が存在する。①CBHI がセルロース糖化において重要な酵素であることから、発現用 DNA 断片は *cbh1* ローカスではなく、非相同的にゲノム中に挿入されることが望ましい。②転写調節因子のタイトレーションが他の加水分解酵素遺伝子の発現に影響を与える可能性がある。③生産された酵素標品における異種宿主発現されたセルラーゼの比率を考慮する必要がある。これらの制限は、*cbh1* プロモーターに限られたものではなく、ほぼすべてのセルラーゼ、キシラナーゼ遺伝子のプロモーターで少なからず生じる。このように、様々な状況を考慮して有用酵素の導入を行う必要がある。

*T. reesei* における遺伝子組換えによる菌株改良において最も頻繁に行われることは BGL 活性の改善である。*T. reesei* のセルラーゼは BGL 活性が低く、バイオマスの加水分解においてセロビオースの蓄積をもたらす。セロビオースの蓄積は CBH や EGL 活性を阻害し糖化率の減少を引き起こす(89)。そのため、*T. reesei* の遺伝子工学的な菌株改良において、BGL 活性の増強が第一に行われる。*T. reesei* の BGLI の高発現による糖化能力の改良においては、*cbh1* プロモーターの制御下で BGLI を発現させた Rut C-30 株で BGL 活性が 1.8 倍~3.7 倍に増加し、とうもろこし穂軸に対する糖化能が 11~29% 増加した(90)。また、コピー数の増加により BGL 活性を 106 倍に増加させた遺伝子組換え体が生産する酵素標品はとうもろこし穂軸に対する糖化能が 70% から 84% までしか増加しないと報告されている。これは、遺伝子組換えによりセルラーゼ遺伝子のプロモーターのコピー数が増加したことで、セルラーゼ遺伝子の転写活性化に重要な因子の必要数が増加し、タイトレーションが生じていると考えられている(33)。これを回避するため、Rahman らはセルラーゼ生産への影響が少ない *egl3* や *xyn3* のプロモーターの制御下で *T. reesei* BGLI を発現させた菌株を構築し、酵素の生産性を下げることなく BGL 活性を 4.0 倍および 7.5 倍に増加させた(91)。しかしながら、先述のように BGLI が比活性自体が高くないことから、*T. reesei* BGLI の増強による糖化能の改善には限界がある。そこで、他の真菌の高性能な  $\beta$ -グルコシダーゼ遺伝子を導入することが行われている。*Penicillium decumbens* (92) や *Aspergillus aculeatus* (93, 94)、*Periconia* sp. (95)、*Neosartorya fischeri* (96)、*Chaetomium atrobrunneum* (97) といった様々な微生物が  $\beta$ -グルコシダーゼ遺伝子の供給源として使われている。特に、*N. fischeri*、*C. atrobrunneum* の耐熱性微生物由来の BGL は高い熱安定性を持つことから、糖化の限界を取り除くことに成功している(96-98)。当研究室でも、高機能な BGL を発現させた *T. reesei* 菌株の開発を行ってきた(Fig. 1-15)。*T. reesei* で生産させるターゲット選抜には多くの研究機関の協力があり、産業技術総合研究所のメタゲノム解析チームによる BGL 遺伝子 180,000 クローンからの優良 BGL の選抜、製品評価技術基盤機構(NITE)による保有微生物コレクションからの選抜が行なわれた。中でも、大阪府立大学で長年研究が続けられている糸状菌 *A. aculeatus* 由来の BGL (GH3)(AaBGLI)の活性が *T. reesei* BGLI の比活性の 18 倍であったことから発現ターゲットとして選抜された。AaBGLI は  $K_m$  が高く、生成物阻害(グルコース)に対する耐性が高いことから、バイオマス糖化に使用するために大きなアドバンテージがある。この AaBGLI を発現量の異なる様々なプロモーターの制御下で発現させた PC-3-7 株が構築され、その能力が評価されている(Fig. 1-15)。

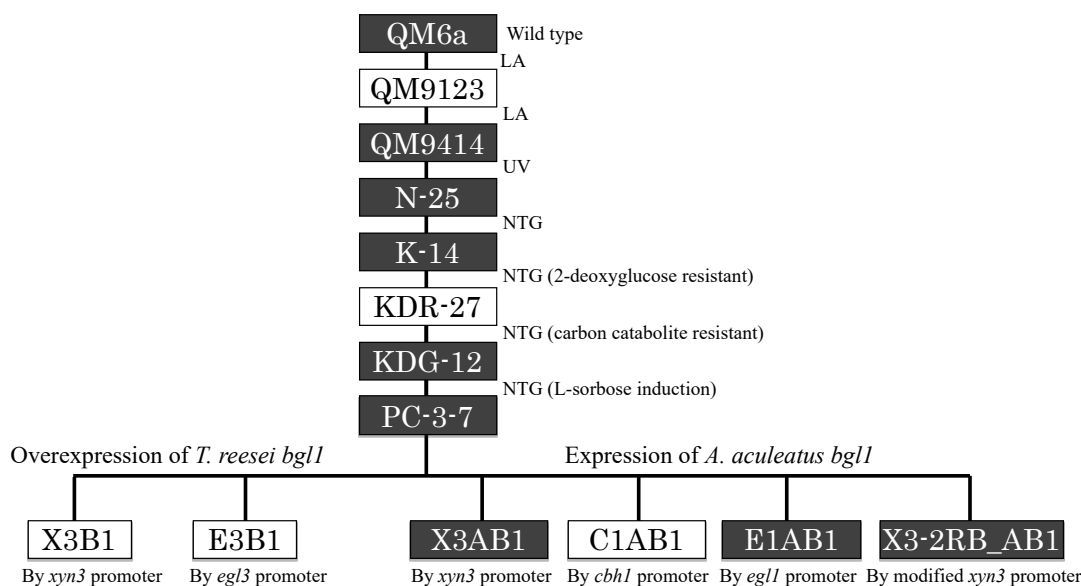


Fig. 1-15 当研究室が保有する *T. reesei* 工業用糖化酵素生産菌株の系統樹

L/A: 線形加速器、UV: 紫外線照射、NTG: N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン。遺伝子組換え体は、菌株名の下に酵素発現に使用したプロモーターを示す。

*xyn3* プロモーターの制御下で AaBGL1 を発現させた PC-3-7 株(X3AB1 株)(93)が作り出す酵素標品 JN11 は親株のものとは比べ 63 倍もの BGL 活性を示し、セルロース系バイオマスの糖化能が劇的に改善していた。しかし、別の研究で XYNIII はアルカリ処理バイオマスの糖化を促進することが明らかとなり、ヘミセルロースを豊富に含む前処理バイオマスの糖化には XYNIII が必要であることが示唆された。X3AB1 株は、発現カセットが *xyn3* ローカスに相動的に導入されており、XYNIII が欠損している。そこで、糖化能を最適化するため、XYNIII の発現が維持されている新たな菌株の作出を目指し、*eglI* プロモーターの制御下で AaBGL1 を発現させた PC-3-7 株(E1AB1 株)が構築されてきた(94)。この E1AB1 株は XYNIII を生産することができるため、この菌株により生産された酵素標品 JN13 は NaOH 処理稲わらに対する糖化能が JN11 よりも 20~30% も高く、最新の市販酵素よりも優れている。JN13 は NaOH 処理エリアンサスの糖化において JN11 や市販酵素よりも少ない酵素量で糖化できる。一方で、希硫酸処理エリアンサスには JN11 が適していた。そのため、各前処理バイオマスに対して適切な酵素比率でセルラーゼ標品を分泌することができる工業用菌株を開発することが要求されている。*T. reesei* 由来の精製した成分酵素のカクテルは、各前処理バイオマスに対する相対的な影響を明確にするために使用され、効率的な糖化は多量の CBHI~CBHII および EGLI が 13~25%、6% 以上のキシラナーゼを必要とすることが示されている(99)。このように酵素標品の活性だけでなく、含まれる酵



素の比率も重要となってくる。しかしながら、これらの工業用菌株においても、いまだ実用化レベルの酵素生産を行うためには莫大なコストが必要である。そのため、各種前処理バイオマスに対して、最適な酵素比率を示す菌株の開発や有用酵素の導入による糖化能の改善、酵素生産量の向上が必要である

## 1.6. 環境応答性のセルラーゼ生産制御機構

糸状菌は、細胞外の環境因子(栄養源や温度、pH、浸透圧など)に応答し、必要に応じた加水分解酵素やプロテアーゼ等の代謝酵素を分泌する。これにより、多様な化合物を代謝し、多様な環境条件下にも適応することができる。また、塩などのストレス条件下では、トランスポーターによる有害物質の排出量の増加など、種々のストレスに応答した発現制御機構を保持している。現在までに、セルラーゼ・ヘミセルラーゼの炭素源依存的な誘導機構についてはよく研究されており、いくつかの転写調節因子が同定されてきた。しかし、これらの遺伝子は自然界において誘導されるごく一部の遺伝子発現制御機構のみであると考えられる。*T. reesei*には、種々の環境因子に応答する転写調節因子のホモログが存在している。セルラーゼ、ヘミセルラーゼ高生産という特性から、*T. reesei*は他の微生物には類を見ない複雑なセルラーゼ、ヘミセルラーゼ遺伝子の発現制御機構を保持していると考えられ、環境応答転写調節因子の関与も推測されている。しかしながら、*T. reesei*におけるこれら環境応答の遺伝子発現制御機構に関して報告が少ない。*T. reesei*の生産する酵素および糸状菌そのものを工業的に効率よく利用するためには、*T. reesei*の生態学的な全体像を理解することが非常に重要である。そのため、遺伝子発現制御機構の網羅的な研究を行うことは必要不可欠である。

### 1.6.1. シグナル伝達機構

微生物は外的環境の変化に応答するため、細胞外物質や種々のストレスの認識・シグナル伝達機構を保持している。このようなシグナル伝達機構は栄養源の獲得や有害物質の回避のために重要である。微生物におけるシグナル伝達に関する研究は、これまでに原核生物のモデル生物である大腸菌を中心に、様々な環境ストレスへの応答について解析が行われてきた。これにより、多くの細胞膜受容体や二成分制御系などのメカニズムが発見されてきた。また、真核生物においては、モデル生物である酵母 *S. cerevisiae* や糸状菌 *N. crassa* および *A. nidulans* を中心にシグナル伝達機構に関する研究が行われている。シグナル伝達経路は多くの生物に共通して存在していることから、逆遺伝学的手法により他の微生物においても種々のシグナル伝達タンパク質が見出されている。これまでに、炭素源代謝や窒素源代謝、硫黄代謝などの栄養源の代謝に関与するシグナル伝達経路や熱、浸透圧、pHなどの種々の環境ストレスに応答するシグナル伝達経路が発見され研究が行われている。しかしながら、*T. reesei*においては未だどのようにして環境の変化を認識し、シグナルを伝達して遺伝子発現制御を行っているのかは不明な点が多い。

### 1.6.2. pH

pH シグナル伝達経路は、糸状菌において最も研究されているシグナル伝達経路の1つである。環境 pH は、真菌の形態に重大な影響を与えるだけでなく、種々の代謝酵素の分泌にも影響があることが知られている。

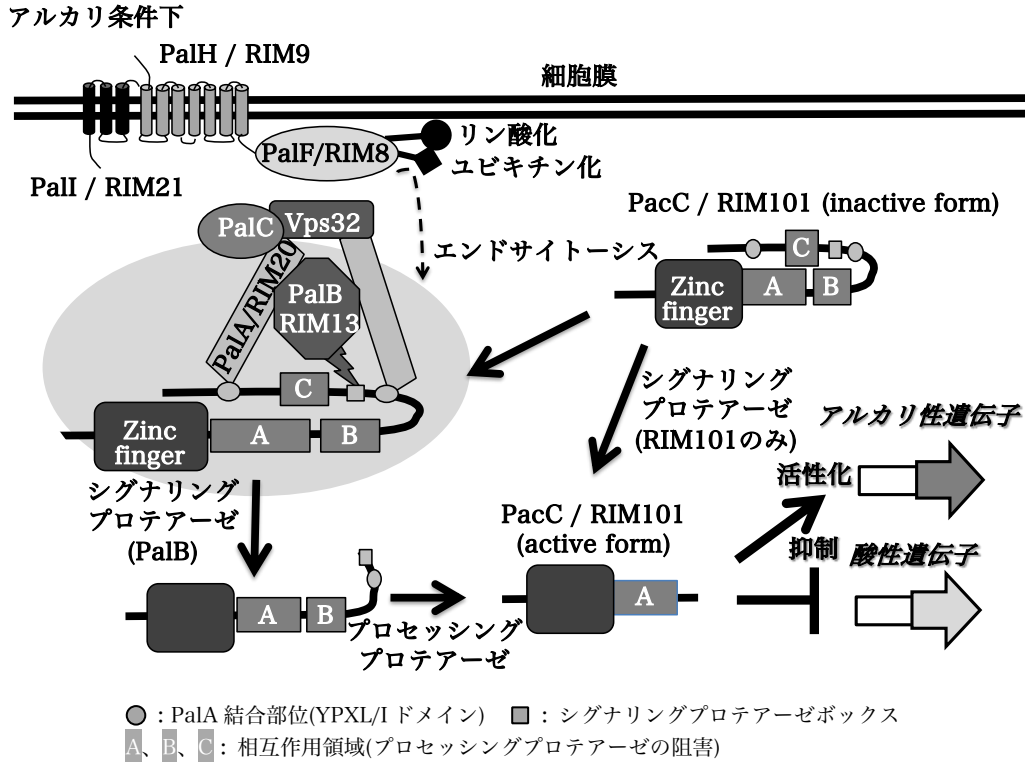


Fig. 1-16 真菌における pH シグナル伝達経路の推定モデル

pH シグナル伝達経路は、真菌に広く保存されているシグナル伝達経路であり、酵素連結型受容体を介した経路である (Fig. 1-16)。真菌における pH シグナル伝達経路は、酵母では pH 応答転写調節因子 RIM101 および 5 種の RIM タンパク質群 (RIM20、RIM13、RIM8、RIM21、RIM9) から、糸状菌ではそのホモログである pH 応答転写調節因子 PacC および 6 種の Pal タンパク質群 (PalA、PalB、PalC、PalF、PalH、PalI) から構成される (100)。*A. nidulans* において、全 6 種の *pal* 遺伝子群は既に解析が行われている (101-105)。これらの解析結果より、Fig. 1-16 のような pH シグナル伝達が行われていることが提唱されている。膜貫通ドメインを含む 2 つのタンパク質 PalI および PalH は細胞膜上に局在している。PalH が環境 pH を認識する pH センサーの役割を担っており、PalI は PalH を細胞膜に局在を維持させている。PalH は膜貫通ドメインを保有しているものの、PalI 欠損時には細胞質内に局在していることが明らかとなっている。このことから PalH が何らかのシグナルを細胞質内に輸送していることが考えられている。PalH には、アレスチン結合ドメイン

が存在し、アレスチン様タンパク質である PalF が結合している。PalH が pH を認識すると、PalF がリン酸化およびユビキチン化された後、エンドサイトーシスにより PalI、PalH および PalF が細胞内に取り込まれる。これにより、エンドソーム輸送選別機構により認識され、Vps32 と共にエンドソーム輸送選別複合体を形成し、PalA および PalB が相互作用することによりシグナリングプロテアーゼボックスが切断される。PalA は複数の SH3 ドメイン結合領域とプロリンリッチドメインを保持し、それぞれ Vps32 および PacC とタンパク質-タンパク質相互作用することで複合体を形成している。しかし、PalC は糸状菌には広く存在しているが、酵母においてはホモログが存在していない(106)。糸状菌では PalC は Vps32 と相互作用する Bro1 ドメインを保持しており、Vps32 および PalA の相互作用を補助していると考えられている。PalB はカルパイン様システインプロテアーゼであり、PacC のシグナリングプロテアーゼボックスを切断する。

セルラーゼの制御に関しては、今までに *A. nidulans* のキシラナーゼや $\alpha$ -L-アラビノフラノシダーゼ遺伝子の転写が PacC に制御されることや、*N. crassa* において PacC 破壊株のセルロース培地上での生育が低下することが報告されている(107, 108)。また、*T. reesei* もこれら pH シグナル伝達経路遺伝子群(*pac1* および 6 種の *pal* 遺伝子)のホモログの存在が確認されており、PacC のホモログである Pac1 による pH 応答が行われていることが示唆されている(109, 110)。セルラーゼ遺伝子や *xyl1* の転写も Pac1 により抑制されていると報告されている(109)。別の研究では、ゲノムワイド転写解析によりいくつかの糖質加水分解酵素遺伝子のみが直接的に Pac1 により制御され、他の制御メカニズムが pH 依存的な遺伝子発現に関与していることが示唆されている(110)。また、*T. reesei* のセルラーゼ生産における培養 pH の影響についても報告例がある。例えば、Bailey et al. は Rut C-30 のキシラナーゼ生産は pH 6.0 から 7.0 の高 pH を好み、セルラーゼ生産は pH 4.0 のような低 pH で最も生産されると報告している(111)。さらに、ラクトース培地でのキシラナーゼ I、II、III の生産は各酵素の至適 pH と一致した培養 pH で最も生産されると報告されている(112)。また、pH によってセルラーゼ、糖質加水分解酵素の分泌が異なることは QM6a および QM9414、Rut C-30、QM9414MG5 のセクレトーム解析からも示されている(113)。この解析も低 pH がタンパク質発現を促進すると証明している。さらに、環境 pH はセルラーゼ生産だけでなく、ソフォロースやセロビオースのようなセルラーゼインデューサーの取り込みにも影響を与える(114)。日本型変異株では、PC-3-7 の pH 依存的セルラーゼ生産は親株である QM9414 と異なることが示されている(77, 115)。PC-3-7 株は pH 4.0 から pH 5.0 や 6.0 へとシフトさせることにより高い BGL 活性を示す(115)。しかしながら、PC-3-7 における詳細な pH 応答性の解析は未だ行われておらず、他の糖質加水分解酵素への影響は不明である。

### 1.6.3. 窒素

窒素源は微生物において生育やタンパク質生産に最も影響を与える因子の1つである。糸状菌における窒素源応答性の転写調節因子は、主に *Aspergillus* 属の AreA や *N. crassa* の Nit-2 がよく知られており、窒素源飢餓や非好適窒素源条件下で様々な窒素源の代謝に関与する代謝酵素の発現を活性化する(116, 117)。AreA および Nit-2 のアミノ酸配列は高い相同性を示し、Cys<sub>2</sub>/Cys<sub>2</sub> タイプの zinc finger motif から成る DNA 結合ドメインを持つ。AreA および Nit-2 は機能的オルソログであり、HGATAR モチーフに優先的に結合することが明らかとなっている(118)。AreA/Nit-2 はグルタミンやアンモニウムのような簡便に代謝可能な窒素源の非存在下で非好適窒素源の資化に関与する多数の遺伝子の発現を活性化する(119)。 *A. oryzae* において、AreA は窒素飢餓時にアンモニアの輸送システムの発現も制御している(120)。 *A. nidulans* において、アンモニア輸送システムはアンモニアやグルタミンの菌体内濃度により調節されており、AreA は窒素源制限時や非好適窒素源が存在するときアンモニアパーミアーゼ遺伝子の発現を活性化している(121, 122)。さらに、AreA は L-アミノ酸酸化酵素をコードする遺伝子を活性化する(123)。AreA は NADP 結合型グルタミン酸デヒドロゲナーゼの発現も制御している(120)。 *S. cerevisiae* において、AreA のオルソログである Gat1p は一般的なアミノ酸パーミアーゼ *gap1* 遺伝子の発現を活性化する(124)。以上のことから、AreA/Nit-2 は微生物における窒素源代謝の包括的な活性化因子として認識されている。近年の研究では、AreA が窒素代謝遺伝子だけでなく、二次代謝産物生産に関与する遺伝子の発現も制御することが明らかとなっている(119)。

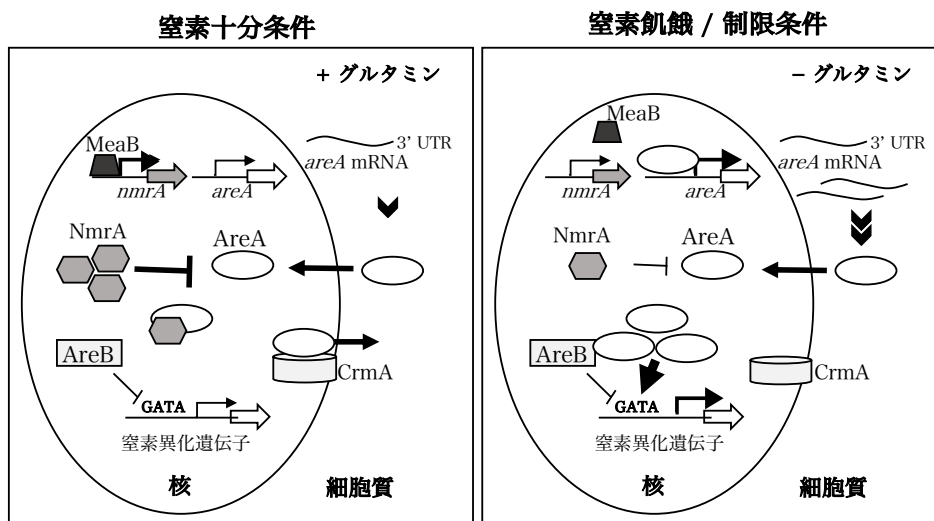


Fig. 1-17 AreA による窒素源異化抑制の制御モデル

AreA 自身の活性化は細胞外の窒素源利用性や細胞内窒素状況によって制御される(125)。AreA の活性レベルは4つのメカニズムによって複雑に制御されている(126)(Fig. 1-17)。1つ目はグルタミンに応答した *areA* 転写産物の分解である。詳細なメカニズムは不明だが、*areA* 転写産物はグルタミン存在下で分解されることが明らかとなっている(125, 127)。*areA* の部分欠損解析により、このグルタミンに応答した転写産物の分解は *areA* mRNA の3'非翻訳領域(3'UTR)が関与していることが明らかとなっている(128, 129)。そのため、3'UTR 欠損株はグルタミン存在下においても *areA* 転写産物は分解されない。また、*N. crassa* の Nit-2 は転写産物の配列に3'UTRを持たないためグルタミンによる転写産物の分解は起こらない(130)。2つ目は自己転写制御である。窒素飢餓または制限条件下では *areA* の転写は AreA 自身によって活性化されることで安定的な転写産物量が確保される(131)。3つ目はリプレッサーNmrAによるタンパク質レベルの抑制である。bZIP型の転写因子 MeaB はグルタミンおよびアンモニウム存在下で *nmrA* の発現を活性化し、リプレッサーNmrA は AreA の C 末端および DNA 結合ドメインに相互作用することで核内 AreA の転写調節を抑制する(132-134)。4つ目は AreA の核外排出による抑制である。AreA は窒素飢餓や制限条件下では核内に局在しているが、細胞内の窒素源濃度が上昇すると核輸送タンパク質 CrmA によって核外に排出され、それにより AreA による転写活性化が行われなくなる(135)。このように、AreA の活性レベルはすべて細胞内のグルタミンあるいは窒素源の濃度に応答して調節されている。このため、細胞内の窒素が十分に存在するときは AreA の活性レベルが低くなり、窒素異化遺伝子の発現が活性化されず二次窒素源の利用が抑制される。一方で、細胞内の窒素源が枯渇もしくは少ないとき AreA は高い活性レベルを示すことで窒素異化遺伝子の発現が活性化され、二次窒素源の利用が促進される。この AreA を中心とした窒素代謝制御が窒素源異化抑制機構である。このため *areA* および *nit-2* 遺伝子を失った変異株はアンモニウムとグルタミン以外の窒素源を利用できなくなる(136, 137)。また、上記の AreA 活性レベルの制御の他に、GATA型 zinc finger をもつ AreB は GATA 配列への結合を AreA と競合することによって窒素異化遺伝子の発現を負に制御することが予想されている(138)。

AreA/Nit-2 は窒素源の代謝だけでなく、*Fusarium oxysporum* のような植物病原真菌や *Penicillium marneffei* のような日和見病原菌において、完全な病原性のために必須であり、感染時に窒素源飢餓条件と似た状況にさらされるためであると考えられている(139, 140)。*P. marneffei* において、AreA は細胞外プロテアーゼのような感染に関与する因子の発現を制御することで病原性に寄与すると推測されている(140)。

セルラーゼ転写抑制因子 Ace1 のオルソログとして同定されている *A. nidulans* の StzA タンパク質は、プロリン代謝遺伝子 *prnD-prnB* 間のプロモーター領域上で AreA

と結合配列間で競合または相互作用することが示されている。さらに、転写調節因子 CpcA (アミノ酸飢餓に応答してアミノ酸合成を制御)のプロモーター領域には Ace1/StzA の結合配列が高度に保存されており、これらのことから細胞内の窒素状態とセルラーゼ遺伝子発現との関連性が示唆されている(59)。*N. crassa* の COL-26 は BglR のオルソログであり、一次炭素源および窒素源の利用に関与していることが報告されている(141)。アンモニウムを窒素源として利用するために必須であるグルタミン合成酵素遺伝子 *gln-1* および *gln-2*, *cpc-1* (*N. crassa* における *cpcA* オルソログ)は Col-26 依存的に発現することが示されている。BglR も Col-26 と同様に一次炭素源および窒素源代謝の調節に重要な役割を果たすことが示唆されている(141)。*T. reesei* Rut-C30 において Xyr1 は推定 NmrA タンパク質の発現を活性化していることが報告されている(142)。これはリグノセルロース誘導条件下で Xyr1 が NmrA の活性化を介して AreA を抑制することで、二次窒素源の利用を抑制していると示唆している(142)。リグノセルロースから利用可能な炭素源を得るために必要なセルラーゼの発現を制御するこれら転写調節因子が同時に窒素源の利用を制御していることから、炭素源と窒素源の利用の制御は非常に密接していると考えられる。しかし、セルラーゼ発現の転写調節因子と窒素源代謝の関連がいくつか報告されている一方で、窒素源に応答したセルラーゼ・ヘミセルラーゼ発現制御に関する分子生物学的知見は少ない。Lockington et al.は、*A. nidulans* において AreA 活性を失った株、構成的 AreA 機能株を用いてセルラーゼ生産性を試験した。その結果、AreA が構成的に機能する株ではセルラーゼ生産量が増加し、AreA 活性を失った株では減少を示した。また、構成的 AreA 機能株においては *cbhA* (*A. nidulans* における *cbh1*) の mRNA 量が高レベルで存在しており、窒素代謝調節因子 AreA はセルラーゼ生産に関与していると考えられている(143)。

*T. reesei* における窒素源に制御されるセルラーゼ生産の全体像はどのようにして行われているのかその詳細は不明である。*T. reesei* は微生物の中で最大のタンパク質分泌能を保持することから窒素源のセルラーゼ生産への影響を解析することは非常に重要である。無機窒素源が *T. reesei* において完全なセルラーゼ生産のために窒素源として使用されることが報告されている(144)。一方で、ほとんどの文献の培地はセルラーゼ生産を向上させるために普遍的にペプトンや yeast extract のような天然由来の窒素源が含まれている(145, 146)。近年、Rodriguez-Gomez et al.はペプトンやグルタミンのような有機窒素源の添加は濃度依存的にセルラーゼ生産の増加を引き起こすことを報告している(147)。このように、窒素源がセルラーゼ生産に与える影響に注目が集まってきているが、ほとんどの研究が Rut C-30 のような高生産変異株で行われており、QM6a や QM9414 などの標準的な菌株での解析が求められる。

## 1.7. 目的

糸状菌 *Trichoderma reesei* は広く工業利用が可能な有用性から突然変異導入による菌株改良が世界中で実施されてきた。しかしながら、突然変異導入によるセルラーゼ生産能の向上には炭素利用率からこれ以上の大幅な改良は望めない。そのため、*T. reesei* の遺伝子工学的な菌株改良がよく行われたが、セルラーゼ遺伝子プロモーターの制御下で内在性や異種由来の糖質加水分解酵素を発現させてきた。しかしながら、遺伝子組換えによりセルラーゼ遺伝子のプロモーターのコピー数が増加することで、セルラーゼ遺伝子の転写活性化に重要な転写調節因子の必要数が増加し、タイトレーションが生じることが懸念されている。セルラーゼ生産は、転写レベルで制御されており、特定の炭素源の存在下で誘導的に発現される。しかし、炭素源以外の環境因子においてもセルラーゼ生産性が変化するが、その応答機構は解明されていない。環境因子応答機構を解明することができれば、酵素生産により適した培地条件の提案および環境因子応答性転写調節因子を利用した菌株開発が可能となる。また、実際に糖化される前処理バイオマスは、それぞれのバイオマス種や前処理方法によりセルロース、ヘミセルロース組成が変化する。そのため、環境応答性のセルラーゼ生産機構を解明することができれば、培養条件の変化により種々の前処理バイオマスに最適な酵素標品を容易に作出することができると推測される。

本研究では、セルラーゼ生産制御機構の全容を理解し、工業用糖化酵素生産菌株の開発へ応用するため、*T. reesei* のセルラーゼ生産機構において明らかとなっていない炭素源応答性、pH 応答性および窒素源応答のセルラーゼ生産制御機構について解析を行った。



第2章 *xyn3* プロモーターを利用した炭素源応答メカニズムの解析およびその応用  
による工業用糖化酵素生産菌株の造成

## 2.1. 緒言

第1章で述べたとおり、近年の工業用糖化酵素生産菌株は、様々な内在性および外来性の $\beta$ -グルコシダーゼを発現させてきた。発現のためには、セルラーゼ遺伝子のプロモーターが主に用いられてきた。しかしながら、セルラーゼ遺伝子のプロモーターの多重利用はセルラーゼ遺伝子の転写活性化因子のタイトレーションを引き起こしてしまう(33)。*egl3* や *xyn3* は破壊してもセルラーゼ生産に影響はないため、これらのプロモーターを利用した相同組換えによる異種宿主発現を行った場合、セルラーゼ生産に影響がなく目的の酵素を発現させることができる(91)。バイオマスはセルロース、ヘミセルロースを含むことから、工業用糖化酵素生産菌株は導入した有用酵素を多種多様な培養条件で発現させることが望ましい。しかしながら、セルラーゼ遺伝子のプロモーターはセルロース系の炭素源でのみ誘導能を保持している。一方で、ほとんどのキシラナーゼ遺伝子はセルロースおよびキシランにより誘導される。セルラーゼおよびキシラナーゼ遺伝子の転写発現機構の研究が長く行われているにもかかわらず、その誘導メカニズムの違いがどのようにして引き起こされるのかは明らかとなっていない。それゆえに、糖質加水分解酵素のプロモーターの誘導メカニズムの解明が必要である。

*T. reesei* PC-3-7 より同定された3番目のキシラナーゼ遺伝子である *xyn3* はソフォロース誘導においてキシラナーゼ遺伝子の中で最も高い発現量を示す(21, 35)。*xyn3* はキシラナーゼであるにも関わらず、その発現はキシラン系基質では誘導されずセルラーゼ遺伝子の発現と同様にセルロース系基質にのみで誘導される(21)。一方で、*xyn1* および *xyn2* はセルラーゼ遺伝子や *xyn3* と異なりセルロース系およびキシラン系基質の両方で誘導される。このことから、他の2つの主要なキシラナーゼ遺伝子の制御メカニズムとは異なる制御メカニズムであることが示唆されている(31)。しかしながら、これらキシラナーゼ遺伝子のプロモーター上に存在する転写活性化配列は類似しており、未知の誘導メカニズムの存在が推測されている。さらに、XYNIII は日本型系統樹変異株でのみ発現しているキシラナーゼだが、*xyn3* ORF やその上流領域に突然変異が生じていない(71)。これらの興味深い特徴から、*xyn3* の発現制御メカニズムの解析が進められてきた。また、*xyn3* プロモーターは相同組換えによる酵素発現に有用であるため、セルラーゼ、キシラナーゼ遺伝子プロモーターの発現制御の解析はセルラーゼ、キシラナーゼ発現制御機構の解明だけでなく、工業用糖化酵素生産菌株への応用にも非常に重要である。このような利点から、当研究室では *xyn3* プロモーターを利用し、高機能タンパク質をコードする遺伝子が発現させることを行ってきた。*xyn3* プロモーターの制御下で AaBGLI を発現させた形質転換体である X3AB1 株は、高い BGL 活性を保持し、バイオマス糖化能力が劇的に改善していた(93, 94)。工業用糖化酵素生産菌株はヘミセルラーゼの発現を誘導させるためしばしばキシラン含有セルロース

やバイオマスそのものを炭素源として含む培地で培養される。そのため、*xyn3* プロモーターがキシラン系炭素源による誘導能を獲得すれば、工業用糖化酵素生産において非常に有用なプロモーターとなる。

これまでに当研究室では、*xyn3*の発現に重要なシス配列の同定がなされてきた(72)。しかしながら、*xyn3*がなぜ日本型変異株でのみ発現しているのか、セルラーゼ遺伝子と同様の発現制御メカニズムを持つのかはいまだ明らかとなっていない。以上のことから、*xyn3* プロモーターは組換え遺伝子の発現だけでなく、発現制御メカニズムの解析にも重要であることが示されている(148)。そこで、本章ではセルロース系基質でのみ誘導能を持つ *xyn3* プロモーターのシス配列をセルロース系およびキシラン系基質で誘導される *xyn1* プロモーターのシス配列と置換し、その影響を解析することでセルロース系およびキシラン系基質に対する誘導メカニズムの解明を目指した。また、構築した *xyn3* 改変プロモーターを用いて高機能 BGL である AaBGLI を発現させた PC-3-7 株を作出し、キシラン含有培地で生産された酵素標品の各種酵素活性およびバイオマス糖化能を評価した。さらに、*xyn3* 改変プロモーターの制御下で AaBGLI を発現させた QM9414 株を構築した。

## 2.2. 実験操作

### 2.2.1. 菌株と培養条件

本章において使用した *T. reesei* QM9414 株(ATCC26921)および PC-3-7 株(ATCC66579)は、協和発酵バイオ株式会社(Tokyo, Japan)により提供された菌株である。*T. reesei* PC-3-7 株は L-ソルボースによるセルラーゼ誘導を獲得したセルラーゼ高生産変異株である(149)。これらの菌株は Difco™ Potato Dextrose Agar (PDA; BD, NJ, USA) プレート培地にて生育させ、分生子は使用時まで 10% グリセロールを含む 0.9% NaCl 溶液中で凍結保存した。セルラーゼ生産のために、 $1 \times 10^7$  個の分生子を 1% Avicel または 1% Avicel および 0.5% birch wood xylan を炭素源として含む basal medium にて 28 °C、220 rpm で 5 日間培養を行った(149)。培養上清はミラクロス(Merck Millipore, MA, USA)を用いたフィルターろ過により回収し、酵素標品として使用した。

### 2.2.2. プロモーター解析のための GUS レポーターカセットの構築

pKFxyn3PD0 は本研究室のプラスミドライブラリーより使用した(72)。pKFxyn3PD0 は *xyn3* 遺伝子上流領域を含むプラスミドである。*xyn3* プロモーターのシス配列を取り除くおよび XbaI サイトを付加するため、pKFxyn3PD0 を鋳型として *xyn3P\_cis\_inv\_Fw* および *Rv* をプライマーセットとして使用しインバース PCR を行った。その後、PCR 産物はセルフライゲーションさせ、pKFxyn3P- $\Delta$ cis プラスミドを獲得した。

各 *xyn1* シス配列を生成するため、アニーリングにより DNA 断片を調製した。2Box の場合においては、2つの *xyn1* シス配列を含む DNA 断片を Genscript (Nanjing, China)にて人工合成により構築した。各 DNA 断片は pKFxyn3P- $\Delta$ cis の XbaI サイトに挿入し、それぞれ得られたプラスミドを pKFxyn3P-1Box および-1RBox、-2Box、-2RBox、-XREG、-RXREG と名付けた(Fig. 2-1)。

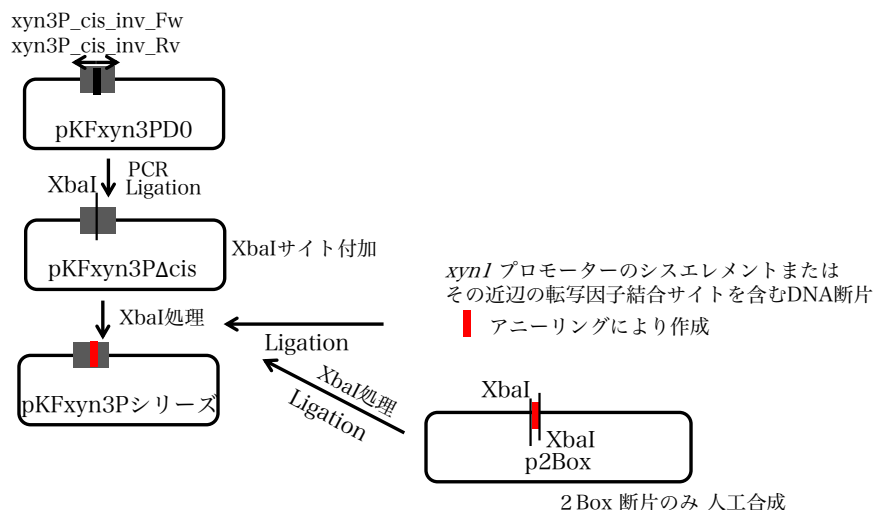


Fig. 2-1 pKFxyn3P シリーズの構築方法

pKFxyn3P 組み換えプラスミドは BamHI および NcoI により消化し、得られた *xyn3* の上流領域を含む DNA 断片は pTgus-2(72)の BamHI/NcoI サイトにサブクローニングした。pTgus-2 はレポーター遺伝子として *Escherichia coli uidA* ( $\beta$ -グルクロニダーゼ遺伝子; *gus*) および *xyn3* の下流領域を含んでいる。これにより得られたプラスミドは pTgus-3- $\Delta$ cis および-1Box、-1RBox、-2Box、-2RBox、-XREG、-RXREG と名付けた。pTgus-3 組み換えプラスミドは EcoRI および NsiI によって消化し、pBxyn3amdS (71)の EcoRI/NsiI サイトにサブクローニングした。pBxyn3amdS は形質転換のための選択マーカーとしてアセトアミダーゼをコードする *A. nidulans amdS* が含まれている(150)。得られたプラスミドは pBxyn3ag- $\Delta$ cis および-1Box、-1RBox、-2Box、-2RBo、-XREG、-RXREG と名付けた (Fig. 2-2)。 *xyn3* 改変プロモーターおよび *gus*、*amdS* 選択マーカーは GenomeLab™ Dye Terminator Cycle Sequencing Quick Start Kit を用いて CEQ™ 2000XL DNA sequencer (Beckman Coulter, Beverly, USA)により変異が生じていないことを確認している。pBxyn3ag レポータープラスミドシリーズは SalI によって消化し、得られた DNA 断片を PC-3-7 へと導入するために使用した。本章で使用したプライマーは Table 2-1 に示した。

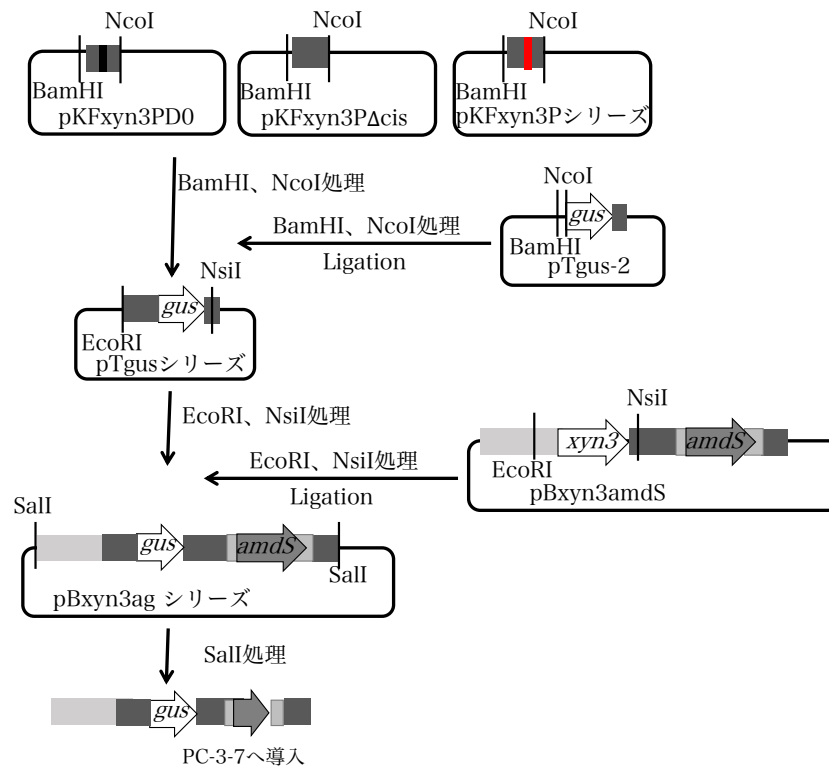


Fig. 2-2 pBxyn3ag シリーズの構築方法

### 2.2.3. *aabgl1* 発現カセットの構築

*pyr4* 選択マーカーは PC-3-7 ゲノムを鋳型とし PCR によって獲得した。PCR 産物を pBluescriptII SK(+) (Stratagene, La Jolla, CA, USA) の EcoRV サイトに挿入し、pBpyr4 を獲得した。*pyr4* マーカーリサイクルシステム(151)を構築するため、*xyn3* 下流領域を PC-3-7 ゲノムを鋳型として PCR により増幅し、pUC118 (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) の HincII サイトに導入した(pUxyn3DR)。pUxyn3DR を EcoRV および BamHI によって消化し、pBpyr4 の EcoRV/BamHI サイトにサブクローニングした(pBpyr4RM)。pBxyn3aabgl1 は *xyn3* プロモーターの制御下で *A. aculeatus bgl1* を発現させ、*xyn3* 下流領域の NarI サイトに *amdS* 選択マーカーを含むプラスミドである(93)。このプラスミドは *amdS* マーカーを取り除くためインバース PCR により増幅させた。*xyn3* 下流領域を含む *pyr4* 選択マーカーを獲得するため、pBxyn3RM を鋳型として PCR を行った。これらの PCR 産物をライゲーションし、pBxyn3aabgl1pyr4RM を獲得した。pBxyn3aabgl1pyr4RM よりネイティブな *xyn3* プロモーターを取り除くため、pBxyn3aabgl1pyr4RM はインバース PCR された。2RBox プロモーター領域を含む DNA 断片は pKFxyn3P-2RB を鋳型として PCR により獲得し、pBxyn3aabgl1pyr4RM のインバース PCR 産物と In-Fusion® HD Cloning Kit (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) を用いてサブクローニングした

(pBxyn3\_2RbaabgIpyr4RM)。発現カセットは pBxyn3\_2RbaabgIpyr4RM を SspI および NotI で消化することで獲得し、形質転換に使用した(Fig. 2-3)。本章で使用したプライマーは Table 2-1 に示した。

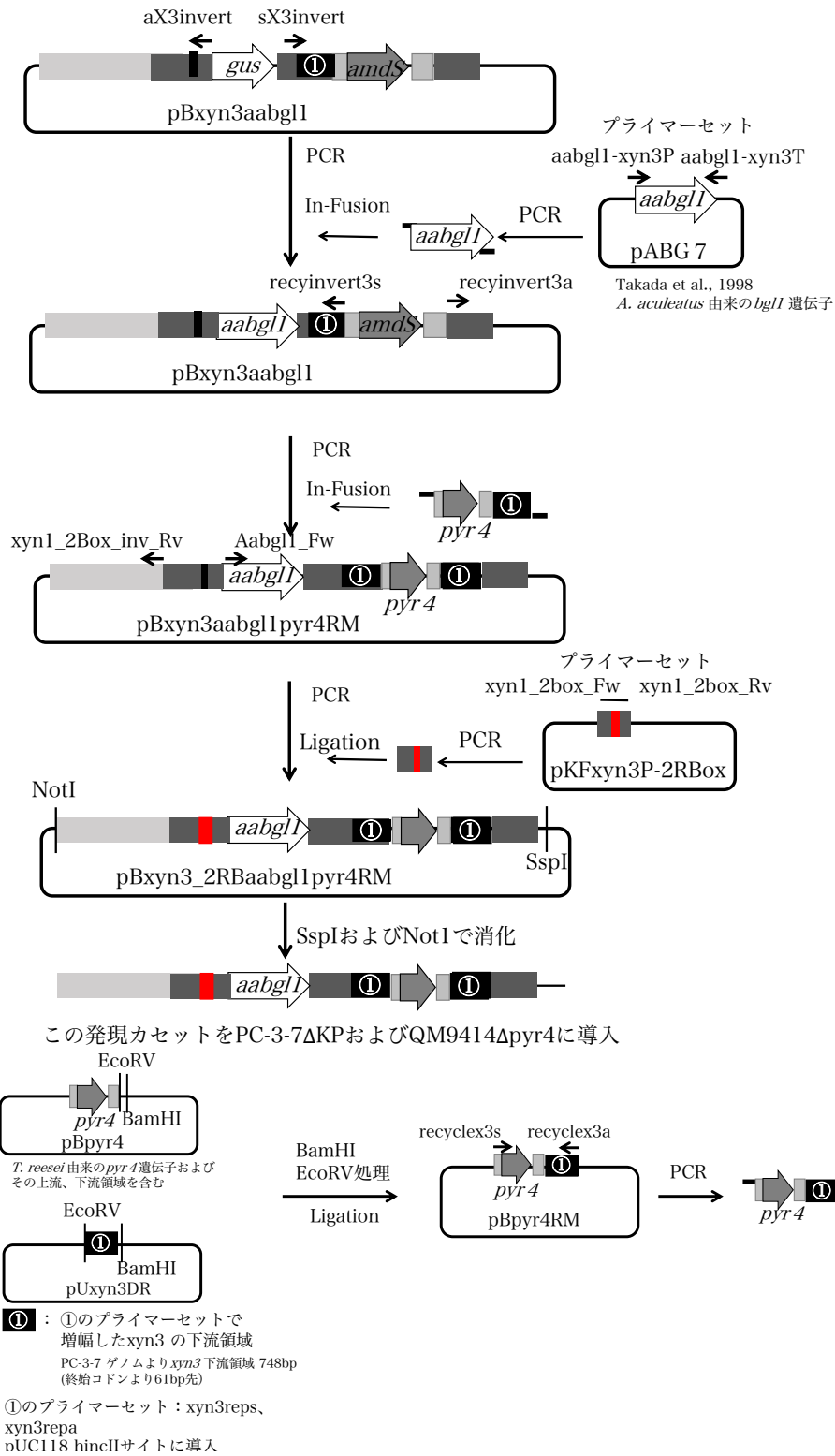


Fig. 2-3 pBxyn3\_2RbaabgIpyr4 の構築方法

#### 2.2.4. *xyn3* 改変プロモーターを含む発現カセットの形質転換およびサザン解析

*T. reesei* へ DNA 断片を導入するために、*T. reesei* プロトプラストの形質転換は Penttilä et al. の報告に従って行った(152)。pBxyn3ag プラスミド由来の DNA 断片を PC-3-7 に導入し、GUS レポーター株の形質転換体はアセトアミドを唯一の窒素源とした最小培地で選抜した。2RBox プロモーターを用いた AaBGLI 発現株の場合、pBxyn3\_2RBoxabg1pyr4RM 由来の DNA フラグメントを PC-3-7ΔKP または QM9414ΔP (83) に導入し、ウリジン原栄養性を指標にウリジンを含まない最小培地にて選抜した。形質転換候補株は安定した形質転換体を獲得するため、2 回ウリジンを含まない最小培地にストリークした。相同組換えおよびコピー数は AlkPhos Direct Kit (GE Healthcare Bio Science, Waukesha, WI) を用いてサザンブロット解析にて確認した。染色体 DNA は Seiboth et al (153) の報告を元に獲得し、SacI により消化した。電気泳動後、消化された染色体 DNA は Hybond N+ membrane (GE Healthcare Bio Science, Waukesha, WI) へとブロッティングし、alkaline phosphatase 標識した *xyn3* 上流領域をプローブとして用いた。

#### 2.2.5. 無細胞抽出液の調製と GUS 活性測定

$1 \times 10^6$  個の分生子を 0.3% グルコースを含む basal medium にて 28°C、220 rpm で 48 時間培養し、その後生育した菌糸をフィルターろ過により回収、0.1% グルコース、0.05% ソルボース、0.01% ソフォロース、0.1% キシロース、0.1% キシランをそれぞれ唯一の炭素源として含む誘導培地に再懸濁した(77)。誘導 12 時間後に菌糸を回収し、直ちに液体窒素にて凍結した。凍結菌体はマルチビーズショッカー (Yasui Kikai, Osaka, Japan) を用いて 1700 rpm、10 s で微細粉体まで粉碎した。粉碎した菌体は GUS 抽出バッファー (50 mM リン酸ナトリウム buffer (pH 7.0) および 10 mM EDTA (pH 8.0)、10 mM β-メルカプトエタノール、0.1% Triton-X100、0.1% ラウロイルサルコシナトリウム) に懸濁し、13,000×g、4 °C で 15 分間遠心して、上清を無細胞抽出液として取得した。β-グルクロニダーゼ活性測定は 4-methylumbelliferyl-β-D-glucuronide (4-MUG) を基質として使用し 37 °C で 10 min 間反応させた。それぞれの値は独立した 3 培養系の平均を示す。

#### 2.2.6. 生化学的分析

培養上清は 12.5% ポリアクリルアミドゲル上にて SDS-PAGE に供し、Coomassie brilliant blue R250 にて染色した。Precision Plus Dual Color Standard Marker (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) は分子量マーカーとして使用した。ウェスタンブロット解析のために、培養上清のタンパク質は SDS-PAGE により分離し、その後、polyvinylidene difluoride membrane (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) へと転写した。抗 AaBGLI ウサギ

抗体は一次抗体として 5,000 倍希釈で使用し、西洋わさび由来ペルオキシダーゼを付加した抗ウサギ IgG ロバ血清(GE Healthcare Bio Science, Waukesha, WI)を二次抗体として 10,000 倍希釈で免疫検出に使用した。ECL (Amersham ECL Select, GE Healthcare Bio Science, Waukesha, WI)による化学発光シグナルは、LuminoGraphI (ATTO, Tokyo, Japan)を用いて検出した。

タンパク質濃度は牛ガンマグロブリンをスタンダードとしてブラッドフォード法により決定した。Avicelase およびカルボキシメチルセルラーゼ(CMCase)、キシラナーゼ活性は 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS)法により還元糖量を測定した。Avicelase 活性は 50 mM 酢酸バッファー(pH 5.0)中に終濃度 0.5% Avicel (Funakoshi, Tokyo, Japan)を基質として 50 °C で 30 min 間反応させ測定した。CMCase 活性は 50 mM 酢酸バッファー(pH 5.0)中で終濃度 1% CMC (low viscosity, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)を基質として 50 °C で 15 min 間反応させ測定した。キシラナーゼ活性は 50 mM 酢酸バッファー(pH 5.0)中で終濃度 1% birch wood xylan (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)を基質として 50 °C で 10 min 間反応させ測定した。活性の 1 ユニットは 1 分間でグルコース 1  $\mu$ mol 相当の還元糖を生産する酵素の量として決定した。セロビアーゼ活性は 50 mM 酢酸バッファー(pH 5.0)中で終濃度 20 mM セロビオース (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)を基質として 50 °C で 10 min 間反応させ、Glucose C2 kit (Wako pure chemical, Osaka, Japan)により放出されたグルコースを測定した。セロビアーゼ活性の 1 ユニットは 1 分間でグルコース 2  $\mu$ mol を生産する酵素の量として決定した。それぞれの値は独立した 3 培養系の平均を示す。

定量的リアルタイム PCR (qRT-PCR)を行うために、total RNA は Shida et al. (83) によって報告されている改良したホットフェノール法により凍結菌体から抽出した。cDNA は total RNA 1  $\mu$ g より Transcriptor First-Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Applied Science, Bavaria, Germany)を用いて合成した。qRT-PCR は LightCycler® 480 System (Roche Applied Science, Bavaria, Germany)を用いて行った。相対転写量はハウスキーピング遺伝子 *act1* の値をコントロールとして用いて計算した。それぞれの値は独立した 3 培養系の平均を示す。本章で使用したプライマーは Table 2-1 に示した。

#### 2.2.7. 実バイオマスの糖化試験

糖化に使用した基質はアルカリ処理エリアサス(草本系)および水熱処理ユーカリ(木質系)である。アルカリ処理エリアンサスおよび水熱処理ユーカリは小林良則博士(Japan Bioindustry Association, Ibaraki, Japan)から提供されたものを使用した。バイオマスの前処理は Kawai et al. (99)の方法通りに行われており、アルカリ処理は 1% NaOH で 120 °



C、5分間処理し、水熱処理は210 °C、30分間加熱処理を行った。前処理バイオマスの組成は NREL により公開された方法(154)に従って高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて測定した。前処理バイオマスの酵素標品による糖化は2 ml プラスチックボトルを用いて100 mM 酢酸バッファー(pH 5.0)中に5% バイオマス(乾燥重量)に10 mg/g-バイオマスとなるように酵素を充填し、50 °Cで48時間反応させた。糖化後、サンプルは酵素の失活のため10 min 間煮沸し、DNS 法にてグルコース量を測定した。それぞれの値は独立した3培養系の平均を示す。

### 2.2.8. 統計分析

統計分析は Student's t テストにより行った。親株は他の形質転換体と比べるためのスタンダードとして使用した。優位性は  $P < 0.05$  (\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ )とした。

## 2.3. 実験結果

### 2.3.1. *xyn3* 改変プロモーターの誘導能の評価

キシラナーゼ遺伝子 *xyn1* および *xyn3* のプロモーター領域のシス配列はともにセルラーゼの主要な転写活性化因子 Xyr1 の結合モチーフの逆向き反復配列がスペーサー配列(10 bp (*xyn1* プロモーター)および16 bp (*xyn3* プロモーター))によって隔てられている構造を持つ(Fig. 2-5A)。 *xyn1* および *xyn3* の誘導にはこのシス配列が必須であり、種々の炭素原に応答した発現誘導メカニズムに関与していると考えられている。しかしながら、*xyn3* はキシラナーゼをコードする遺伝子であるにも関わらず、セルロース、ソフォロースおよび L-ソルボースにより誘導され、D-キシロース、キシロオリゴ糖やキシランでは誘導されない(31)。それに対して、*xyn1* はセルロース系、キシラン系の基質両方で誘導される。そのため、*xyn3* プロモーターに *xyn1* プロモーターのシス配列を導入することによりキシラン誘導能を付与できると推測した。この仮説を実証するため、*xyn3* シス配列を *xyn1* シス配列に置換した改変プロモーターを構築した(Fig. 2-5A)。構築した改変プロモーターの強度を評価するため、*xyn3* 改変プロモーターの制御下にレポーター遺伝子 *gus* を導入した発現カセット(レポーターカセット)を構築し、PC-3-7 株へ導入した。レポーターカセットが相同組換えにより1コピーで *xyn3* 座に導入されていることはサザンブロット解析により確認した(Fig. 2-5B, C)。相同組換え体はそれぞれ導入したレポーターカセットに基づいて D0C (オリジナルの *xyn3* プロモーター)および  $\Delta$ cis (*xyn3* シス配列を削除したプロモーター)、XREG、1Box、2Box、RXREG、1RBox、2RBox (Rxxx はシス配列を相補的に導入)と名付けた(Fig. 2-4)。

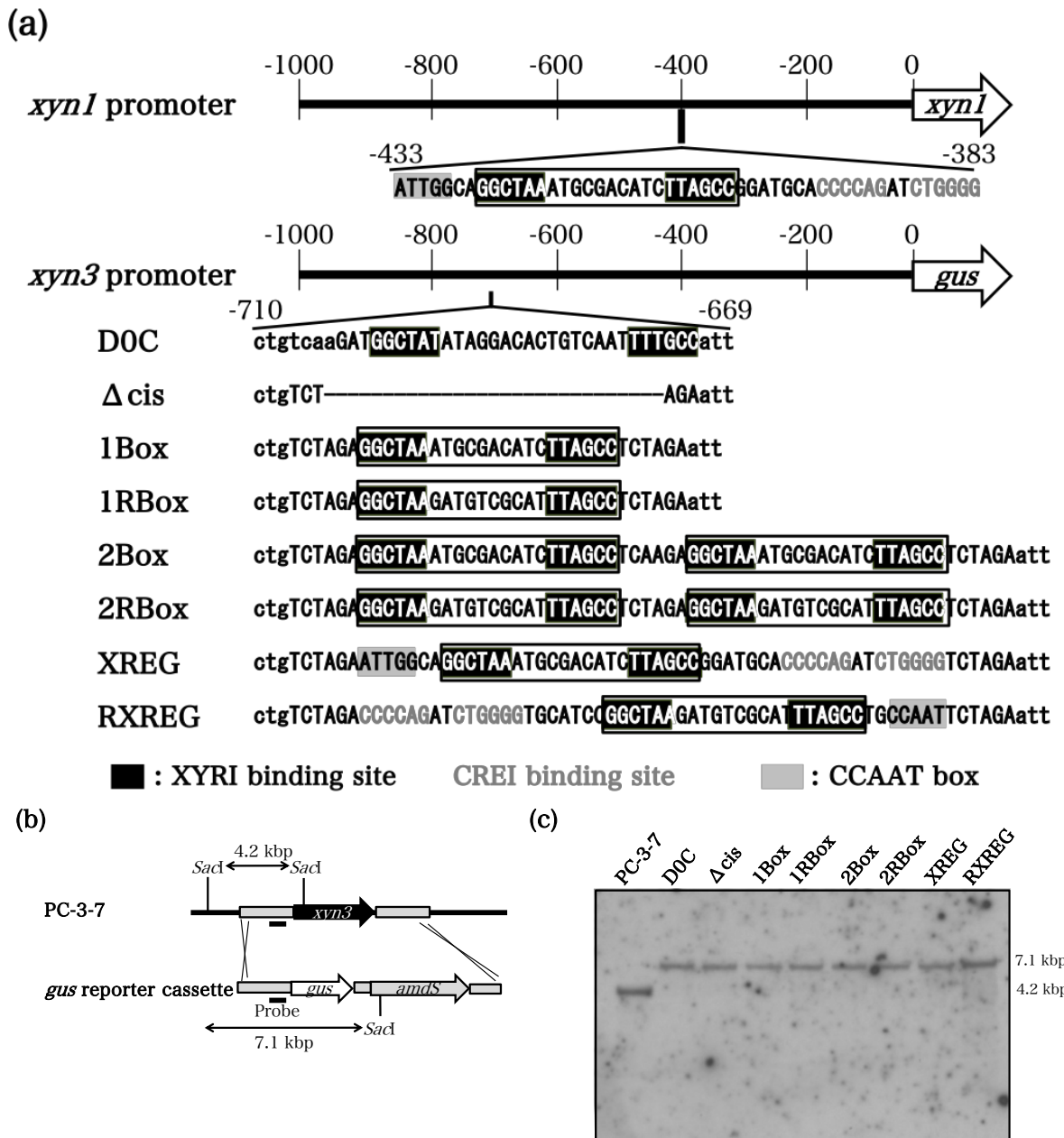


Fig. 2-4 *xyn3* 改変プロモーターの構造および GUS レポーター株の構築

*gus* 遺伝子は *xyn3* プロモーターの制御下に置かれ、これを DOC とした。オリジナル *xyn3* プロモーターより *xyn3* シス配列を取り除いたものが Δcis である。*xyn1* シス配列は 10 bp のスペーサー配列をもつ 2 つの XYRI 結合サイト (black box) からなる。*xyn3* シス配列を *xyn1* シス配列に置換したプロモーターを 1Box または 1RBox プロモーターとした。また、2 つの *xyn1* シス配列を導入したプロモーターを 2Box または 2RBox プロモーターとした。XREG および RXREG プロモーターは CCAAT ボックス (gray box) および 2 つの CREI 結合サイト (gray letter)、*xyn1* シス配列を含む領域を *xyn3* プロモーターに導入したものである。(b) *gus* レポーターカセットは PC-3-7 を親株として導入した。*xyn3* ローカスに存在する *SacI* の制限酵素サイトを示した。(c) サザンブロット解析は PC-3-7 および各 GUS レポーター変異株のゲノム DNA (3 μg) を *SacI* により消化し、*xyn3* 上流領域の一部をプローブとして用いた。

これら形質転換体は 0.3% グルコース basal medium を用いて前培養を行い、その後、菌体のみを 0.05% L-ソルボースまたは 0.01% ソフォロース、0.1% キシラン、0.1% キシロースをそれぞれ含む誘導培地へ移した。菌体抽出液は 12 時間誘導後の菌体より獲得し、GUS 活性測定に使用した。Δcis 株は、コントロール(D0C)と比べてかなり低い GUS 活性を示した(Fig. 2-5A)。xyn1 シス配列が誘導能へ与える影響を評価するため、xyn3 シス配列を xyn1 シス配列周辺の Xyr1 以外の転写調節因子結合配列を含む領域全て(HAP2/3/5 complex 結合サイトおよび 2 つの CREI 結合サイト、2 つの Xyr1 結合サイト)と置換した XREG および RXREG を使用した(Fig. 2-4A)。これらの改変プロモーターは D0C と同等のセルロース誘導能を示し、キシラン系基質での誘導能を持たなかった(Fig. 2-5A, B)。1Box および 1RBox は xyn3 プロモーターに xyn1 シス配列を挿入することで構築した(Fig. 2-4A)。GUS 活性はセルロース系基質においてそれぞれ 2.3 倍(1Box)、2.6 倍(1RBox)に増加した(Fig. 2-5A)。さらに、xyn1 シス配列をタンデムに 2 コピー挿入した場合(2Box)は 3.2 倍となった(Fig. 2-5A)。しかしながら、2RBox は 1Box と同等の GUS 活性だった(Fig. 2-5A)。キシロースやキシランを誘導基質とした際、1Box は GUS 活性を検出することができなかった。しかしながら、1RBox および 2Box、2RBox はキシラン系基質での誘導能を示した(Fig. 2-5B)。これらの GUS 活性はキシラン誘導時に D0C と比べ、それぞれ 174 倍および 133 倍、177 倍の値を示した。以上の結果から、2RBox が最も高いキシラン系基質に対する誘導能を示した。

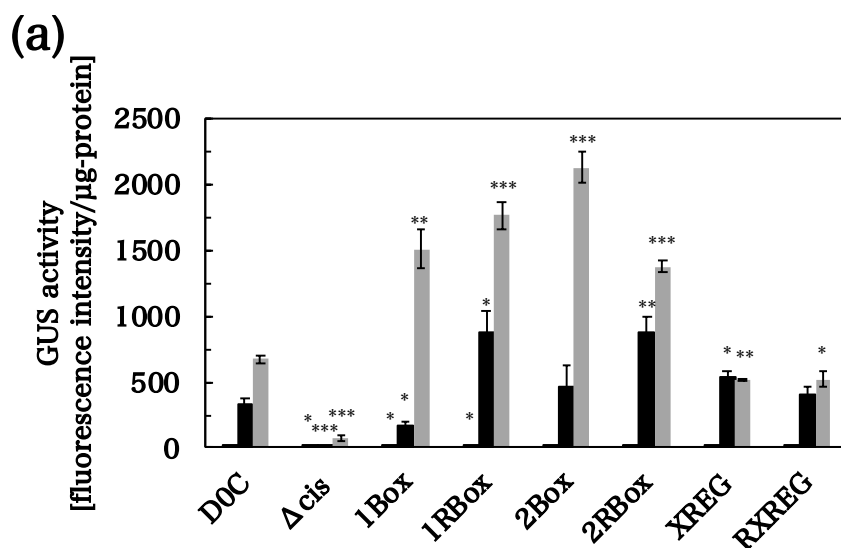


Fig. 2-5 種々の炭素源にตอบสนองした xyn3 改変プロモーターのプロモーター強度

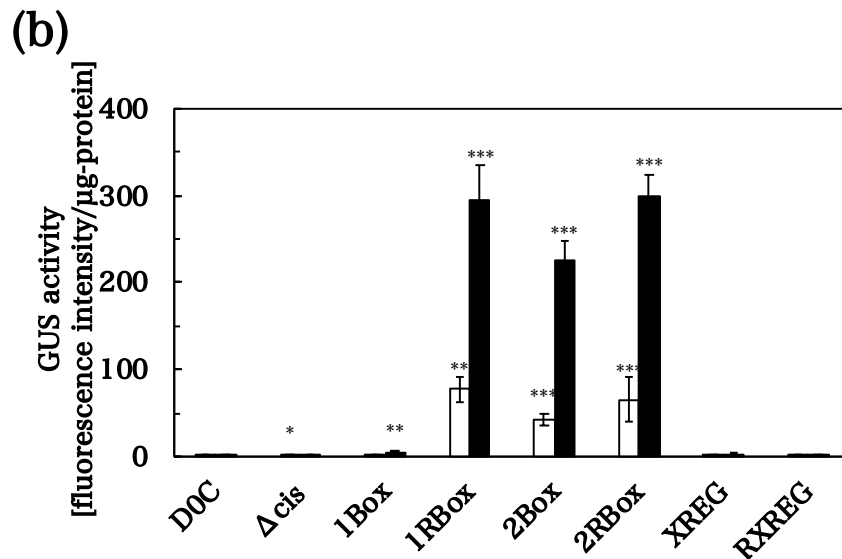


Fig. 2-5 種々の炭素源に応答した *xyn3* 改変プロモーターのプロモーター強度(続き)

GUS 活性は異なる誘導条件で各形質転換体を測定した。0.3% グルコース培地で前培養後、各形質転換体を(a)セルロース系炭素源として 0.1% glucose (white bar)または 0.05% L-sorbose (black bar)、0.01% α-sophorose (gray bar)や(b)キシラン系炭素源として 0.1% xylose (white bar)または 0.1% birch wood xylan (black bar)を含む誘導培地に移され、12 時間誘導した。GUS 活性は細胞抽出液にて測定し、蛍光強度/mg-タンパク質で示した。各値は独立した 3 実験の平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。

### 2.3.2. 2RBox プロモーターの制御下での *A. aculeatus bglI* の発現

PC-3-7 は工業的利用のためのベース菌株として使用されている。これまでに、我々は *xyn3* および *eglI* プロモーターの制御下で *A. aculeatus* BGLI (AaBGLI)を発現させた PC-3-7 株(それぞれ X3AB1 株および E1AB1 株)を構築してきた。これらの形質転換体は BGL 活性が改善され、高い糖化能を示した(93, 94)。しかしながら、これらのプロモーターはセルロースだけに応答し発現する。今回開発した *xyn3* 改変プロモーター、特に 2RBox プロモーターは *xyn3* プロモーターと比べてセルロース系およびキシラン系基質に対する誘導能が増加していた。そのため、*xyn3* 改変プロモーターの利用はこれまでの形質転換体よりも酵素発現を改善することができると予測した。セルロース系バイオマスはセルロースおよびキシランの両方から成ることから、増加した BGL 活性はキシラン分解後のセルロースの効率的な糖化に役立つと考えられる。そのため、*xyn3* 改変プロモーターを利用したさらなる糖化能の増強を行うため、2RBox プロモーターの制御下で AaBGLI を発現させた PC-3-7 株を構築した。当研究室では以前に XYNIII がバイオマス糖化のために重要であることを報告している(94)。そのため、SDS-PAGE により非相同組換え体の選抜を行い、いくつかの形質転換体を獲得した。高セロビアーゼ活性を示す形質転換体を獲得するため、得られた形質転換体を 1% Avicel 培地にて培養しそのセロビアーゼ活性を測定した。また、コ

ントロールとして *xyn3* プロモーターの制御下で AaBGLI を発現させた X3AB1 を用いた。2RBox プロモーターの制御下で AaBGLI を発現させた形質転換体はどれも X3AB1 よりも高いセロビアーゼ活性を示した(Fig. 2-6)。そこで、最も高いセロビアーゼ活性を示した No.6-5 を選抜し、X3-2RB\_AB1 株と名付けた(Fig. 2-6)。

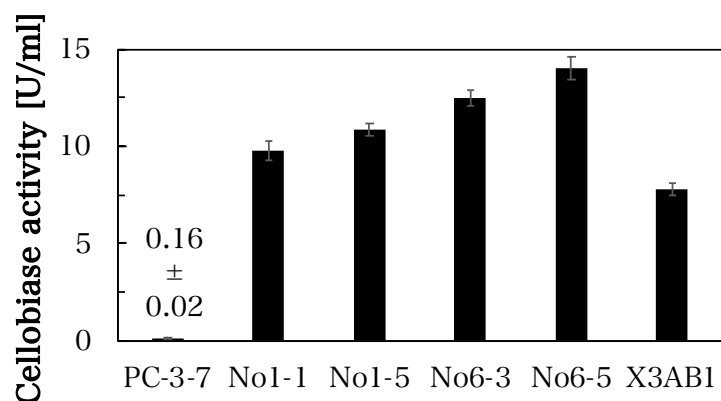


Fig. 2-6 PC-3-7 およびその派生菌株におけるセロビアーゼ活性

*T. reesei* PC-3-7 および 2RBox プロモーターの制御下で AaBGLI を発現させた形質転換体を 1% Avicel 培地で 5 日間培養した。セロビアーゼ活性は培養上清を用いて測定した。各値は独立した 3 実験の平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。

サザン解析の結果から、*aabgl1* 発現カセットが少なくとも 1 コピーで非相同的に X3-2RB\_AB1 ゲノムに導入されていることを確認した(data not shown)。セルラーゼ生産を行うため、この菌株を 1% Avicel または 1% Avicel および 0.5% xylan を含む培地で培養した。培養液上清の SDS-PAGE 解析の結果、X3-2RB\_AB1 では約 130 kDa に AaBGLI のバンドが検出され、その他のバンドパターンは PC-3-7 とほぼ同じであった(Fig. 2-7A)。ウェスタン解析においても、X3-2RB\_AB1 で AaBGLI のシグナルが検出され、PC-3-7 では検出されなかった(Fig. 2-7B)。さらに、X3-2RB\_AB1 は非相同組換え体であることから、XYNIII のバンドが約 32 kDa に観察された(Fig. 2-7A)。

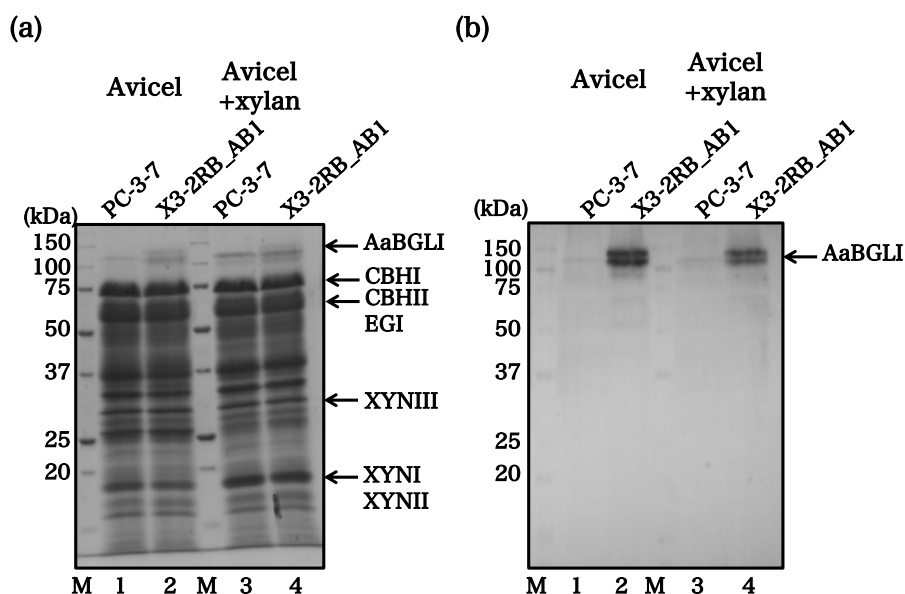


Fig. 2-7 PC-3-7 および X3-2RB\_AB1 の SDS-PAGE およびウェスタンブロット解析

*T. reesei* PC-3-7 (WT, lanes 1, 3) および X3-2RB\_AB1 (lanes 2, 4) を 1% Avicel (lanes 1, 2) または 1% Avicel+0.5% xylan (lanes 3, 4) 培地で 5 日間培養した。培養上清(20  $\mu$ l) は 12.5% SDS-PAGE により解析された。異種宿主発現された *A. aculeatus* BGLI および XYNI-III、CBHI、CBHII、EGI は図中に示した。

CMCase および xylanase 活性は PC-3-7 および X3-2RB\_AB1 でほぼ同等であったが、X3-2RB\_AB1 は PC-3-7 と比べ劇的に高いセロビアーゼ活性 (Avicel 培養で 121 倍、Avicel+キシラン培養で 85 倍) を示した (Table 2-2)。さらに、X3-2RB\_AB1 は親株より高い Avicelase 活性を示したが、SDS-PAGE では同様のセルラーゼ組成だった。

Table 2-2 PC-3-7 および X3-2RB\_AB1 の酵素活性

Strain	Culture condition	Protein concentration mg/ml	avicelase activity	CMCase activity	cellobiase activity	xylanase activity
			[U/ml]	[U/ml]	[U/ml]	[U/ml]
PC-3-7	Avicel	1.44 $\pm$ 0.01	0.685 $\pm$ 0.023	33.7 $\pm$ 0.9	0.289 $\pm$ 0.030	179 $\pm$ 7
	Avicel + xylan	1.42 $\pm$ 0.03	0.695 $\pm$ 0.054	30.6 $\pm$ 1.0	0.207 $\pm$ 0.019	265 $\pm$ 2
X3-2RB_AB1	Avicel	1.44 $\pm$ 0.01	0.911 $\pm$ 0.004	38.3 $\pm$ 0.7	35.0 $\pm$ 3.9	180 $\pm$ 7
	Avicel + xylan	1.41 $\pm$ 0.01	0.915 $\pm$ 0.007	33.7 $\pm$ 1.6	17.7 $\pm$ 3.4	270 $\pm$ 9

*T. reesei* を 1% Avicel または 1% Avicel+0.5% xylan 培地で 5 日間培養した。各値は独立した 3 実験の平均値である。

Avicel 培養の X3-2RB\_AB1 の酵素標品を JN14、Avicel+キシラン培養の酵素標品を JN14H と名付け以降の解析に使用した。JN14 と JN14H のバイオマス糖化能を評価するため、NaOH 処理エリアンサス、水熱処理ユーカリを基質として使用した(Fig. 2-8)。JN14 の糖化能は水熱処理ユーカリで 1.5 倍、NaOH 処理エリアンサスで 1.3 倍親株より高かった(Fig. 2-8)。さらに、JN14H による糖化ではそれぞれ 1.7 倍、1.4 倍であった(Fig. 2-8)。

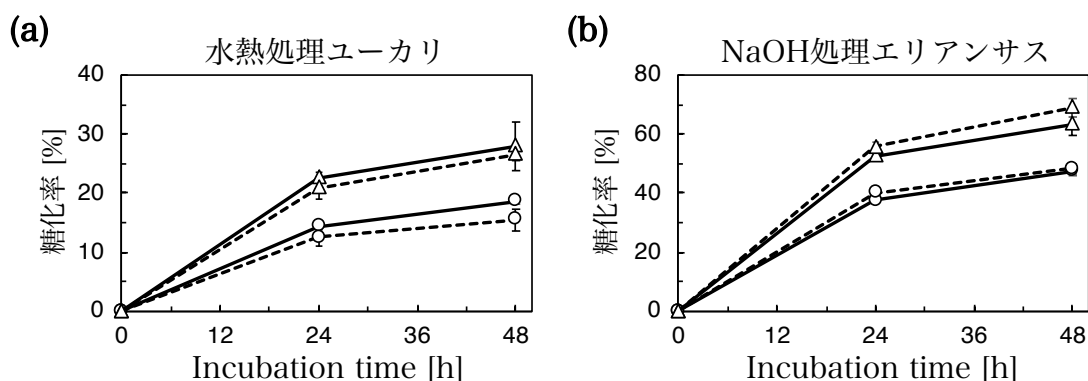


Fig. 2-8 X3-2RB\_AB1 由来の酵素標品による前処理バイオマスの糖化

前処理バイオマスとして水熱処理ユーカリ(a)および NaOH 処理エリアンサス(b)を使用した。酵素は 10 mg/g-バイオマスで使用し、50 °Cで 48 時間反応させた。WT および WT\_H は PC-3-7 由来(circles)、JN14 および JN14H は X3-2RB\_AB1 由来(triangles)である。Avicel 培養は実線および Avicel+キシラン培養は破線で示す。糖化率は生産されたグルコースおよびキシロースの全糖量に対する割合として計算した。各値は独立した 3 実験の平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。

### 2.3.3. 2RBox プロモーター制御下の *A. aculeatus* *bgl1* の転写

改良株における転写レベルでの *xyn3* 改変プロモーターを評価するため、X3-2RB\_AB1 株の転写解析を行った。PC-3-7 と X3-2RB\_AB1 はグルコース培地にて前培養を行い、その後ソフォロースまたはキシランを含む誘導培地へと移された。発現解析のためのターゲット遺伝子として、主要なセルラーゼ遺伝子 *cbh1*, *cbh2*, *egl1*, *bgl1*、主要なキシランナーゼ遺伝子 *xyn1*, *xyn2*, *xyn3*, *bxl1* を選択した。さらに *xyl1* 遺伝子もセルラーゼ遺伝子発現の主要な転写活性化因子として選んだ(33)。ソフォロースを誘導基質として使用した場合、*cbh1* および *cbh2*, *egl1*, *bgl1*, *xyn3*, *xyl1* の発現量は、WT および X3-2RB\_AB1 の間でほぼ同じだった(Fig. 2-9)。一方で、キシランナーゼ遺伝子の発現は両株ともにセルラーゼ遺伝子より遅れていた(Fig. 2-9)。キシラン誘導では、両株ともに高い *xyn1*, *xyn2*, *bxl1* 遺伝子の発現量が観察されたが、*xyn3* 遺伝子の発現は検出されなかった(Fig. 2-10)。しかしながら、*aabgl1* 遺伝子は *xyn3* 改変プロモーターの制御下ではソフォロースおよびキシラン両方の誘導時に発現していた(Fig. 2-9, 10)。

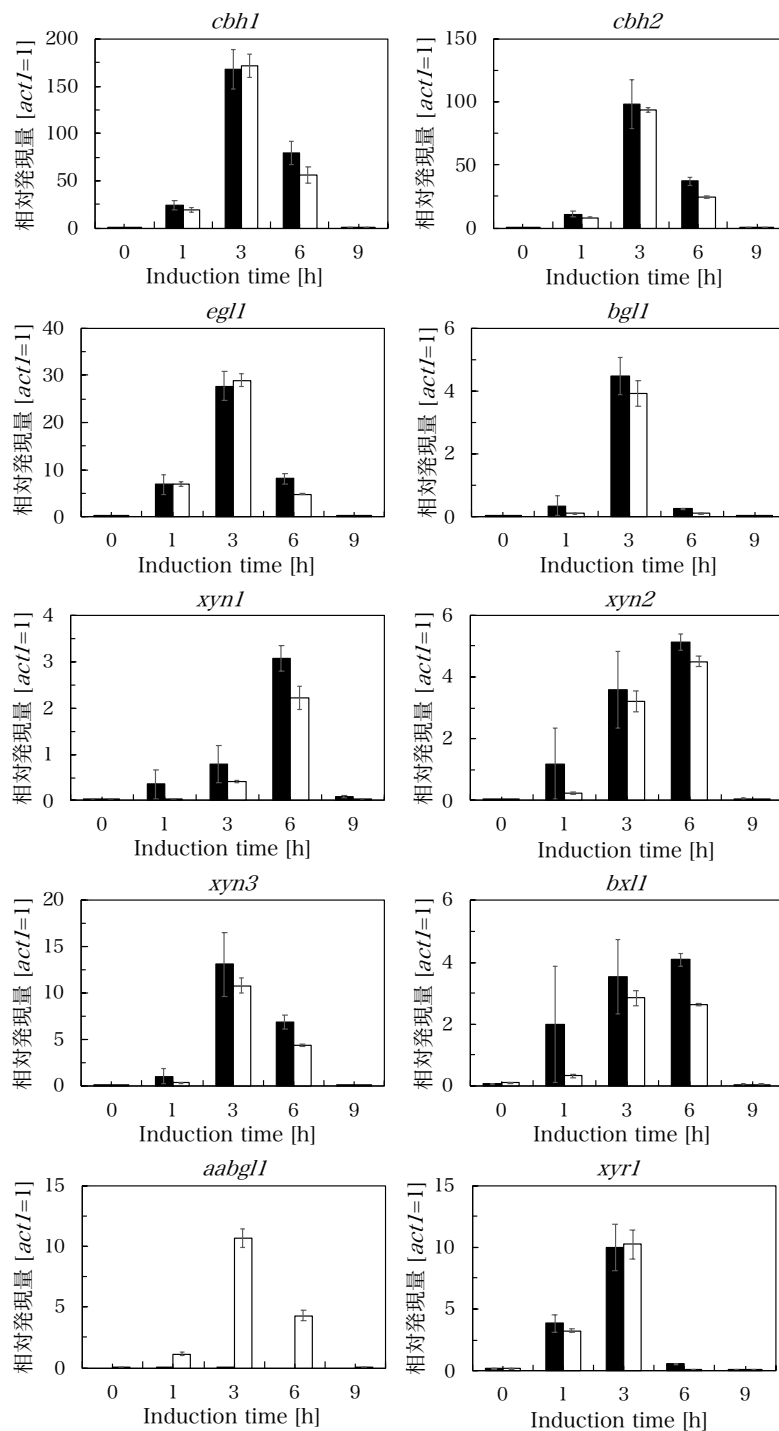


Fig. 2-9 ソフォロース誘導における PC-3-7 (black bar) および X3-2RB\_AB1 (white bar) の主要なセルラーゼおよびキシラナーゼ遺伝子発現のプロファイル

0.3% グルコース培地で前培養後、*T. reesei* 菌体を 0.01%  $\alpha$ -sophorose を含む誘導培地に移し、1 および 3、6、9 h 培養した。主要なセルラーゼおよびキシラナーゼ遺伝子に転写解析は qRT-PCR により行った。すべての値はハウスキーピング遺伝子 *act1* の発現により標準化した。各値は独立した 3 実験の平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。



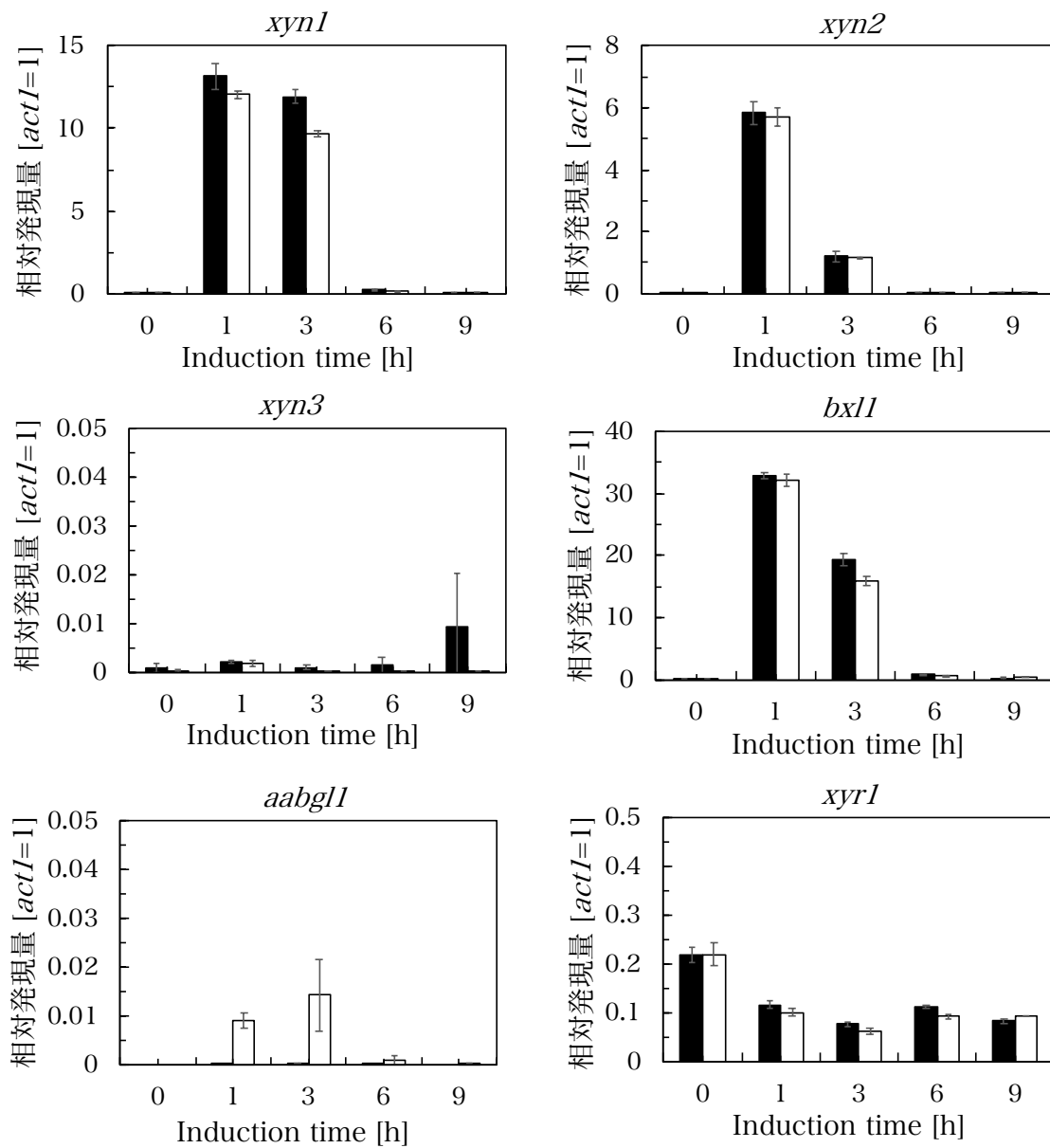


Fig. 2-10 キシラン誘導における PC-3-7 (black bar) および X3-2RB\_AB1 (white bar) の主要な糖質加水分解酵素遺伝子発現のプロファイル

0.3% グルコース培地で前培養後、*T. reesei* 菌体を 0.1% キシランを含む誘導培地に移し、1 および 3、6、9 h 培養した。*xyn1* および *xyn2*、*xyn3*、*bxl1*、*aabg1*、*xyr1* の転写解析は qRT-PCR により行った。すべての値はハウスキーピング遺伝子 *act1* の発現により標準化した。各値は独立した 3 実験の平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。

### 2.3.4. QM9414 における 2RBox プロモーターの制御下での AaBGLI の発現

PC-3-7 は QM9414 より 5 回の突然変異導入および選抜により作出された変異株である(77)。XYNIII は PC-3-7 では発現しているが、QM9414 では発現していない。だが一方で、XYNI は両株で発現している。それゆえに、もし QM9414 において 2RBox プロモーターが機能するならば、QM9414 より派生した他の変異株および遺伝子組み換え体にも遺伝子発現のためのプロモーターとして応用することが可能である。2RBox プロモーターの有用性を確認するため、2RBox プロモーターの制御下に *aabgl1* を導入した DNA フラグメントを QM9414 へと導入した。ランダムに 6 つの形質転換体を選択し、SDS-PAGE およびセロビアーゼ活性測定を行った(Fig. 2-11)。驚くべきことに、これらの形質転換体の上清の SDS-PAGE は約 130 kDa に AaBGLI のバンドが観察され、親株よりもかなり高いセロビアーゼ活性を示した(Fig. 2-11A)。セロビアーゼ活性は QM9414 と比べ最小で 20.1 倍(#7)、最大で 78.7 倍(#3)に増加していた(Fig. 2-11B)。これらの結果は 2RBox プロモーターが QM9414 において機能していることを示唆している。最も高いセロビアーゼ活性を示した #3 を選抜、QMX3-2RB\_AB1 株と命名し、そのセルラーゼ生産を解析した。

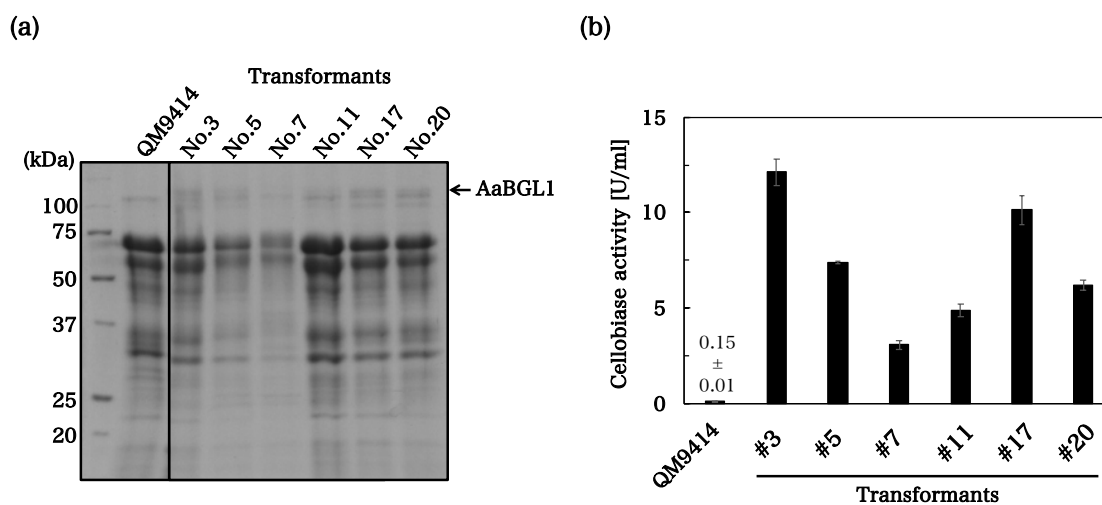


Fig. 2-11 QM9414 およびその派生菌株における SDS-PAGE およびセロビアーゼ活性

*T. reesei* QM9414 および 2RBox プロモーターの制御下で AaBGLI を発現させた形質転換体を 1% Avicel 培地で 5 日間培養した。(a) 培養上清(20  $\mu$ l)は 12.5% SDS-PAGE により解析された。(b) セロビアーゼ活性は培養上清を用いて測定した。各値は独立した 3 実験の平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す

サザンブロット解析により、QMX3-2RB\_AB1 ゲノム中に *aabgl1* 発現カセットが少なくとも 1 コピーで非相同的に *xyn3* ローカス周辺に導入されていることを確認した(data not shown)。ウェスタンブロット解析の結果、QMX3-2RB\_AB1 由来の培養上清から AaBGLI のシグナルが検出された(Fig. 2-12B)。培養上清の SDS-PAGE 解析の結果、その他

のバンドパターンは QM9414 とほぼ同じであった(Fig. 2-12A)。QMX3-2RB\_AB1 は QM9414 とほぼ同等のタンパク質量を示したが、Avicelase および CMCase、セロビアーゼ、xylanase 活性は QM9414 より高かった(Table 2-3)。また、QMX3-2RB\_AB1 はどちらの培地条件でも同様のセロビアーゼ活性を示した(Table 2-3)。

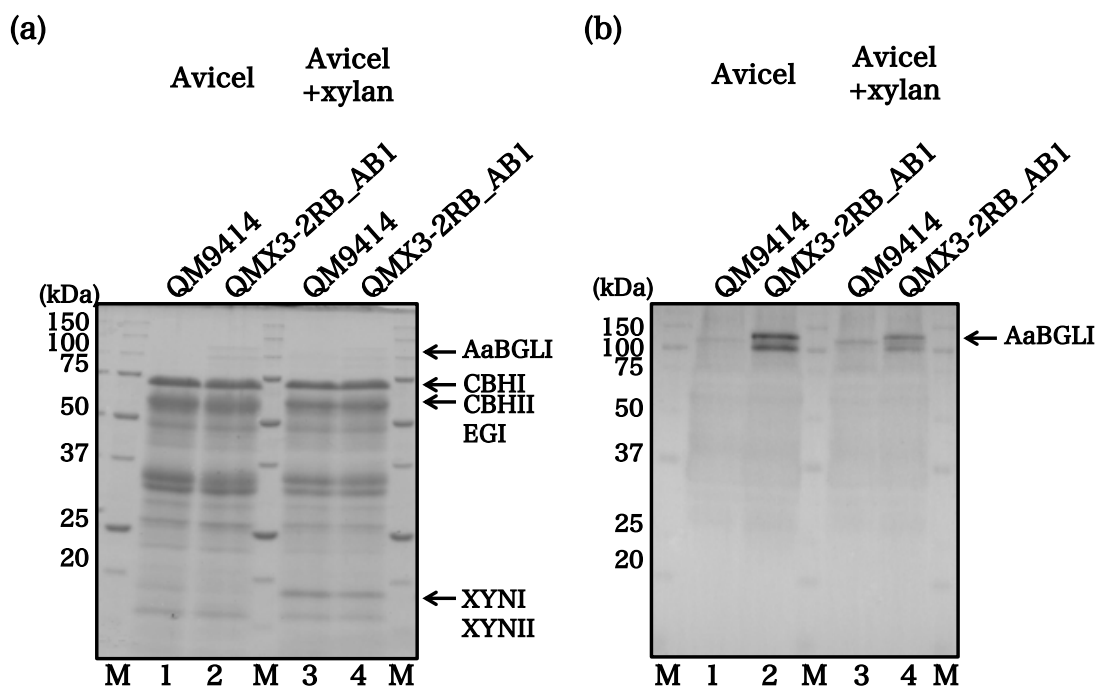


Fig. 2-12 QM9414 および QMX3-2RB\_AB1 の SDS-PAGE およびウェスタンブロット解析  
*T. reesei* QM9414 (lanes 1, 3)および QMX3-2RB\_AB1 (lanes 2, 4)を 1% Avicel (lanes 1, 2)または 1% Avicel + 0.5% xylan (lanes 3, 4)培地で 5 日間培養した。培養上清(20  $\mu$ l)は 12.5% SDS-PAGE により解析された。異種宿主発現された *A. aculeatus* BGLI および XYNI、XYNII、CBHI、CBHII、EGI は図中に示した。

Table 2-3 QM9414 および QMX3-2RB\_AB1 の酵素活性

	Culture condition	Protein concentration	avicelase activity	CMCase activity	cellobiase activity	xylanase activity
		mg/ml	[U/ml]	[U/ml]	[U/ml]	[U/ml]
QM9414	Avicel	0.93 $\pm$ 0.01	0.629 $\pm$ 0.013	30.1 $\pm$ 0.8	0.390 $\pm$ 0.041	55.7 $\pm$ 1.9
	Avicel + xylan	0.85 $\pm$ 0.03	0.639 $\pm$ 0.006	28.3 $\pm$ 0.8	0.251 $\pm$ 0.008	95.7 $\pm$ 2.1
QMX3-2RB_AB1	Avicel	0.97 $\pm$ 0.01	0.859 $\pm$ 0.047	35.3 $\pm$ 0.5	13.9 $\pm$ 2.4	59.9 $\pm$ 0.2
	Avicel + xylan	0.88 $\pm$ 0.02	0.781 $\pm$ 0.032	29.6 $\pm$ 1.9	12.5 $\pm$ 0.7	90.4 $\pm$ 6.7

*T. reesei* を 1% Avicel または 1% Avicel+0.5% xylan 培地で 5 日間培養した。各値は独立した 3 実験の平均値である。

さらに、QM9414における転写レベルでの *xyn3* 改変プロモーターの有用性を確認するため、PC-3-7 と同様にソフォロースまたはキシランによる誘導試験を行った。ソフォロース誘導の結果、QMX3-2RB\_AB1 における *cbh1* の転写量は親株と同等であった(Fig. 2-13)。さらに、*aabgl1* の発現が QMX3-2RB\_AB1 で観察された。*xyn3* は QM9414 においてかなり低いレベルで発現していたが、QMX3-2RB\_AB1 では発現していなかった(Fig. 2-13)。キシラン誘導では、QMX3-2RB\_AB1 は親株と比べ *xyn1* の低い転写量を示した(Fig. 2-14)。また、QMX3-2RB\_AB1 において、*aabgl1* の発現が *xyn1* の発現量と同等であった。

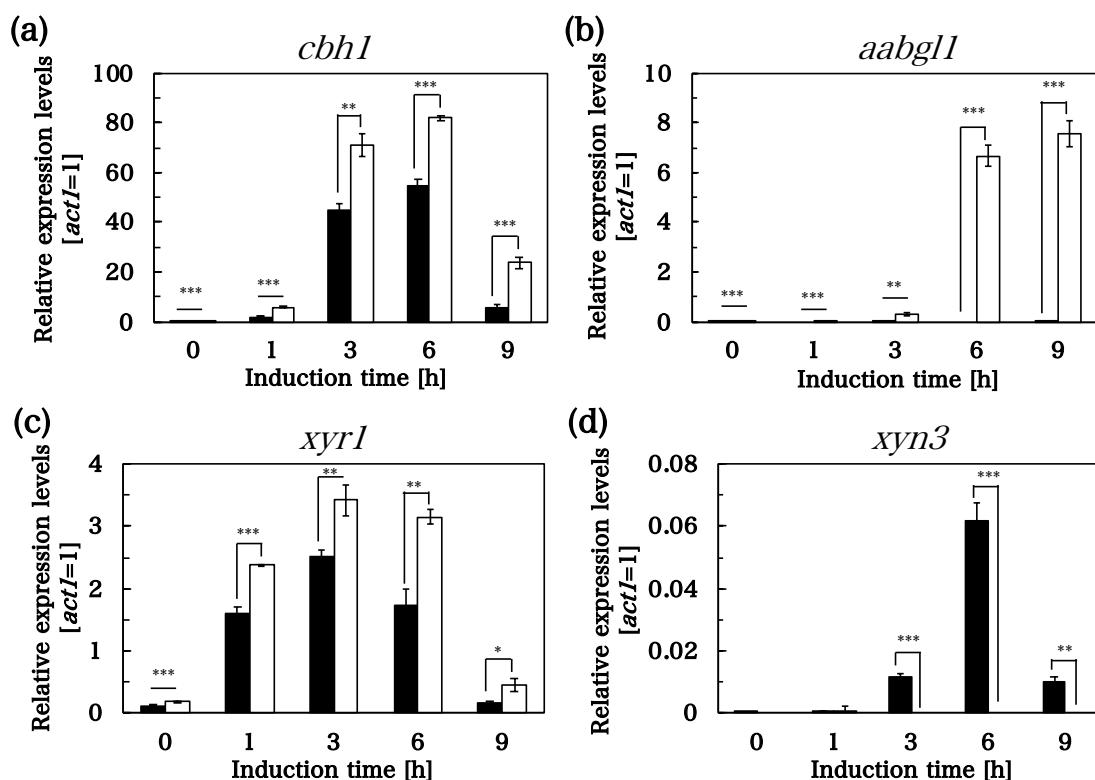


Fig. 2-13 ソフォロース誘導における QM9414 (black bar) および QMX3-2RB\_AB1 (white bar) の主要なセルラーゼおよびキシランナーゼ遺伝子発現のプロファイル

0.3% グルコース培地で前培養後、*T. reesei* 菌体を 0.01%  $\alpha$ -sophorose を含む誘導培地に移し、1 および 3、6、9 h 培養した。主要なセルラーゼおよびキシランナーゼ遺伝子に転写解析は qRT-PCR により行った。すべての値はハウスキーピング遺伝子 *act1* の発現により標準化した。各値は独立した 3 実験の平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。QM9414 および QMX3-2RB\_AB1 間の発現の違いは Student's t test により統計学的な有為であることを確認した。\*\* P < 0.01; \*\*\* P < 0.001

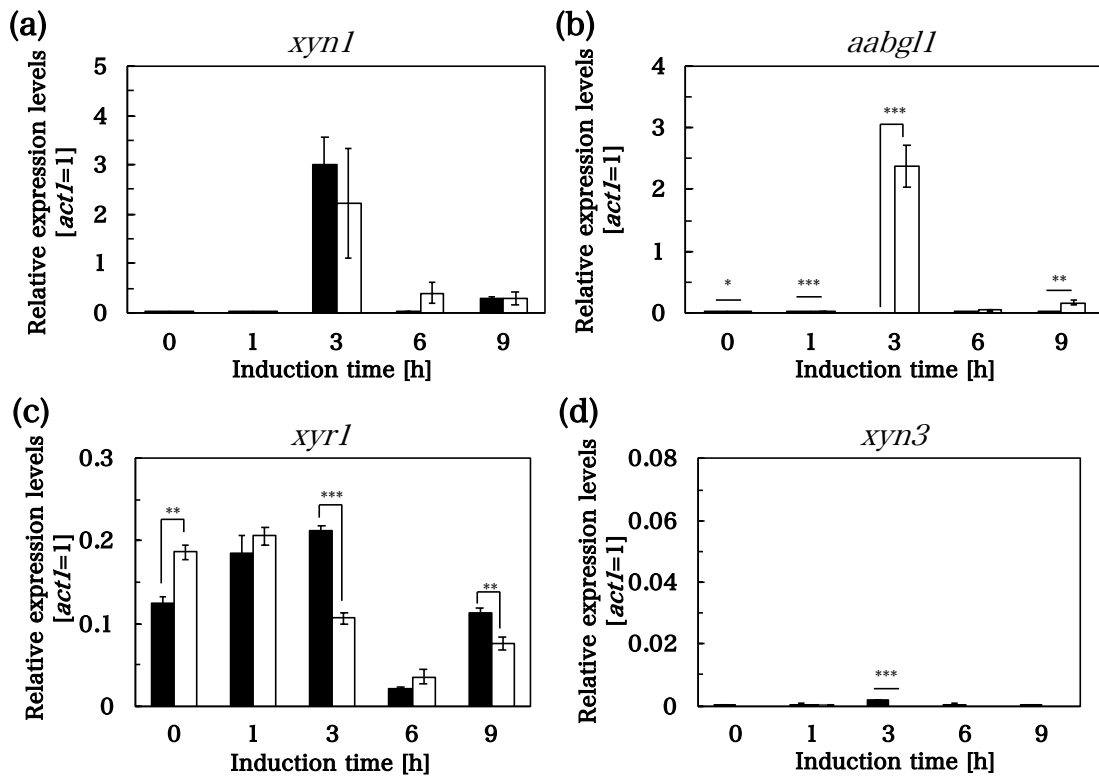


Fig. 2-14 キシラン誘導における QM9414 (black bar) および QMX3-2RB\_AB1 (white bar) の主要な糖質加水分解酵素遺伝子発現のプロファイル

0.3% グルコース培地で前培養後、*T. reesei* 菌体を 0.1% キシランを含む誘導培地に移し、1 および 3、6、9 h 培養した。*xyn1* および *xyr1*、*xyn3*、*aabgl1* の転写解析は qRT-PCR により行った。すべての値はハウスキーピング遺伝子 *act1* の発現により標準化した。各値は独立した 3 実験の平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。QM9414 および QMX3-2RB\_AB1 間の発現の違いは Student's t test により統計学的な有意であることを確認した。\*\* P < 0.01; \*\*\* P < 0.001

## 2.4. 考察

*xyn3* はセルラーゼ遺伝子と協調的に発現しており、他の 2 つ主要なキシラナーゼ遺伝子の制御メカニズムとは異なる制御メカニズムであることが示唆されている(31)。*xyn3* の発現はキシラナーゼであるにも関わらずキシラン系基質では誘導されない(21)。一方で、*xyn1* および *xyn2* はセルラーゼ遺伝子や *xyn3* と異なりセルロース系およびキシラン系基質の両方で誘導される。しかしながら、セルロース系、キシラン系基質による誘導メカニズムの違いは明らかとなっていない。これらキシラナーゼ遺伝子のプロモーター領域のシス配列は類似している。*xyn3* シス配列は 2 つの Xyr1 結合モチーフとそれを分ける 16 塩基のスペーサー配列からなり(72)、*xyn1* シス配列は 2 つの Xyr1 結合モチーフとそれを分ける 10 塩基のスペーサー配列からなるモチーフおよびその周辺の Cre1 結合サイト、CCAAT 配列で構成される(70)。そのため、*xyn3* プロモーターのシス配列(セルロース系基質でのみ

誘導)を *xyn1* プロモーターのシス配列(セルロース系、キシラン系基質で誘導)と置換することで(Fig. 2-4a)、キシラン系基質に対する誘導メカニズムの一端の解明を目指した。XREG および RXREG (*xyn1* シス配列周辺の領域すべて(*xyn1* シス配列および CreI 結合サイト、CCAAT 配列)と置換)の実験の結果は *xyn1* および *xyn3* の2つの Xyr1 結合配列を隔てるスペーサー配列の長さの違いはプロモーター強度に重要ではないことを示唆している。さらに、XREG および RXREG においてキシラン系基質での誘導能は存在しなかったことから(Fig. 2-5b)、CreI 結合サイトおよび CCAAT BOX はキシラン誘導に影響を与えないことが示唆された。Xyr1 は両方の GGCTAA モチーフと相互作用することができ、Xyr1 が GGCTAA の逆向き反復配列にホモダイマーとして結合し *xyn1* 発現を活性化すると推測されている(70)。さらに、下流領域の GGCTAA への AceI の特異的な結合も証明されている(70)。そのため、GGCTAA エlementでの Xyr1 と AceI の競合が *xyn1* の誘導時に生じていることが推察されている。本章では *xyn1* シス配列を正向きに1つまたは2つ持つ *xyn3* 改変プロモーター1Box、2Box、相補的に1つまたは2つ持つプロモーター1RBox、2RBox を構築した(Fig. 2-4a)。これらのプロモーターの能力はセルロース系基質では *xyn1* シス配列数の倍加により増加し、L-sorbose 誘導は挿入の方向に依存して変動した。さらに、キシラン系基質による誘導は 1RBox および 2Box、2RBox で確認されたが、1Box では見られなかった(Fig. 2-5b)。驚くべきことに、1Box と 1RBox 間の違いは 10 bp のスペーサー配列だけである(Fig. 2-4a)。これらの結果は *xyn1* シス配列のスペーサー配列がキシラン系基質による誘導に重要な役割を持っていることを示している。また、1Box と 2Box 間に至っては、同様のスペーサー配列を持ち Xyr1 結合モチーフの数しか違いは存在しない。そのため、キシラン誘導に与えるスペーサー配列の影響は Xyr1 の結合に関係があるかもしれない。以前にセルラーゼ、キシラナーゼ遺伝子のプロモーター領域中の Xyr1 結合モチーフの逆向き反復配列を探索した結果、*cbh1* および *egl1*、*xyn1*、*xyn2*、*xyn3* のプロモーター領域のみで見出された(35)。さらに、他のキシラナーゼ遺伝子のの上流領域には Xyr1 結合モチーフの逆向き反復配列は存在しなかった。これらの結果はキシラン系基質によるキシラナーゼ遺伝子発現のために Xyr1 の結合がその結合配列の逆向き反復配列に限定されないことを示唆している。しかしながら、本章の結果からキシラン系基質による誘導能は *xyn1* プロモーター由来の逆向き反復配列の導入のみで獲得されることが明らかとなった(Fig. 2-5b)。そこで、3つのキシラナーゼ遺伝子プロモーターの Xyr1 結合モチーフの逆向き反復配列間でスペーサー配列の比較を行った。しかしながら、セルロース系およびキシラン系基質で誘導される *xyn1* および *xyn2* の間でスペーサー配列に保存されている領域はなかった。これはいまだ同定されていない制御メカニズムがキシラン系基質による誘導のために必要であることを示唆している。キシラン系基質による遺伝子発現制御に与えるシス配列

の影響に関する詳細な解析によってさらなる知見が得られるだろう。

2Box および 2RBox は高いキシラン誘導能を有していた(Fig. 2-5b)。これは Xyr1 結合サイト数がキシラン誘導に影響を与えることを示唆する。そのような影響は *A. oryzae* においてアミラーゼ遺伝子をコードする *amyB*, *glaA*, *agdA* のプロモーター領域中に保存されている配列(regionIII: 複数のアミラーゼ遺伝子のプロモーター中に保存されている転写活性化因子結合サイト)で報告されている。*agdA* プロモーターへ regionIII のマルチコピーの導入はプロモーター活性の劇的な増加となった(155)。*T. reesei* において、*cbh1* プロモーター中に CCAAT ボックスと Ace2 結合サイトを含む-820 bp から-620 bp のシス配列がある。Liu et al. (156)は *cbh1* プロモーターにおいて Cre1 結合サイトの削除および *cbh1* シス配列のコピー数の増加によってプロモーター強度を増強できることを報告している。これらの報告はプロモーター活性がシス配列数の増加にともない高められることを示唆する。さらに、*A. oryzae* のエノラーゼをコードする構成的遺伝子のプロモーター活性は 12 個の regionIII をタンデムに導入することにより増加させることが可能だった。これらのプロモーターの活性は挿入の方向に依存して変化した(157)。これは挿入された領域の方向が転写調節因子の結合に影響を与えることを示唆している。

これまでに、当研究室では *A. aculeatus* BGLI を発現する PC-3-7 株を構築してきた(93, 94, 158)。このような高糖化酵素生産菌株はセルラーゼだけでなくキシラナーゼも生産させるためセルロース系およびキシラン系基質の両方またはバイオマスを含む培地で培養される。しかしながら、X3AB1 (*xyn3* プロモーターの制御下で AaBGLI を発現)および E1AB1 (*egl1* プロモーターの制御下で AaBGLI を発現)はセルロースでのみ AaBGLI を生産する。それゆえに、キシランを含むバイオマスに対する糖化能を改善するためセルロースおよびキシランの両方で AaBGLI を生産できる株の構築を目指していた。本章では、2RBox プロモーターの制御下で AaBGLI を発現させた形質転換体 X3-2RB\_AB1 を構築した。X3-2RB\_AB1 はセロビアーゼ活性が増強されているとともに親株と同等のキシラナーゼ活性を持つのに対して、キシラン誘導条件において *xyn3* 以外のキシラナーゼ遺伝子が PC-3-7 で誘導されていた(Fig. 2-10)。X3-2RB\_AB1 において 2RBox プロモーターの制御下で *aabgl1* はキシラン系基質により誘導されていた(Fig. 2-10)。X3AB1 や E1AB1 のようなこれまでに構築された AaBGLI 発現株(93, 94)と比較して、2RBox プロモーターを使用した菌株はセルロース系バイオマスの分解にとってより有益なものである可能性がある。実際、JN14 (X3-2RB\_AB1 により生産された酵素標品)は JN13 (E1AB1 により生産された酵素標品)と同等の高い糖化能力を示した(94)(Fig. 2-8)。これは 2RBox プロモーターが酵素発現のための効率的なプロモーターであることを示している。

QM9414 においては、*xyn3* 遺伝子発現はどのような誘導基質でもほとんど検出

することができない(31)。そのため、*xyn3*プロモーターはQM9414では機能することができないと示唆されていた。しかしながら、*xyn3*発現はQM9414の親株であるQM6aでは観察される(17)。PC-3-7はQM9414と比較して260もの一塩基多型の存在が明らかとなっている(82)。QM9414の*xyn3*の上流領域やORFの配列はPC-3-7のものと同じであることが報告されている(71)。さらに、Furukawa et al. (35)はXyr1が*xyn3*シス配列に結合することを報告した。そのため、未知の*xyn3*特異的な制御因子の存在が以前から示唆されていた(72)。これまでに、行われた変異株の比較ゲノム解析から、*cre1*や*bglr*、*bgl2*の変異がPC-3-7に高いセルラーゼ生産能をもたらすことが明らかとなっている(62, 82, 83)。しかしながら、これらの研究からはPC-3-7の*xyn3*発現の回復の原因を明らかにできていない。QM9414由来の形質転換体であるQMX3-2RB\_AB1はソフォロース、キシランの両方で*aabgl1*発現を示した(Fig. 2-13, 14)。特に、キシラン誘導時の*aabgl1*の発現量はQMX3-2RB\_AB1では*xyn1*の発現量と同等であった(Fig. 2-14)。しかしながら、X3-2RB\_AB1(PC-3-7由来)では、*xyn1*の発現量と比べて*aabgl1*の発現量はかなり低かった(Fig. 2-10)。PC-3-7の*xyn1*発現量はQM9414のものに比べて劇的に増加しているため、X3-2RB\_AB1とQMX3-2RB\_AB1の間の*aabgl1*発現の違いはPC-3-7の高められたキシラナーゼ生産能の影響かもしれない。*xyn3*プロモーター由来の2RBoxプロモーターがQM9414においてどのようにして機能するのか明らかにするためには、QM9414のGUSレポーター菌株を構築し解析していく必要がある。

セルラーゼ遺伝子発現はQM9414とQMX3-2RB\_AB1で同様であった(Fig. 2-13)。しかしながら、QMX3-2RB\_AB1のキシラナーゼ遺伝子の発現量はQM9414とくらべわずかに低かった(Fig. 2-14)。キシラナーゼ誘導の減少は*T. reesei*ゲノム中に*xyn3*プロモーターがマルチコピーで存在するために引き起こされたと推測される。Furukawa et al. は*xyn1*シス配列には*xyn3*シス配列よりも強くXyr1と結合することを示唆している(35)。それゆえに、2RBoxの利用により*xyn1*シス配列の*T. reesei*ゲノム中での増加によってXyr1のタイトレーションが生じたかもしれない。2RBoxプロモーターはXyr1の強い結合能によってQM9414でも機能しているのかもしれない。

JN14での2RBの動きがおかしいことの考察



### 第3章 *T. reesei* の pH 応答に関する研究

### 3.1. 緒言

2章において、プロモーター中のシス配列の置換により誘導能の改変が可能であることが示唆された。これまでも述べたとおり、工業用糖化酵素生産菌株の開発ではしばしばセルラーゼプロモーターの制御下で有用酵素を発現させるが、転写活性化因子のタイトレーションが引き起こされることも多い。そこで、セルラーゼ生産に種々の環境因子応答性のメカニズムや転写調節因子を利用することができれば、タイトレーションの問題が解決され、異種由来の高活性、高耐性を示す高機能な酵素を産出する工業用糖化酵素生産菌株の開発が可能となるかもしれない。しかしながら、*T. reesei*は炭素源以外の環境因子に対する応答機構に関する知見があまりにも少ない。1章で述べたように、*A. nidulans*のようなモデル糸状菌においては、種々の環境因子に対する応答機構が解析されており、一部は糖質加水分解酵素の発現にも関与することが知られている。これらの発現制御は炭素源による制御とは異なるため、その他の環境因子に応答するセルラーゼ生産制御機構の理解も重要である。

PC-3-7株は工業用糖化酵素生産菌のベースとして使用されている。前述のように *xyn3* (X3AB1株)や *egl1* (E1AB1株)、*cbh1* (C1AB1株)、*xyn3-2RB* (X3-2RB\_AB1株)プロモーターの制御下で高機能なBGLを発現させたPC-3-7株を構築しており、劇的にセロビアーゼ活性およびバイオマスの糖化能を向上させてきた(93, 94)。X3AB1株によって生産される酵素標品JN11は水熱処理バイオマスのようなセルロースのみを含む前処理バイオマスに対して最も高い糖化能を示した(93)。一方で、E1AB1株によって生産される酵素標品JN13HはNaOH処理バイオマスのようなセルロースおよびヘミセルロースを含む前処理バイオマスに対する糖化能が劇的に改善していた(94)。この糖化能の違いは酵素比率の変化により引き起こされていると推測される。これらのことから、各前処理バイオマスに対して最適な酵素比率を持つセルラーゼ標品を分泌することができる工業用菌株の開発が望ましい。それゆえに、セルラーゼ、ヘミセルラーゼの工業的利用のために分泌酵素の割合をコントロールするメカニズムの解析は非常に重要である。PC-3-7株は長い間、誘導基質応答性、遺伝子制御、ゲノム解析など様々な解析が行われてきた。しかしながら、これまでの解析は他の環境因子でも表現型が変化するにもかかわらず、炭素源を用いたセルラーゼ生産に関する領域しか行われていない。日本の多くの工業用菌株はPC-3-7を親株として作出されていることから、PC-3-7の基礎的な特徴を理解することは工業用糖化酵素生産菌株の産業的応用において非常に重要である。

培養時のpHは*T. reesei*の酵素生産において重要な因子の一つである。*T. reesei* Rut C-30株のキシラナーゼ生産はpH 6.0から7.0の高pHを好み、それに対してセルラーゼ生産はpH 4.0のような低pHで最も生産されると報告されている(111)。さらに、ラクトース培地でのキシラナーゼ(XYNI~III)の生産は各酵素の至適pHで培養するとき最も生産

されると報告されている(112)。また、pH による糖質加水分解酵素の分泌の変化は QM6a および QM9414、Rut C-30、QM9414MG5 のセクレトーム解析からも示されている(113)。これらのことは、培養 pH の変更により酵素比率の操作が可能であることを示している。それゆえに、*T. reesei*における pH 応答の理解は *T. reesei*のよりよい産業利用性を向上させると推測される。

日本型変異株 PC-3-7 の pH 依存的セルラーゼ生産もその親株である QM9414 とは異なることが示されている(77, 115)。PC-3-7 株は pH 4.0 から pH 5.0 や 6.0 のような高 pH へとシフトさせることにより高い BGL 活性を示す(115)。興味深いことに、PC-3-7 株には *pacI* 遺伝子や pH シグナル伝達に關与する *pal* 遺伝子群のホモログには変異が生じていないことが明らかとなっている(159)。それゆえに、PC-3-7 の pH 依存的セルラーゼ生産メカニズムは PACI 制御システムに依存していない別のメカニズムの存在を示している。この新規のメカニズムの解明は工業用菌株の改良において重要な知見を得ることができるだろう。しかしながら、日本型変異株の pH 依存的なセルラーゼ生産性についての詳細な解析は行われていない。

本章では、pH 依存的セルラーゼ生産メカニズムの新たな知見を獲得するため、異なる *T. reesei* 変異株を評価した。その結果、変異株における pH 依存的な表現型とセルラーゼ生産能の違いは菌株開発の早期でもたらされていることが示唆された。

## 3.2. 実験操作

### 3.2.1. *T. reesei* 変異株と培養条件

*T. reesei* 野生株 QM6a (ATCC13631) およびその変異株 QM9414 (ATCC 26921)、N-25、K-14、KDG-12、PC-3-7 (ATCC66589) は花王株式会社(Tokyo, Japan) より提供された。QM9414 $\Delta$ P および PC-3-7 $\Delta$ KP [*pyr4* 遺伝子破壊株(83)]、N-25 は形質転換体の親株として利用した。これらの菌株は Difco™ Potato Dextrose Agar (PDA; BD, NJ, USA) プレート培地にて生育させ、分生子は使用時まで 10% グリセロールを含む 0.9% NaCl 溶液中で -80 °C で保存した。セルラーゼ生産のために、 $1 \times 10^7$  個の分生子を酒石酸バッファーにて pH 3.5-5.5 に調整された 1% Avicel を炭素源として含む basal medium にて 28 °C、220 rpm で 5 日間培養を行った(160)。培養上清はミラクロス(Merck Millipore, MA, USA)を用いたフィルターろ過により回収し、酵素標品として使用した。転写解析に使用するため、菌糸はミラクロスによるフィルターろ過により回収し、直ちに液体窒素により凍結した。

### 3.2.2. 遺伝子破壊プラスミドの構築

本実験では、*pac1* および *tr22911*, *tr120879*, *tr22009*, *tr61550*, *tr62938*, *tr121960*, *tr75416* の破壊カセットを構築した(Fig. 3-1-3)。 *pac1* 破壊カセット構築のため、 *pac1* 遺伝子の 1.5 kbp 上流領域および 1.6 kbp 下流領域を QM9414 ゲノムを鋳型として PCR により増幅した。その際、EcoRI サイトを上流領域の 5'末端および下流領域の 3'末端に付加した。 *pyr4* 選択マーカーは EcoRV 消化により pU*pyr4* (83)から獲得した。 pUΔ*pac1pyr4* を構築するため、これらの DNA 断片は pUC118 (Takara Bio, Shiga, Japan)の HincII サイトへ In-Fusion cloning kit を用いて *pac1* 上流領域、 *pyr4* マーカー、 *pac1* 下流領域の順で挿入した(Fig. 3-1)。

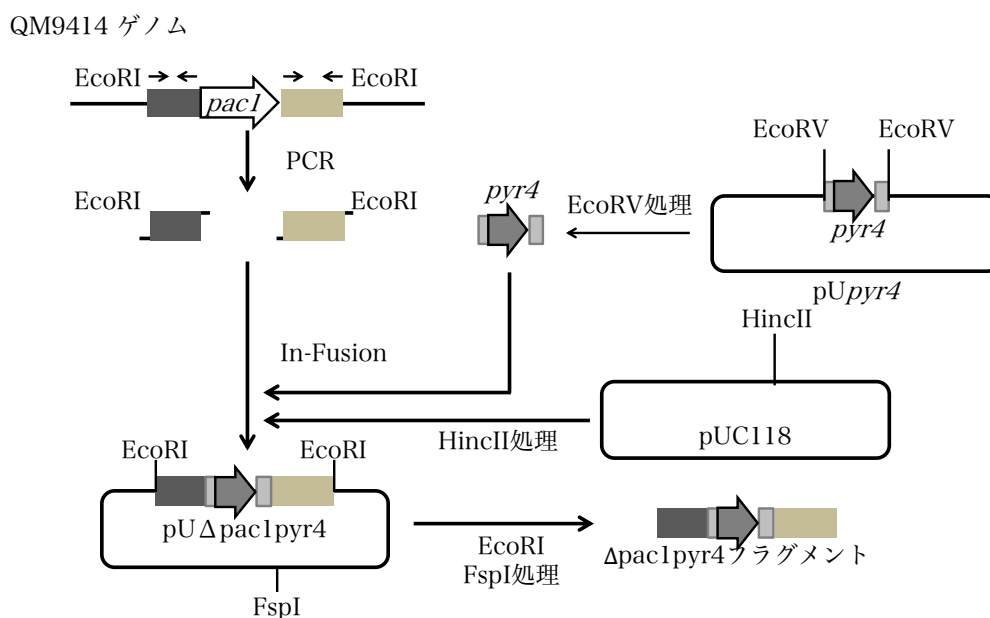


Fig. 3-1 pUΔ*pac1pyr4* の構築方法

*tr22911*, *tr22911*, *tr120879*, *tr22009*, *tr61550*, *tr121960* 破壊カセット構築のため(Fig. 3-2)、各遺伝子の 1.5 kbp 上流領域および ORF、1.8 kbp 下流領域を含む DNA 断片を QM9414 ゲノムを鋳型にして PCR により増幅した。その DNA 断片の両端には ScaI サイトを付加し、 *tr62938* の PCR 産物のみ XmnI サイトを付加した。この産物を In-Fusion cloning kit を用いて pUC118 の HincII サイトにクローニングした。得られたプラスミドを pU*tr22911* および pU*tr22911*, pU*tr22911*, pU*tr120879*, pU*tr22009*, pU*tr61550*, pU*tr121960* とし、それぞれ ORF を取り除くため、インバース PCR を行った。 *pyr4* 選択マーカーをインバース PCR 産物へと In-Fusion cloning kit を用いて挿入し、 pUΔ*tr22911pyr4* および pUΔ*tr22911pyr4*, pUΔ*tr22911pyr4*, pUΔ*tr120879pyr4*, pUΔ*tr22009pyr4*, pUΔ*tr61550pyr4*, pUΔ*tr121960pyr4* を獲得した(Fig. 3-2)。

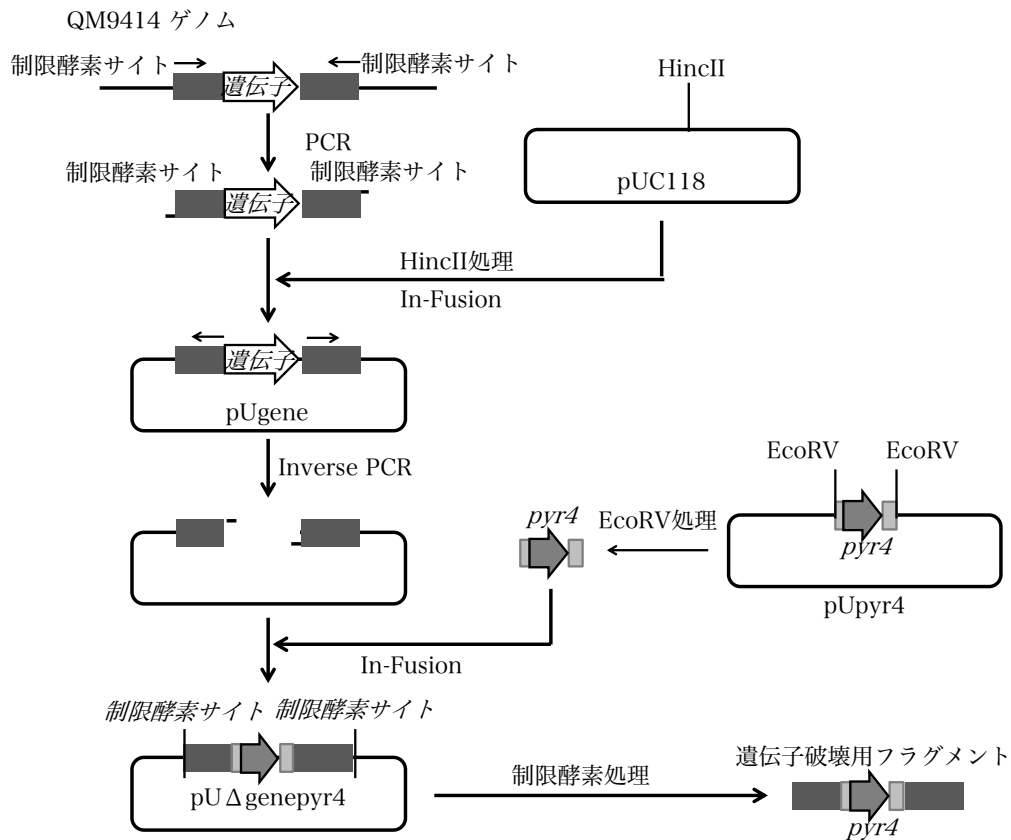


Fig. 3-2 SNP 遺伝子破壊用プラスミドの構築方法

*tr76418(ace1)*破壊カセット構築のため、1.9 kbp の上流領域および *ace1* ORF、2.5 kbp の下流領域を含む DNA 断片を PC-3-7 ゲノムを鋳型とし PCR により増幅した。その DNA 断片の両端には BamHI サイトを付加した。pUace1 を得るため、この PCR 産物を pUC118 の HincII サイトへと挿入した。開始コドンを含む *ace1* の一部を取り除くため、pUace1 は *ace1* 上流領域と ORF に存在する BglII サイトで切断し、セルフライゲーションを行った(pUace1Bg)。その後、*amdS* 選択マーカー(pBamdS (83))を SpeI、XbaI にて消化し獲得)を pUace1Bg の PshA1 サイトに挿入した。得られたプラスミド pUΔace1amdS を NsiI、FspI により消化し、*ace1* 破壊用フラグメントを獲得した(Fig. 3-3)。

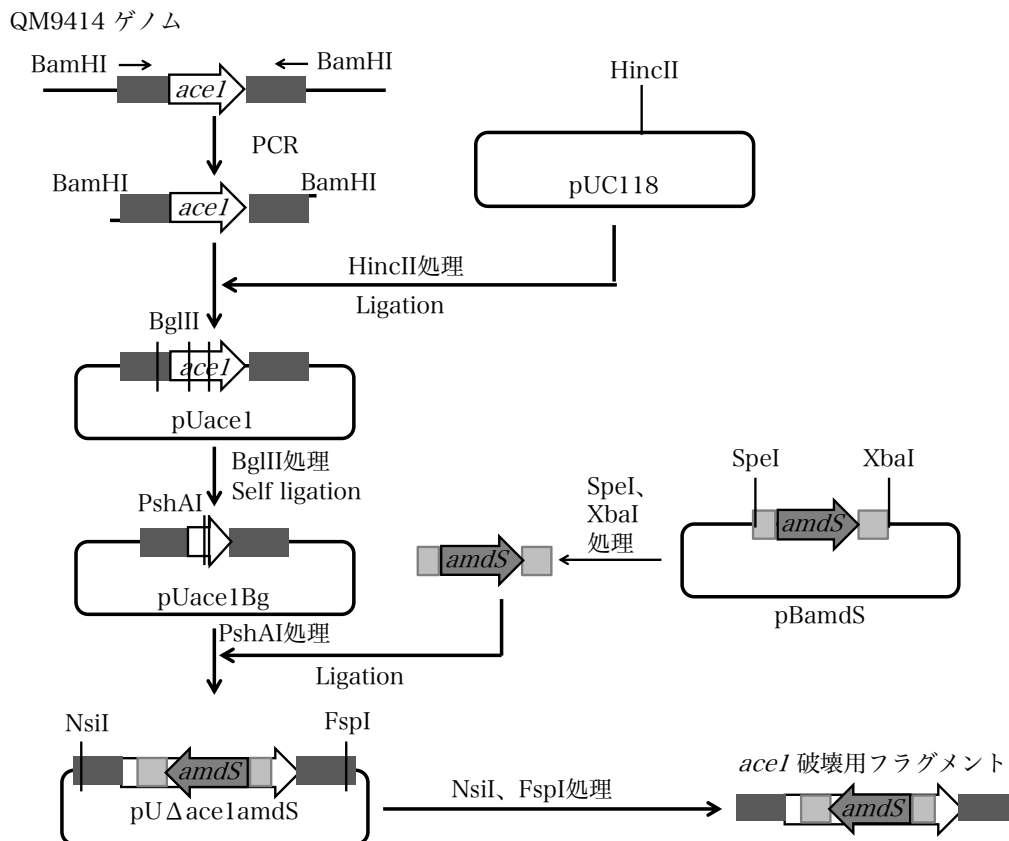


Fig. 3-3 pUΔace1amdS の構築方法

N-25 株を親株として *pyr4* マーカーを使用し形質転換を行うためには、この菌株のウリジン要求株を準備する必要がある。次の DNA フラグメントは分子内相同組換え(151)を通して *pyr4* 破壊カセットを構築するために準備した。1.9 kbp の *pyr4* 上流領域および *pyr4* ORF、0.5 kbp の下流領域を含むおよそ 4.7 kbp の DNA 断片、終止コドンから 0.5 kbp-1.5 kbp の *pyr4* 下流領域を PCR により増幅し、SpeI サイトを上流領域の 5' 末端および下流領域の 3' 末端に付加した。0.5 kbp DNA 断片(開始コドンから -722 bp--1221 bp の領域)は PCR により増幅され、ダイレクトリピートとして使用した。*amdS* 選択マーカーは pUamdSF を FspI で消化し獲得した(82)。これら 4 つの DNA 断片を pUC118 の HincII サイトへと Gibson Assembly Cloning Kit (New England Biolabs, Hitchin, UK)を用いて 4.7 kbp DNA 断片、*amdS* マーカー、ダイレクトリピート、1 kbp 下流領域の順で挿入した。獲得したプラスミドは pUΔpyr4amdSRM とし、SpeI により 8.1 kbp の DNA 断片を獲得した(Fig. 3-4)。このフラグメントはプロトプラスト-PEG 法にて N-25 に導入した。形質転換体はサザンブロット解析により相同組み換えにより挿入されていることを確認し、N-25pyr4amdSRM と名付けた。本章でプラスミド構築のために使用したプライマーは Table 3-1 に示した。

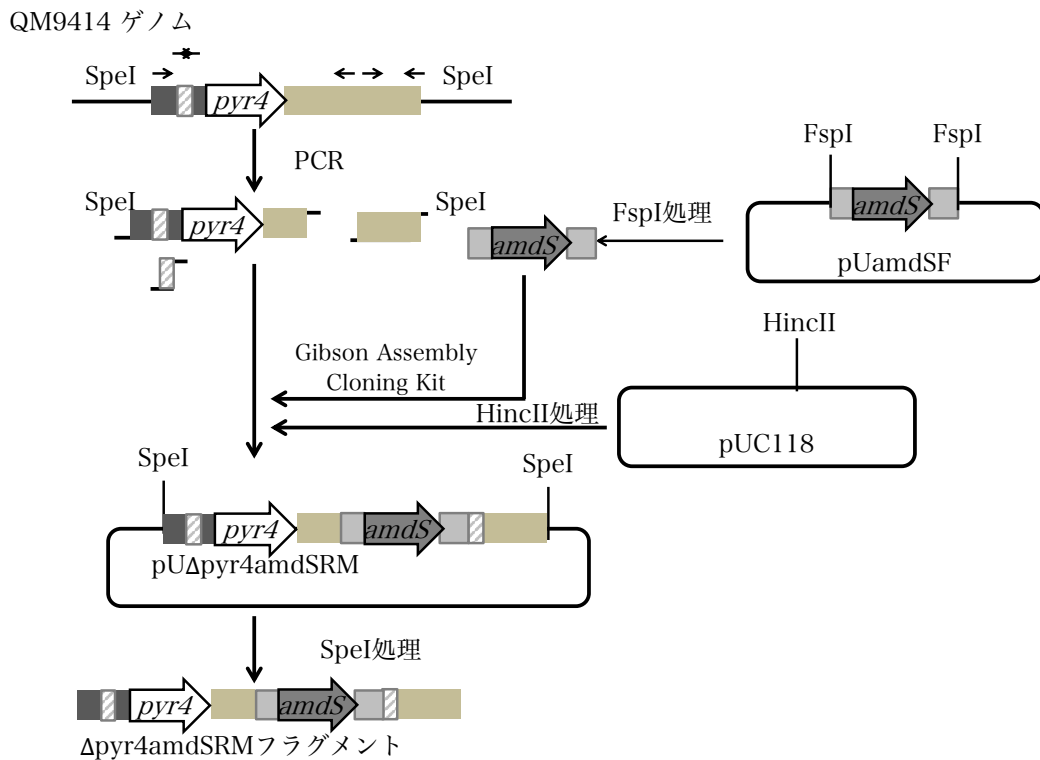


Fig. 3-4 pUΔpyr4amdSRM の構築方法

また本実験では、*tr120879* および *tr22009* の野生型タンパク質発現カセットを構築した(Fig. 3-5, 6)。*tr22009* 発現カセット構築のため(Fig. 3-5)、QM9414 ゲノムを鋳型として 1.5 kbp の *tr22009* 上流領域および *tr22009* ORF、0.5 kbp の下流領域を含む DNA 断片、終止コドンから 0.5 kbp-1.5 kbp の *tr22009* 下流領域を PCR により増幅し、*ScaI* サイトを上流領域の 5'末端および下流領域の 3'末端に付加した。*pyr4* 選択マーカーは pUpyr4 を *EcoRV* で消化し獲得した(82)。これら 4 つの DNA 断片を pUC118 の *HincII* サイトへと Gibson Assembly Cloning Kit を用いて上流領域および ORF を含む DNA 断片、*pyr4* マーカー、1 kbp 下流領域の順で挿入した。獲得したプラスミドは pUwtr22009pyr4 とし、*ScaI* により 7.0kbp の DNA 断片を獲得した。このフラグメントはプロトプラスチド-PEG 法にて N-25ΔPA に導入した。形質転換体はサザンブロット解析により相同組み換えにより挿入されていることを確認し、変異点はシーケンス解析により野生型に復帰していることを確認した。

QM9414 ゲノム

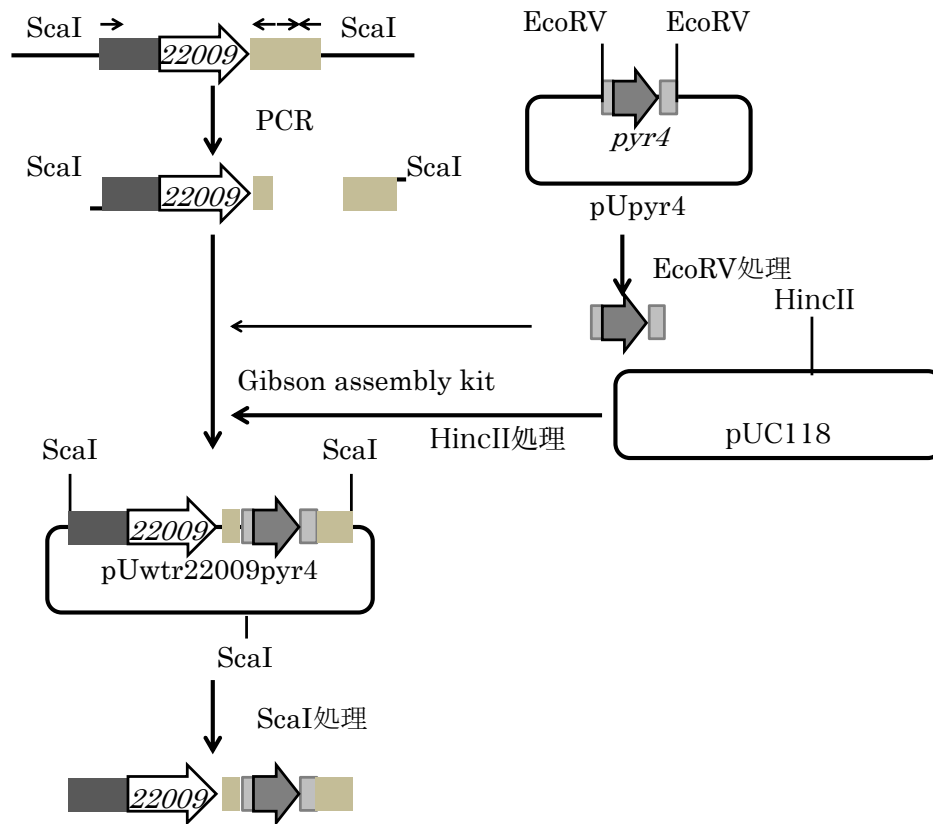


Fig. 3-5 pUwtr22009pyr4 の構築方法

*tr120879* 発現カセット構築のため(Fig. 3-6)、QM9414 ゲノムを鋳型として 1.5 kbp の *tr120879* 上流領域および *tr120879* ORF、0.5 kbp の下流領域を含む DNA 断片、終止コドンから 0.5 kbp-1.5 kbp の *tr120879* 下流領域を PCR により増幅し、ScaI サイトを上流領域の 5'末端および下流領域の 3'末端に付加した。*amdS* 選択マーカーは pUamdSF を FspI で消化し獲得した(82)。これら 4 つの DNA 断片を pUC118 の HincII サイトへと Gibson Assembly Cloning Kit を用いて上流領域および ORF を含む DNA 断片、*amdS* マーカー、1 kbp 下流領域の順で挿入した。獲得したプラスミドは pUwtr120879amdS とし、ScaI により 8.3 kbp の DNA 断片を獲得した。このフラグメントはプロトプラスト-PEG 法にて N-25 に導入した。形質転換体はサザンブロット解析により相同組み換えにより挿入されていることを確認し、変異点はシーケンス解析により野生型に復帰していることを確認した。



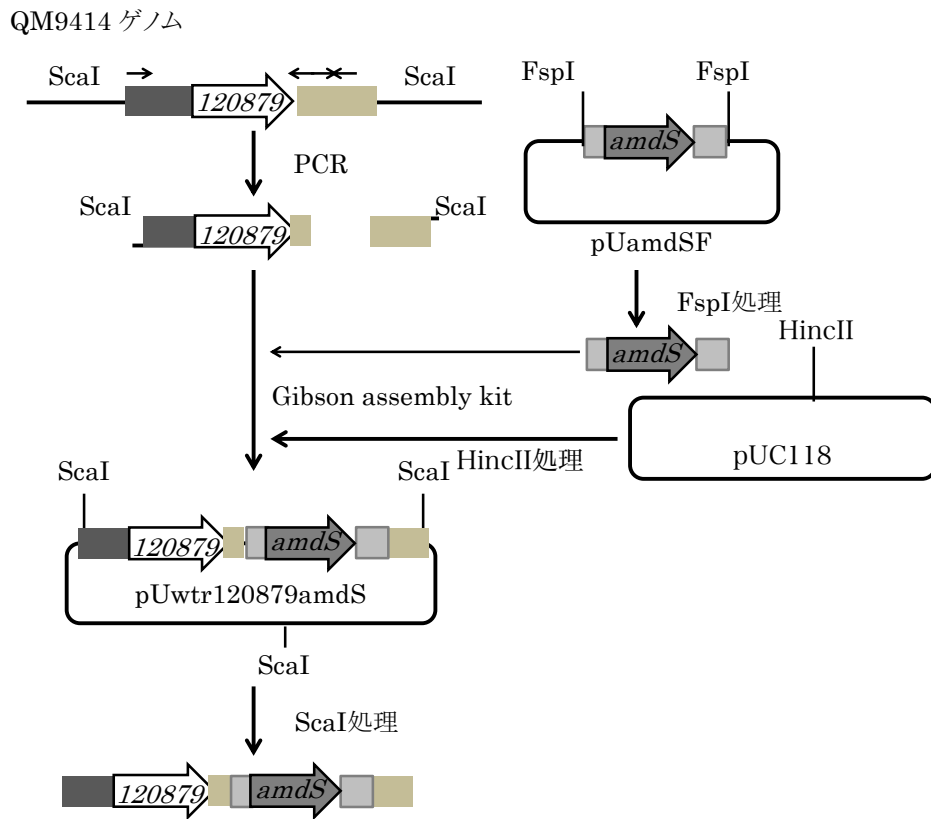


Fig. 3-6 pUw120879amdS の構築方法

Table 3-1 本章でプラスミド構築のために使用したプライマーリスト

Name	Sequence (5' → 3')
IF_pac1_up_Fw	GGATCCTCTAGAGTCGAATTCAAGACGCCCCAGA
IF_pac1_up_Rv	GGGAGCAGCGCTGATTCTTGGCGGTCTTGGCATTG
IF_pac1_down_Fw	GCAGTTGTTCGACGATATTCCTTGCTAGCAAGGCGC
IF_pac1_down_Rv	GCATGCCTGCAGGTCGAATTCTTCATGATGTAGAGGTT
IF_tr22911_up_Fw	GGATCCTCTAGAGTCAGTACTTGTGCTCAAAGGCTGGAG
IF_tr22911_up_Rv	GGGAGCAGCGCTGATGCCGCAGAGGTTGTGCTTG
IF_tr22911_down_Fw	GCAGTTGTTCGACGATCAAAGGTTAGGACGAAACCGTT
IF_tr22911_down_Rv	GCATGCCTGCAGGTCAGTACTAGGAGTTACCACTGTAAATACATTGCC
IF_tr22009_up_Fw	GGATCCTCTAGAGTCagTACTATTCGAGTTTACCAGGCGT
IF_tr22009_up_Rv	GGGAGCAGCGCTGATGGCGCAGATGCGGGAAG
IF_tr22009_down_Fw	GCAGTTGTTCGACGATGGGCAATGGAAAAAGAAAGTCTTTCC
IF_tr22009_down_Rv	GCATGCCTGCAGGTCAGTACTGTAGCTGGGCAATATCTCG
IF_tr62938_up_Fw	GGATCCTCTAGAGTCgAAGCCTTTCAACTACATCAACGGC
IF_tr62938_up_Rv	GGGAGCAGCGCTGATATCACCGACGGTGTAGACAGA
IF_tr62938_down_Fw	GCAGTTGTTCGACGATGAGGGGGCTTGATGGAAGGC
IF_tr62938_down_Rv	GCATGCCTGCAGGTCgaaAATATTTCCAACCGCCTGACAAGAAC
IF_tr121960_up_Fw	GGATCCTCTAGAGTCaGTACTAGCCTTGATTCTATTCGTCATTATTACTTG
IF_tr121960_up_Rv	GGGAGCAGCGCTGATAATGACGTTACGAGATGATGAAAAAGATGC
IF_tr121960_down_Fw	GCAGTTGTTCGACGATCTTTGTCCATCAAACTGGAAAAAGCTAT
IF_tr121960_down_Rv	GCATGCCTGCAGGTCaGTACTCGTATGAAAGGCAGCGAA
IF_tr120870_up_Fw	GGATCCTCTAGAGTCAGTACTCTCTCGATGCAGATCTACC
IF_tr120870_up_Rv	GGGAGCAGCGCTGATTTGTGATTCATTCTTCGGGCTCAG
IF_tr120870_down_Fw	GCAGTTGTTCGACGATGCATAGCTATCCTTTTGAAGAGCCG
IF_tr120870_down_Rv	GCATGCCTGCAGGTCaGTACTCGACCATCATGTATGCGAC
IF_tr61550_up_Fw	GGATCCTCTAGAGTCagtACTCCAGTAGCTTCAACTTAGAAAAGTC
IF_tr61550_up_Rv	GGGAGCAGCGCTGATGGGAAGAATTCACCTCTTTGCAG
IF_tr61550_down_Fw	GCAGTTGTTCGACGATGCAGGTGAATAGAGCCTGTTGAT
IF_tr61550_down_Rv	GCATGCCTGCAGGTCagtACTCTGAGCGCCAGTAGTCC

### 3.2.3. *T. reesei*の形質転換

*T. reesei* へ DNA 断片を導入するために、*T. reesei* プロトプラストの形質転換は Penttilä et al.の報告に従って行った(152)。形質転換されたプロトプラストはアセトアミドを唯一の窒素源として含む最小培地(*amdS* マーカーの場合)またはウリジンを含まない最小培地(*pyr4* マーカーの場合)に塗布し選抜した。各遺伝子破壊の候補株は安定化された菌株を獲得するため、アセトアミドを唯一の窒素源として含む最小培地(*amdS* マーカーの場合)またはウリジンを含まない最小培地(*pyr4* マーカーの場合)に2回シングルコロニーアイソレーションを行った。相同組換えおよびコピー数は AlkPhos Direct kit (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Waukesha, WI, USA)を用いてサザンブロット解析により確認した。サザンブロット解析のための制限酵素は *pac1* 破壊株では Sall および FspI、*tr22911* 破壊株では NdeI および HindIII、*ace1* 破壊株では KpnI および MfeI を使用した。酵素消化した染色体 DNA を電気泳動で分離したのち、Hybond N+ membrane (GE Healthcare Bio Sciences Corp.)へと転写され、alkaline phosphatase によって標識した *pac1* の上流領域の PstI フラグメント(*pac1* 破壊の確認のため)および *pyr4* ORF の NcoI フラグメント(*tr22911*, *tr22911*, *tr120879*, *tr22009*, *tr61550*, *tr121960* 破壊の確認のため)、*ace1* ORF の Sall フラグメント(*ace1* 破壊の確認のため) をプローブとして用いてサザン解析を行った。

分子内相同組換えにより *pyr4* 遺伝子を取り除くため(151)、N-25pyr4amdSRM の胞子を 5 mM フルオロオロト酸(FOA; Funakoshi Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan)、20 mM ウリジン(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)、0.2% ウラシル(Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan)を含む PDA 培地に塗布し、その後、28 °Cで培養した。培養後、得られたコロニーを再度 5 mM フルオロオロト酸、20 mM ウリジン、0.2% ウラシルを含む PDA 培地に塗布した。*pyr4* 遺伝子の除去を確認するため、生育したコロニーのゲノム DNA を対象とし、PCR による評価を行った。分子内相同組換えにより獲得された *pyr4*破壊株を N-25ΔPA と名付けた。

### 3.2.4. 生化学的分析

タンパク質濃度は牛ガンマグロブリンをスタンダードとしてブラッドフォード法により決定した(161)。Avicelase およびカルボキシメチルセルラーゼ(CMCCase)、キシラナーゼ活性は 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS)法(162)により還元糖量を測定した。Avicelase 活性は 50 mM 酢酸バッファー(pH 5.0)中に終濃度 0.5% Avicel (Funakoshi, Tokyo, Japan)を基質として 50 °Cで 30 min 間反応させ測定した。CMCase 活性は 50 mM 酢酸バッファー(pH 5.0)中に終濃度 1% CMC (low viscosity, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)を基質

として 50 °C で 15 min 間反応させ測定した。キシラナーゼ活性は 50 mM 酢酸バッファー(pH 5.0)中に終濃度 1% birch wood xylan (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)を基質として 50 °C で 10 min 間反応させ測定した。活性の 1 ユニットは 1 分間でグルコース 1 μmol 相当の還元糖を生産する酵素の量として決定した。セロビアーゼ活性は 50 mM 酢酸バッファー(pH 5.0)中に終濃度 20 mM セロビオース(Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)を基質として 50 °C で 10 min 間反応させ、Glucose C2 kit (Wako pure chemical, Osaka, Japan)により放出されたグルコースを測定した。セロビアーゼ活性の 1 ユニットは 1 分間でグルコース 2 μmol を生産する酵素の量として決定した。それぞれの活性は独立した 3 培養系の平均を示す。

定量的リアルタイム PCR (qRT-PCR)を行うために、total RNA は Shida et al.によって報告されている改良したホットフェノール法により凍結菌体から抽出した(83)。cDNA は total RNA 1 μg より Transcriptor First-Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Applied Science, Bavaria, Germany)を用いて合成した。qRT-PCR は LightCycler® 480 System (Roche Applied Science, Bavaria, Germany)を用いて行った。相対転写量はハウスキーピング遺伝子 *act1* の値をコントロールとして計算した。それぞれの値は独立した 3 培養系の平均を示す。発現解析に使用したプライマーは Table 3-2 に示した。

Table 3-2 本章で転写解析のために使用したプライマーリスト

Gene name	Sequence (5' → 3')	
Glycosyl hydrolase genes	Fw	Rv
<i>cbh1</i>	CTTGCAACGAGTTCTCTT	TGTTGGTGGGATACTTGCT
<i>cbh2</i>	CGTCAAATTGTCGTGGAA	ACTGAGCATTGGCACACTT
<i>egl1</i>	CGGCTACAAAAGCTACTACG	CTGGTACTTGCGGGTGAT
<i>bgl1</i>	AGTGACAGCTTCAGCGAG	GGAGAGGCGTGAGTAGTTG
<i>xyn1</i>	GGTTGGACGACTGGATCT	GGTTGTCCTCCATGATGTAG
<i>xyn2</i>	CCGTCAACTGGTCCAAC	ACACGGAGAGGTAGCTGTT
<i>xyn3</i>	GTACAAGGGCAAGATTCGT	AAGGCAATCGAGACAACT
Transcription factor genes	Fw	Rv
<i>xyl1</i>	TGCGAGACCATTGTTAGG	CTGCTGCTCAGCTAAATCTT
<i>ace1</i>	GAGGTTGATGAAGGCTTTG	CACTTGGCATATCGGTAAAC
<i>ace2</i>	ATACGGCTGCCTCAATG	GAACGACCTTTGCTTCTCTC
<i>cre1</i>	TCTACGGCTCCTTCTTCTC	ACAGGTTTCTCAGACTCGG
<i>ace3</i>	GACATTTTCCCCGAAGGAGA	GTTGGAGTGGAAGTAGCGAATG
pH transduction pathway genes	Fw	Rv
<i>pac1</i>	ACATCCGTGTTACAGTTC	GAGTCATCGGCATGAGTC

Table 3-2 のつづき

<i>palA</i>	AAGACGGTCATGGAGGAT	CTCTCTCCAGGATCTTCAGTT
<i>palB</i>	GAGGCGGCTATGACTTTC	TTGATCCTGTTCCATGTCTC
<i>palC</i>	GCAAAGTGGAACAAGATCAA	CCAGATGGGAAGCTGATA
<i>palF</i>	CCTATATCCAAGAGGACGAAG	ACTGATCTCGCTTTGCAC
<i>palH</i>	CGAAGAGGTGTACGAAGTCA	ACAGAGGCGGATTGGTAG
<i>palI</i>	CAGGTA CTCTCAAGATGAGCA	CCAGACATATTCGGGGTAG
Mutated genes in N-25		
	Fw	Rv
<i>tr22009</i>	CAACGACAAGAATGGAACGAAG	ATGCCCGAGAAGAACAGGAG
<i>t120879</i>	GGGGTTTGATGCCCTCTATGT	TCAGTGGAGAGAAGCCGTTG
<i>tr61550</i>	AAGATCATAAGCCGCGTCATC	CTCTCCTCCTTCTCCTCCCTCT
<i>tr78582</i>	CTCAACGAGGTCGGAGACTTTT	CGTCGTA CTGCTTCTGGATCTTT
<i>tr62938</i>	ATCAAAAGGAGCGGACAAGG	GAGTCCAGTGTGGCTGAAGG
<i>tr22911</i>	TCCTTTTCAACAACAACCTCCA	GCTCTTGGTGCCTTTTCC
<i>tr111593</i>	CCAGCTCCCACCAGGAAAA	ATGTACGCGGAAACACACCTC
<i>tr5991</i>	TACTCTTCAACTGGCCTTCCTTG	AATCAGCAGGTCGTATCGGTTT
Housekeeping gene		
	Fw	Rv
<i>actI</i>	TCCATCATGAAGTGCGAC	GTAGAAGGAGCAAGAGCAGTG

### 3.2.5. 実バイオマスの糖化試験

糖化に使用した基質はアルカリ処理エリアンサス(草本系)および水熱処理ユーカリ(木質系)である。アルカリ処理エリアンサスおよび水熱処理ユーカリは小林良則博士(Japan Bioindustry Association, Ibaraki, Japan)から提供されたものを使用した。バイオマスの前処理は Kawai et al. (163)の方法通りに行われており、アルカリ処理は 1% NaOH で 120 °C、5 分間処理し、水熱処理は 210 °C、30 分間加熱処理を行った。前処理バイオマスの組成は NREL により公開された方法に従って高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて測定した(154)。前処理バイオマスの酵素標品による糖化は 2 ml プラスチックボトルを用いて 100 mM 酢酸バッファー(pH 5.0)中に 5% バイオマス(乾燥重量)と 10 mg/g バイオマスとなるように酵素を充填し、50 °C で 48 時間反応させた。糖化後、サンプルは酵素を失活させるため 10 分間煮沸し、DNS 法にて還元糖量を測定した。それぞれの値は独立した 3 培養系の平均を示す。

### 3.2.6. ゲノム DNA シークエンスおよびバイオインフォマティクス解析

ゲノム DNA はフェノールクロロホルムおよびエタノール沈殿の組み合わせにより凍結菌体の粉末から抽出した。QM9414 および N-25 のゲノム DNA はイルミナ Miseq プラットフォームにより配列を解析した。野生株 QM6a のゲノム配列は Joint Genome Institute

(JGI) website (<http://genome.jgi-psf.org/Trire2/>)よりダウンロードし、比較ゲノム解析のリファレンスとして使用した。Miseq リードのクオリティコントロールは trimmomatic ver. 0.36 (164)を使用し、低クオリティのリードを除去した。クオリティコントロール後、QM9414 および N-25 のリード数はそれぞれ620万と550万だった。リファレンス配列とのマッピングは bwa ver. 0.7.12 を用いて mem アルゴリズムのデフォルトパラメーターにより行った。リファレンスゲノムに対する全体のマッピング率は QM9414 で 95%、N-25 で 94% であった。SNPs は samtools ver. 1.8 および bcftools ver. 1.2 (<http://samtools.sourceforge.net/>)(165)を用いて抽出した。その後、SNP の候補は 5 read 以上の変化および 1 read 以上の両方向の合致、変異を示す read の割合が 80%以上のものを perl script にて選別した。変異遺伝子での各 SNP の影響は *T. reesei* ゲノムデータベースの遺伝子モデルにより SnpEff ver. 4.3q (166)を用いて判断した。

### 3.3. 実験結果

#### 3.3.1. 異なる培養 pH における変異株間のセルラーゼ、キシラナーゼの生産パターン

様々な pH 条件における詳細なセルラーゼ生産能を評価するため、*T. reesei* QM9414 および PC-3-7 を酒石酸バッファーにより pH 3.5 から pH 5.5 に調整した 1% Avicel basal medium にて培養した。獲得した培養上清は SDS-PAGE 解析および各種酵素活性を測定した(Fig. 3-7)。QM9414 において、pH 5.0 および pH 5.5 での培養におけるタンパク質生産は低 pH 条件での培養時のタンパク質量と比較して極めて低くなっていた(Fig. 3-7A, B)。分泌タンパク質の電気泳動パターンもタンパク質量を反映していた(Fig. 3-7A, B)。PC-3-7 においては、pH 3.5 以外の条件で QM9414 より高いタンパク質生産能が観察された(Fig. 3-7B)。加えて、PC-3-7 ではタンパク質生産性で QM9414 とは異なる傾向が観察され、培養 pH が増加するのに伴いタンパク質生産が増加した(Fig. 3-7B)。SDS-PAGE から、これら両株間で培養 pH により分泌タンパク質のパターンが変化することも観察された(Fig. 3-7A)。

培養上清の酵素活性は Avicel、CMC、セロビオース、キシランを基質として、それぞれセロビオヒドロラーゼ、エンドグルカナーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼ、キシラナーゼ活性を測定した(Fig. 3-7C-F)。QM9414 において、Avicelase および CMCase 活性は高 pH 条件において低くなった(Fig. 3-7C, D)。だが一方で、PC-3-7 では pH 4.5 で最も高い活性を示し、pH 5.0、5.5 でも高い活性を保持していた(Fig. 3-7C, D)。QM9414 は pH 4.0、4.5 で高いセロビアーゼ活性を示したが、PC-3-7 は pH 5.0、5.5 で高い活性を示した(Fig. 3-7E)。QM9414 のキシラナーゼ活性は実験したどの pH でも同様の値だった(Fig. 3-7F)。対して、PC-3-7 では培養 pH の増加に伴い、キシラナーゼ活性は高くなった(Fig. 3-7F)。

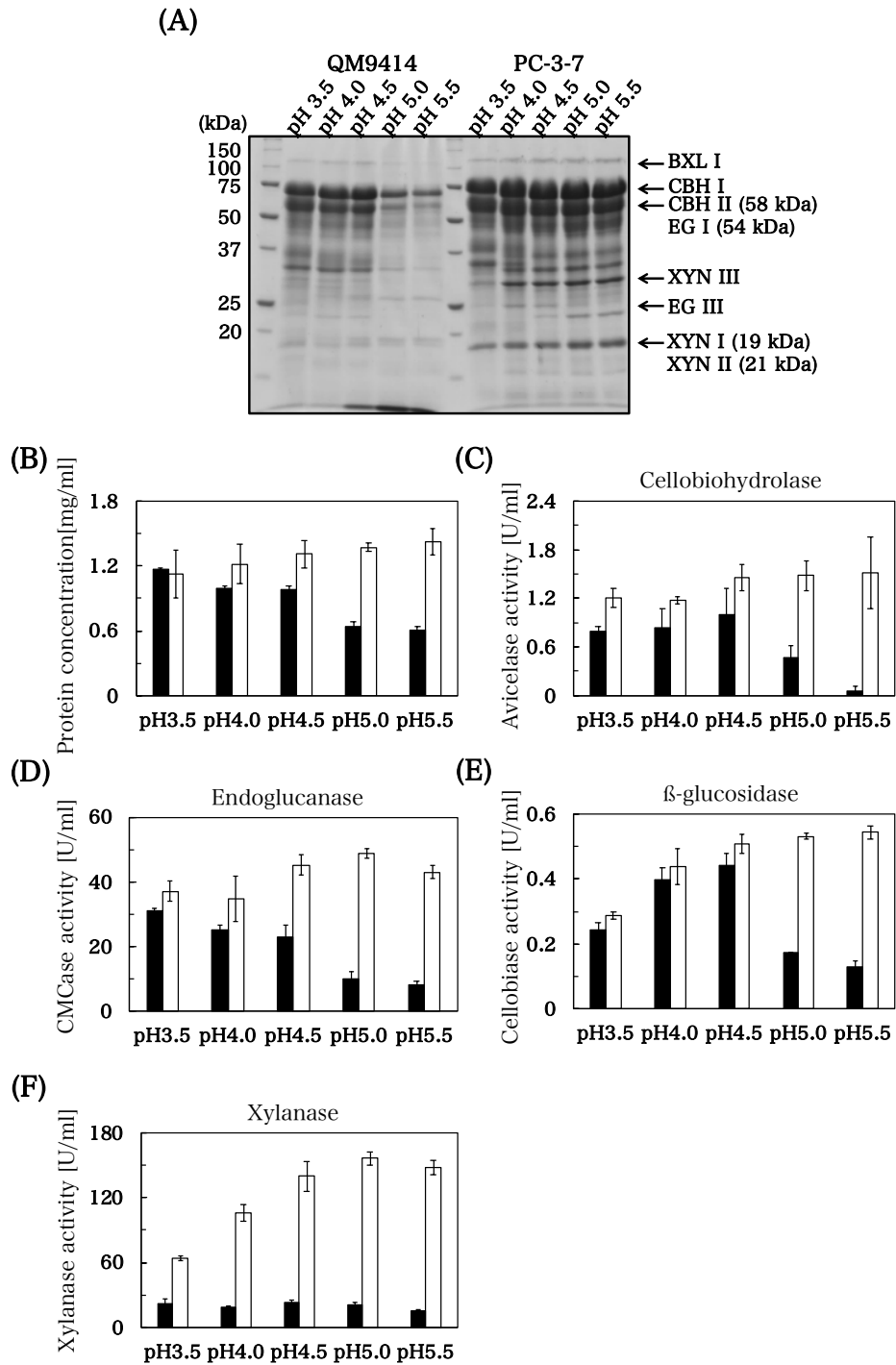


Fig. 3-7 QM9414 および PC-3-7 の各 pH 条件におけるセルラーゼ生産パターン

*T. reesei* QM9414 (black bar)およびPC-3-7 (white bar)を酒石酸バッファーを用いて pH 3.5~5.5 に調整した 1% Avicel 培地で 5 日間培養した。(A)培養上清(16  $\mu$ l)は 12.5% SDS-PAGE により解析された。ゲルはクマシーブリリアントブルーにより染色した。タンパク質量(B)および Avicelase (C)、CMCase (D)、セロビアーゼ(E)、キシランナーゼ(F)活性は培養上清を用いて測定した。各値は独立した 3 実験の平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。

培養 pH での変化をセルラーゼ遺伝子発現のレベルで解析するため、主要なセルラーゼ遺伝子をコードする *cbh1* および *cbh2*, *egl1*, *bgl1*、主要なキシラナーゼ遺伝子をコードする *xyn1* および *xyn2*、主要なセルラーゼ活性化因子をコードする *xyl1* の転写量を qRT-PCR により定量した。本実験で使用した Total mRNA は pH 3.5、4.5、5.5 に調整された Avicel 培地で 3 day 培養した菌糸より抽出したものである。QM9414 では、セルラーゼ遺伝子の転写量は pH の増加に伴い減少し、pH 5.5 では転写はほぼ見られなかった(Fig. 3-8)。一方で、PC-3-7 の転写量はかなり高く、pH 3.5 から 4.5 へ増加していた(Fig. 3-8A-C)。この発現パターンは *xyl1* の発現パターンと総じて一致していた(Fig. 3-8G)。QM9414 における *bgl1* の発現パターンは他のセルラーゼ遺伝子と異なり、pH 4.5 で最も高い発現量が観察された(Fig. 3-8D)。このパターンは PC-3-7 においても維持されており、pH 4.5、5.5 で劇的に発現が増加していた(Fig. 3-8D)。しかしながら、キシラナーゼ遺伝子発現では、QM9414 の *xyn1* および *xyn2* の発現は対象的なパターンを示した(Fig. 3-8E, F)。すなわち、*xyn1* 発現は高 pH では低いながら *xyn2* の発現は高くなっていた(Fig. 3-8E, F)。さらに、PC-3-7 においてもほぼ同様の傾向が観察された(Fig. 3-8E, F)。これらの結果は両菌株の pH に応答した酵素生産性の変化は転写レベルでの制御によるものであることを示唆している。

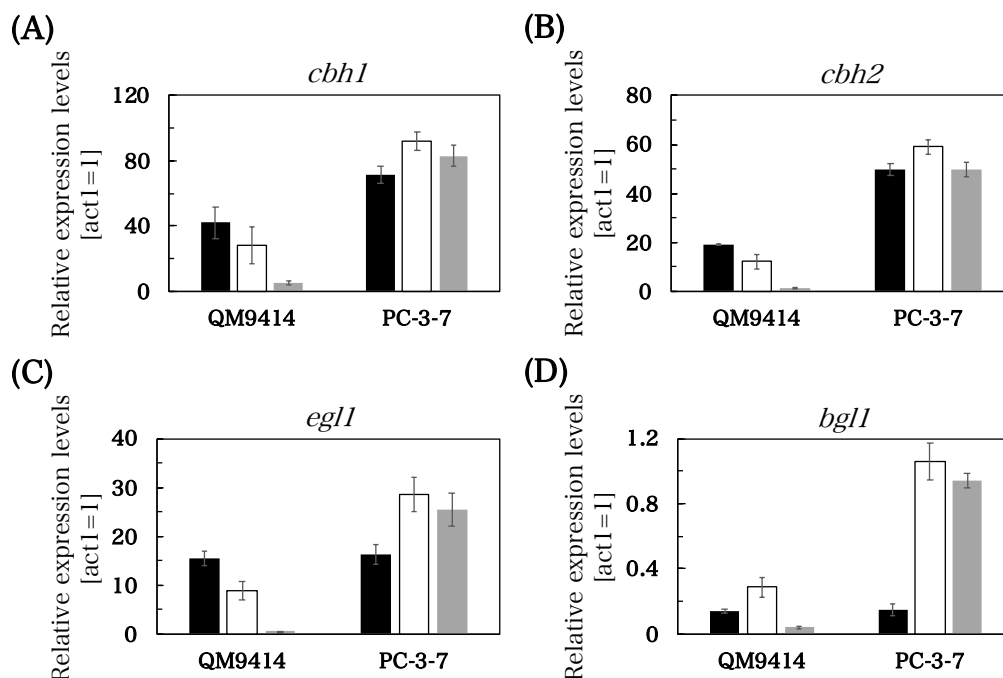


Fig. 3-8 種々の pH 条件での *T. reesei* 糖質加水分解酵素遺伝子および *xyl1* 遺伝子の発現プロファイル



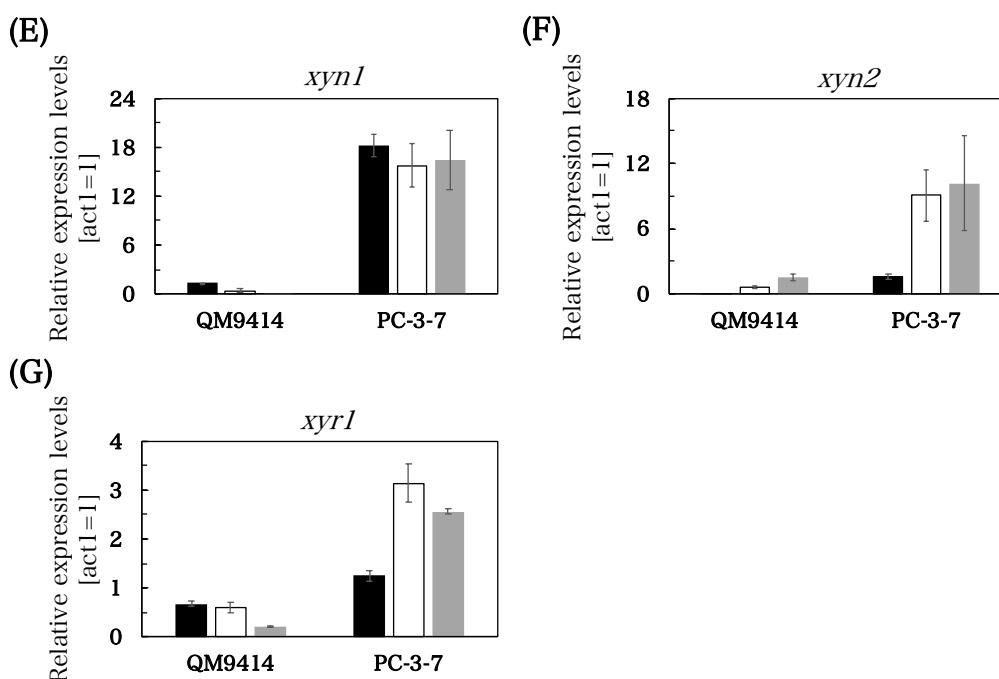


Fig. 3-8 種々の pH 条件での *T. reesei* 糖質加水分解酵素遺伝子および *xyr1* 遺伝子の発現プロファイル(続き)

*T. reesei* QM9414 および PC-3-7 を酒石酸バッファーを用いて pH 3.5 (black bar) および 4.5 (white bar)、5.5 (gray bar) に調整した 1% Avicel 培地で 3 日間培養した。セルラーゼ遺伝子(A) *cbh1* および(B) *cbh2*、(C) *egl1*、(D) *bgl1*、キシラナーゼ遺伝子(E) *xyn1* および(F) *xyn2*、セルラーゼ転写活性化因子遺伝子(G) *xyr1* の転写解析は qRT-PCR により行った。すべての値はハウスキーピング遺伝子 *act1* の発現により標準化した。各値は独立した 3 実験の平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。

### 3.3.2. *T. reesei* におけるセルラーゼ生産への pH シグナル伝達経路の影響

pH シグナル伝達経路と酵素発現における QM9414、PC-3-7 間の異なる pH 応答の関係性を解析するため、pH シグナル伝達経路に関与する因子をコードする遺伝子の発現をセルラーゼ生産条件で解析した。*palA* および *palB*、*palH* のホモログはゲノムデータベースから探索し、それぞれ protein ID *tr124132* および *tr70560*、*tr21415* を同定した。これら遺伝子および *palC*、*palF* (110)、*pac1* の発現は qRT-PCR により決定した。*palB* および *palC*、*palH*、*palI*、*pac1* の転写量およびパターンは QM9414 および PC-3-7 間で同様だった(Fig. 3-9)。しかしながら、低い発現量ではあるが、QM9414 と比べて、PC-3-7 において *palA* の発現量が pH 5.5 で高いことが観察された(Fig. 3-9)。*palF* の発現量は PC-3-7 では高い pH であるほど高い発現量である。一方で QM9414 では pH 3.5-pH 5.5 で一定の発現を維持していた(Fig. 3-9)。

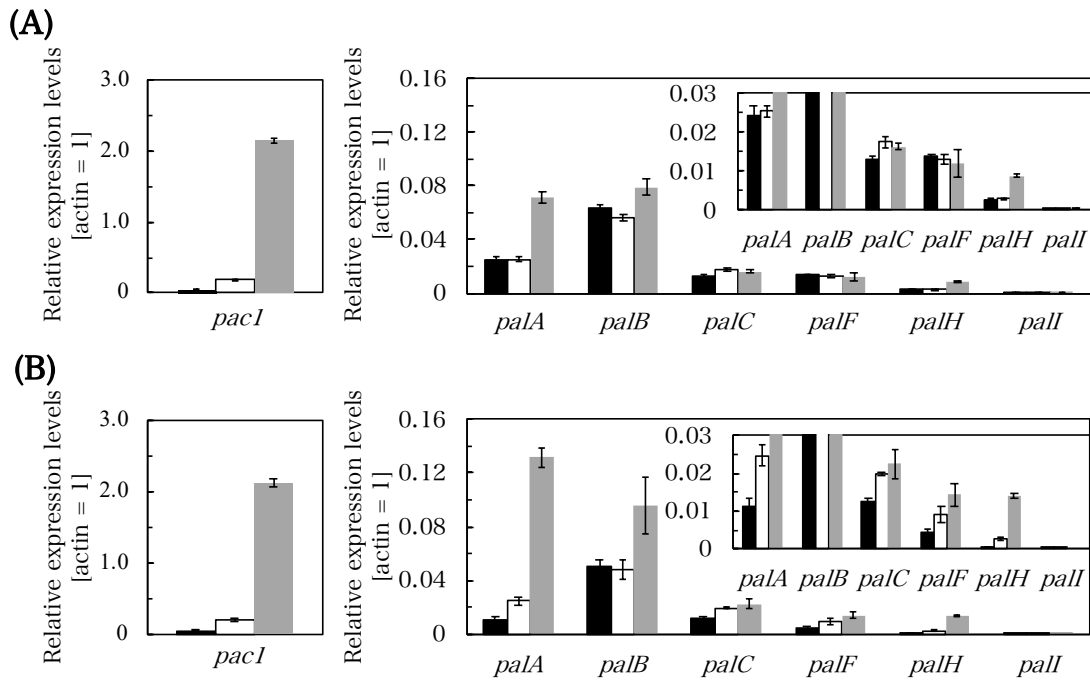


Fig. 3-9 種々の pH 条件における pH シグナル伝達経路遺伝子の発現プロファイル

*T. reesei* QM9414 および PC-3-7 を酒石酸バッファーを用いて pH 3.5 (black bar) および 4.5 (white bar)、5.5 (gray bar) に調整した 1% Avicel 培地で 3 日間培養した。pH 応答性転写調節因子 *pac1* および pH シグナル伝達経路遺伝子のホモログ *palA* および *palB*、*palC*、*palF*、*palH*、*pall* の転写解析は qRT-PCR により行った。すべての値はハウスキーピング遺伝子 *act1* の発現により標準化した。各値は独立した 3 実験の平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。

Pac1 によるセルラーゼ、ヘミセルラーゼ遺伝子の制御が PC-3-7 で行われているか確認するため、PC-3-7 の *pac1* 破壊株(PCΔ*pac1*)を構築し(Fig. 3-10)、その酵素生産を解析した。PC-3-7 と PCΔ*pac1* の間でセクレトームのパターンに大きな違いはなかった(Fig. 3-11A)。分泌タンパク質量は評価したすべての pH 条件で PC-3-7 より PCΔ*pac1* のほうが低かった(Fig. 3-11B)。CMCase 活性は *pac1* 破壊の影響をほとんど受けなかった(Fig. 3-11C)。しかしながら、Avicelase 活性は PC-3-7 と PCΔ*pac1* の間で pH 4.0 以外で同様であったが、PCΔ*pac1* は他の実験した pH 条件とくらべ pH 4.0 のみ高い活性を示した(Fig. 3-11B)。さらに、PCΔ*pac1* はセロビアーゼ活性において pH 3.5、4.0、キシラナーゼ活性においてはすべての pH 条件で PC-3-7 のものより高い活性を示した(Fig. 3-11D, E)。

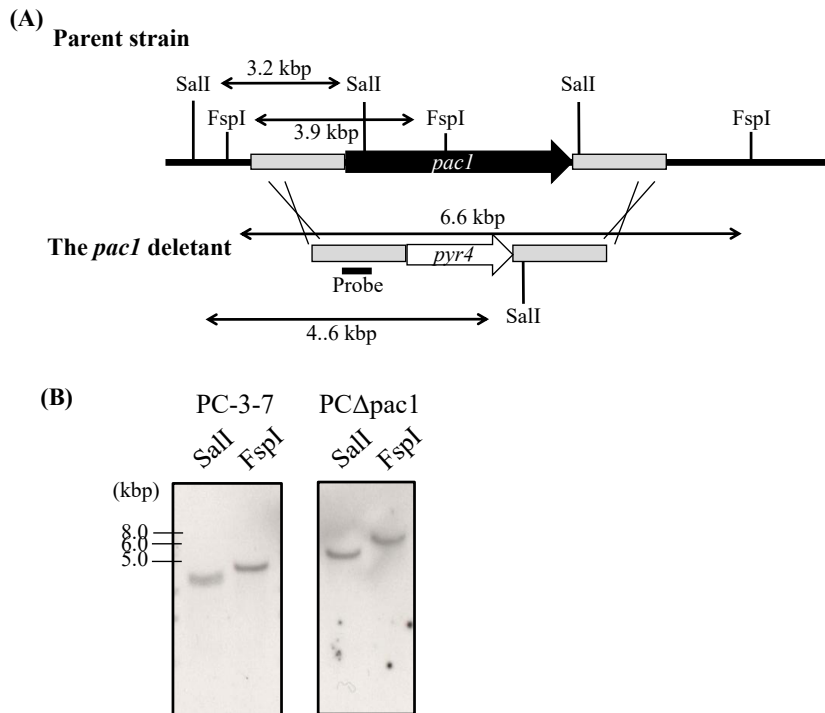


Fig. 3-10 *T. reesei* PC-3-7 における *pac1* 破壊株の構築

(A) *pac1* 遺伝子ノックアウト用 DNA フラグメントを *T. reesei* PC-3-7 $\Delta$ KP (親株)へと導入した。*pac1* ローカスに存在する SalI および FspI の制限酵素サイトを示した。(B) サザンブロット解析は PC-3-7 および PC $\Delta$ *pac1* のゲノム DNA (3  $\mu$ g) を SalI または FspI により消化し、*pac1* の上流領域 600 bp をプローブとして用いた。

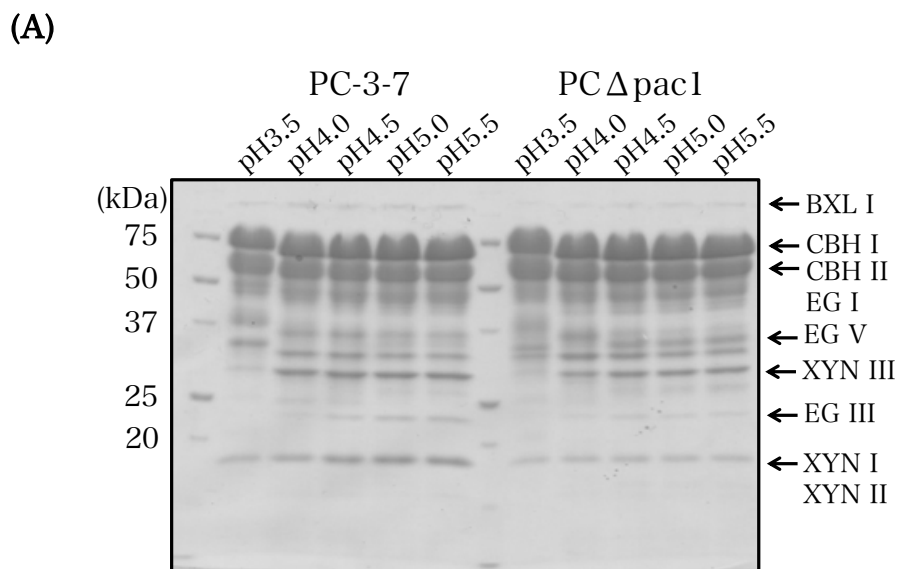


Fig. 3-11 種々の pH 条件における PC-3-7 および PC $\Delta$ *pac1* のセルラーゼ生産性

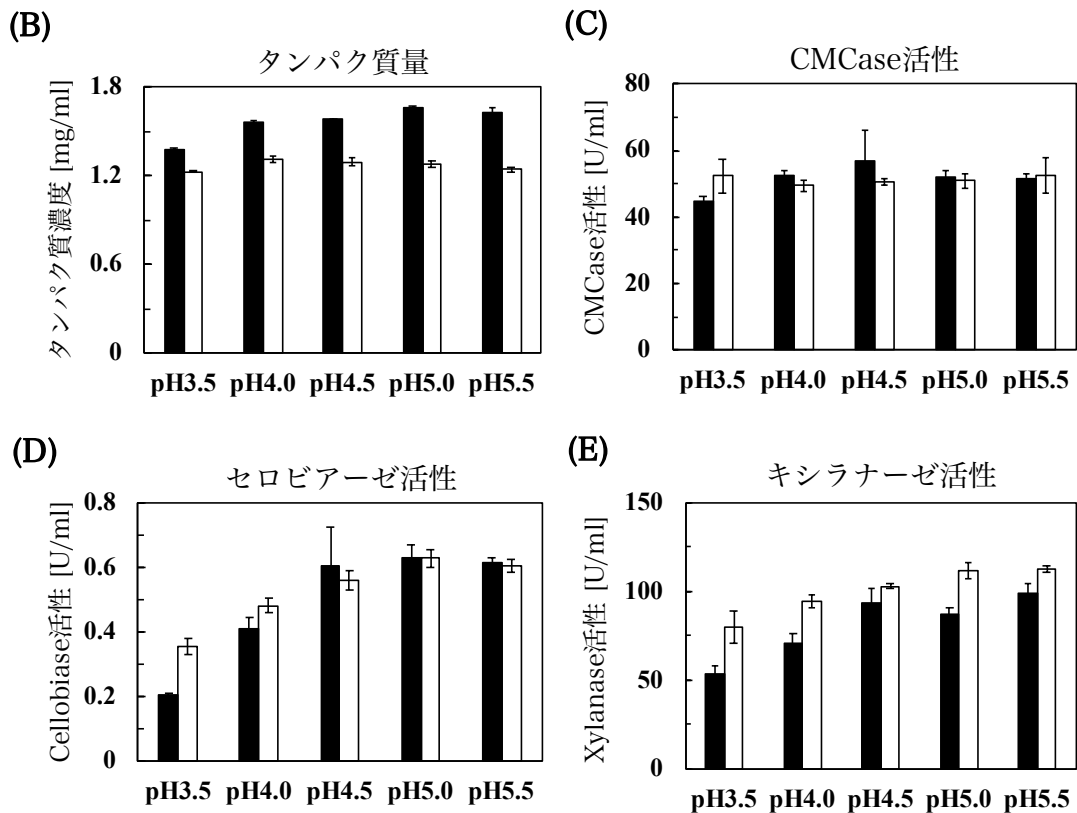


Fig. 3-11 種々の pH 条件における PC-3-7 および PCΔpac1 のセルラーゼ生産性(続き)

*T. reesei* PC-3-7 (black bar)および PCΔpac1 (white bar)を酒石酸バッファーを用いて pH 3.5~pH 5.5 に調整した 1% Avicel 培地で 5 日間培養した。(A)培養上清(16 μl)は 12.5% SDS-PAGE により解析された。ゲルはクマシーブリリアントブルーにより染色した。タンパク質量(B)および CMCase(C)、セロビアーゼ(D)、キシラナーゼ(E)活性は培養上清を用いて測定した。各値は独立した 3 実験の平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。

PC-3-7 における遺伝子発現への *pac1* 破壊の影響を解析するため、主要なセルラーゼ遺伝子をコードする *cbh1* および *cbh2*, *egl1*, *bgl1*, 主要なキシラナーゼ遺伝子をコードする *xyn1* および *xyn2*, *xyn3*, セルラーゼ転写調節因子をコードする *xyr1* および *ace3*, *ace2*, *cre1*, *ace1* の転写量を qRT-PCR により定量した。*cbh1* および *cbh2*, *egl1* の転写は *pac1* 破壊により pH 4.5、5.5 で減少した(Fig. 3-12A)。キシラナーゼ遺伝子は PCΔpac1 において pH 4.5 および pH 5.5 だけでなく、pH 3.5 でも減少していることが観察された(Fig. 3-12B)。特に、*xyn2* および *xyn3* の発現はすべての実験した pH 条件で PC-3-7 より PCΔpac1 において低くなっていた(Fig. 3-12B)。転写調節因子において、*xyr1* および *ace3*, *ace2*, *ace1* の発現は PCΔpac1 において実験したすべての pH 条件で同様であった(Fig. 3-12C)。さらに、pH 4.5 および 5.5 での転写調節因子の発現は PC-3-7 より PCΔpac1 において低くなっていた(Fig. 3-12C)。PC-3-7 のセルラーゼおよびキシラナーゼ遺伝子の発現パ

ターンは *xyl1* 発現のパターンと同様だったが、*pac1* の破壊は pH 3.5 でのみセルラーゼおよびキシラナーゼ遺伝子と *xyl1* 間で異なる発現パターンを示した (Fig. 3-12)。一方で、QM9414 における *pac1* 破壊はセルラーゼ遺伝子と *xyl1* 間で同様の発現パターンを示した (Fig. 3-13)。PC-3-7 と QM9414 が pH 3.5 のみ *pac1* 破壊の影響が異なることから、PACI が関与するメカニズムとは異なる pH 応答メカニズムが PC-3-7 の表現型を引き起こしているかもしれない。

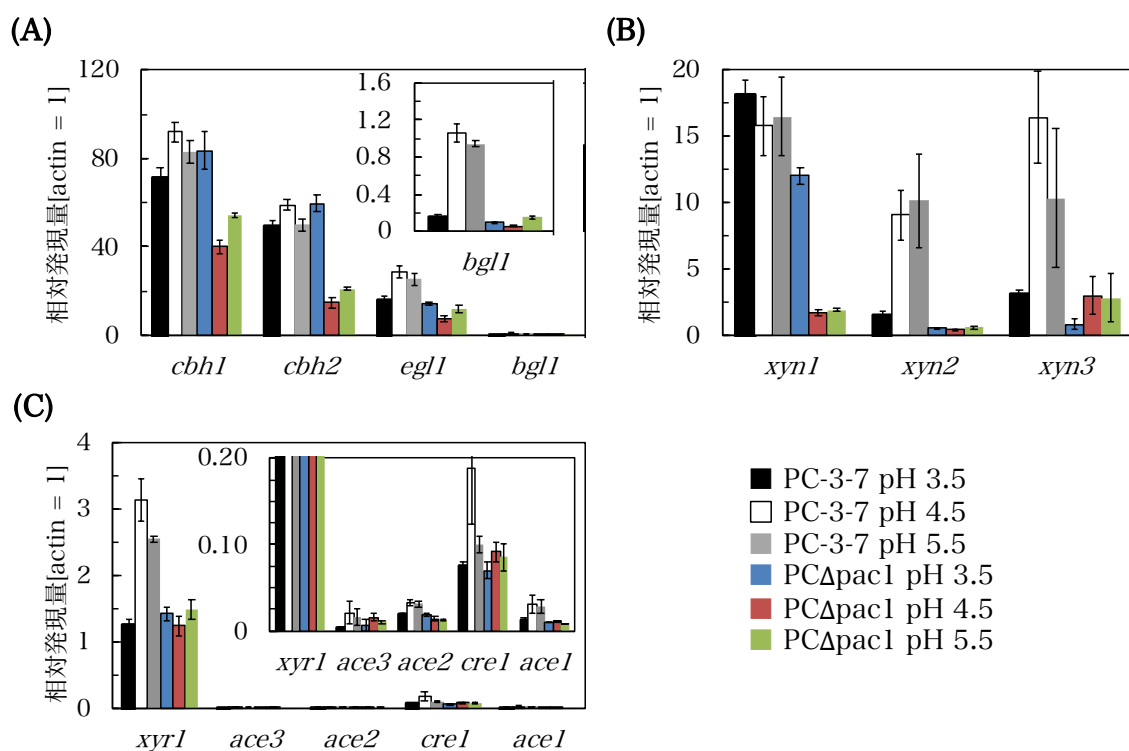
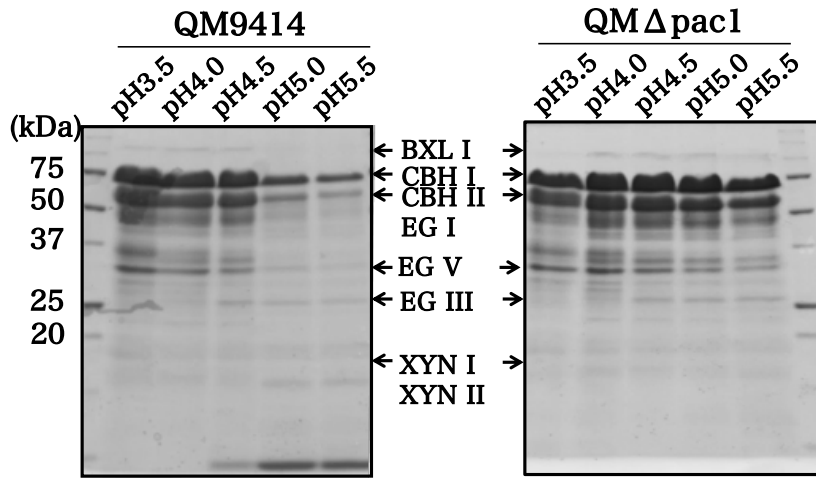


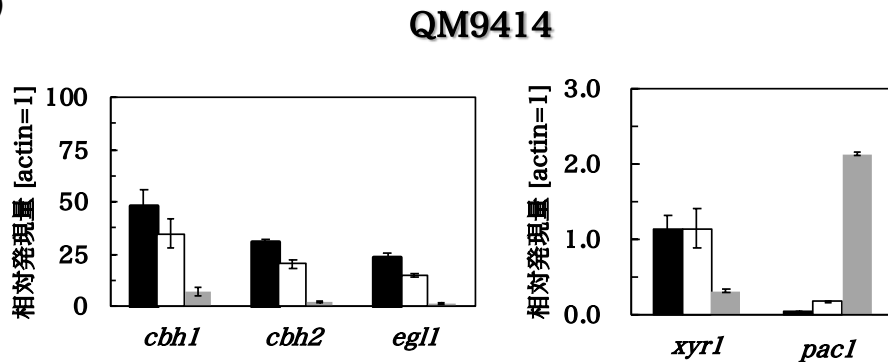
Fig. 3-12 種々の pH 条件での *T. reesei* PC-3-7 および PC $\Delta$ *pac1* における糖質加水分解酵素遺伝子および転写調節因子遺伝子の発現プロファイル

*T. reesei* PC-3-7 および PC $\Delta$ *pac1* を pH 3.5 および、4.5、5.5 に調整した 1% Avicel 培地で 3 日間培養した。セルラーゼ遺伝子(A) *cbh1* および *cbh2*, *egl1*, *bgl1*, キシラナーゼ遺伝子(B) *xyn1* および *xyn2*, *xyn3*, セルラーゼ転写調節因子遺伝子(C) *xyl1* および *ace3*, *ace2*, *cre1*, *ace1* の転写解析は qRT-PCR により行った。すべての値はハウスキーピング遺伝子 *act1* の発現により標準化した。各値は独立した 3 実験の平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。

(A)



(B)



(C)

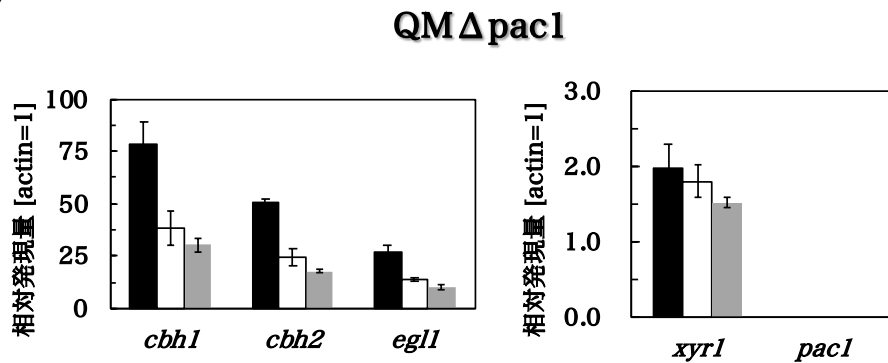


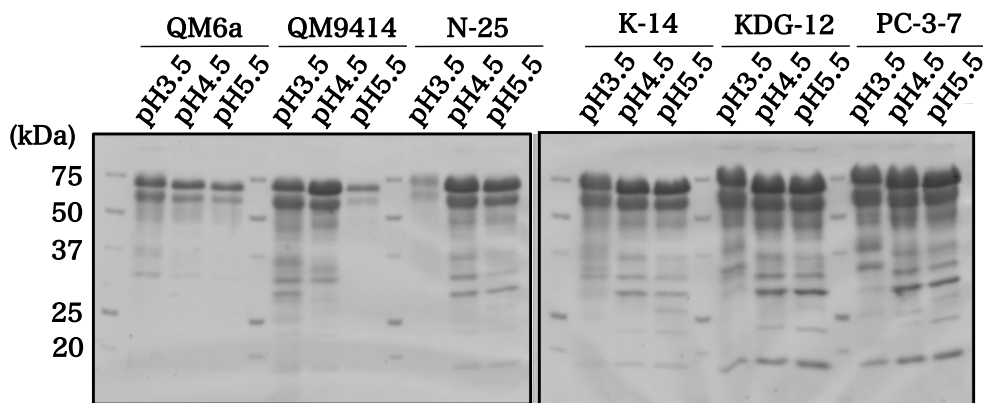
Fig. 3-13 種々の pH 条件での *T. reesei* QM9414 および QMΔpac1 における糖質加水分解酵素遺伝子および転写調節因子遺伝子の発現プロファイル

*T. reesei* QM9414 (B) および QMΔpac1 (C) を pH 3.5 (black bar) および 4.5 (white bar)、5.5 (gray bar) に調整した 1% Avicel 培地で 5 日間培養した。(A) 培養上清(16 μl) は 12.5% SDS-PAGE により解析された。ゲルはクマシーブリリアントブルーにより染色した。セルラーゼ遺伝子 *cbh1* および *cbh2*、*egl1*、セルラーゼ転写調節因子遺伝子 *xyr1* および *pac1* の転写解析は qRT-PCR により行った。すべての値はハウスキーピング遺伝子 *act1* の発現により標準化した。各値は独立した 3 実験の平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。

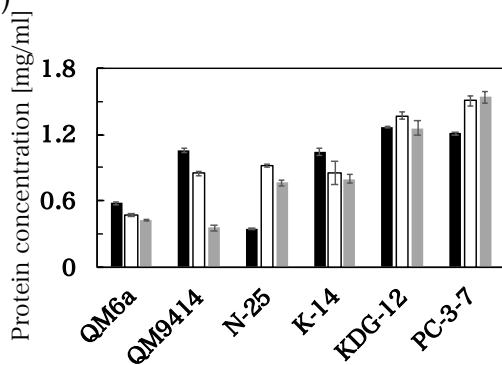
### 3.3.3. 種々の日本型変異株における pH 依存的セルラーゼ生産性

突然変異導入によるセルラーゼ高生産変異株の構築において、QM9414 から 5 世代の変異導入、選抜を経て PC-3-7 に至っている。PC-3-7 ゲノム中に生じている多くの遺伝子の変異はその過程で生じているため(82)、pH 応答に影響を与える変異を明らかにすることは極めて困難である。ゆえに、PC-3-7 開発までの変異株において pH 応答が変化した菌株を同定することが重要である。高 pH 依存的セルラーゼ生産能を獲得した変異株を同定するため、異なる pH 条件での *T. reesei* 野生株 QM6a、標準株 QM9414、日本型変異株 N-25、K-14、KDG-12、PC-3-7 のセルラーゼ生産能を評価した(Fig. 3-14)(167)。SDS-PAGE の結果から、高 pH での高いセルラーゼ生産は N-25 とその子孫で観察されることが示された(Fig. 3-14A)。変異株の酵素活性のパターンにおいて、Avicelase および CMCase 活性は SDS-PAGE やタンパク質量と同様の pH 応答性であった(Fig. 3-14A-D)。しかしながら、セロビアーゼ活性は QM9414 では pH 4.5 で最大になったが、N-25 および以降の変異株は pH 5.5 で最も高い活性を示した(Fig. 3-14E)。興味深いことに、N-25 は pH 3.5 でのセルラーゼ生産が減少していた。この表現型は N-25 の次の変異株である K-14 で回復していた(Fig. 3-14)。

(A)



(B)



(C)

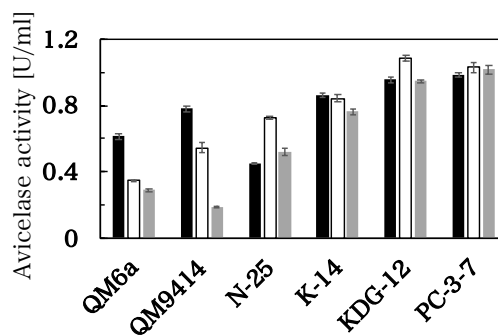


Fig. 3-14 種々の pH 条件における *T. reesei* 日本型変異株のセルラーゼ生産性

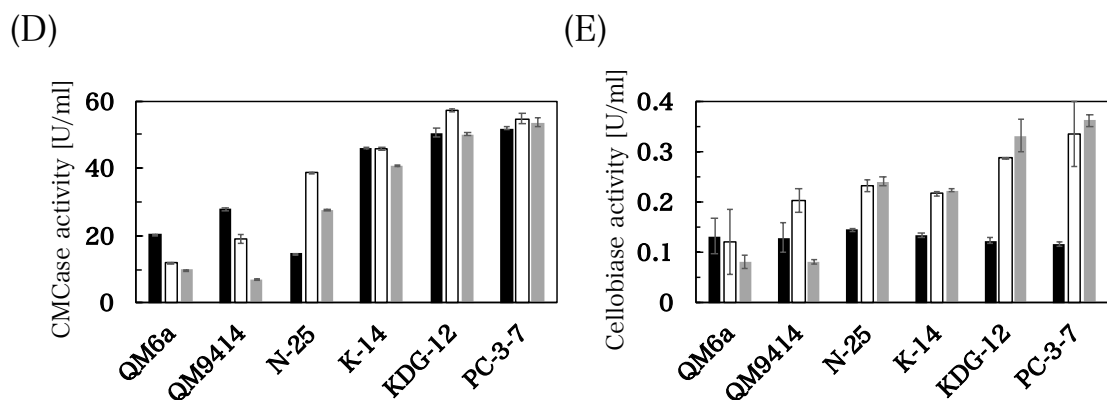


Fig. 3-14 種々の pH 条件における *T. reesei* 日本型変異株のセルラーゼ生産性(続き)

*T. reesei* QM6a および QM9414、N-25、K-14、KDG-12、PC-3-7 を酒石酸バッファーを用いて pH 3.5 (black bar) および 4.5 (white bar)、5.5 (gray bar) に調整した 1% Avicel 培地で 5 日間培養した。(A) 培養上清(16  $\mu$ l) は 12.5% SDS-PAGE により解析された。ゲルはクマシーブリリアントブルーにより染色した。タンパク質量(B) および Avicelase (C)、CMCase (D)、セロビアーゼ(E) 活性は培養上清を用いて測定した。各値は独立した 3 実験の平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。

### 3.3.4. QM9414 と N-25 間の比較ゲノム解析

N-25 のタンパク質生産パターンは低 pH、高 pH の両条件での pH 応答性のセルラーゼ生産に関与する変異によって引き起こされることが推測される。N-25 にて生じた変異点を同定するため次世代シーケンサーを用いて QM9414 と N-25 のゲノム解析を行った。QM9414 ではトータル 620 万リード、N-25 では 550 万リードが得られ、野生株 QM6a リファレンスゲノムにマッピングした。検出された一塩基多型 (single nucleotide polymorphism: SNP) からフィルタリングを行い、エクソンに生じている SNP および翻訳産物に影響を与えている SNV を抽出した(Table 3-3)。



Table 3-3 QM9414 および N-25 間で同定された SNP

Protein ID	Mutation	Element <sup>a</sup>	アミノ酸置換	Annotation/function
4860	C>T	Promotor		Siroheme synthase
5991	T>C	Exon	F158S	Importin 13
21120	T>G	Promotor		Alpha-methylacyl-CoA racemase
21937	C>T	Promotor		Mitochondrial protein import protein Mas5
22009	T>A	Exon	F341L	Tetracycline transporter
22911	C>G	Exon	P154A	Glucose-repressible alcohol dehydrogenase transcriptional effector Ccr4
48058	C>T	Promotor		Unknown
50212	T>C	Terminator		Unknown
52165	T>A	Terminator		Fk506 suppressor Sfk1
59100	A>T C>T	Promotor		Glycoprotease family protein
60498	A>T	Promotor		Female-specific protein transformer
61550	C>A	Exon	T275N	ATP-dependent RNA helicase DRS1
62938	C>G	Exon	L323V	Testis protein TEX11
63744	T>C	Terminator		Nuclear protein
65292	G>T	Exon	A264A	Short-chain-fatty-acid-CoA ligase
69384	A>T	Terminator		Uncharacterized protein Ymr031c homologue
70933	A>C	Promotor		Major facilitator superfamily protein
70943	C>T	Exon	G1162G	Putative histidine kinase HHK5p
72183	T>G	Promotor		Mannan-binding lectin
75418	G>T	Exon	G330V	Zinc finger transcription factor Ace1
77138	A>T	Terminator		Unknown
78582	A>C	Exon	Q323P	Ferrochelatase
82599	C>A	Promotor		Transcription factor Btf3
102411	T>G	Promotor		C6 transcription factor
108519	C>A	Promotor		Ubiquitin-conjugating enzyme
110122	C>T	Exon	N555N	Unknown
111593	T>A	Exon	H95Q	Unknown
120879	A>T	Exon	N285I	Luxr family transcriptional regulator
121495	A>T	Exon	V378V	Extracellular serine protease Tvsp1
121960	A>T	Exon	N194I	Unknown
122431	G>T	Promotor		Pex19 family protein

<sup>a</sup> Elements are classified in three categories; exon, promoter (1 kbp upstream of the start codon), terminator (500 bp downstream of the stop codon).

QM9414 と N-25 の比較ゲノム解析により 29 個の SNP を明らかにし、そのうち 10 SNPs はプロモーター領域(開始コドンから 1 kbp 以内)、5 SNPs はターミネーター領域(終止コドンから 500 bp 以内)、14 SNPs はエキソン内に存在していた(Table 3-3)。エキソン内に生じていた 14 SNPs のうち 4 個はサイレント変異だった。さらに、アミノ酸置換が生じた 10 遺伝子の転写パターンは QM9414 および N-25 間で同様であった(Fig. 3-15)。

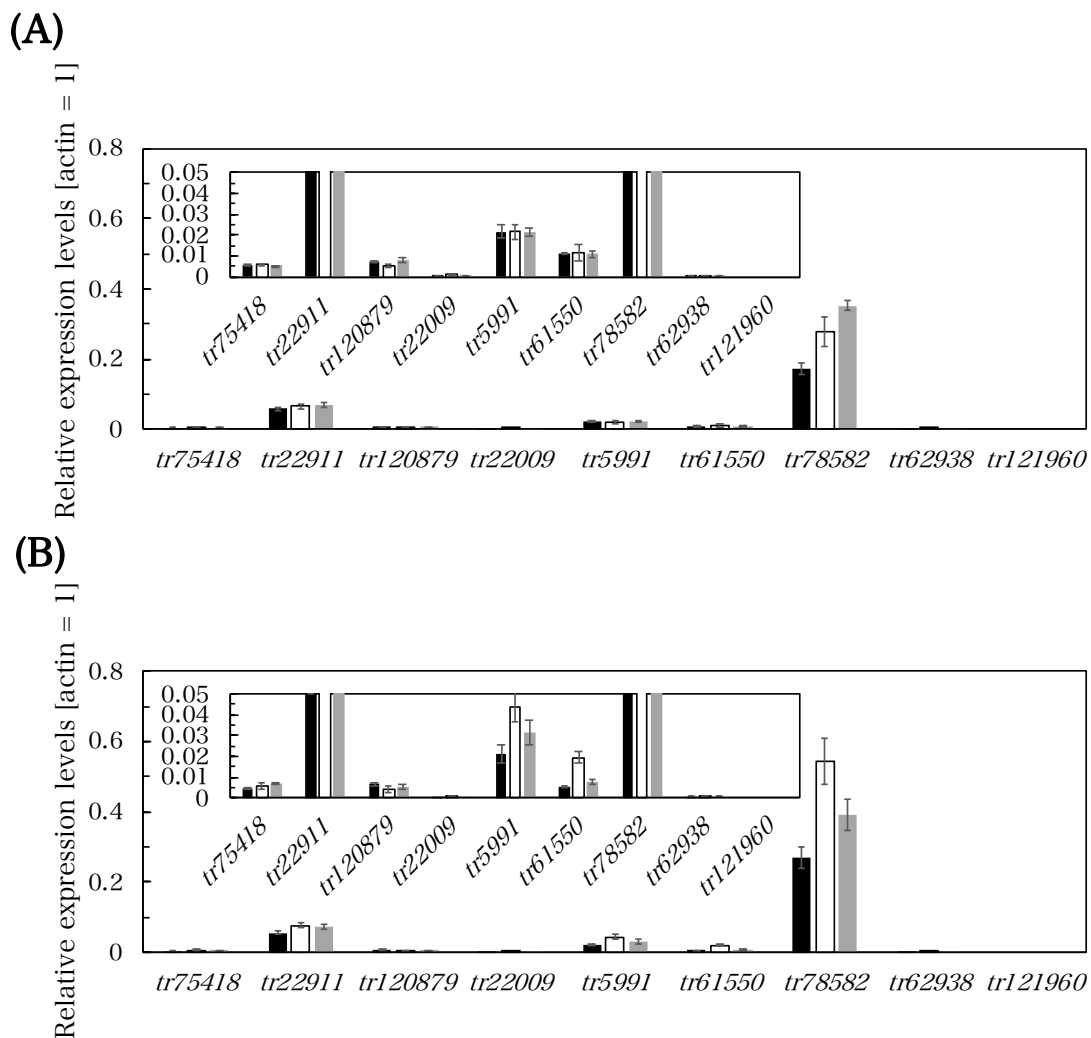


Fig. 3-15 種々の pH 条件におけるアミノ酸置換を伴う SNP 遺伝子の発現プロファイル  
*T. reesei* QM9414(A)および N-25(B)を酒石酸バッファーを用いて pH 3.5 (black bar)および 4.5 (white bar)、5.5 (gray bar)に調整した 1% Avicel 培地で 3 日間培養した。SNP 遺伝子(*tr75418*および *tr120879*, *tr22009*, *tr61550*, *tr78582*, *tr22911*, *tr5991*, *tr111593*, *tr62938*)の転写解析は qRT-PCR により行った。すべての値はハウスキーピング遺伝子 *act1* の発現により標準化した。各値は独立した 3 実験の平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。

コード領域に変異が見つかった 14 個の SNPs のうち、*tr75418* および *tr22911* の 2 遺伝子は転写調節因子をコードしていた。*tr75418* はセルラーゼ誘導条件でセルラーゼ発現のリプレッサーとして働く ACEI をコードしており、*tr22911* は *N. crassa* において炭素源異化抑制に関与する CCR4 と高い相同性を示した(58, 168)。これら転写調節因子が pH 依存的セルラーゼ生産に関与すると推測されたことから、QM9414 株でこれら遺伝子の破壊の影響を評価した。TR75418 および TR22911 をコードする遺伝子のゲノムのローカスにそれぞれの ORF 破壊 DNA 断片を組み込みはサザンブロット解析により確認した(data not shown)。しかしながら、遺伝子破壊の影響はセクレトーム、培養上清の酵素活性ともにあまり観察されなかった(Fig. 3-16)。

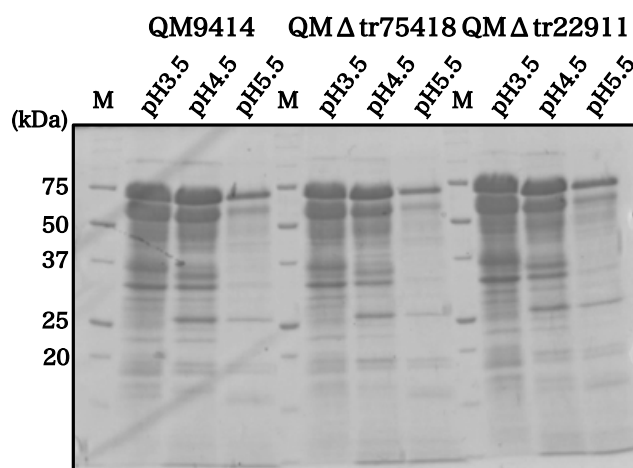


Fig. 3-16 転写調節因子をコードする SNP 遺伝子破壊株のセルラーゼ生産パターン

*T. reesei* QM9414 および QM $\Delta$ tr75418、QM $\Delta$ tr22911 を酒石酸バッファーを用いて pH 3.5~5.5 に調整した 1% Avicel 培地で 5 日間培養した。培養上清(16  $\mu$ l)は 12.5% SDS-PAGE により解析された。ゲルはクマシーブリリアントブルーにより染色した。

### 3.3.5. QM9414 と N-25 間の SNP 遺伝子の破壊の影響

QM9414 と N-25 間で生じた変異が転写レベルで pH 依存的なセルラーゼ生産に関与することが考えられるが、転写調節因子に生じた変異は関与していなかった(Fig. 3-16)。それゆえに、他の遺伝子に生じた変異が直接または間接的に pH 依存的なセルラーゼ遺伝子発現に関与していると推測されたが、SNP 遺伝子に pH に応じてセルラーゼ遺伝子発現に関与することが報告されている遺伝子は存在しない。そこで、pH 依存的なセルラーゼ生産制御因子の同定を行うため、他の 7 つの変異遺伝子の破壊株の構築を試みた。しかしながら、Ferrochelatase をコードする *tr78582* および importin13 をコードする *tr5991* の 2 遺伝子については、破壊株の獲得には至らなかった。得られた破壊株は、異なる pH 条件で培養し、セルラーゼ生産能を評価した(Fig. 3-17)。SDS-PAGE の結果、どの SNP 遺伝子破

壊株においても高pHでのセルラーゼ生産能はN-25と一致しなかった(Fig. 2-17)。一方で、*tr120879* および *tr22009* の破壊株は pH 3.5 でのセルラーゼ生産能が N-25 と同様に pH 4.5 と比べ低下していた(Fig. 3-17)。各破壊株の酵素活性のパターンにおいて、CMCase 活性は SDS-PAGE と同様の pH 応答性を示した(Fig. 3-17, 18)。一方で、N-25 および QM $\Delta$ 120879、QM $\Delta$ 22009 において、主要なセルラーゼ遺伝子 *cbh1* の発現は CMCase 活性と異なり、pH 3.5 でも高い転写量を保持していた(Fig. 3-18)。pH 5.5 での *cbh1* の発現量は N-25 以外の株では pH 4.5 と比べて減少していた(Fig. 3-18)。

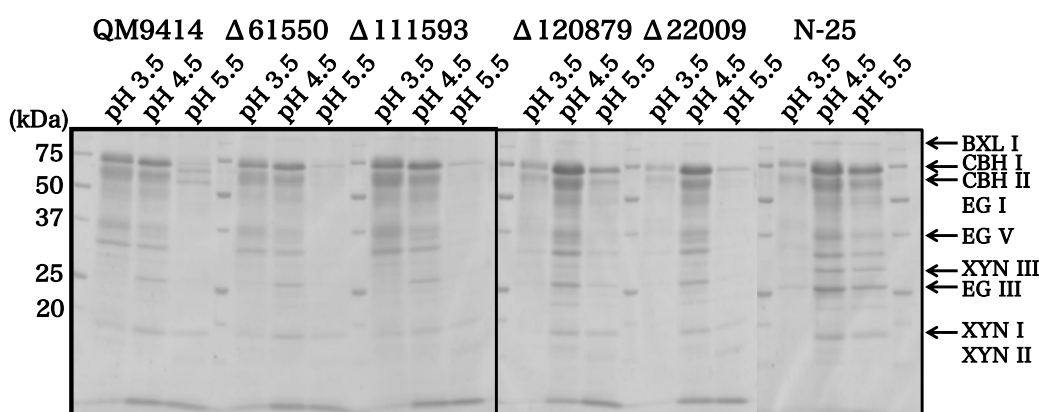


Fig. 3-17 SNP 遺伝子破壊株の各 pH 条件におけるセルラーゼ生産パターン

*T. reesei* QM9414 および QM $\Delta$ tr61550、QM $\Delta$ tr111593、QM $\Delta$ 120879、QM $\Delta$ 22009、N-25 を酒石酸バッファーを用いて pH 3.5~5.5 に調整した 1% Avicel 培地で 5 日間培養した。培養上清(16  $\mu$ l)は 12.5% SDS-PAGE により解析された。ゲルはクマシーブリアントブルーにより染色した。

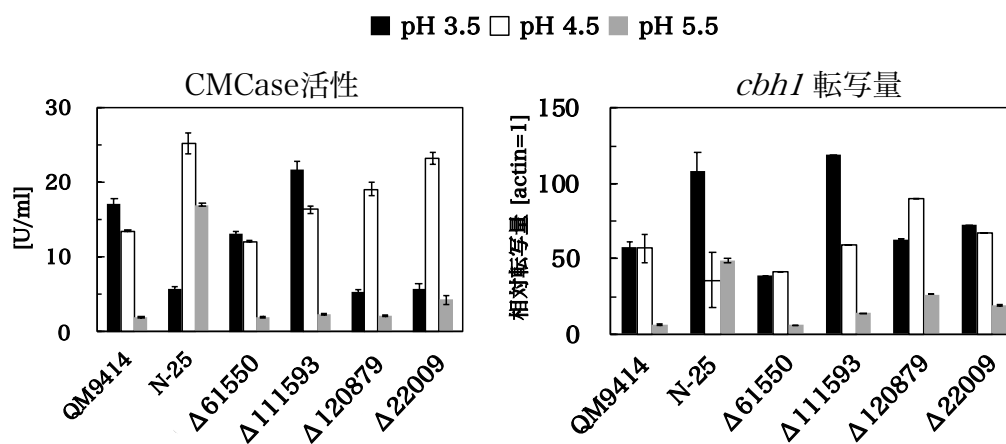


Fig. 3-18 SNP 遺伝子破壊株の各 pH 条件における CMCase 活性および *cbh1* 転写量

*T. reesei* QM9414 および QM $\Delta$ tr61550、QM $\Delta$ tr111593、QM $\Delta$ 120879、QM $\Delta$ 22009、N-25 を酒石酸バッファーを用いて pH 3.5~5.5 に調整した 1% Avicel 培地で 5 日間培養した。CMCase 活性は培養上清を用いて測定した。*cbh1* の転写解析は qRT-PCR により行った。すべての値はハウスキーピング遺伝子 *act1* の発現により標準化した。各値は独立した 3 実験の平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。

N-25 および QM $\Delta$ 120879、QM $\Delta$ 22009 では、pH 3.5 において CMCase 活性は減少していたにもかかわらず、*cbh1* 転写量は高いままであったことから、翻訳後に調節を受けていることが推測された。そこで、菌体外へのセルラーゼの分泌速度を評価するため、CMCase 活性の 1 日あたりの生産率を計算により算出した(Fig. 3-19)。その結果、QM9414 および QM $\Delta$ 120879、QM $\Delta$ 22009 は、pH 3.5 と pH 4.5 において高い生産率を示したが、pH 5.5 では低かった(Fig. 3-19)。N-25 の生産率はどの pH 条件においても高かった(Fig. 3-19)。しかしながら、CMCase 活性は減少していた N-25 および QM $\Delta$ 120879、QM $\Delta$ 22009 の pH 3.5 の生産率のピークは pH 4.5 と比べて遅延していた(Fig. 3-18, 19)。そのため、Tr120879 および Tr22009 が低 pH でのセルラーゼ生産の分泌に関与していることが推測された。

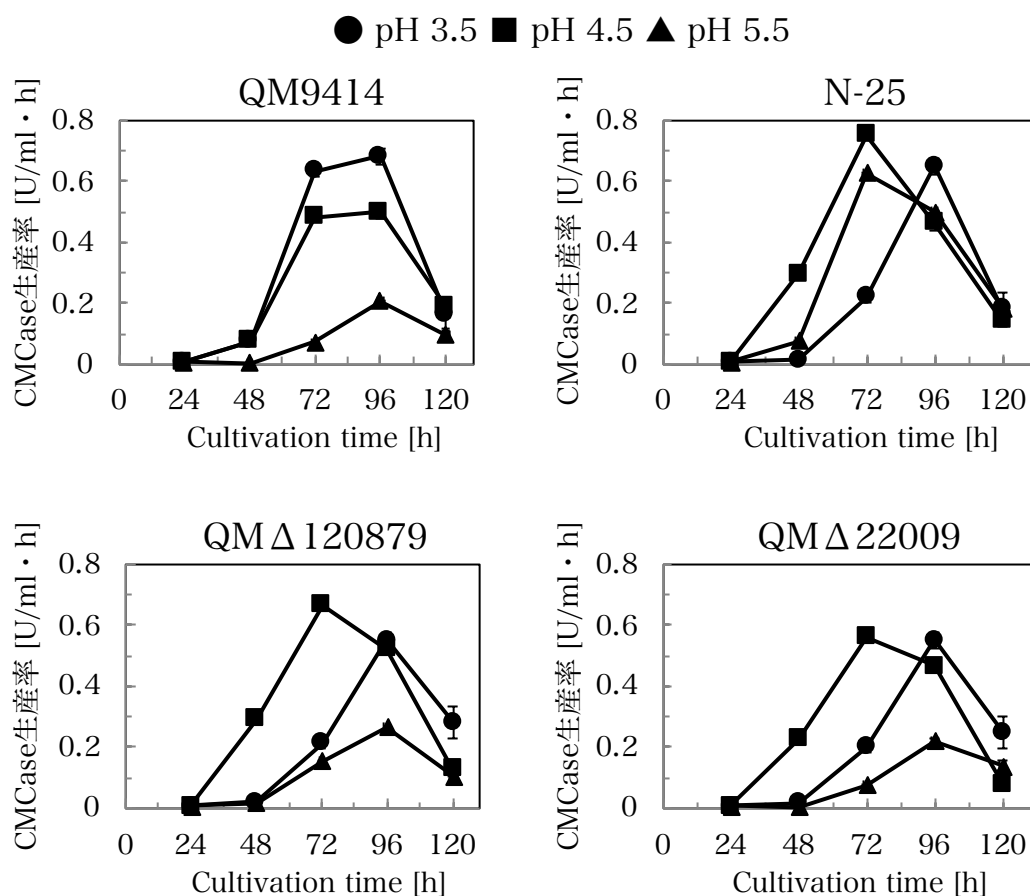


Fig. 3-19 QM $\Delta$ 120879、QM $\Delta$ 22009 の各 pH 条件における CMCase 生産率

*T. reesei* QM9414 および QM $\Delta$ 120879、QM $\Delta$ 22009、N-25 を酒石酸バッファーを用いて pH 3.5~5.5 に調整した 1% Avicel 培地で 5 日間培養した。CMCase 活性は培養上清を用いて測定した。(Ad-Ad-1)/24 (A: CMCase 活性, d: 培養時間)にて単位時間あたりの CMCase 生産率を算出した。各値は独立した 3 実験の平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。

Tr120879 および Tr22009 に生じた変異が低 pH でのセルラーゼ生産性に関与しているのか確認するため、N-25 において野生型タンパク質発現株を構築した。N-25 において、*tr120879* (N-25w120) および *tr22009* (N-25w22) をコードする遺伝子のゲノムのローカスにそれぞれの野生型 ORF 導入 DNA 断片が組み込まれているかはサザンブロット解析により確認した(data not shown)。また、両遺伝子を野生型の塩基配列に復帰させた菌株(N-25w22w120)も構築した。得られた野生型タンパク質発現株は、異なる pH 条件で培養し、セルラーゼ生産能を評価した(Fig. 3-20)。SDS-PAGE の結果、それぞれ単独で野生型タンパク質を発現している N-25w120 および N-25w22 は pH 3.5 でのセルラーゼ生産能が QM9414 と一致しなかった(Fig. 3-20)。一方で、N-25w22w120 は pH 3.5 でのセルラーゼ生産能が N-25 と比べて高くなった(Fig. 3-20)。CMCase 活性も SDS-PAGE と同様の pH 応答性を示した(Fig. 3-20)。このことから、Tr120879 および Tr22009 は同じメカニズムによって低 pH でのセルラーゼ生産を正に調節していることが示唆された。

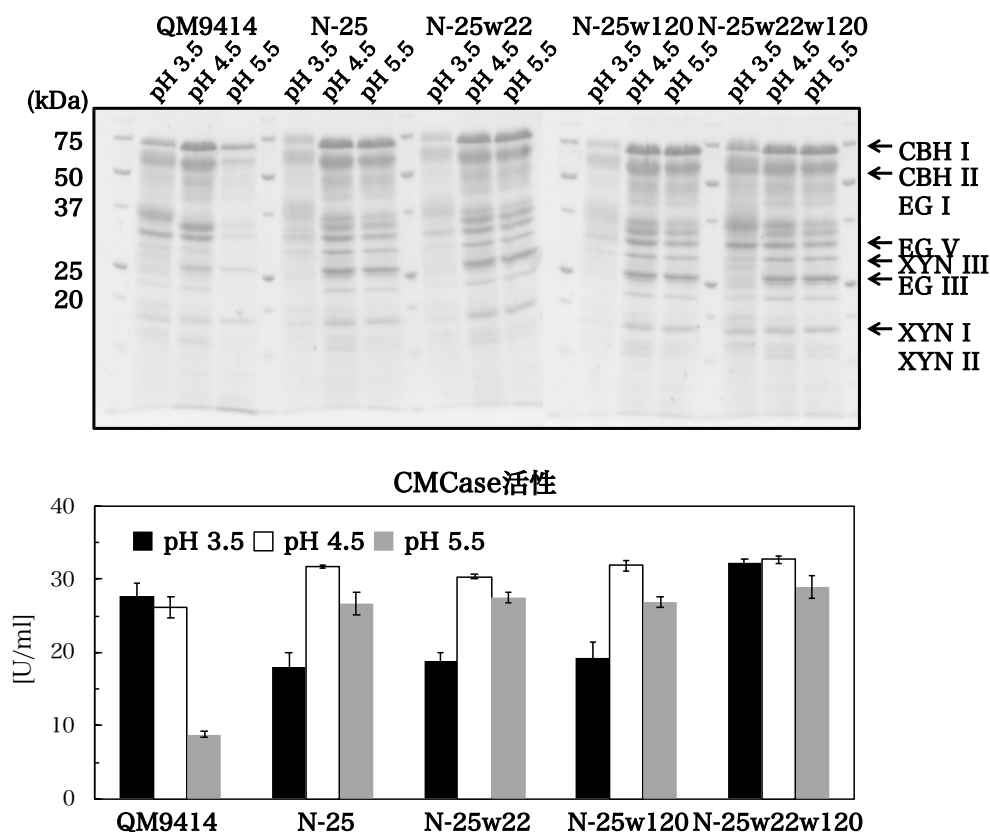


Fig. 3-20 野生型タンパク質発現株の各 pH 条件におけるセルラーゼ生産性

*T. reesei* QM9414 および N-25、N-25w120、N-25w22、N-25w22w120 を酒石酸バッファーを用いて pH 3.5~5.5 に調整した 1% Avicel 培地で 5 日間培養した。培養上清(16  $\mu$ l)は 12.5% SDS-PAGE により解析された。ゲルはクマシーブリリアントブルーにより染色した。CMCase 活性は培養上清を用いて測定した。各値は独立した 3 実験の平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。

### 3.3.6. 工業用糖化酵素生産菌株における培養 pH の変更による酵素組成改変

3.3.1 において、PC-3-7 株は培養 pH によりセルラーゼ、キシラナーゼ活性の比率が変化した。セルロース性バイオマスは、前処理によりセルロース、ヘミセルロース、リグニンの組成が大きく変化する。そのため、pH により各前処理バイオマスの糖化能を改善することができる可能性がある。NaOH 処理エリアンサスはセルロース、ヘミセルロースを含む前処理バイオマスであり、水熱処理ユーカリはセルロースのみを含む前処理バイオマスである。異なる pH によって生産される酵素の糖化能を評価するため、PC-3-7 および PC-3-7 株を親株として作出された X3AB1、E1AB1、X3-2RB\_AB1 を pH 3.5 および pH 5.5 に調整した 1% Avicel 培地または 1% Avicel に 0.5% キシランを含む培地にて培養した。X3AB1 が生産した酵素標品を JN11、E1AB1 が生産した酵素標品を JN13、2 章と同様に X3-2RB\_AB1 が生産する酵素標品を JN14 とした。タンパク質量は PC-3-7 と工業用糖化酵素生産菌株とで同様であった。CMCase 活性はすべての菌株で pH 3.5 よりも pH 5.5 でわずかに高かった(Fig. 3-21)。一方で、キシラナーゼ活性は全ての菌株で pH 5.5 が高かった(Fig. 3-21)。セロビアーゼ活性は JN11 酵素では pH 3.5 に比べて pH 5.5 が 3~4 倍高かったが、JN13 および JN14 酵素は pH 3.5 および pH 5.5 でほぼ同等であった(Fig. 3-21)。

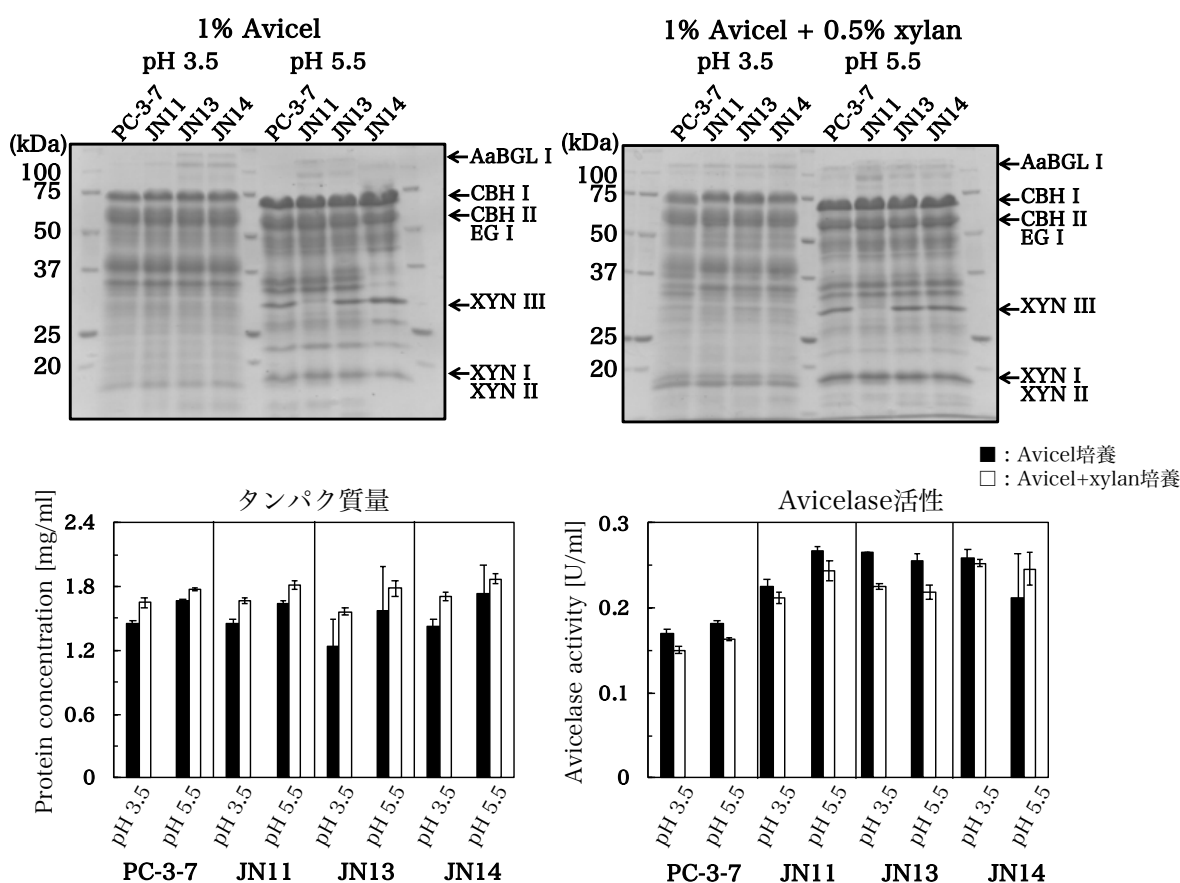


Fig. 3-21 PC-3-7 および派生菌株の各 pH 条件における糖質加水分解活性

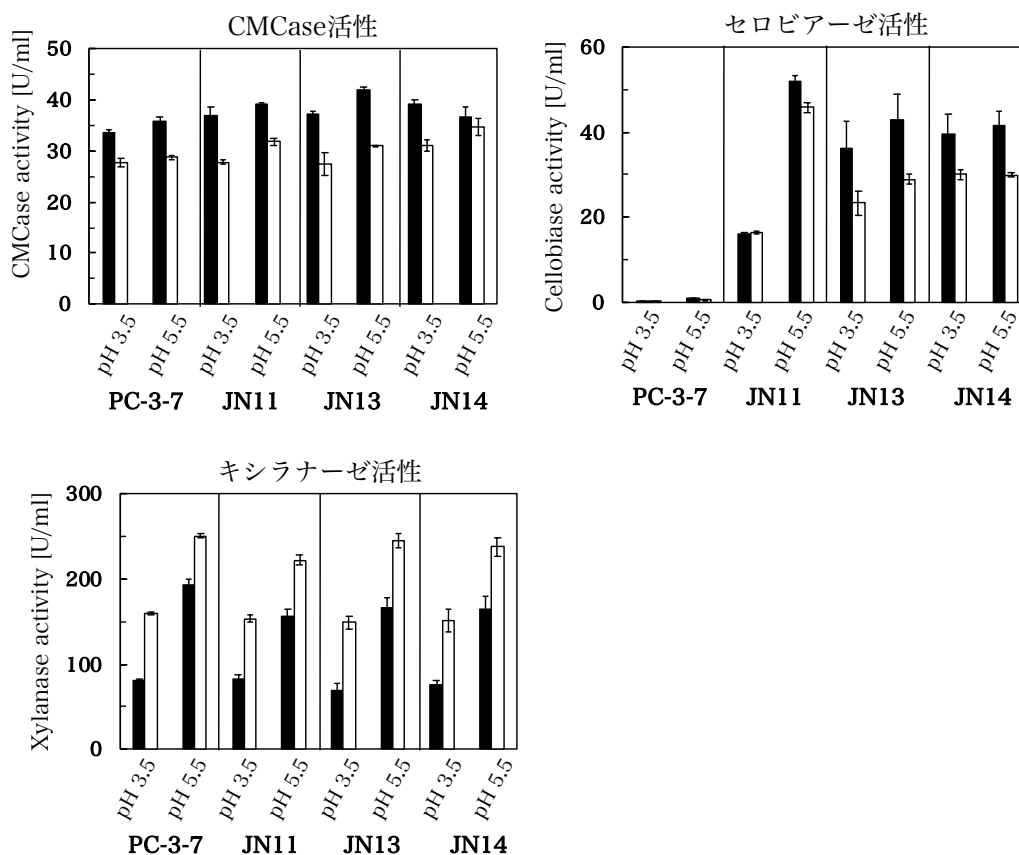


Fig. 3-21 PC-3-7 および派生菌株の各 pH 条件における糖質加水分解活性(続き)

*T. reesei* PC-3-7 および X3AB1 (酵素標品 JN11)、E1AB1 (酵素標品 JN13)、X3-2RB\_AB1 (酵素標品 JN14)を酒石酸バッファーを用いて pH 3.5 および 5.5 に調整した 1% Avicel 培地(black bar)または 1% Avicel+0.5% キシラン培地(white bar)で 5 日間培養した。培養上清(16 μl)は 12.5% SDS-PAGE により解析した。ゲルはクマシーブリリアントブルーにより染色した。タンパク質量および Avicelase 活性、CMCase、セロビアーゼ、キシラナーゼ活性は培養上清を用いて測定した。各値は独立した 3 実験の平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。

工業用糖化酵素生産菌株においても、PC-3-7 と同様に pH によって酵素標品に含まれるセルラーゼとキシラナーゼの活性比率が変化していたことから、実バイオマスの糖化を行った。2 種類の異なるバイオマス、NaOH 処理エリアンサス、水熱処理ユーカリを基質として使用した(Fig. 3-22)。NaOH 処理エリアンサス(セルロースおよびヘミセルロースを含む前処理バイオマス)ではどの培養 pH で得られた酵素でもほぼ同じ糖化能を示した(Fig. 3-22)。一方で、水熱処理ユーカリ(セルロースのみを含む前処理バイオマス)では pH 3.5 培養の酵素標品において pH 5.5 培養の酵素標品より高い糖化率が観察された(Fig. 3-22)。



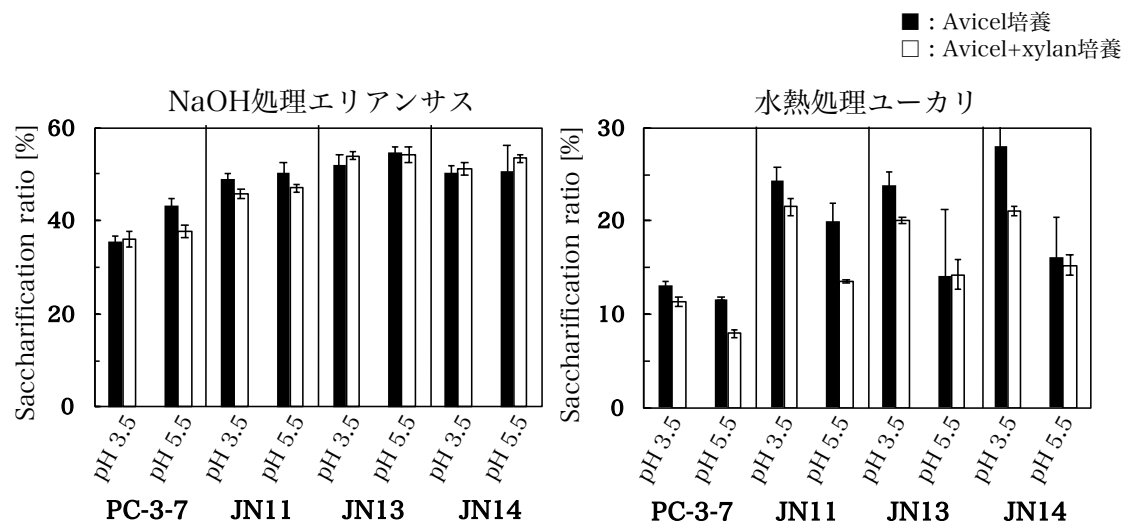


Fig. 3-22 工業用糖化酵素生産菌株由来の酵素標品による前処理バイオマスの糖化

*T. reesei* PC-3-7 および X3AB1 (酵素標品 JN11)、E1AB1 (酵素標品 JN13)、X3-2RB\_AB1 (酵素標品 JN14)を酒石酸バッファーを用いて pH 3.5 および 5.5 に調整した 1% Avicel 培地(black bar)または 1% Avicel+0.5% キシラン培地(white bar)で 5 日間培養した。酵素は 10 mg/g-バイオマスで使用し、50 °C で 48 h 反応させた。前処理バイオマスとして水熱処理ユーカリおよび NaOH 処理エريانサスを使用した。糖化率は生産されたグルコースおよびキシロースを全糖量の割合として計算した。各値は独立した 3 実験の平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。

### 3.4. 考察

本章では、*T. reesei* の pH 依存的セルラーゼ生産メカニズムを同定するため *T. reesei* 変異株における異なる pH 条件下での酵素生産の比較解析を行った。これまでに、PC-3-7 の誘導基質応答性や遺伝子発現の制御、ゲノム解析、菌糸形態について古くから解析されてきた(169)。PC-3-7 は QM9414 や野生株と異なりセロビオースのような可溶性のセルロース系炭素源を用いた時でも大量のセルラーゼを生産する(62)。さらに、PC-3-7 は QM9414 では発現しない GH10 キシラナーゼ XYNIII を生産することができる(71)。バイオマス糖化において XYNIII の重要性が実証されており(94)、PC-3-7 やその派生菌株は工業的利用において高い価値がある。また、QM9414 および PC-3-7 間の pH 応答の表現型の変化はセルラーゼ、ヘミセルラーゼの遺伝子制御メカニズムについて新規の知見を得ることができる。本章では、PC-3-7 とその親株 QM9414 における酵素生産と遺伝子発現の比較により PC-3-7 が高 pH 条件でも多量の酵素を生産できることを示した(Fig. 3-5)。これまでに、PC-3-7 の炭素源に応答したセルラーゼ生産に関する部分は解析されており、*creI* および *bglr*、*bgl2* の変異がセルラーゼ生産に関与することが同定されている(62, 82, 83)。しかしながら、これら 3 つの変異だけでは PC-3-7 の高いセルラーゼ、キシラナーゼ生産能を説

明することは困難である。QM9414 と PC-3-7 間の pH に応答するセルラーゼ生産性の変化はその他の様々な環境因子に対する応答も *T. reesei* 変異株において変化していることを示しているかもしれない。

真菌において、環境 pH への応答は Pal シグナル伝達経路および転写調節因子 PacC により制御される(170)。Pal タンパク質群は中性からアルカリ条件で pH シグナルを伝達し、pH 依存性および非依存性タンパク質分解により PacC を活性化する(171)。*T. reesei* において、PacC のホモログである PACI は高 pH 条件でのセルラーゼ遺伝子発現の負の制御因子であり、*pac1* 破壊株の酵素生産は酸性条件での挙動を示す(109)。さらに、この抑制は主要なセルラーゼ活性化因子 XYRI の発現の減少によって引き起こされることが示唆されている(109)。それゆえに、PC-3-7 の高 pH での高いセルラーゼ生産能は Pal タンパク質群や PACI の変異がこれらの機能を変化または欠損させたことで引き起こされると推測された。このような転写調節因子の機能の変化はこれまでも報告されている。*T. reesei* 高生産変異株 Rut C-30 において転写抑制因子 CREI は一部欠損し発現しているが、この欠損型の CREI は活性化因子として機能していた(172)。しかしながら、以前の比較ゲノム解析によって Pal ホモログおよび PACI をコードする遺伝子に変異がないことが示されている(82)。また、糸状菌において *pac1/pacC* の発現は PACI/PacC 自身により活性化される(171)。PACI の活性化は Pal タンパク質群により引き起こされる。ゆえに、*pal* 遺伝子の発現が QM9414 および PC-3-7 間で異なるならば、*pac1* 発現が変わると推測される。しかし、QM9414 および PC-3-7 間で *pac1* の発現レベルおよびそのパターンは同様であったことから(Fig. 3-9)、*palA* および *palF* の発現パターンの違いは生理学的に有効な変化ではないのであろう。さらに、*pal* 遺伝子の発現レベルはかなり低いことから、その小さな変化を区別することは困難であるのかもしれない。

PC-3-7 の *pac1* 破壊はセルラーゼ、キシラナーゼ遺伝子の発現の減少をもたらした(Fig. 3-12)。ゆえに、PACI は PC-3-7 においても確実に機能している。しかしながら、PC-3-7 の *pac1* 破壊はセルラーゼ、キシラナーゼ活性にあまり影響を与えず、以前の報告のように酸性条件での酵素生産挙動を示さなかった(Fig. 3-12)(109)。これらの事実は、*T. reesei* において *pac1* 破壊の影響をマスクするような環境 pH に応答する別のメカニズムが存在することを示唆している。Hakkinen et al. (110)の2015年の報告では、PACIにより直接的に発現が制御されている糖質加水分解酵素は少なく、pH 応答により様々な糖質加水分解酵素の発現を変化させる PACI 制御とは異なるメカニズムの存在について述べている。しかしながら、この報告における *pac1* 破壊の影響は本章および He et al. (109)が示した種々のセルラーゼ、キシラナーゼ遺伝子の転写が変化することと矛盾している。また、本章では、PACI は PC-3-7 において転写活性化因子として機能している。しかしながら、He et al. の

報告では QM9414 における PACI 破壊によって高 pH でのセルラーゼ遺伝子発現が酸性条件と同じ挙動を示し(109)、PC-3-7 に導入した *pacI* 破壊用断片を QM9414 に導入した当研究室の菌株でも酸性条件と同じ挙動を示した(Fig. 3-13)。PACI の解析における矛盾は培養条件や遺伝子発現の検出原理の違いのような様々な要因によって生じているかもしれない。興味深いことに、酵素生産はセルラーゼ遺伝子発現とは異なり *pacI* 破壊による影響が見られなかった(Fig. 3-11, 12)。pH 4.5、5.5 での遺伝子発現は減少していたものの(Fig. 3-12)、*T. reesei* により生産された酵素は培養中に上清に蓄積していくが、遺伝子発現は菌体のその瞬間の応答を示している。そのため、酵素活性と遺伝子発現量の間で違いが生じたかもしれない。さらに、*T. reesei* により生産される酵素標品は多くの種類のセルラーゼ、ヘミセルラーゼを含む複合酵素であり、相乗的に基質を分解する。それゆえに、転写の減少がマスクされた可能性もある。現在この現象を説明することは難しく、PC-3-7 のより詳細な分子生物学的解析が必要である。

キシラナーゼ生産において、発現の制御は培養 pH に依存して変化すると考えられている(110, 173)。キシラナーゼ遺伝子の発現量は PC-3-7 のほうがかなり高かったが(Fig. 3-7)、発現パターンは QM9414 と同様であった。これは QM9414 と PC-3-7 間でキシラナーゼ遺伝子の発現制御メカニズムに違いが無いことを示している。*xyn1* 遺伝子は pH 3.5 で高い発現を示し、*xyn2*、*xyn3* 遺伝子は pH 4.5、5.5 で多量の発現が観察された(Fig. 3-6)。*T. reesei* は各酵素をそれぞれの至適 pH で機能させるため環境 pH によりセルラーゼ生産を制御するとの報告はこれまでもされている(110–112, 174)。

一方で、β-グルコシダーゼ遺伝子の発現は他のセルラーゼ、キシラナーゼ遺伝子とは異なる pH 応答性を示した(Fig. 3-7)。セルラーゼ遺伝子の発現パターンは QM9414、PC-3-7 とともに *xyl1* 遺伝子の発現と一致していた。しかしながら、*bglI* 発現は両株とも pH 4.5 で最大値を示した。この結果から、β-グルコシダーゼ遺伝子の発現はセルラーゼ遺伝子発現とは異なり、別のメカニズムにより制御されることが示唆された。このような制御としては転写活性化因子 BglR がセルラーゼ遺伝子発現ではなく、BGL 遺伝子群の発現を制御していることが報告されている(62)。さらに、PC-3-7 において、*pacI* 破壊は pH 4.5、5.5 で *bglI* 発現の減少をもたらしたが、セルラーゼ遺伝子発現は減少しなかった(Fig. 3-12)。それゆえに、*bglI* 発現は PACI により強く制御されているかもしれない。

分泌酵素の酵素活性測定から低 pH、高 pH 条件で異なる酵素比率であることが明らかとなった(Fig. 3-7)。酵素比率の pH 依存的な変化は Rut C-30 株の報告において同様に知られており、キシラナーゼの効率的な生産は高 pH で行われ、逆に低 pH 条件ではセルラーゼ生産が活発となる(111)。さらに、Li et al. はエキソグルカナーゼ、エンドグルカナーゼ、β-グルコシダーゼの生産はそれぞれ pH 5.0、4.5、5.5 が最適であると示唆している(175)。

Rut C-30 と比較して、PC-3-7 における各酵素の分泌の最適 pH は高くなっていた。ほとんどの場合において、酵素生産は pH 5.0 より高い条件で促進されたが、キシラナーゼ活性は pH 4.5 以上で劇的に増加した(Fig. 3-7)。これは PC-3-7 の酵素組成は高 pH 条件においてキシラナーゼの割合が増加していたことを示す。PC-3-7 をベースに作られた工業用菌株 X3AB1 および E1AB1、X3-2RB\_AB1 を異なる pH 条件で培養した時でも、PC-3-7 の結果から予想される活性パターンを示した(Fig. 3-22)。水熱処理ユーカリ(セルロースのみを含む前処理バイオマス)に対する糖化能は pH 5.5 で培養した酵素標品よりも pH 3.5 で培養した酵素標品により改善されていた(Fig. 3-23)。日本の多くの工業用菌株は PC-3-7 をベースに開発されていることから、PC-3-7 の pH 依存的セルラーゼ生産能の応用はそれら工業用菌株の糖化能をさらに改善することを可能にするかもしれない。

QM9414 から PC-3-7 への変異株開発において、N-25 は高 pH におけるセルラーゼ高生産という表現型を獲得していた。これは N-25 により生じた変異が高 pH におけるセルラーゼ生産に寄与していることを意味する(Fig. 3-14)。QM9414 と N-25 間の比較ゲノム解析は N-25 ゲノム中に 10 遺伝子にアミノ酸置換を伴う変異が生じていることを明らかとした(Table 3-3)。加えて、その 10 遺伝子の転写パターンは QM9414 と N-25 間で同様であった(Fig. 3-15)。ゲノムデータベースおよび BLAST 解析の結果、転写調節因子をコードする遺伝子 *tr75418* および *tr22911* を破壊解析のターゲットとして選抜した。セルラーゼ抑制因子 AceI をコードする *tr75418* は *T. reesei* においてセルラーゼ誘導条件下でセルラーゼの抑制因子として働き(58)、*A. nidulans* のストレス応答に関与する転写調節因子 StzA と高い相同性を示す(59)。*tr22911* は、*T. reesei* で同様な働きをしているか不明だが、*S. cerevisiae* の炭素源異化抑制に関与する CCR4 タンパク質と相同性がある(176)。2 種の変異遺伝子は炭素源代謝に関与する転写抑制因子をコードすることから、N-25 における異なる pH 応答にこれらの変異遺伝子が関与していることが予想された。しかしながら、QM9414 におけるこれら変異遺伝子の破壊株は親株である QM9414 と同様のセルラーゼ生産性を示した(Fig. 3-16)。この結果は解析した 2 つの転写調節因子以外の他の遺伝子への変異が N-25 の高 pH での高いセルラーゼ生産をもたらしていることを示している。TR22009 および TR61550、TR78582、TR120879 をコードしている遺伝子への変異はそれらの翻訳産物の機能的ドメイン中にアミノ酸置換が生じている(data not shown)。これらの遺伝子は膜輸送や金属イオン濃度のようなホメオスタシスメカニズムに関与する。なかでも、高 pH 条件で発現が高くなった遺伝子である *tr78582* は推定フェロケラターゼをコードしている(Fig. 3-15)。金属イオンホメオスタシスは遺伝子発現において様々な役割をもることが示されている。これまでに、*T. reesei* においてセルラーゼ遺伝子の発現がカルシウムシグナリングを経てマグネシウムイオンにより制御されることが報告されている

(177)。さらに、細胞外カルシウムイオンが *T. reesei* においてセルラーゼ遺伝子の活性化に寄与することも報告されている(178)。鉄も微生物にとって重要であり、フェロケラターゼはすべての細胞においてヘム生合成経路の末端に存在している。それゆえに、鉄は *T. reesei* においてセルラーゼ生産に関与するかもしれない。

一方で、QM9414 と N-25 間の低 pH 条件でのセルラーゼ生産の変化は、Tr120879 および Tr22009 が関与することが推測された(Fig. 3-17, 21)。さらに、これらの遺伝子は N-25 においてそれぞれを単独で野生型のタンパク質に復帰させた場合はセルラーゼ生産に影響は見られないが、QM9414 ではこれらの遺伝子の単破壊で影響が観察される(Fig. 3-21)。そのため、Tr120879 および Tr22009 は同一のメカニズムによって、*T. reesei* の低 pH でのセルラーゼ生産に関与していると示唆された。Tr120879 は LuxR ファミリーの転写調節因子としてアノテーションされている(Table 3-3)。このタイプの転写調節因子はバクテリアでは多種多様な遺伝子発現を制御しており、代謝酵素の発現やストレス応答に関与していることが報告されている(179)。Tr22009 は Major facilitator super family に属する膜タンパク質であり、テトラサイクリントランスポーターとアノテーションされた(Table 3-3)。しかし、これらのタンパク質間で相互作用があることや pH 応答に関与する報告はない。N-25 や QM9414 における Tr120879 および Tr22009 破壊株ではセルラーゼ遺伝子の高い転写量が維持されているため(Fig. 3-18)、Tr120879 および Tr22009 は転写後にセルラーゼ生産を正に制御していることが推測される。これまでに、*T. reesei* Rut C-30 においてゴルジ体から液胞/リソソームへの輸送に関与するアダプタータンパク質(AP3)複合体がセルラーゼ遺伝子の発現ではなく、菌体外へのセルラーゼの分泌に関与することが報告されているが(180)、セルラーゼ分泌に関する報告はこれ以外に存在しない。そのため、Tr120879 および Tr22009 が関与する低 pH でのセルラーゼ生産メカニズムは未知のメカニズムであり、今後詳細な分子メカニズムの解析が必要となる。

#### 第4章 *T. reesei*の窒素源応答に関する研究

#### 4.1. 緒言

*T. reesei*はセルラーゼ・ヘミセルラーゼを含む細胞外タンパク質を多量に分泌する。タンパク質合成には窒素源が必須であるため、細胞内の窒素状態に応答したセルラーゼ発現制御が存在する可能性がある。*T. reesei*野生株 QM6a より派生した Rut C-30 株によるセルラーゼ分泌は窒素飢餓によって阻害されることが報告されている(181)。この事実は *T. reesei* が分泌タンパク質のためにどのようにして窒素源を使用するかをより理解することの重要性を強調する。しかしながら、*T. reesei*の窒素源に応じたセルラーゼ生産制御メカニズムはいまだ理解されていない。

*A. nidulans*において転写調節因子 AreA (*N. crassa*においては Nit-2)が糸状菌において窒素代謝の重要な制御因子であることが示されている。この転写調節因子は硝酸や尿素、アミノ酸のような種々の窒素源の資化も活性化する(116, 117)。AreA/Nit-2 は窒素源制限時や非好適窒素源が存在するときに窒素源代謝に関与する酵素の転写を誘導する(119)。*A. oryzae*において、AreA は窒素飢餓時にアンモニアの輸送システムの発現も制御している(120)。*A. nidulans*において、アンモニア輸送システムはアンモニアやグルタミンの菌体内濃度により調節されており、AreA は窒素源制限時や非好適窒素源が存在するときアンモニアパーミアゼ遺伝子の発現を活性化している(121, 122)。以上のように、AreA/Nit-2 は微生物における窒素源代謝の包括的な活性化因子として認識されている。過剰な窒素源や好適窒素源の存在時、AreA/Nit-2 は核から排出され、遺伝子発現を活性化しない(182)。近年の研究では、AreA が窒素代謝遺伝子だけでなく、二次代謝産物生産に関与する遺伝子の発現も制御することが明らかとなっている(119)。*F. oxysporum*や *P. marneffei*のようないくつかの病原性真菌において、AreA オルソログは感染時の窒素飢餓状態に完全に適応するためと完全な病原性を示すためにに必須である(139, 140)。

本章では、世界的標準株 QM9414 において窒素源に応答するセルラーゼの発現制御メカニズムを明らかにすることを目的としている。セルラーゼ生産と窒素源との関係性の解析を通して、*T. reesei*において AreA ホモログ(Are1)の存在が予測されたため、遺伝子破壊を用いて *T. reesei*におけるセルラーゼ遺伝子発現制御への Are1 の役割を解析した。Are1 が窒素輸送を制御することにより窒素代謝に関与している可能性を見出した。さらに、Are1 破壊株は親株と比較して低いセルラーゼ生産を示したが、これは転写レベルで引き起こされていた。これらの結果から Are1 が窒素代謝だけでなく、セルラーゼ遺伝子発現も調節していることが示唆された。本章の発見はセルラーゼ遺伝子発現を制御するメカニズムへの新たな知見を与えるものである。

## 4.2. 実験操作

### 4.2.1. *T. reesei* 菌株と培養条件

*T. reesei* QM9414 株(ATCC26921)は本実験を通して親株として使用した。QM9414ΔP は QM9414 の *pyr4* 遺伝子破壊株であり(83)、形質転換体構築のための親株として使用した。*T. reesei*は PDA プレート培地で培養し、得られた胞子は使用まで 10% グリセロールを含む 0.9% NaCl 溶液にて-80 °C で保存した。

本章で使用した培地は basal medium (炭素源および 0.01 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、0.2% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.03% CaCl<sub>2</sub>、0.03% MgSO<sub>4</sub>、0.1% Bacto™ Polypeptone、0.05% Bacto™ Yeast extract、0.1% (w/v) Tween 80、0.000006% H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>、0.000026% (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>、0.0001% FeCl<sub>3</sub>、0.4% CuSO<sub>4</sub>、0.000008% MnCl<sub>2</sub>、0.0002% ZnCl<sub>2</sub>、50 mM tartaric acid buffer (pH 4.0) (77))をベースとした。ゲノム DNA 抽出のために *T. reesei*は 0.3% グルコースを含むマンデル培地で 28 °C、220 rpm で 48 h 培養された。表現型解析には、1×10<sup>7</sup> 個の胞子を最小寒天培地(2% glucose および 0.6 mg/ml MgSO<sub>4</sub>、0.6 mg/ml CaCl<sub>2</sub>、12.5 mM CsCl<sub>2</sub>、10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> buffer (pH 5.5)、0.005 mg/ml FeSO<sub>4</sub>、0.0016 mg/ml MnSO<sub>4</sub>、0.0014 mg/ml ZnSO<sub>4</sub>、0.002 mg/ml CoCl<sub>2</sub>、2% agar)に植菌し、28 °C で 6 日間培養した。セルラーゼ生産では、1×10<sup>7</sup> 個の胞子を 50 ml の 1% Avicel を唯一の炭素源として含む basal medium に植菌し、28 °C、220 rpm で 120 h 培養した。培養上清はミラクロスを用いたフィルターろ過により回収し、酵素標品として使用した。菌体からは転写解析のために total RNA を抽出した。

### 4.2.2. マルチプルアラインメントおよび系統樹解析

*A. nidulans* AreA (CAA36731.1)のアミノ酸配列を *T. reesei*ゲノムデータベースより Are1 (protein ID 76817)を同定するための BLASTP 解析のクエリ配列として使用した。機能的ドメインの推定は Conserved Domain Database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>)を使用して行った。Are1 および AreA/Nit-2 オルソログのマルチプルアラインメント解析は MUSCLE アルゴリズムを利用して行った。Are1 および既知の Are1 オルソログ間の統計学的相関解析は MEGA 7.0 を用いて 1,000 回のブートストラップによる最尤法により行った。オルソログとしては下記のタンパク質を使用した(120, 140, 183–188): *Trichoderma harzianum* AreA (KKP00251.1)、*A. nidulans* AreA、*A. oryzae* AreA (AAK08066.1)、*Aspergillus niger* AreA (CAA68196.1)、*Penicillium decumbens* AreA (AGY46355.1)、*F. fujikuroi* AreA (CAA71897.1)、*P. marneffeii* AreA (ABI34463.1)、*N. crassa* Nit-2 (AAB03891.1)、*Magnaporthe grisea* Nut1 (AAB03415.1)、*S. cerevisiae* Gat1p (NP\_116632.1)、*Candida albicans* Gat1 (Q5A432.1)



#### 4.2.3. プラスミド構築および形質転換

遺伝子破壊用プラスミドの構築のため、*are1* の上流領域 1.5 kbp および下流領域 1.6 kbp を QM9414 ゲノムを鋳型として PCR により増幅した。さらに、これらの PCR 産物には形質転換のための DNA 断片を切り出すために EcoRI サイトを付加した。*pyr4* をコードする選択マーカー遺伝子は pU*pyr4*F を FspI で消化して獲得した(83)。これらの DNA 断片を pUC118 (Takara Bio, Shiga, Japan) の HincII サイトに In-Fusion クローニングし、pU $\Delta$ *are1pyr4* を構築した(Fig. 4-1)。pU $\Delta$ *are1pyr4* は EcoRI および FspI により消化され、得られた 5.0 kbp の断片を形質転換に使用した。

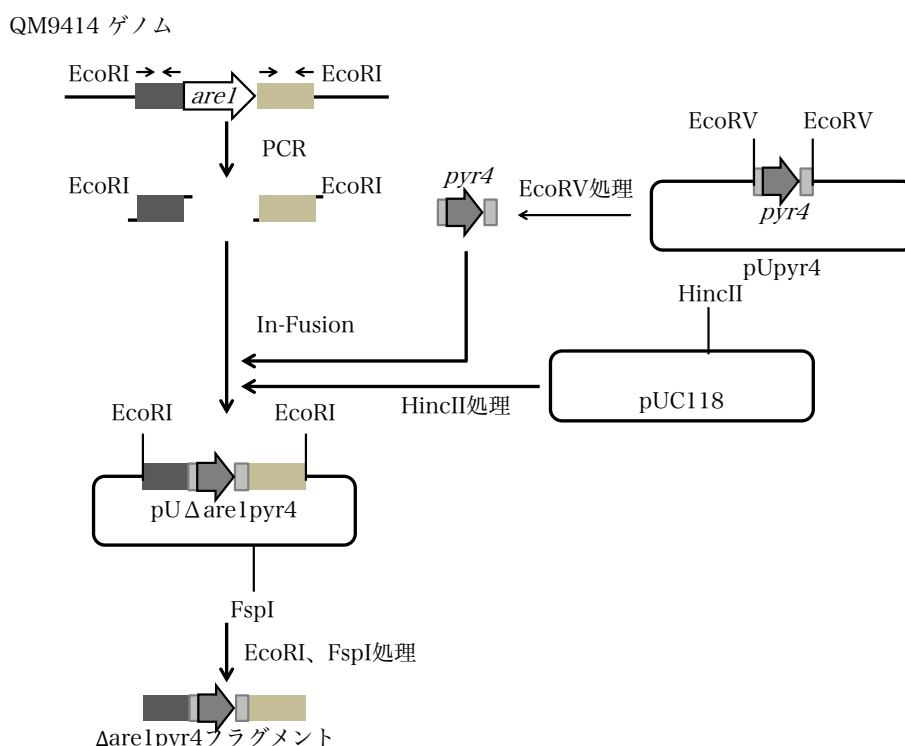


Fig. 4-1 pU $\Delta$ *are1pyr4* の構築方法

*xyr1* プロモーター変異導入用プラスミドの構築には、QM9414 株のゲノムを鋳型として、*xyr1* の ORF を含む上流領域 1.5 kbp から下流領域 2.0 kbp までの DNA 断片を PCR によって増幅させた。この DNA 断片を pUC118 HincII サイトに NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix (New England Biolabs) を用いてアッセンブルし pU*xyr1* を構築した。pU*xyr1* の *xyr1* の終止コドンより下流 500 bp の部分をインバース PCR によって開裂させ、選択遺伝子マーカーとして *pyr4* マーカーを NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix を用いて pU*xyr1pyr4* を構築した。また、pU*xyr1pyr4* を鋳型とし変異導入用プライマーを用いて *xyr1* の開始コドンより上流-140 bp (Site I) または-562 bp (Site II) に

(G→T)の点変異を導入し、それぞれ得られたプラスミドを pUxylmSiteI および pUxylmSiteII と命名した。pUxylmSite I、pUxylmSite II を制限酵素 DraI で消化し、得られた断片を形質転換に利用した(Fig. 4-2)。用いたプライマーは Table 4-1 に示す。

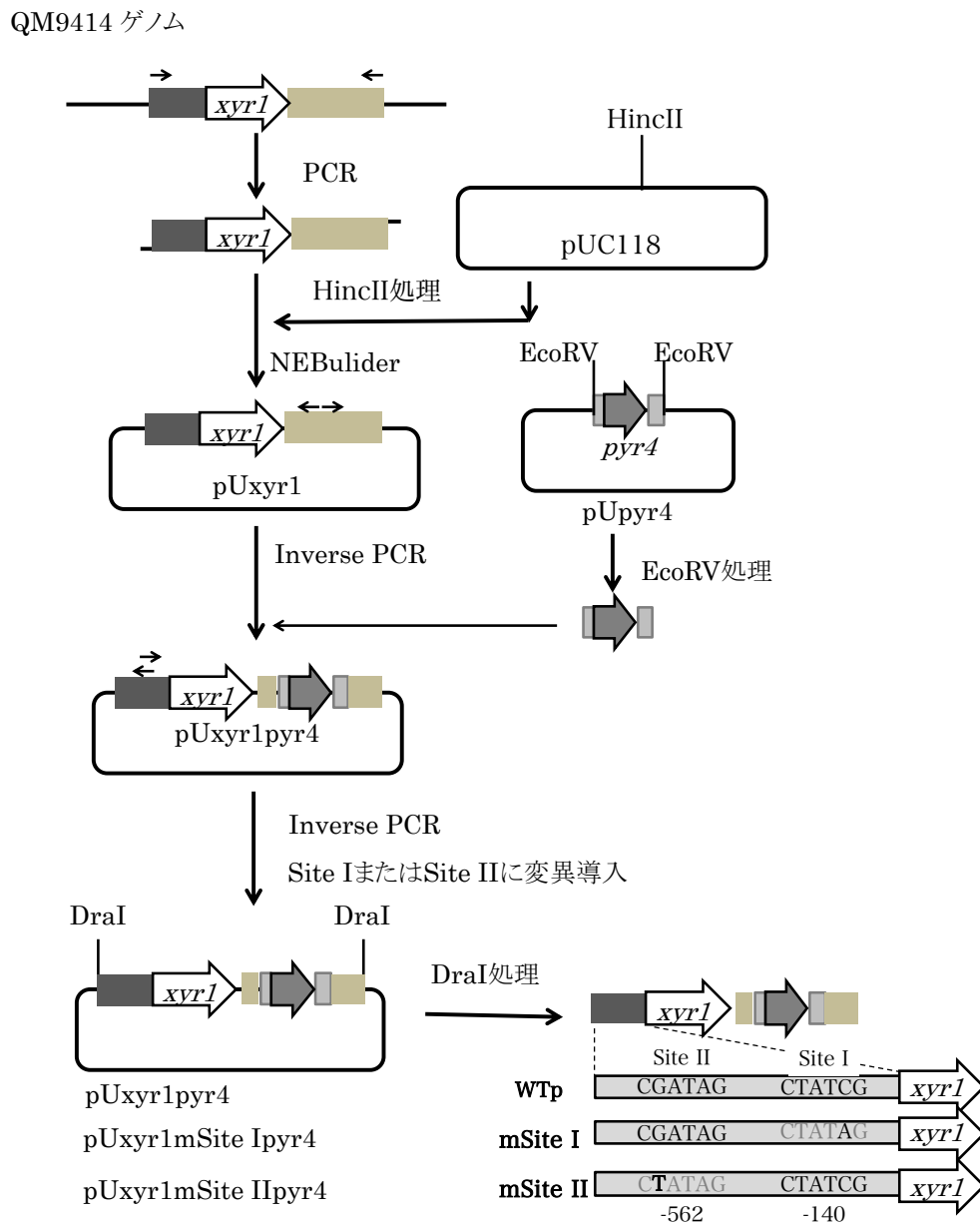


Fig. 4-2 *xylI* プロモーター変異導入カセットの構築

*T. reesei* プロトプラストの形質転換は Penttilä et al.の方法で行った(152)。形質転換されたプロトプラストはウリジン原栄養性に基づいたスクリーニングによりウリジンを含まない最少培地で培養した。形質転換体は安定化のためウリジンを含まない最少培地で 2

回シングルコロニーアイソレーションした。相同組換えおよびコピー数は AlkPhos Direct kit (GE Healthcare Bio Science, Waukesha, WI, USA)を用いてサザンブロット解析により確認した。*areI*破壊候補株のゲノム DNA を SphI または NheI によってゲノム DNA を消化し電気泳動したのち、Hybond N+ membrane (GE Healthcare Bio Science, Waukesha, WI, USA)へと転写した。alkaline phosphatase によりラベル化された *pyr4* ORF NcoI 断片 0.5 kbp をプローブとして用いた。本章で使用したプライマーは Table 4-1 に示した。

Table 4-1 本章で使用したプライマーリスト

Name	sequence (5' → 3')
Plasmid construction	
<i>areI</i> 破壊断片用	
IF_are1_up_Fw	GGATCCTCTAGAGTCGAATTCATATTCGCTCTGCTGGAA
IF_are1_up_Rv	GGGAGCAGCGCTGATTTCTCTCTGCTTGACGTCGTA
IF_are1_down_Fw	GCAGTTGTCGACGATAATTTGACACGGGATCGTTGATGC
IF_are1_down_Rv	GCATGCCTGCAGGTCGAATTCATCTCTCGAGTCCCTGTCTGATC
<i>xyr1</i> プロモーター解析用	
xyr1_up_Fw	GGATCCTCTAGAGTttaaCGTGAGGACCACTCCGTTTC
xyr1_down_Rv	GCATGCCTGCAGGTCtttaaGTTGTTGCGTATGGCGTG
xyr1t_inv_Fw	<u>GTTGTCGACGATATCCTGTAGAAATTGAGGGTGAC</u>
xyr1t_inv_Rv	<u>TAGGGAGCAGCGCTGCCATGCTCATCGTGCACTTG</u>
xyr1p_pm1_Fw	TTGCTATAGAAGCGGTCTGCTATAC
xyr1p_pm1_Rv	CGCCTTCTATAGCAAAACCGAGAAAC
xyr1p_pm2_Fw	CGCTCGCTATAGGAGTTTCGCCTGC
xyr1p_pm2_Rv	TCCCTATAGCGAGCGCGCCTTGACAA
AreI DNA binding domain 発現用	
Are1DBD_Fw	GAAGGAGATATACATCAACCTGCATGCGGC
Are1DBD_Rv	TGGTGGTGGTGGTGGGGAGGACGCCGTGGT
Transcriptional analysis	
Cellulase genes	
qRT_cbh1_Fw	CTTGGCAACGAGTTCTCTT
qRT_cbh1_Rv	TGTTGGTGGGATACTTGCT
qRT_cbh2_Fw	CGTCAAATTGTCGTGGAA
qRT_cbh2_Rv	ACTGAGCATTGGCACACTT
qRT_egl1_Fw	CGGCTACAAAAGCTACTACG
qRT_egl1_Rv	CTGGTACTTGCGGGTGAT

Table 4-1 本章で使用したプライマーリスト (続き)

qRT_bgl1_Fw	AGTGACAGCTTCAGCGAG
qRT_bgl1_Rv	GGAGAGGCGTGAGTAGTTG
Xylanase genes	
qRT_xyn1_Fw	GGTTGGACGACTGGATCT
qRT_xyn1_Rv	GGTTGTCCTCCATGATGTAG
qRT_xyn2_Fw	CCGTCAACTGGTCCAACCT
qRT_xyn2_Rv	ACACGGAGAGGTAGCTGTT
Transcription factor genes	
qRT_xyr1_Fw	TGCGAGACCATTTGTTAGG
qRT_xyr1_Rv	CTGCTGCTCAGCTAAATCTT
qRT_ace3_Fw	GACATTTTCCCCGAAGGAGA
qRT_ace3_Rv	GTTGGAGTGGAAGTAGCGAATG
qRT_ace2_Fw	ATACGGCTGCCTCAATG
qRT_ace2_Rv	GAACGACCTTTGCTTCTCTC
Transceptor genes	
qRT_crt1_Fw	CATGGACAAGATTGGCTG
qRT_crt1_Rv	TCGTCAAGCTCTTCCAAA
Housekeeping genes	
qRT_act1_Fw	TCCATCATGAAGTGCGAC
qRT_act1_Rv	GTAGAAGGAGCAAGAGCAGTG

小文字は DraI カットサイト。アンダーラインは *pyr4*断片との相同領域。太文字は変異導入点を示す。

#### 4.2.4. 生化学的分析

タンパク質濃度は牛ガンマグロブリンをスタンダードとしてブラッドフォード法により決定した。Avicelase およびカルボキシメチルセルラーゼ(CMCCase)、キシラナーゼ活性は 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS)法により還元糖量を測定した。Avicelase 活性は 50 mM 酢酸バッファー(pH 5.0)中に終濃度 0.5% Avicel (Funakoshi, Tokyo, Japan)を基質として 50 °C で 30 min 間反応させ測定した。CMCase 活性は 50 mM 酢酸バッファー(pH 5.0)中に終濃度 1% CMC (low viscosity, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)を基質として 50 °C で 15 min 間反応させ測定した。キシラナーゼ活性は 50 mM 酢酸バッファー(pH 5.0)中に終濃度 1% birch wood xylan (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)を基質として 50 °C で 10 min 間反応させ測定した。活性の 1 ユニットは 1 分間でグルコース相当の還元糖 1  $\mu$ mol を生産する酵素の量として決定した。セロビアーゼ活性は 50 mM 酢酸バッファー(pH 5.0)中に終濃度 20 mM セロビオース(Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)を基質として 50 °C で 10 min 間反応させ、Glucose C2 kit (Wako pure chemical, Osaka, Japan)によ

り放出されたグルコースを測定した。セロビアーゼ活性の 1 ユニットは 1 分間でグルコース 2  $\mu\text{mol}$  を生産する酵素の量として決定した。それぞれの活性は独立した 3 培養系の平均で示した。

菌体内 DNA 量を測定するため、1 ml 分の菌糸をフィルターろ過により回収した。回収した菌糸は培養上清を取り除くため水で洗浄し、15,000 rpm で 10 分間遠心した。1 ml の 10% トリクロロ酢酸(TCA)に菌糸ペレットを懸濁した。その後、懸濁液を 30 分間煮沸した。DNA を含む可溶性画分からセルデブリを取り除くため、15,000 rpm で 10 分間遠心分離を行った。DNA 量は Nano-Drop One (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)を用いて可溶性画分の測定を行った。

定量的リアルタイム PCR (qRT-PCR)を行うために、total RNA は Shida et al.によって報告されている改良したホットフェノール法により凍結菌体から抽出した(83)。cDNA は total RNA 1  $\mu\text{g}$  より Transcriptor First-Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Applied Science, Bavaria, Germany)を用いて合成した。qRT-PCR は LightCycler® 480 System (Roche Applied Science, Bavaria, Germany)を用いて行った。相対転写量はハウスキーピング遺伝子 *act1* の値をコントロールとして用いて計算した。それぞれの値は独立した 3 培養系の平均で示した。本章で使用したプライマーは Table 4-1 に示した。

#### 4.2.5. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Are1 DNA Binding Domain (Are1DBD)の構築は Are1 (Tr76817)の 664 から 854 番目のアミノ酸領域を pET-22b(+)<sup>+</sup>の T7 プロモーターの制御下にクローニングし(Table 4-1, Fig. 4-3)、C 末端側には His-tag を付加し TALON resin による精製にて行った (pETare1DBDHis)。発現させる Are1 の DNA binding domain 領域は Muro-Pastor et al. 1999 の AreA DNA binding domain の領域を参考にした。

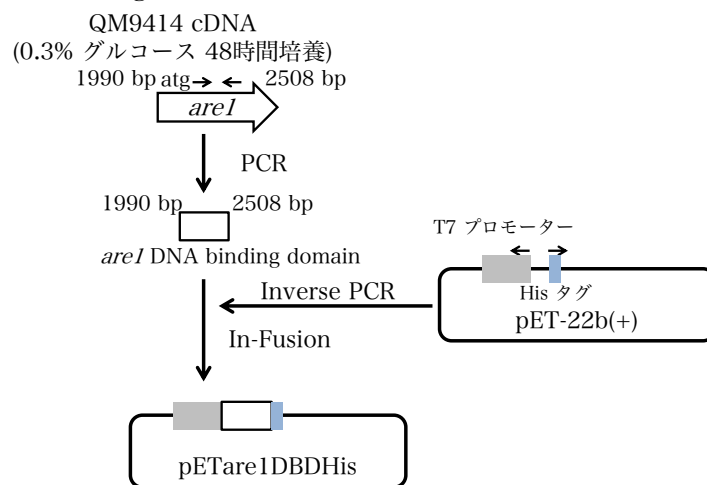


Fig. 4-3 Are1 DNA binding domain 発現用プラスミドの構築

アンピシリンを添加した TB 培地 50 ml に Are1DBD 発現用プラスミドを導入した *E. coli* BL21 のコロニーを植菌し、37 °C、180 rpm で 18 時間前培養した。その後、新しい TB 培地 50 mL に培養液を 500 µL 添加後、25 °C、180 rpm で培養して OD<sub>600</sub>=0.6 になったのち 0.1 M イソプロピルチオガラクトシド(IPTG)を添加し 25 °C、180 rpm で 18 時間誘導を行った。誘導後、遠心分離により菌体を回収し、洗浄 Buffer(50 mM リン酸ナトリウム buffer (pH 7.5)、300 mM NaCl、10 mM イミダゾール)で懸濁した。この懸濁液を超音波破碎に供し、無細胞抽出液を獲得した。無細胞抽出液を TALON® Metal Affinity Resin (Clontech) 2 ml に吸着させ、洗浄 Buffer でレジンを洗浄したのち、溶出 Buffer (50 mM リン酸ナトリウム buffer (pH 7.5)、300 mM NaCl、150 mM イミダゾール)を添加して 1 ml ずつ分画した。

EMSA に用いる DNA プローブは推定 AreA 結合配列(HGATAR)を中心としたオリゴヌクレオチドプライマー(30 bp) 100 pmol ずつ混合し、95 °C で 5 分間加熱した後ゆっくりと室温まで冷却することでアニーリングさせ獲得した。アニーリングしたプローブはポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動で精製した。精製したオリゴヌクレオチドを Gel Shift kit, 2<sup>nd</sup> (Roche)のジゴキシゲニンでラベリングして DNA プローブとした。ラベル化したプローブをエタノール沈殿で精製し、ペレットを 25 fmol/µL となるよう ddH<sub>2</sub>O で溶解した。1x Binding buffer 中でラベル化したプローブ(75 fmol)および Are1DBD、1 µg の Poly (dI-dC)、0.1 µg Poly L-lysine を混合し、25 °C で 20 分間インキュベートした。反応混合物をポリアクリルアミド(150 V で 30 分間 pre-run)にアプライし、0.5x TBE buffer を用いて 150 V、4 °C で 120 分電気泳動した。泳動後のゲルにメンブレン(Hybond N<sup>+</sup>)を重ね、0.5x TBE buffer で湿らせた 4 枚の Whatmann 3mm filter paper で挟み、気泡を抜いたのち 12 V、200 mA で 120 分間ブロッキングした。ブロッキング後のメンブレンに UV クロスリンカーを用いて 1,200 J で 40 秒間 UV を照射した。

### 4.3. 実験結果

#### 4.3.1. *T. reesei*における種々の窒素源に応答したセルラーゼ生産性

一般的に、basal medium での培養では *T. reesei*のための窒素源として 0.01 M 硫酸アンモニウム(窒素イオン濃度: 0.02 M)が使用される(77, 160)。様々な硫酸アンモニウム濃度での *T. reesei*のセルラーゼ生産性を評価するため、*T. reesei*を 0、0.005、0.01、0.02、0.05、0.1 M 硫酸アンモニウムを窒素源として含む 1% Avicel basal medium で培養した (Table 4-2)。Basal medium は窒素源としてペプトンおよび yeast extract を含んでいる (77)。菌体蓄積量の違いを除去するため、CMCase 活性は total DNA 量により標準化した (Table 4-2)。CMCase 活性は 0.01 M まで濃度の増加に伴い濃度依存的に増加した。0.02

M では、CMCase 活性はプラトーに達し、0.1 M では減少した。菌体蓄積は 0.01 M 硫酸アンモニウムでプラトーに達し、この濃度が *T. reesei* における完全な生育のために必要な最少窒素源濃度であると示唆された。

菌体蓄積が 0.01 M 硫酸アンモニウム(窒素イオン濃度: 0.02 M)でプラトーに達したことから、0.02 M 窒素イオンを本実験で使用する濃度として選択した。窒素源の種類によるセルラーゼ生産性への影響を評価するため、*T. reesei* を 0.02 M 硝酸ナトリウム、0.01 M 硝酸アンモニウム、0.01 M 尿素、0.01 M グルタミン、0.02 M メチオニンを窒素源として含む 1% Avicel basal medium で培養した(Table 4-2)。CMCase 活性のデータを元に、セルラーゼ生産は硝酸ナトリウム、尿素、メチオニンの添加は窒素源を非添加(0 M)の条件と同様であった。対して、硝酸アンモニウム、グルタミンでの培養はセルラーゼ生産を示した。菌体蓄積により標準化しているにもかかわらず、高い CMCase 活性は菌体蓄積と同様の傾向を示した。

Table 4-2 *T. reesei* QM9414 における種々の窒素源に対する CMCase 活性

Conditions	CMCase activity [U/mg-total DNA] <sup>1</sup>	Total DNA content [mg/ml] <sup>1</sup>
Concentration of ammonium sulfate		
0 M	10.2 ± 0.1	0.093 ± 0.001
0.005 M	57.9 ± 3.9	0.184 ± 0.013
0.01 M	134.4 ± 16.1	0.222 ± 0.005
0.02 M	160.2 ± 2.8	0.197 ± 0.005
0.05 M	160.9 ± 20.5	0.223 ± 0.027
0.1 M	131.6 ± 13.7	0.284 ± 0.019
Kind of nitrogen source		
0.01 M ammonium nitrate	52.4 ± 2.8	0.147 ± 0.012
0.02 M sodium nitrate	14.4 ± 3.0	0.108 ± 0.003
0.01 M urea	3.4 ± 0.4	0.082 ± 0.003
0.01 M glutamine	66.6 ± 1.8	0.206 ± 0.028
0.02 M methionine	7.8 ± 0.8	0.077 ± 0.001

<sup>1</sup>*T. reesei* を 1% Avicel 培地(ペプトン、yeast extract を含む)で 5 日間培養した。各値は独立した 3 実験の平均値である。

#### 4.3.2. Mycelia transfer method を用いた窒素源に対するセルラーゼ生産性

種々の窒素源に対する生育の違いを評価するため、*T. reesei* を天然窒素源を含むもしくは含まない 1% glucose basal medium にて種々の窒素源を用いて培養した。硫酸アンモニウムを本実験のコントロールとして使用し、硝酸ナトリウムを非好適および利用不可能な窒素源およびグルタミンを好適窒素源として 0.02 M の窒素イオン濃度で使用した。天然窒素源を含む培地のとき、*T. reesei* は用いた窒素源にかかわらず生育を示した(Fig. 4-4A)。しかしながら、天然窒素源を含まない条件では、*T. reesei* は硫酸アンモニウムおよびグルタミンで生育したが、硝酸ナトリウムや窒素源を用いない場合では生育できなかった(Fig. 4-4B)。

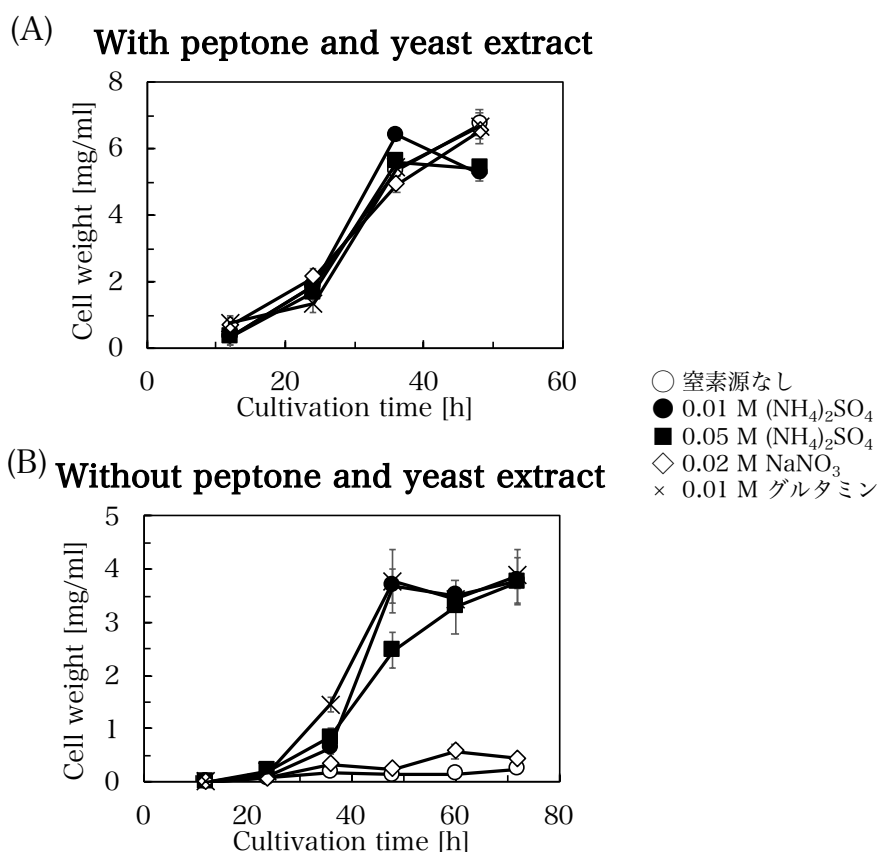


Fig. 4-4 1% グルコース培地での乾燥菌体重量

*T. reesei* を 0.01 M 硫酸アンモニウムおよび 0.01 M グルタミン、0.02 M 硝酸ナトリウムを窒素源として含むまたは窒素源を添加しない 1% グルコース培地にて培養した。また、天然窒素源を含む培養(A)および含まない培養(B)を行った。各値は独立した 3 実験の平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。



*T. reesei* は天然窒素源のみで生育できるにもかかわらず、セルラーゼをほとんど生産することができなかった(Table 4-2, Fig. 4-4A)。そのため、窒素源依存的なセルラーゼ生産が生育の有無ではなく窒素源のセルラーゼへの同化によるものなのか窒素源への応答により引き起こされているのかを確認するため、*T. reesei* を 0.01 M 硫酸アンモニウムを含むグルコース basal medium で前培養して菌体を取得して、各窒素源を単一の窒素源として含む Avicel basal medium (天然窒素源を除いた)へと移した。培養上清の酵素活性は CMC およびキシランを基質として、エンドグルカナーゼおよびキシラナーゼ活性を測定した(Fig. 4-5)。各酵素活性は菌体蓄積の影響を除外するため、total DNA 量により標準化した(Fig. 4-5)。その結果、硝酸ナトリウムや窒素源なしでのタンパク質量は硫酸アンモニウムやグルタミンのものに比べて低かった(Fig. 4-5A)。硫酸アンモニウムでのタンパク質量はグルタミンより高い値を示した(Fig. 4-5A)。CMCase およびキシラナーゼは窒素源を用いなかった場合や硝酸ナトリウムにおいて活性が極めて低かった(Fig. 4-5B, C)。硫酸アンモニウムでの CMCase 活性が実験したすべての条件の中で最も高かった(Fig. 4-5C)。硫酸アンモニウム培養と比べ、グルタミンを用いた培養では CMCase 活性は減少した。一方で、キシラナーゼ活性は硫酸アンモニウムとグルタミンで同様だった(Fig. 4-5C)。菌体蓄積は硫酸アンモニウムよりもグルタミンで高いことが観察され、硝酸ナトリウムと窒素源なしは同等の値を示した(Fig. 4-5E)。セルラーゼ生産は菌体蓄積が可能な窒素源で観察されたことから、窒素源代謝がセルラーゼ生産に重要であることが示唆された。

(A)

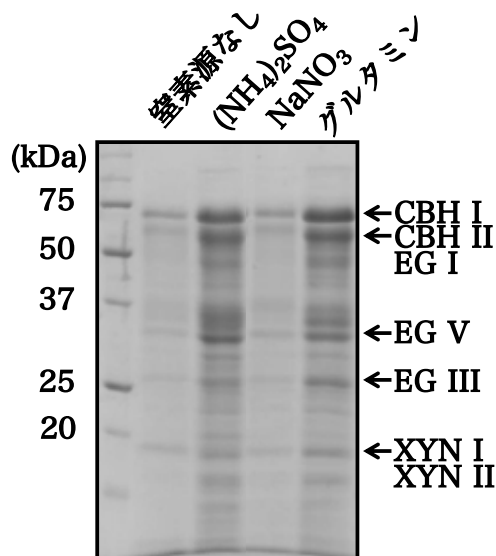


Fig. 4-5 種々の窒素源条件における QM9414 のセルラーゼ生産性

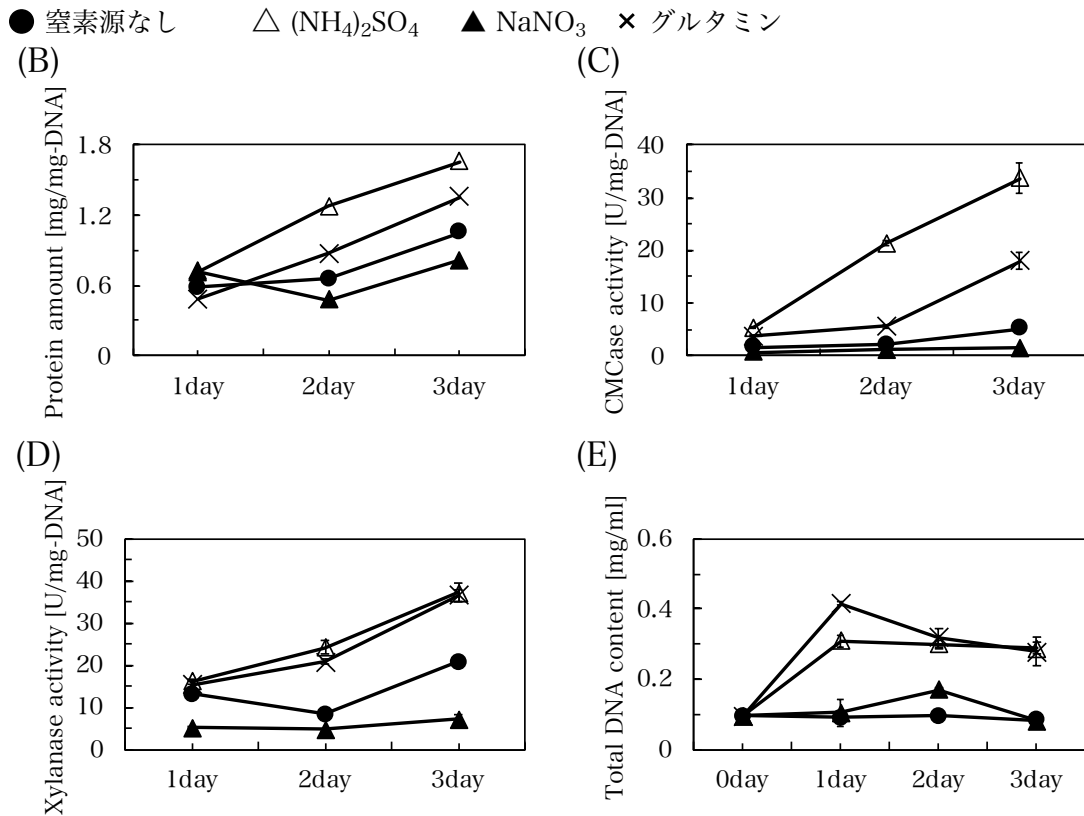


Fig. 4-5 種々の窒素源条件における QM9414 のセルラーゼ生産性(続き)

*T. reesei* QM9414 を 0.3% グルコース培地で 2 日間前培養し、菌糸のみを 0.01 M 硫酸アンモニウム (white triangle) または 0.01 M グルタミン (cross mark)、0.02 M 硝酸ナトリウム (black triangle) を唯一の窒素源として含むまたは窒素源なし (black circle) の 1% Avicel 培地へと移し、3 日間培養した。培養上清 (16  $\mu$ l) は 12.5% SDS-PAGE (A) により解析した。ゲルはクマシーブリーリアントブルーにより染色した。タンパク質量 (B) および CMCase (C)、キシラナーゼ (D) 活性は培養上清を用いて測定した。菌体内 DNA 量 (E) は菌体を用いて測定した。各値は独立した 3 実験の平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。

#### 4.3.3. 窒素源に対するセルラーゼ遺伝子の発現解析

窒素源依存的なセルラーゼ生産が転写レベルにより調節されているのか解明するため、主要なセルラーゼ遺伝子 *cbh1* および *cbh2*, *egl1*、主要なキシラナーゼ遺伝子 *xyn1* および *xyn2*、主要なセルラーゼ転写活性化因子 *xyr1* の転写量を qRT-PCR により測定した。セルラーゼ、キシラナーゼ遺伝子は窒素源なしや硝酸ナトリウムではほとんど発現していなかった (Fig. 4-6A, B)。グルタミンでは、セルラーゼ遺伝子の発現は硫酸アンモニウムのものと比べると、より低い値を示した (Fig. 4-6)。しかしながら、*cbh1* および *cbh2*, *egl1* の発現パターンは硫酸アンモニウムとグルタミンで同様だった (Fig. 4-6A)。これらのセルラーゼ遺伝子の転写量はセルラーゼ活性と一致していた (Fig. 4-4C, 4-6A)。キシラナーゼ遺伝子発現の観点では、*T. reesei* は硫酸アンモニウムでグルタミンより高い *xyn1* 遺伝子の

転写量を示した(Fig. 4-6B)。対して、*xyn2*発現は硫酸アンモニウム培養と比べ、グルタミンで増加していた(Fig. 4-6B)。*xyn1* および *xyn2*のトータル転写量は硫酸アンモニウム、グルタミンで同様だった(Fig. 4-6B)。転写調節因子の場合、*xyr1* の転写は硝酸ナトリウムや窒素源なしではかなり低かった(Fig. 4-6C)。グルタミンでは、*xyr1* の発現は硫酸アンモニウムと比べ減少していた(Fig. 4-6C)。

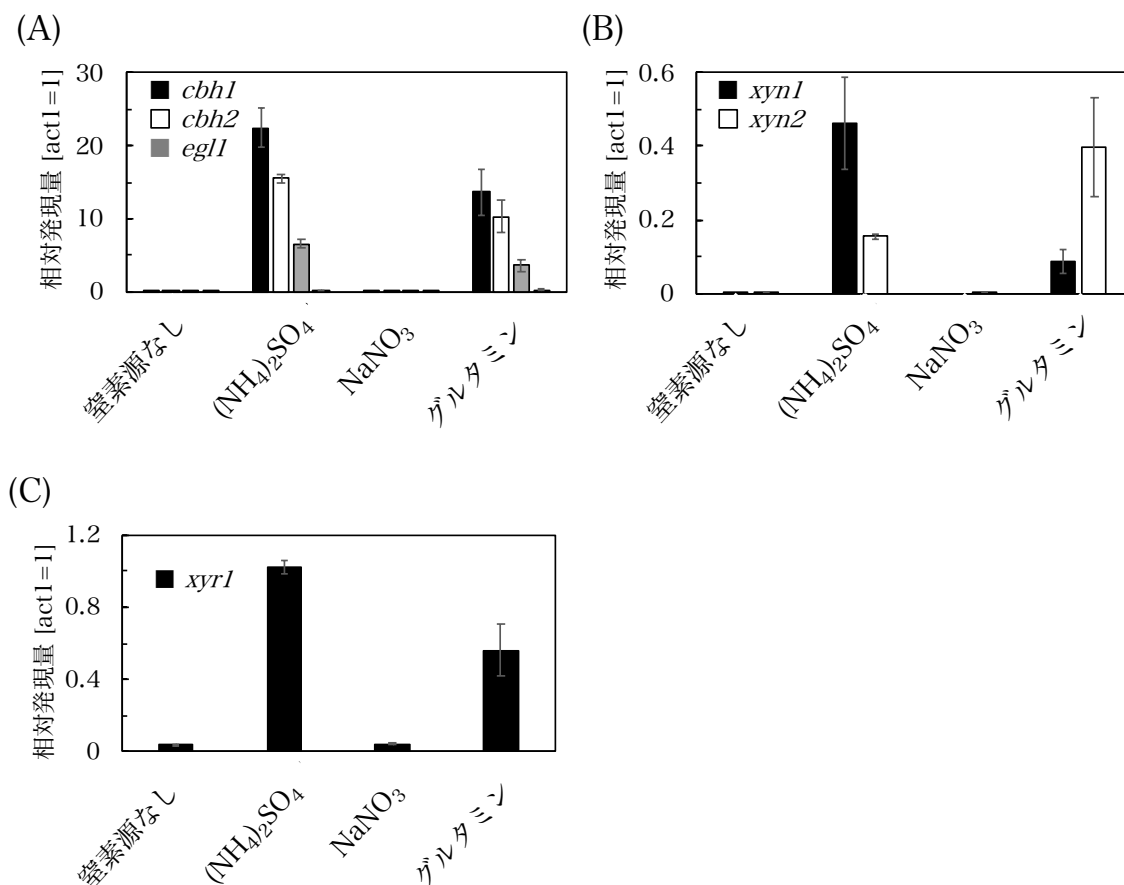


Fig. 4-6 種々の窒素源条件における QM9414 の発現プロファイル

*T. reesei* QM9414 を 0.3% グルコース培地で 2 日間前培養し、菌糸のみを 0.01 M 硫酸アンモニウムまたは 0.01 M グルタミン、0.02 M 硝酸ナトリウムを唯一の窒素源として含むまたは窒素源なしの 1% Avicel 培地へと移し、3 日間培養した。セルラーゼ遺伝子(A) *cbh1* および *cbh2*、*egl1*、キシラナーゼ遺伝子(B) *xyn1* および *xyn2*、セルラーゼ転写調節因子遺伝子(C) *xyr1* の転写解析は qRT-PCR により行った。すべての値はハウスキーピング遺伝子 *act1* の発現により標準化した。各値は独立した 3 実験の平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。

野生株である *T. reesei* QM6a は硝酸、亜硝酸を窒化することができないことが知られている(190)。硝酸は硝酸還元酵素および亜硝酸還元酵素によりアンモニアへと変換される。他の真菌において、これら代謝酵素は硝酸に反応して発現する(119)。*T. reesei* ゲノムにも硝酸還元酵素 *NiaD* および亜硝酸還元酵素 *NiiA* のホモログが存在する(191)。*T. reesei* において硝酸反応が保存されているか解明するため、硝酸還元酵素および亜硝酸還元酵素のホモログの発現量を qRT-PCR により測定した(Fig. 4-7)。Total cDNA は天然窒素源を含まない 1% Avicel basal medium で 3 日間培養した菌体より獲得した。*niaD*、*niiA* のホモログ遺伝子は硝酸ナトリウムにのみ反応し発現していた(Fig. 4-7)。これは、*T. reesei* においても硝酸に対する反応機構が保存されていることを示唆している。

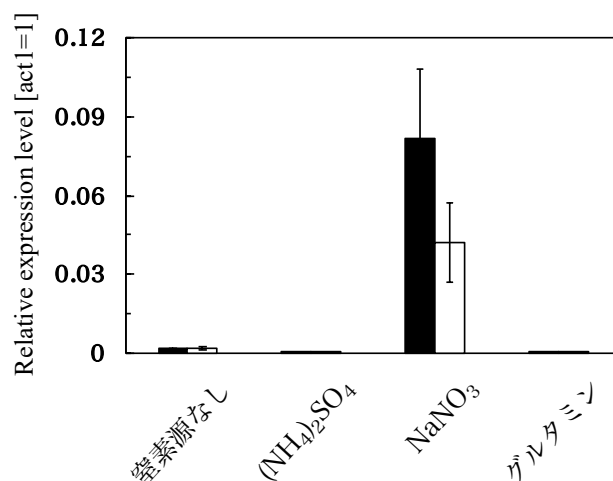


Fig. 4-7 *T. reesei*における硝酸代謝酵素遺伝子ホモログの発現プロファイル

*T. reesei* QM9414 を 0.3% グルコース培地で 2 日間前培養し、菌糸のみを 0.01 M 硫酸アンモニウムまたは 0.01 M グルタミン、0.02 M 硝酸ナトリウムを唯一の窒素源として含むまたは窒素源なしの 1% Avicel 培地へと移し、3 日間培養した。*niaD* (black bar) および *niiA* (white bar) のホモログ遺伝子の転写解析は qRT-PCR により行った。すべての値はハウスキーピング遺伝子 *act1* の発現により標準化した。各値は独立した 3 実験の平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。

#### 4.3.4. *T. reesei*における様々な窒素源に反応したセルラーゼ遺伝子の転写

これまでの結果から窒素源依存的なセルラーゼ生産は窒素源に反応して転写レベルで制御されている可能性が示された。しかしながら、これまでの実験は生育を伴う条件である、生育を無視した条件で窒素源に対するセルラーゼ遺伝子の転写反応を解析する必要がある。そこで、休止菌体を用いた誘導実験を行った。誘導培地は生育能を排除するため basal medium より炭素源、窒素源、リン源を取り除いた培地である(28)。*T. reesei* を 0.01 M 硫酸アンモニウムを窒素源として含む 0.3% glucose basal medium で前培養した後、菌糸の

みを硫酸アンモニウム、硝酸ナトリウム、グルタミンを唯一の窒素源として含む 0.1% Avicel 誘導培地に移した。誘導した菌糸より獲得した Total cDNA はテンプレートとして使用し、主要なセルラーゼ遺伝子 *cbh1* および主要な転写活性化因子 *xyr1* の転写量を qRT-PCR により決定した。培養実験と異なり、*cbh1* および *xyr1* の発現は硫酸アンモニウムやグルタミンだけでなく、硝酸ナトリウムや窒素源を含まない場合でも検出された(Fig. 4-8)。グルタミン誘導は実験した他の条件と比べて、低い *cbh1* 転写量を示した(Fig. 4-8A)。一方で、*xyr1* 発現は硝酸ナトリウムや窒素源なしのような代謝することができない窒素源より硫酸アンモニウムやグルタミンのような代謝可能な窒素源で高い発現量を示した(Fig. 4-8B)。

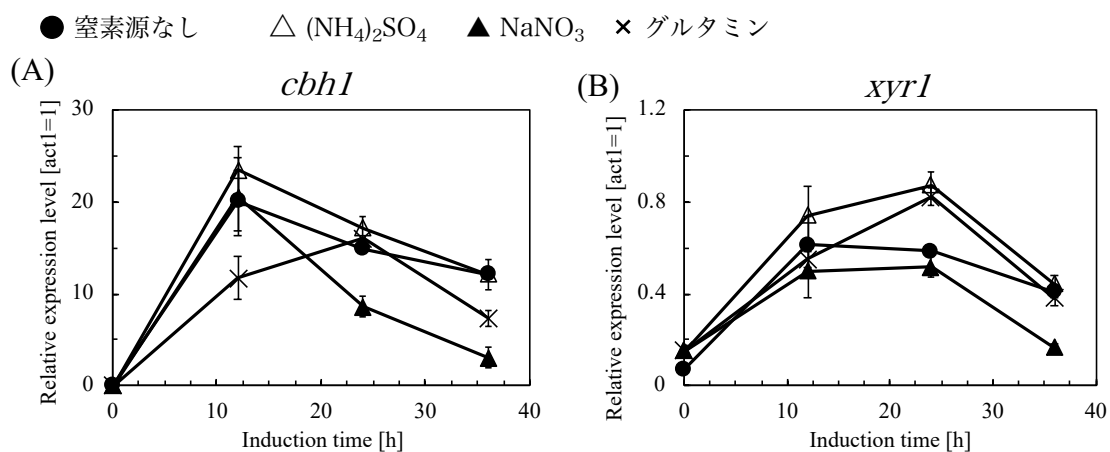


Fig. 4-8 休止菌体を用いた種々の窒素源にตอบสนองした遺伝子発現プロファイル

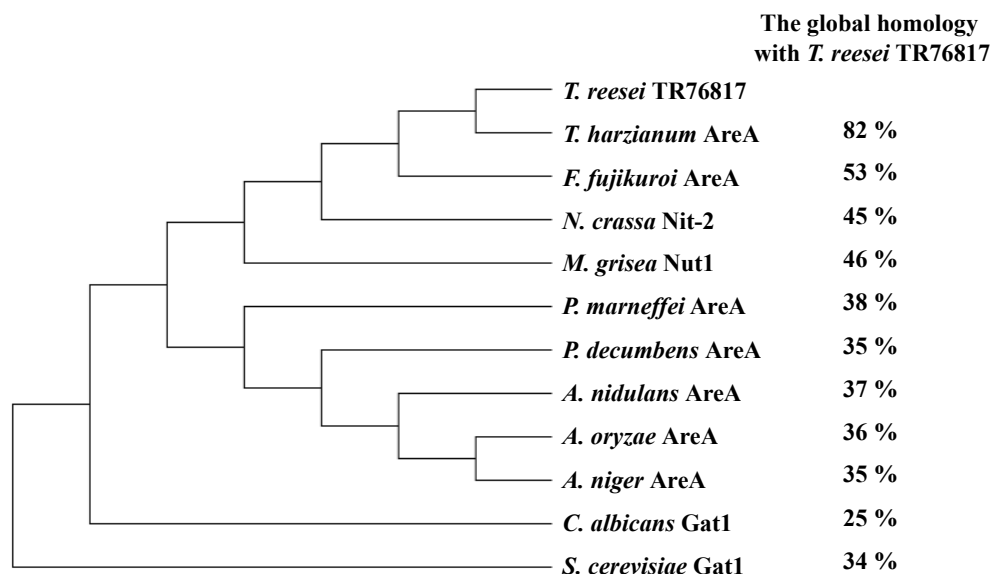
*T. reesei* QM9414 を 0.3% グルコース培地で 2 日間前培養し、菌糸のみを 0.01 M 硫酸アンモニウム (white triangle) または 0.01 M グルタミン (cross mark)、0.02 M 硝酸ナトリウム (black triangle) を唯一の窒素源として含むまたは窒素源なし (black circle) の 0.1% Avicel 誘導培地へと移した。セルラーゼ遺伝子 (A) *cbh1* およびセルラーゼ転写調節因子遺伝子 (B) *xyr1* の転写解析は qRT-PCR により行った。すべての値はハウスキーピング遺伝子 *act1* の発現により標準化した。各値は独立した 3 実験の平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。

#### 4.3.5. *T. reesei* における AreA ホモログの同定

好適窒素源であるグルタミンで、セルラーゼ遺伝子発現が減少したことから、窒素源異化抑制がセルラーゼ生産に関与することが推測された。包括的な窒素源代謝活性化因子 AreA/Nit-2 が糸状菌において窒素源異化抑制を調節していることが知られている(119)。AreA/Nit-2 のホモログは既知の AreA アミノ酸配列 (*A. nidulans*) をクエリ配列として使用して、*T. reesei* のゲノムデータベースから BLASTP により探索した。これにより Protein ID 76817 (TR76817) が AreA と 33.5% の相同性 (E-value: 1.96E-74) を示したことから同定された (Fig. 4-9A)。さらに、TR76817 は Nit-2 (*N. crassa*) とも 56.6% の相同性を示し

た。よって、TR76817 を AreA ホモログとして以降の解析に用いた。TR76817 のアミノ酸配列は他の真菌由来の AreA オルソログの配列とアライメントし、系統樹は最尤法を用いて構築した(Fig. 4-9A)。TR76817 は *T. harzianum* AreA (82%)および *F. fujikuroi* AreA (53%)、*M. grisea* Nut1 (46%)、*N. crassa* Nit-2 (45%)、*P. marneffei* AreA (38%)、*A. nidulans* AreA (37%)、*A. oryzae* AreA (36%)、*P. decumbens* AreA (35%)、*S. cerevisiae* Gat1 (34%)、*C. albicans* Gat1 (25%)と相関性が高かった。TR76817 の保存されている領域は 681-731 番目のアミノ酸部分の GATA 型 zinc finger DNA 結合ドメイン(pfam00320)、101-127 番目のアミノ酸部分の DUF1752 ドメイン(pfam08550)だった(Fig. 4-9B)。AreA の C 末端領域は種々の真菌由来の AreA オルソログにおいて保存されており、他の転写調節因子との相互作用に関与していることが知られている(140)。TR76817 の C 末端部分の 933-945 番目のアミノ酸部分も *A. nidulans* AreA の C 末端領域と全く同じに保存されていた(data not shown)。それらの結果から、TR76817 を AreA のホモログとして決定し、Are1 と名付けた。

(A)



(B)

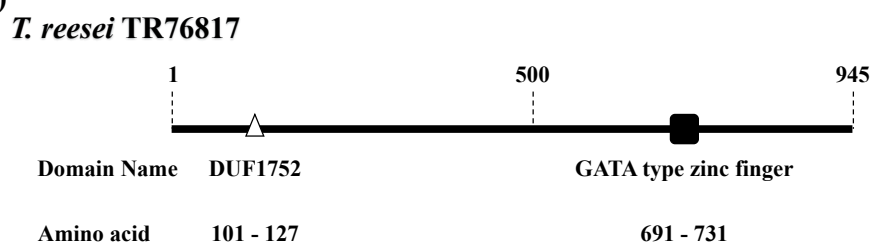


Fig. 4-9 Are1 のアミノ酸配列のアライメントおよび系統解析

*T. reesei* の TR76817 を含むいくつかの糸状菌由来の AreA ホモログの系統解析(A)。系統樹は MUSCLE algorithm によるアライメントののち、MEGA 7.0 を用いて最尤法により構築した。(B)Are1 において発見された重要なモチーフはアミノ酸の範囲およびモチーフの名前をそれぞれの下部分に示した。

#### 4.3.6. 窒素源資化能に対する *areI* 破壊の影響

他の真菌において AreA の機能は窒素代謝に関与していることから、*T. reesei* においても AreI が窒素資化に関して同様の機能を持つと推察した。*T. reesei* における AreI の機能を決定するため、QM9414 において AreI をコードする遺伝子(*areI*)の破壊を行った。ゲノムの *areI* ローカスへの *areI* ORF 破壊カセットの組み込みはサザン解析により確認した (Fig. 4-10A, B)。QM9414 において *areI* は 0.3% グルコース培地で培養された菌体において発現していた。対して、*areI* 破壊株では *areI* の転写は検出されなかった (Fig. 4-10C)。この結果は *areI* 遺伝子は *areI* 破壊株では破壊されていることを示す。

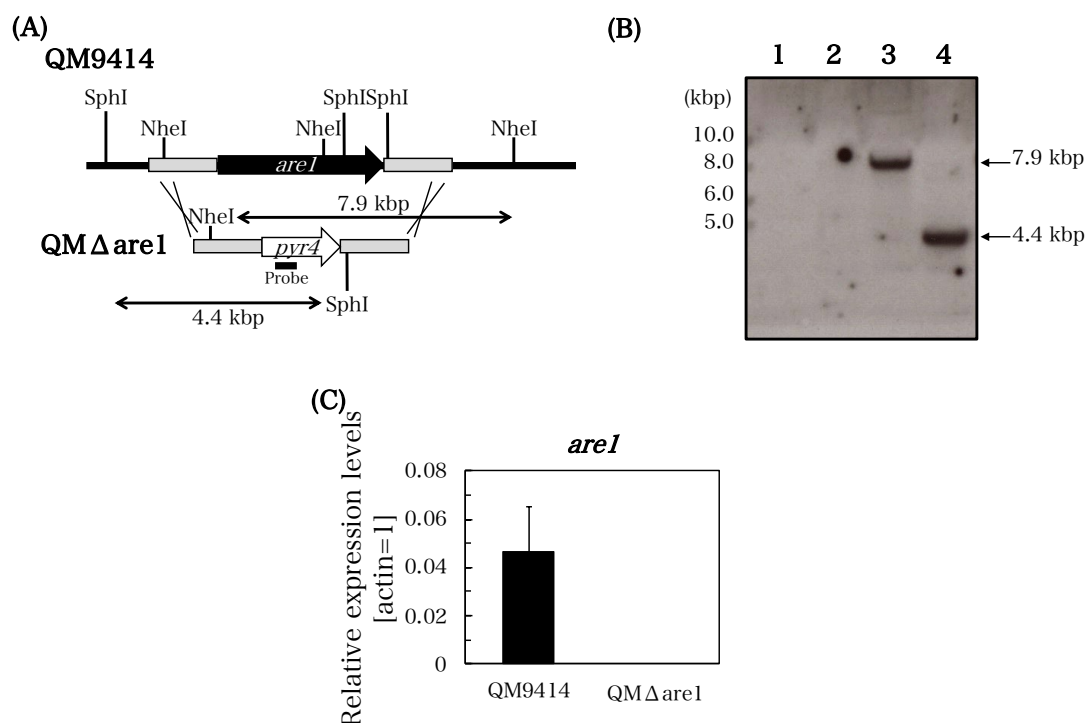


Fig. 4-10 *T. reesei* QM9414 における *areI* 破壊株の構築

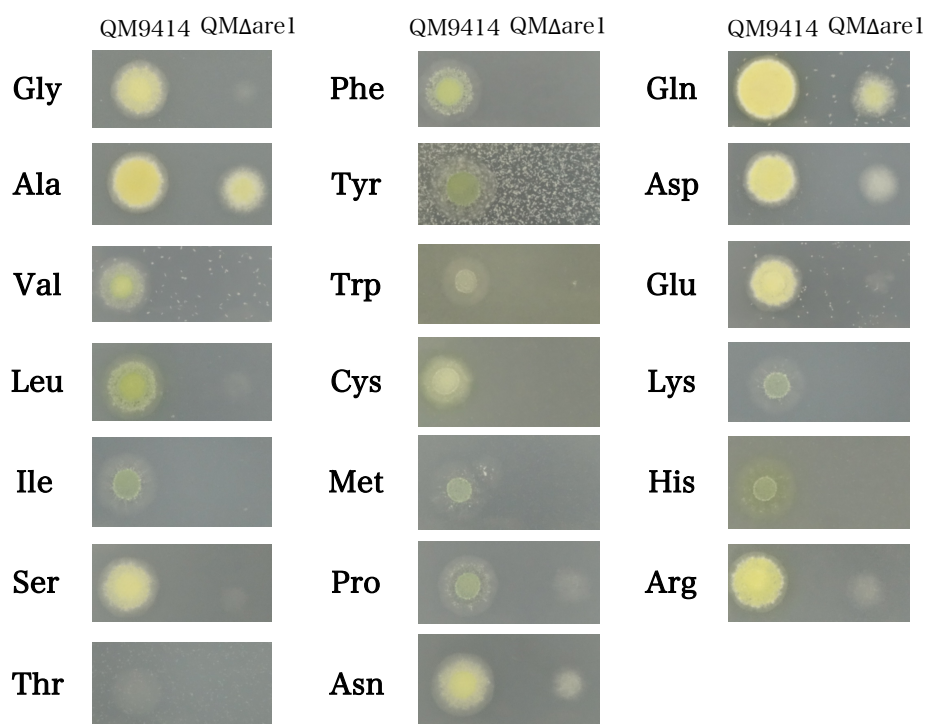
(A) *areI* 遺伝子破壊用 DNA フラグメントは *T. reesei* QM9414ΔP へと形質転換した。*areI* ローカスに存在する SphI および NheI の制限酵素サイトを示した。(B) サザンプロット解析は QM9414 (lane 1, 2) および QMΔ*areI* (lane 3, 4) のゲノム DNA (3 μg) を SphI または NheI により消化し、*pyr4* ORF の 500 bp をプローブとしてハイブリダイズした。(C) *areI* の発現解析は 0.3% グルコース培地で 48 h 培養した菌体より抽出した total RNA により行った。値はハウスキーピング遺伝子 *act1* の発現により標準化した。各値は独立した 3 実験の平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。

種々の窒素源の資化への *areI* 破壊の影響を解析するため、*areI* 破壊株を種々の窒素源を唯一の窒素源として含む最少培地に接種し、その生育を観察した(Fig. 4-11)。異なるアミノ酸を唯一の窒素源として培養したとき、QM9414 は生育の度合いが異なるもののすべてのアミノ酸において生育を示した(Fig. 4-11A)。すべての条件で *areI* 破壊株は親株よりも低い生育だった。*areI* 破壊株はアラニン、プロリン、アスパラギン、グルタミン、アスパラギン酸、グルタミン酸、アルギニンで比較的良好な生育を示した。グリシンやバリン、ロイシン、セリンでの生育は非常に悪く(Fig. 4-11A)、イソロイシンやトレオニン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、システイン、メチオニン、リジン、ヒスチジンで生育しなかった(Fig. 4-11A)。

AreI が窒素源の濃度依存的に窒素源代謝を調節しているかどうか確認するため、*areI* 破壊株を 1、5、10、50、100 mM の硫酸アンモニウムやグルタミン、硝酸ナトリウム、尿素を唯一窒素源として含む最少培地に接種した(Fig. 4-11B)。硫酸アンモニウムでは、*areI* 破壊株は低濃度では生育できなかったが硫酸アンモニウムの濃度の増加に伴い生育が観察された。高濃度アンモニウムを使用したとき、*areI* 破壊株は QM9414 と比べて極めて低い生育を示したが、50 mM、100 mM の濃度で明確に生育した(Fig. 4-11B)。グルタミンを唯一の窒素源として使用したとき、*areI* 破壊株は低い濃度よりも高い濃度でよりよい生育を示し、QM9414 ほどの条件でも旺盛な生育を示した(Fig. 4-11B)。また、QM9414 は尿素において濃度依存的な生育を示したが、*areI* 破壊株では全濃度条件でコロニーが観察されなかった。硝酸ナトリウムを唯一の窒素源とした培養では QM9414 ではわずかにコロニーを確認することができたが、培地中の硝酸濃度が増加しても生育の改善は観察されなかった(Fig. 4-11B)。これら結果から、QM $\Delta$ *areI* は QM9414 と比較して多くの窒素源で生育の低下を示した。そのため、AreI を欠損したことにより、種々の窒素源を資化することができなくなっていると推測され、アライメント解析と合わせると AreI は *T. reesei* における窒素代謝の調節因子であることが強く示唆された。



(A)



(B)

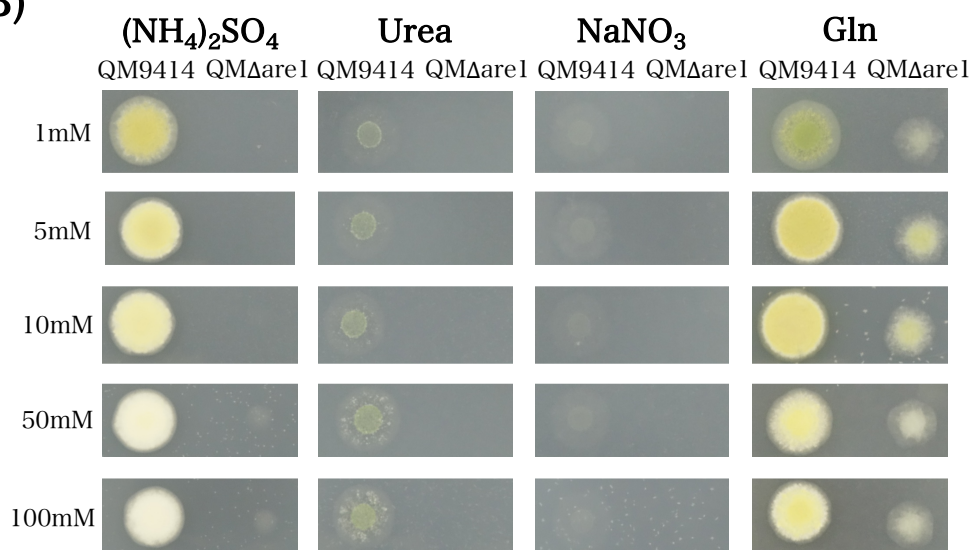


Fig. 4-11 QM9414 および QMΔare1 の表現型

(A) QM9414 および QMΔare1 の各アミノ酸 (終濃度: 10 mM)を唯一の窒素源として含む最小培地での表現型。Ala, alanine; Arg, arginine; Asn, asparagine; Asp, aspartic acid; Cys, cysteine; Glu, glutamic acid; Gly, glycine; His, histidine; Ile, isoleucine; Leu, leucine; Lys, lysine; Met, methionine; Phe, phenylalanine; Pro, proline; Ser, serine; Thr, threonine; Trp, tryptophan; Tyr, tyrosine; Val, valine. (B) QM9414 および QMΔare1 の硫酸アンモニウムまたはグルタミン、尿素、硝酸ナトリウムを唯一の窒素源として含む最小培地での表現型。各プレートには  $1 \times 10^4$  個の胞子をスポットした。生育は 28°C で 6 日間培養後に観察した。

#### 4.3.7. 窒素輸送体および代謝酵素をコードする遺伝子の発現への *Are1* の影響

QM $\Delta$ are1 の生育は QM9414 と比較して高濃度の硫酸アンモニウムにおいてかなり悪化していたが、グルタミン濃度による影響は少なかった(Fig. 4-11B)。それゆえに、*Are1* がアンモニアトランスポーターか代謝酵素をコードする遺伝子を制御していると推測した。そこで、アンモニアパーミアーゼ、グルタミン合成酵素をコードするホモログ遺伝子の遺伝子の発現量を評価した(Fig. 4-12, 13)。 *T. reesei* の推定アンモニアパーミアーゼは BLASTP によりゲノムデータベースから探索した。 *A. nidulans* において報告されているアンモニアパーミアーゼ MepA (GenBank: AN1181.2) および MepB (GenBank: AN0209.2)、MepC (GenBank: AN0496.2)、MeaA のアミノ酸配列をクエリ配列として使用した。さらに、 *T. reesei* のゲノムデータベースの eukaryotic orthologous groups (KOG) からアンモニア輸送に関与する遺伝子の探索も行った。その結果、2 つの遺伝子 *tr82095* (MepA、MepB、MepC、MeaA とそれぞれ 66.5%、50.4%、42.1%、57.0% の相同性) および *tr43671* (MepA、MepB、MepC、MeaA とそれぞれ 56.9%、46.3%、38.0%、73.6% の相同性) のみが *T. reesei* ゲノム中の推定アンモニアパーミアーゼとして見出された。また、グルタミン合成関連酵素遺伝子群のホモログは、Schmoll et al. (191) によって報告されているグルタミン合成酵素 (*tr122287*) およびグルタミンデヒドロゲナーゼ (*tr73536*)、グルタミントランスアミナーゼ (*tr106250*)、 $\omega$ -アミダーゼ (*tr104803*) をターゲットとして選択した。

推定アンモニアパーミアーゼ遺伝子 *tr82095* および *tr43671* およびグルタミン合成酵素関連遺伝子群の転写を解析するため、QM9414 と QM $\Delta$ are1 を 0.3% グルコースにて前培養し、その後菌体を 0 M (窒素源飢餓条件)、0.01 M (標準的な窒素濃度)、0.05 M (窒素過剰条件) を窒素源として含む 1% グルコース培地 (ペプトン、yeast extract なし) に移行した。さらに、0.01 M グルタミン (好適窒素源) も一つの条件として使用した。0.05 M 硫酸アンモニウムはセルラーゼ生産と生育の結果から窒素源過剰な条件として選択した (Table 4-2, Fig. 4-11B)。推定アンモニウムパーミアーゼの発現量は QM9414 と QM $\Delta$ are1 の生育の違いを除去するため、ハウスキーピング遺伝子 *act1* の発現量で標準化した。その結果、QM9414 における *tr82095* 発現は窒素源を含まない場合で発現していたが、0.01 M および 0.05 M 硫酸アンモニウムやグルタミンでは低い発現が観察された (Fig. 4-12A)。対して、QM9414 における *tr43671* は実験したすべての窒素源で発現し、グルタミンや 0.01 M、0.05 M 硫酸アンモニウムよりも窒素源なしで高発現していた (Fig. 4-12B)。QM $\Delta$ are1 における *tr82095* および *tr43671* の発現は用いた窒素源に関係なく完全に欠損していた (Fig. 4-12)。一方で、グルタミン合成関連酵素をコードする遺伝子群は実験したすべての条件において QM9414 および QM $\Delta$ are1 の両菌株で発現が観察された (Fig. 4-13)。そのため、*are1* 破壊株においても、親株と同様にグルタミンを合成可能であると推測される。

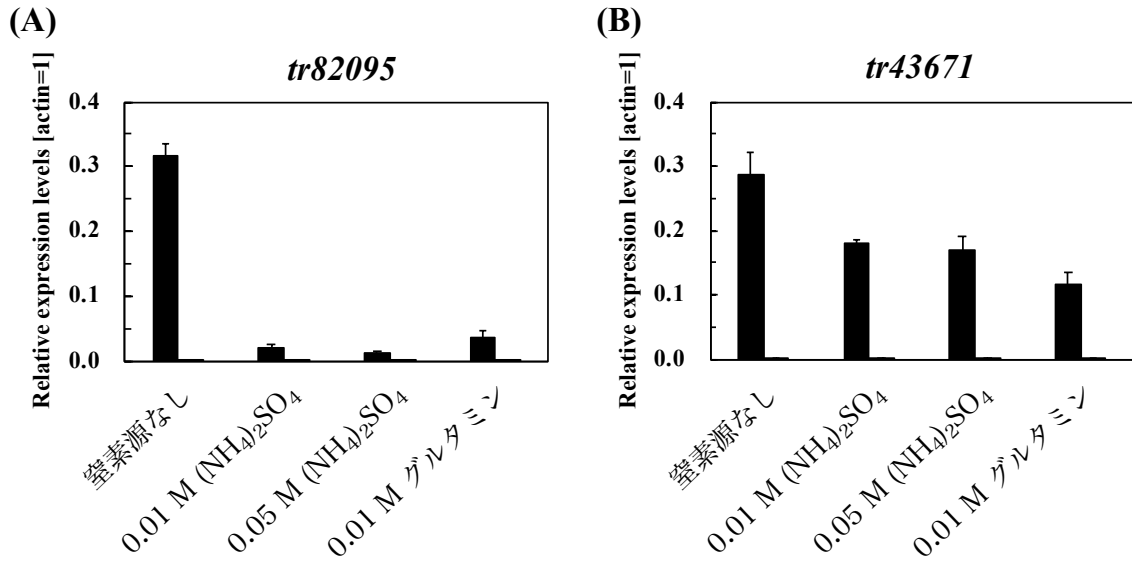


Fig. 4-12 *T. reesei* アンモニアパーミアゼホモログの遺伝子発現

*T. reesei* QM9414 (black bar)および QM $\Delta$ are1 (white bar)を0.3% グルコース培地で2日間前培養し、菌糸のみを0.01 Mまたは0.05 M 硫酸アンモニウムまたは0.01 M グルタミンを唯一の窒素源として含むまたは窒素源なしの1% グルコース培地へと移し、6 h 培養した。(A) *tr82095*および(B) *tr43671*のホモログ遺伝子の転写解析はqRT-PCRにより行った。すべての値はハウスキーピング遺伝子 *act1*の発現により標準化した。各値は独立した3実験の平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。

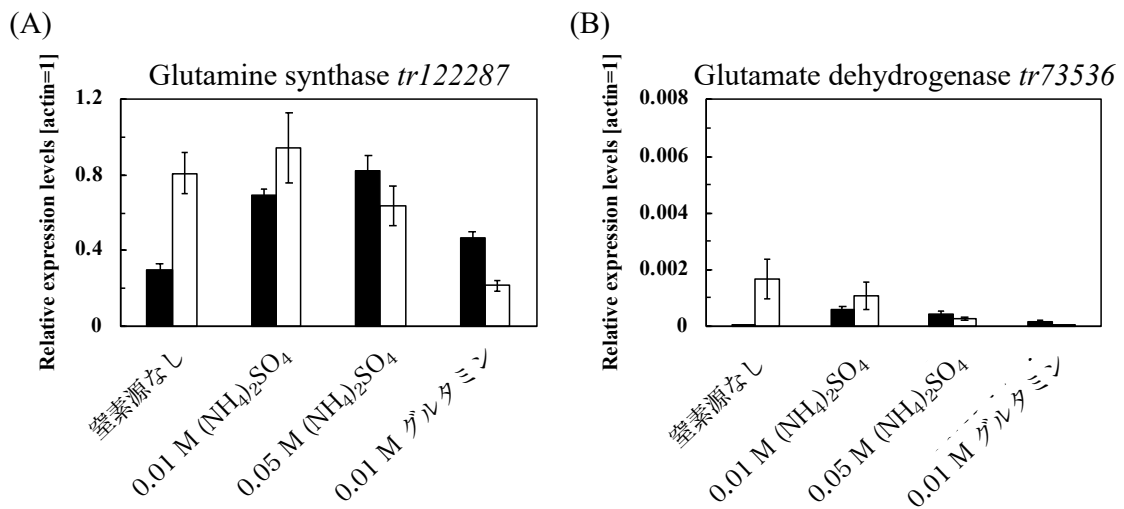


Fig. 4-13 *T. reesei*における推定グルタミン合成関連酵素群の遺伝子発現

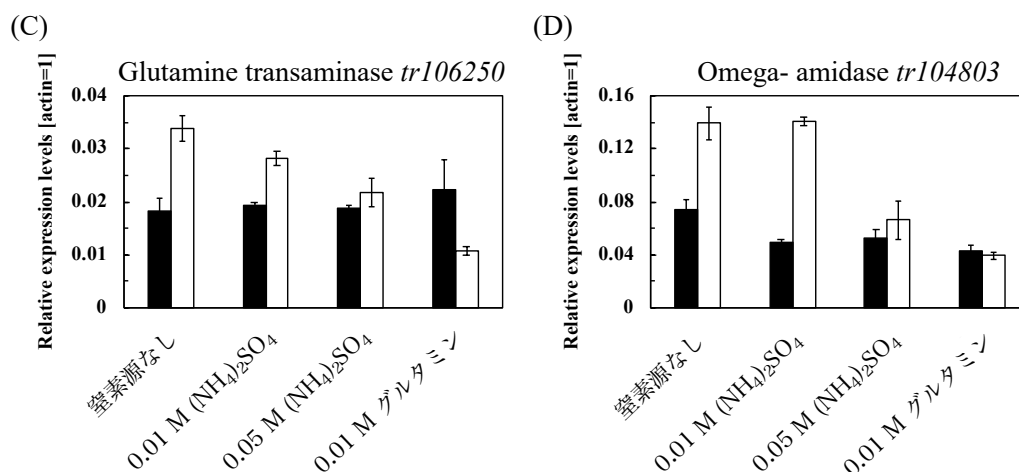


Fig. 4-13 *T. reesei*における推定グルタミン合成関連酵素群の遺伝子発現(続き)

*T. reesei* QM9414 (black bar)およびQM $\Delta$ are1 (white bar)を0.3% グルコース培地で2日間前培養し、菌糸のみを0.01 Mまたは0.05 M 硫酸アンモニウムまたは0.01 M グルタミンを唯一の窒素源として含むまたは窒素源なしの1% グルコース培地へと移し、6 h 培養した。(A) glutamine synthase *tr122287*および(B) glutamate dehydrogenase *tr73536*, (C) glutamine transaminase *tr106250*, (D) omega- amidase *tr104803*の転写解析は qRT-PCR により行った。すべての値はハウスキーピング遺伝子 *act1* の発現により標準化した。各値は独立した3実験の平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。

#### 4.3.8. Are1 破壊のセルラーゼ生産への影響

Are1 がセルラーゼ生産を制御するかどうか確認するため、異なる窒素源の種類や濃度条件下でCMCase およびキシラナーゼ活性を測定した。酵素活性は生育の違いを除去するため、菌体内DNA量により標準化した。QM $\Delta$ are1は天然窒素源なしでは生育することができないため(Fig. 4-14)、本実験では、天然窒素源を含む basal medium を使用して窒素源への応答を解析した。QM $\Delta$ are1において窒素源濃度が生育に影響を与えたことから(Fig. 4-11)、QM9414 およびQM $\Delta$ are1を0および0.01、0.05 Mの硫酸アンモニウムを含む1% Avicel basal medium で培養した(Fig. 4-14)。さらに、QM $\Delta$ are1においてアンモニアとグルタミンの異なる資化性が明らかとなったことから(Fig. 4-11)、0.01 M グルタミンでも培養を行った(Fig. 4-14)。窒素源なしの培地では、QM9414はセルラーゼ、キシラナーゼをわずかに分泌したが、QM $\Delta$ are1ではかろうじて検出できるレベルだった(Fig. 4-14B)。QM9414における0.01 M および0.05 M 硫酸アンモニウムでのCMCase活性は同様だった(Fig. 4-14C)。しかしながら、QM $\Delta$ are1ではCMCase およびキシラナーゼ活性は窒素源なしおよび0.01 M 硫酸アンモニウムで極めて低かった(Fig. 4-14C, D)。0.05 M 硫酸アンモニウムを使用したとき、QM $\Delta$ are1の酵素活性はQM9414のおよそ半分であった(Fig. 4-14C, D)。QM $\Delta$ are1はグルタミンでも減少したCMCase およびキシラナーゼ活性がQM9414と比較して低かった。分泌タンパク質のパターンは0.01 M 硫酸アンモニウムお

よびグルタミンでは QM9414 および QM $\Delta$ are1 間で同様だった(Fig. 4-14A)。さらに菌体蓄積も QM9414 および QM $\Delta$ are1 で酵素活性と異なりどの窒素源でも同様であることが観察された(Fig. 4-14E)。

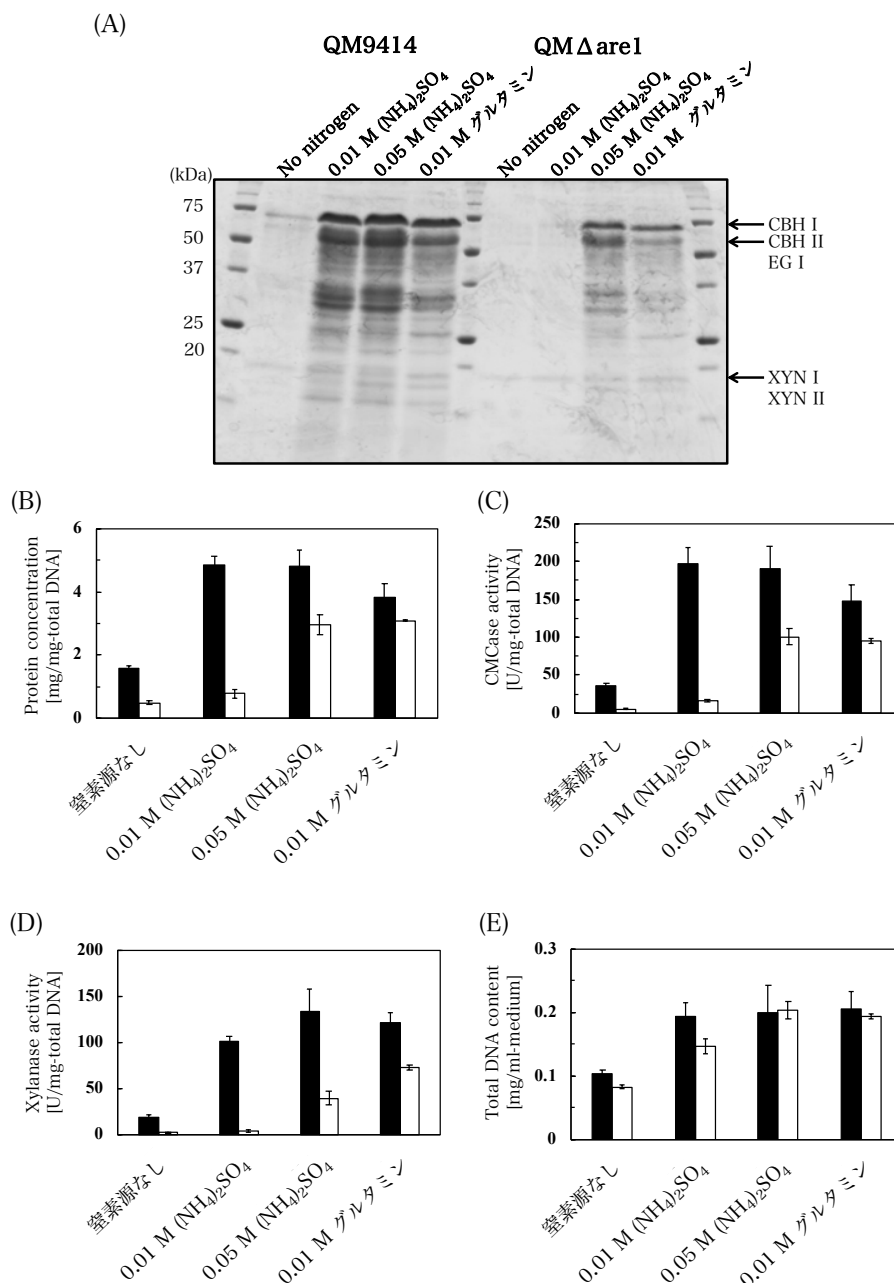


Fig 4-14 QM9414 および QM $\Delta$ are1 の種々の窒素源におけるセルラーゼ生産(続き)

*T. reesei* QM9414 (black bar) および QM $\Delta$ are1 (white bar) を 0.3% グルコース培地で 2 日間前培養し、菌糸のみを 0.01 M および 0.05 M 硫酸アンモニウムまたは 0.01 M グルタミンを唯一の窒素源として含むまたは窒素源なしの 1% Avicel 培地へと移し、3 日間培養した。(A) 培養上清(16  $\mu$ l) は 12.5% SDS-PAGE により解析された。ゲルはクマシーブリアントブルーにより染色した。タンパク質量(B)および CMCase

(C)、キシラナーゼ(D)活性は培養上清を用いて測定した。菌体内 DNA 量(E)は菌体を用いて測定した。各値は独立した 3 実験の平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。

#### 4.3.9. 転写調節因子への Are1 破壊の影響

QM $\Delta$ are1 では、生育しているにもかかわらず、セルラーゼ生産能が減少していた(Fig. 4-14)。そのため、Are1 の関与するセルラーゼ生産が窒素源に応答して転写レベルで制御されているのではないかと推測した。Are1 がセルラーゼ遺伝子発現を調節しているかどうか解明するため、主要なセルラーゼ遺伝子 *cbh1* および *cbh2*、*egl1*、主要なキシラナーゼ遺伝子 *xyn1* および *xyn2* の転写量を qRT-PCR により測定した(Fig. 4-15)。これらのセルラーゼ遺伝子の転写量は両株における各種窒素源存在下で生産されたセルラーゼ活性とパターンが一致していた(Fig. 4-15)。QM9414 と比較して、QM $\Delta$ are1 のセルラーゼ、キシラナーゼ遺伝子の発現は 0.01 M 硫酸アンモニウムで劇的に減少していた(Fig. 4-15)。窒素源なしでのセルラーゼ、キシラナーゼ遺伝子の発現は QM9414 および QM $\Delta$ are1 においてかなり低かった(Fig. 4-15)。しかしながら、*cbh1* および *cbh2*、*egl1* の発現は 0.05 M 硫酸アンモニウムおよびグルタミンで両株ともに同様の発現量だった(Fig. 4-15A, B)。キシラナーゼ発現の観点では、QM9414 では高い *xyn1* 遺伝子の転写量を示したが、QM $\Delta$ are1 ではほとんど発現は見られなかった(Fig. 4-15C, D)。対して、QM $\Delta$ are1 における *xyn2* 発現は QM9414 と比べ減少していたが、セルラーゼ遺伝子の減少率と同等であった(Fig. 4-15C, D)。さらに、*xyn2* 発現は 0.05 M 硫酸アンモニウムおよびグルタミンでわずかに増加していた(Fig. 4-15C, D)。

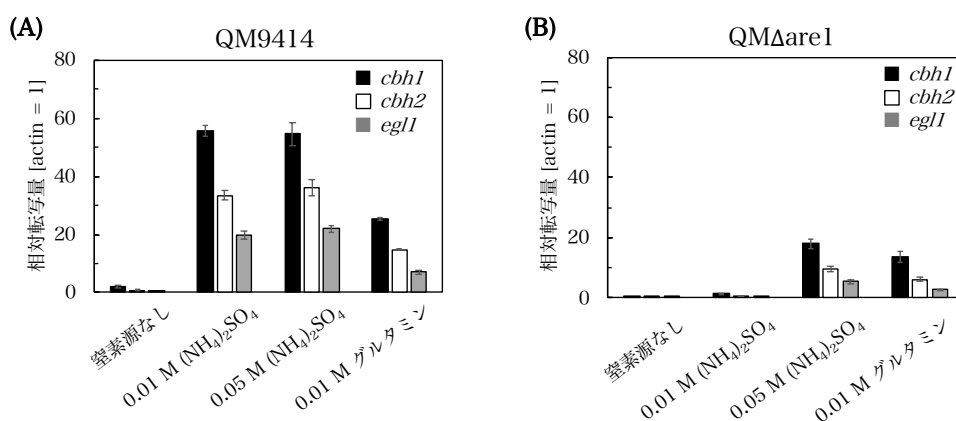


Fig. 4-15 QM9414 および QM $\Delta$ are1 の種々の窒素源における糖質加水分解酵素遺伝子および転写調節因子遺伝子の発現プロファイル

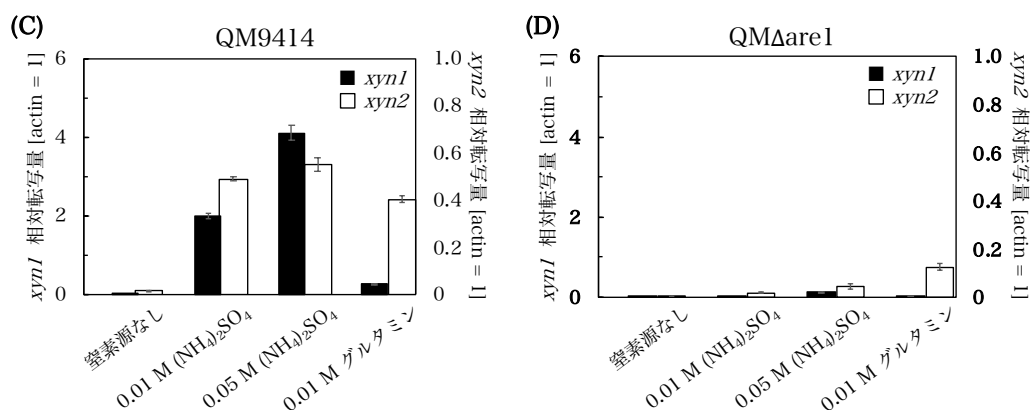


Fig. 4-15 QM9414 および QMΔare1 の種々の窒素源における糖質加水分解酵素遺伝子および転写調節因子遺伝子の発現プロファイル(続き)

*T. reesei* QM9414 (A, C)および QMΔare1 (B, D)を0.3% グルコース培地で2日間前培養し、菌糸のみを0.01 Mおよび0.05 M 硫酸アンモニウムまたは0.01 M グルタミンを唯一の窒素源として含むまたは窒素源なしの1% Avicel 培地へと移し、3日間培養した。セルラーゼ遺伝子(A, B) *cbh1* (black bar)および *cbh2* (white bar)、*egl1* (gray bar)、キシラーゼ遺伝子(C, D) *xyn1* (black bar)および *xyn2* (white bar)の転写解析はqRT-PCRにより行った。すべての値はハウスキーピング遺伝子 *act1* の発現により標準化した。各値は独立した3実験の平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。

これまでの結果から、Are1 がセルラーゼ遺伝子の転写制御に関与し、窒素源依存的なセルラーゼ生産に寄与していると推測される。Are1 が *T. reesei* においてセルラーゼ活性化因子の発現を調節しているのかどうか解析するため、セルラーゼ活性化因子 *xyr1* および *ace3*, *ace2*, *are1* の発現をqRT-PCRにより測定した。*ace3*, *ace2* の発現は両株間で違いは見られなかった(Fig. 4-16A, C)。QMΔare1 における *xyr1* 遺伝子の発現はQM9414 と比べて窒素源なし、0.01 M 硫酸アンモニウムでかなり減少していた(Fig. 4-16B)。しかしながら、0.05 M 硫酸アンモニウムやグルタミンでのQMΔare1 の *xyr1* 発現はQM9414 より低いレベルで発現していた(Fig. 4-16B)。*are1* の発現は *are1* 破壊株では検出されず、QM9414 においてグルタミンによる発現量は他の窒素源と比べて低かった(Fig. 4-16D)。

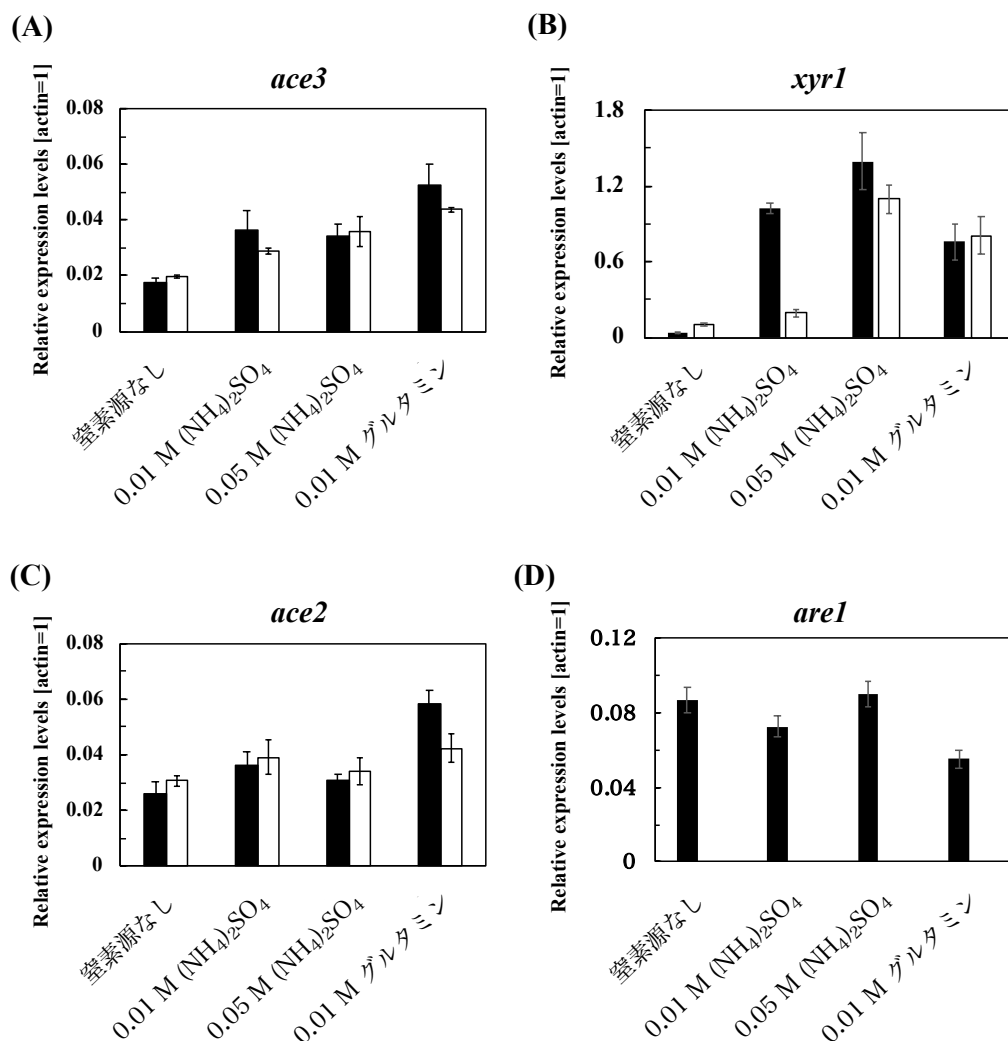


Fig. 4-16 QM9414 および QM $\Delta$ are1 の種々の窒素源における転写調節因子遺伝子の発現プロファイル

*T. reesei* QM9414 (black bar)および QM $\Delta$ are1 (white bar)を0.3% グルコース培地で2日間前培養し、菌糸のみを0.01 Mおよび0.05 M 硫酸アンモニウムまたは0.01 M グルタミンを唯一の窒素源として含むまたは窒素源なしの1% Avicel 培地へと移し、3日間培養した。セルラーゼ転写調節因子遺伝子 *ace3* (A)および *xyr1* (B)、*ace2* (C)、*are1* (D)の転写解析はqRT-PCRにより行った。すべての値はハウスキーピング遺伝子 *act1* の発現により標準化した。各値は独立した3実験の平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。

#### 4.3.10. in vitro における *T. reesei* Are1 のプロモーター結合解析

QM $\Delta$ are1 のセルラーゼ生産と転写解析の結果より(Fig. 4-14-16)、*T. reesei* Are1 はセルラーゼ転写活性化因子 Xyr1 を介してセルラーゼ遺伝子の転写活性化を制御している可能性が示唆された。そのため、Are1 が *xyr1* 遺伝子のプロモーター領域と相互作用するかどうか in vitro において解析した。Are1 の Zinc finger DNA 結合ドメイン(Are1DBD)



と標的遺伝子のプロモーター領域に存在するコンセンサス配列(HGATAR)との相互作用を解析するため、electrophoretic mobility shift assay (EMSA)を行った。*T. reesei* Are1DBD は T7 プロモーター支配下に Are1DBD および His-tag を配置したプラスミドを大腸菌 BL21 に導入し、His-tag 融合タンパク質として異種宿主発現させた。IPTG により誘導させた菌体抽出液より、TALON Resin を用いて Are1DBD タンパク質を精製した(Fig. 4-17)。

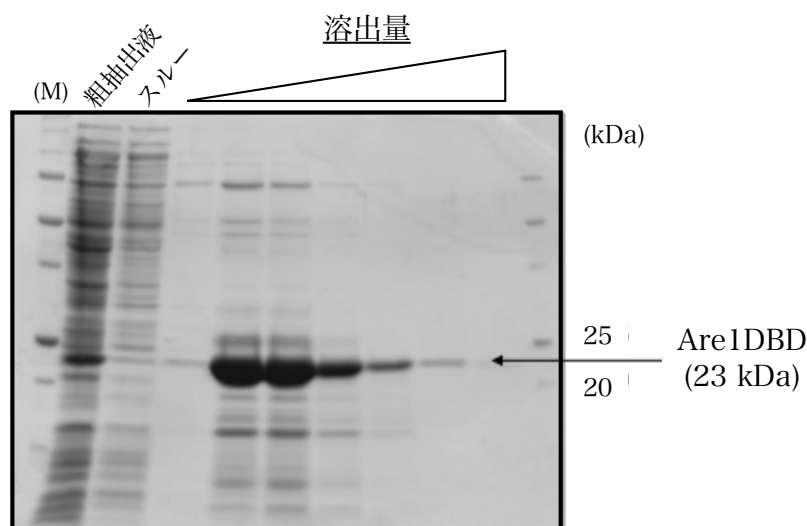


Fig. 4-17 Are1DBD His-tag 融合タンパク質の精製(23 kDa)

*E. coli* BL21 を宿主として、IPTG 誘導により Are1DBD タンパク質を発現させた。Are1DBD His-tag 融合タンパク質は 23 kDa に検出される。目的タンパク質は、粗抽出液を通したカラムを 10 mM イミダゾールを含む 50 mM リン酸ナトリウムバッファー(pH 7.5)で洗浄後(スルー液)、1 ml ごとに 150 mM イミダゾールを含んだ 50 mM リン酸ナトリウムバッファー(pH 7.5)により溶出した。

SDS-PAGE の結果より、菌体抽出液は 23 kDa 付近に宿主に存在しないバンドが発現していた(Fig. 4-17)。溶出液には 23 kDa のバンドが濃縮されており、設計した Are1DBD 融合タンパク質のサイズと一致したことから、発現に成功したと判断した。*A. nidulans* の硝酸・亜硝酸還元酵素をコードする *niaD* および *niiA* 遺伝子は細胞内の窒素状態に応答し、AreA によって転写が制御されている。この転写は *niiA-niaD* 遺伝子間領域に存在する 10 のコンセンサス配列に AreA が結合することで調節されている(192–194)(Fig. 4-18)。AreA は HGATAR のコンセンサス配列に結合することが報告されており(118)、*T. reesei* Are1 も同様の配列に結合することが推測された。Are1 の HGATAR 配列への結合を評価するため、AreA の結合が確認されている配列との Are1DBD の相互作用を EMSA を用いて解析した。*A. nidulans* *niiA-niaD* 遺伝子間領域において特に Site 5 および Site 6 が発現に重要であり、AreA が相互作用することが知られている(189)(Fig. 4-18)。そのため、これら 2 つの HGATAR サイトを含む 30 bp のオリゴヌクレオチドをそれぞれ調製し(Table 4-3)、*T. reesei* Are1 の HGATAR 配列への結合能を評価した。

Table 4-3 *A. nidulans niiA-niaD* 遺伝子間領域の AreA 結合サイトとプローブ

プローブ	領域	コンセンサス配列	プライマー 5'-3'
pAN <i>niiA</i> site 5	500	AGATAA	Fw : TCTTCCCACCAGAGATAAGAGATTCCGAGG
			Rv : CCTCGGAATCTCTTATCTCTGGTGGGAAGA
pAN <i>niiA</i> site 6	540	CGATAA	Fw : ACAGTGAATCAACGATAATCAAGCCCTATC
			Rv : GATAGGGCTTGATTATCGTTGATTCACTGT

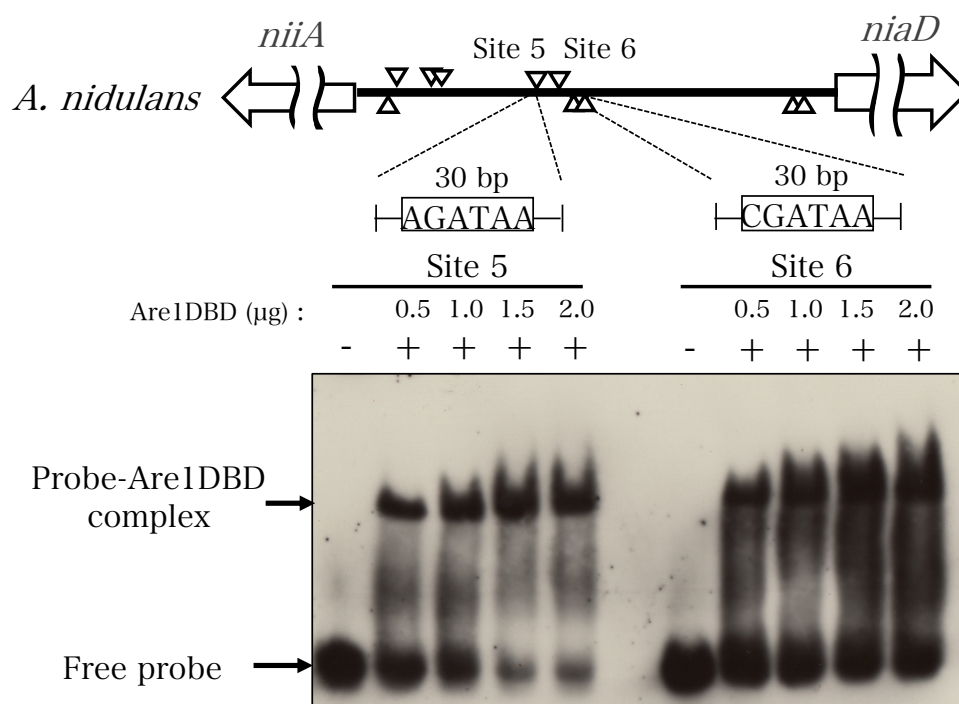


Fig. 4-18 *A. nidulans niiA-niaD* 遺伝子間領域と Are1DBD の相互作用

Site 5 は *niiA* 遺伝子の転写開始地点から上流領域の 3' 方向に 500 bp の位置に、Site 6 は 540 bp の位置に存在する。これらコンセンサス配列を中心とした 30 bp の DNA プローブは 75 fmol を供した。

Site 5 および Site 6 の両方で Are1DBD を添加した場合に、フリープローブより上部にシフトしたシグナルが検出された(Fig. 4-18)。さらに、Are1DBD の添加量が増加するにつれシグナル強度が増加し、フリープローブのシグナル強度が減少した(Fig. 4-18)。Are1DBD と Site 5 および Site 6 を含むプローブとの相互作用が確認されたことから、*T. reesei* Are1 は in vitro において、*A. nidulans* AreA と同様に HGATAR 配列に結合することが示唆された。

#### 4.3.11. *T. reesei* *xyr1* プロモーターと Are1DBD の相互作用

*are1* の欠失は *xyr1* の発現量の減少によるセルラーゼ遺伝子の発現を低下させることが示唆された。そのため、Are1 による *xyr1* の転写制御を解析するため、*xyr1* プロモーターと Are1DBD の相互作用を in vitro において解析した(Fig. 4-19)。*xyr1* の上流 1,000 bp には 2 つの HGATAR 配列が存在している(Fig. 4-19A)。それぞれ、Site I (CGATAG)は *xyr1* の翻訳開始点から-140 bp、Site II (CGATAG)は-562 bp の位置に存在する。前述の実験と同様にこれら配列を中心とした 30 bp のオリゴヌクレオチドを調製し(Table 4-4)、*T. reesei* Are1 との相互作用を評価した。

Table 4-4 *xyr1* 上流領域 1,000 bp 内の Are1 推定結合サイト(HGATAR)とプローブ

プローブ	領域	コンセンサス配列	プライマー 5'-3'
<i>p<sub>xyr1</sub></i> /Site I	-140	CGATAG	Fw : TTCTCGGTTTTGCTATCGAAGGCGGTCTGC
			Rv : GCAGACCGCCTTCGATAGCAAACCGAGAA
<i>p<sub>xyr1</sub></i> /Site II	-562	CGATAG	Fw : AAGGCGCGCTCGCGATAGGGAGTTTCGCCT
			Rv : AGGCGAAACTCCCTATCGCGAGCGCGCCTT

Site I および Site II のプローブにおいて、Are1DBD を添加した場合にフリープローブより上部に新たなシグナルが検出された(Fig. 4-19B)。Are1DBD タンパク質との Site I および Site II への相互作用が検出されたことから、*T. reesei* Are1 は in vitro において *xyr1* プロモーター領域に位置する 2 つのコンセンサス配列に結合することが示唆された(Fig. 4-19)。Site I および Site II において、コンセンサスが同配列であっても Are1 の結合強度が異なることから、HGATAR の 6 塩基の外側の配列の違いで Are1 の結合性が変化することが示唆された。

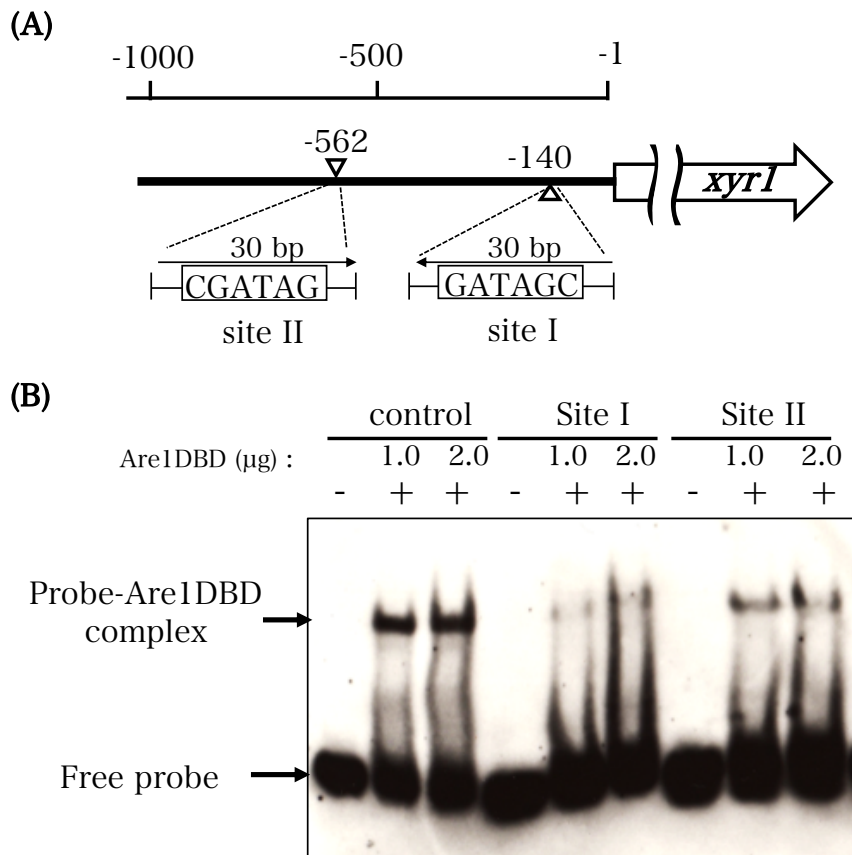


Fig. 4-19 *xyrI* 上流領域と Are1DBD の相互作用解析

コントロールとして、*A. nidulans niiA-niaD* 遺伝子間領域の HGATAR 配列 Site 5 を用いた。Site I (CGATAG)は *xyrI* の翻訳開始地点から-140 bp、Site II (CGATAG)は-562 bp の位置に存在する。これらコンセンサス配列を中心とした 30 bp の DNA プローブは 75 fmol を供した。

#### 4.3.12.in vivo における *xyrI* プロモーターへの Are1 の相互作用の解析

Are1 が *xyrI* プロモーター領域中に存在する HGATAR 配列と相互作用することが示唆され(Fig. 4-19)、Are1 が *xyrI* 遺伝子の転写調節に関与することが推測された。しかしながら、実際に Xyr1 の発現が Are1 に調節されているかどうか確認するためには in vivo での *xyrI* プロモーターへの Are1 の相互作用を評価する必要がある。*niiA-niaD* 遺伝子間領域に位置する Site 5 の HGATAR 配列へ (G→T) の変異を導入したとき、*niiA* および *niaD* の発現量は 50%程度まで低下することが知られている(189)。この変異が *T. reesei* でも応用可能であるか確認するため、*A. nidulans niiA-niaD* 遺伝子間領域の Site 5 を標的として、非ラベル化の Site 5 プローブおよび G→T 変異を導入した変異 Site 5 プローブ(mSite 5)を Are1 との結合反応時に添加することで、Site 5-Are1 複合体形成における競合アッセイを行った(Fig. 4-20)。

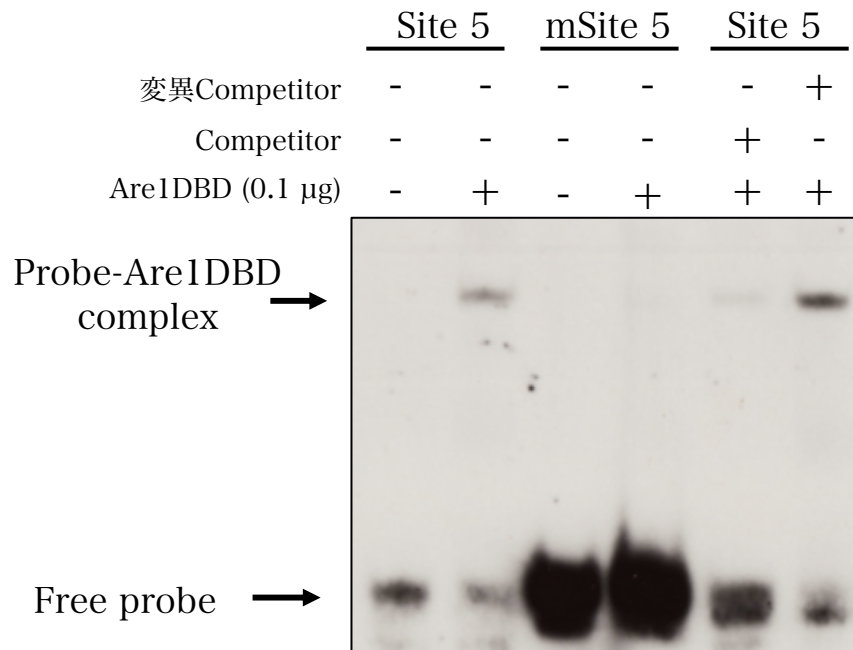


Fig. 4-20 *T. reesei* Are1 の結合特異性解析

*A. nidulans* *niiA-niaD* 遺伝子間領域の HGATAR 配列 Site 5 を用いた。Competitor は非ラベル化の Site 5 プローブ、変異 Competitor は非ラベル化の変異 Site 5 プローブを使用した。これらコンセンサス配列を中心とした 30 bp の DNA プローブは 75 fmol を供した。

Site 5 は Are1DBD 添加時に DNA プローブのシフトが検出された(Fig. 4-20)。一方で、mSite 5 は Are1DBD を添加しても DNA プローブはシフトしなかった。また、Site 5 プローブに Competitor (非ラベル化の Site 5 プローブ)を添加した場合、Are1DBD との相互作用によるシグナルシフトが著しく減少したが(Fig. 4-20)、変異 Competitor (非ラベル化の変異 Site 5 プローブ)を添加した場合は非添加の場合と変わらず Site 5-Are1 複合体形成によるシグナルシフトが検出された(Fig. 4-20)。

*A. nidulans* AreA と同様に *T. reesei* Are1 においても HGATAR 配列への(G→T)変異の導入でコンセンサス配列への結合能を失うことが示されたことから、*xyr1* プロモーター領域の Site I へ(G→T)変異を導入した mSite I 株、Site II へ(G→T)変異を導入した mSite II 株および WT (QM9414)型の *xyr1* 上流領域をもつ WTp 株を構築した(Fig. 4-21A)。*xyr1* の上流領域に変異を導入する選択マーカー *pyr4* を含んだ 3 種類の DNA フラグメントを構築し、プロトプラスト-PEG 法を用いて QM9414Δ*pyr4*amdS 株を形質転換した。相同組換え体はサザンブロット解析によって選抜し、染色体上の *xyr1* 上流領域から下流領域まで *pyr4* を含んだ変異導入 DNA フラグメントに相同的に置換されたことを確認した。また、各形質転換体のゲノムは、*xyr1* 遺伝子の上流領域および ORF をシーケンシングにより、

WTp は塩基の変異なし、mSite I は上流領域 Site I のみ G→T の変異、mSite II は上流領域 Site II のみ G→T の変異を確認した。また、推定 AreI 結合サイトに変異を導入した DNA フラグメントの導入により形質転換体の生育能に影響がないか確認するため、構築した 3 つの変異株の胞子( $10^3$  個)を硫酸アンモニウムおよびグルタミンを唯一の窒素源としたグルコース最少培地にスポットし、静置培養した(Fig. 4-21B)。いずれの窒素条件においても 3 つの変異株間には生育差はなかった。表現型上ではアンモニウムとグルタミンの利用に差は見られず、窒素源濃度による違いも観察されなかった(Fig. 4-21B)。それゆえに、これらの変異株を以降の解析に使用した。

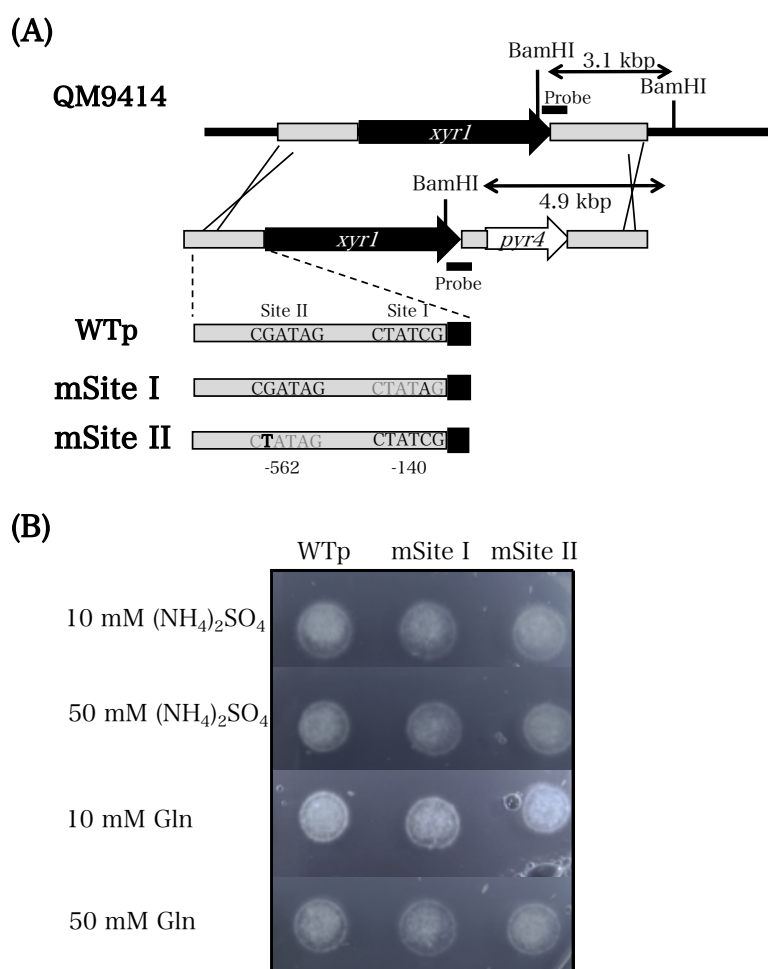


Fig. 4-21 QM9414 における *xyrI* プロモーター変異株の構築

(A) *xyrI* の上流領域に変異を導入する選択マーカー *pyr4* を含んだ 3 種類の DNA フラグメントを構築し、プロトプラスト-PEG 法を用いて QM9414Δ*pyr4amdS* 株を形質転換した。(B) WTp (オリジナル型プロモーター)および mSite I (Site I 変異株)、mSite II (Site II 変異株)を硫酸アンモニウムまたはグルタミンを唯一の窒素源として含む最小培地での表現型。各プレートには  $1 \times 10^3$  個の胞子をスポットした。生育は 28 °C で 6 日間培養後に観察した。

3つの変異株 WTp、mSite I および mSite II を Avicel 培地で培養し、タンパク質生産量、セルラーゼ活性および主要なセルラーゼ関連遺伝子の転写量を測定した(Fig. 4-22, 23)。親株と同様のオリジナル型の *xyrI* プロモーター領域をもつ WTp は QM9414 と同等のタンパク質生産と CMCCase 活性であった(Fig. 4-22)。mSite II も WTp と変わらないタンパク質生産量と CMCCase 活性を示した(Fig. 4-22)。一方で、mSite I のタンパク質生産量および CMCCase 活性は WTp および mSite II と比べ低い値を示した(Fig. 4-22)。

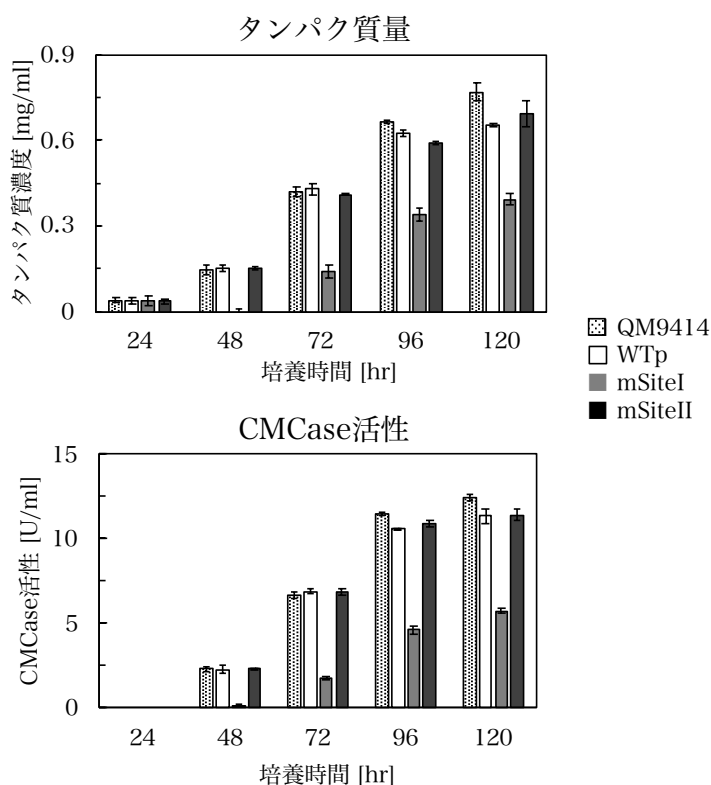


Fig. 4-22 *xyrI* プロモーター変異株のセルラーゼ活性

*T. reesei* QM9414 (dotted bar) および WTp (white bar)、mSite I (gray bar)、mSite II (black bar) を 0.01 M 硫酸アンモニウムを窒素源として含む 1% Avicel 培地で 5 日間培養した。タンパク質量および CMCCase 活性は培養上清を用いて測定した。各値は独立した 3 実験の平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。

主要なセルラーゼ遺伝子の転写解析では、*cbh1*、*egl1* および *xyn1* のセルラーゼ・キシラナーゼ遺伝子発現は、CMCase 活性と同様で WTp と mSite II は同様のパターンを示した(Fig. 4-23)。これら遺伝子の発現量は培養 72 時間目まで上昇し、96 時間目で減少した。*xyr1* の発現パターンにおいても、これら 2 つの変異株は一致していた。一方で、mSite I は他の変異株とは異なり、減少した *cbh1*、*egl1* および *xyn1* の発現パターンを示した(Fig. 4-23)。24 時間から 72 時間では WTp および mSite II と比べて低い発現量であ

るが、96 時間目にはこれら 2 変異株と同等に発現した。*xyl1* の発現は 3 つの変異株の内 mSite I の 24 時間目のみ異なる値を示した。mSite I の 24 時間目の *xyl1* 発現量は WTp および mSite II の半分以下であった。また、3 つの変異株間で *are1* の発現の違いは観察されなかった(Fig. 4-23)。

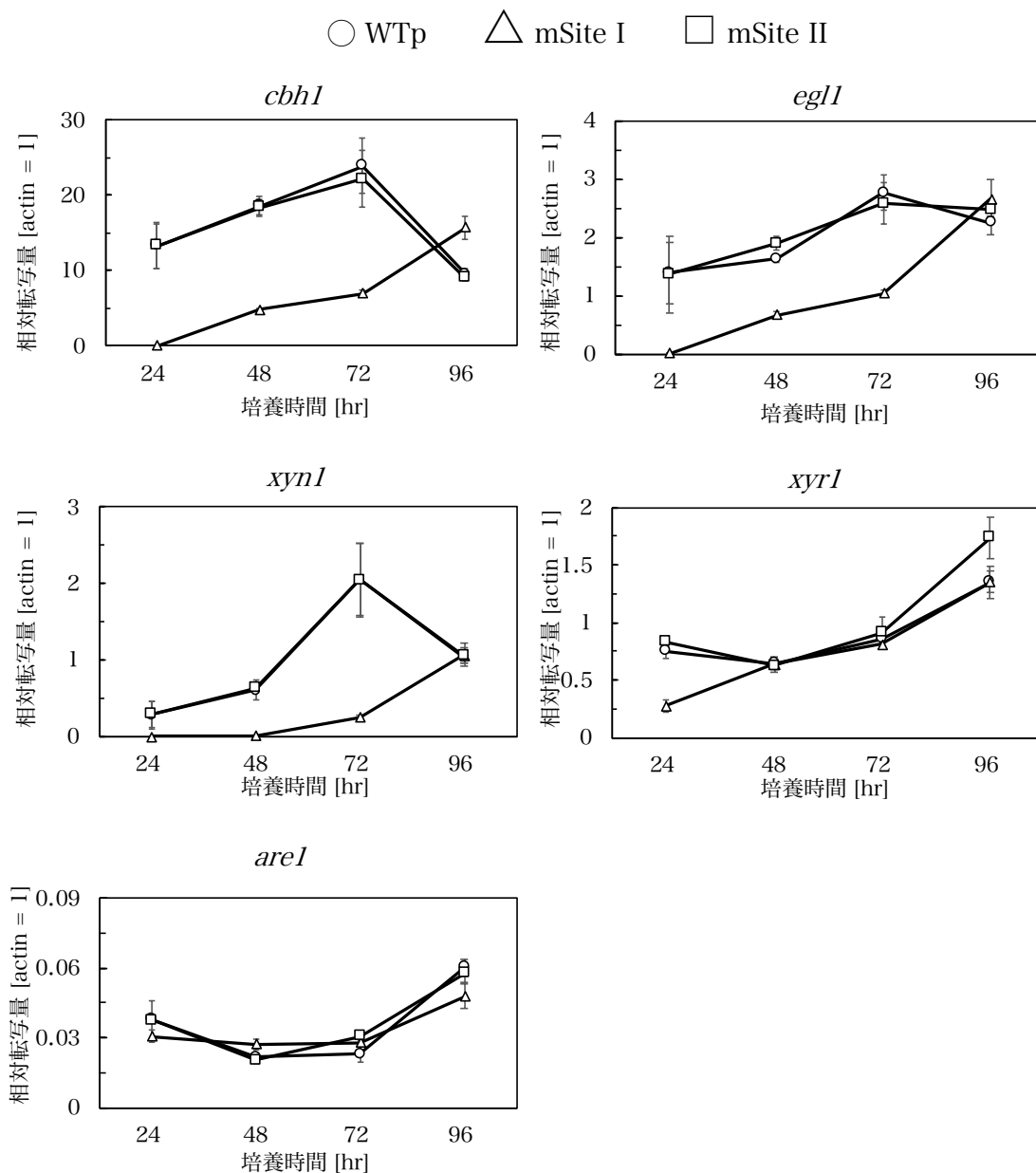


Fig. 4-23 *xyl1* プロモーター変異株のセルラーゼ遺伝子の発現解析

WTp (circle)および mSiteI (triangle)、mSiteII (square)を 0.01 M 硫酸アンモニウムを窒素源として含む 1% Avicel 培地で 5 日間培養した。セルラーゼ転写調節因子遺伝子 *xyl1* (A)および *are1* (B)の転写解析は qRT-PCR により行った。すべての値はハウスキーピング遺伝子 *act1* の発現により標準化した。各値は独立した 3 実験の平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。



#### 4.4. 考察

本章では、窒素源の種類によってセルラーゼ生産が調節されていることを明らかにした(Table 4-2)。窒素源代謝は微生物において生育やタンパク質生産のために重要である。ゆえに、各窒素源による菌体蓄積の影響を除外したセルラーゼ生産性を評価した。しかしながら、菌体蓄積の影響を完全に排除することは困難であった。本章の結果は菌体量やハウスキーピング遺伝子の発現量で標準化することで菌体蓄積の影響の除去を行ったが、セルラーゼ生産性と菌体蓄積は同様のパターンを示した(Table 4-2)。そのため、窒素源や窒素代謝とセルラーゼ生産の関係性がこの結果より明らかとなった。

peptone および yeast extract の添加に関係なく、窒素源を添加しない場合はセルラーゼ・キシラナーゼを生産せず、*xyl1* の発現は非常に低いレベルであった (Fig. 4-4, 15)。この結果は、peptone および yeast extract を菌体蓄積の補助として用いるだけではセルラーゼ遺伝子の誘導発現は起きず、硫酸アンモニウムやグルタミンなどの容易に代謝可能な窒素源が細胞内に必要であることが示唆される。この結果は、Ilmén らによる報告によっても支持され、peptone は細胞増殖によってセルラーゼ生産量を増加させるが、炭素源として異化抑制を引き起こしている可能性を示している(10)。

*T. reesei* は硝酸を窒素源として利用できないことが報告されている(190)。本章においても、QM9414 は硝酸塩存在下では十分なコロニーの形成を観察できず、硝酸塩濃度を高くしても生育は向上しなかった(Fig. 4-11B)。*A. nidulans* の硝酸同化酵素遺伝子はクラスターを組み、硝酸誘導的に AreA および経路特異的調節因子 NirA によって調節されている(195, 196)。*T. reesei* においても、染色体上に硝酸同化酵素遺伝子セットがクラスターを形成している(197)。硝酸同化遺伝子の発現パターンは、*T. reesei* においても硝酸誘導的な Are1 による硝酸代謝調節メカニズムが保存されていることを示唆している。一方で、硝酸塩により誘導された場合でも硝酸同化酵素遺伝子の発現量は極めて低かった(Fig. 4-7)。*T. reesei* が硝酸を利用できないのは硝酸を取り込み・アンモニウム変換を行う同化酵素の遺伝子を有するものの、それらの遺伝子発現量が極めて低いためだと推測される。*T. reesei* は塩素酸塩(硝酸アナログであり分解産物の亜塩素酸、次亜塩素酸が毒性を示す)存在下で生育しないことから、亜硝酸レダクターゼがアンモニウムへの変換における律速となっていると考えられている(190)。

窒素源依存的なセルラーゼ生産は代謝可能な窒素源により転写レベルで調節されていることが示された(Fig. 4-6)。この結果は窒素代謝がセルラーゼ遺伝子発現を促進することを示唆している。これまでに、炭素源や窒素源、リン源のような栄養素の枯渇はセルラーゼ生産の阻害を引き起こすことが報告されている(181)。しかしながら、この現象が転写レベルで引き起こされているかはいまだ知られていない。今回の結果は栄養素がセルラーゼ

生産の遺伝子発現に関与している可能性を示した。一方で、休止菌体を用いた転写解析は実験したすべての条件でセルラーゼ遺伝子発現が誘導されることが明らかとなった(Fig. 4-8)。この結果は培養での転写解析の結果と一致しない。このことから、セルラーゼ遺伝子発現のスイッチは種々の栄養素の同化は関係なく、セルロースのようなセルラーゼ誘導基質の存在がセルラーゼをファインチューニングしていると示唆された。

グルタミンは菌体内で窒素源プールの最終物質の 1 つであり、タンパク質の生合成へと直接的に使用される。そのため、タンパク質生産は他の窒素源と比べてグルタミンの使用により増加すると推測された。しかしながら、グルタミンでの培養はセルラーゼ、*xylI* の発現が硫酸アンモニウムよりも低かった(Fig. 4-6)。グルタミンは好適窒素源の一つであり、アンモニウムや硝酸より容易に代謝される。このことから、窒素源異化抑制がセルラーゼ生産に負の影響を与える可能性がある。窒素源異化抑制は容易に代謝することができる窒素源を優先的に資化するための制御メカニズムであり、包括的な窒素代謝制御因子 AreA により調節されていることが知られている(119)。*A. nidulans* においてグルタミンのような好適窒素源や過剰量の窒素存在下では、AreA の発現は抑制され、様々な窒素代謝酵素の発現が非活性化される(198)。*T. reesei* における AreA のホモログである AreI の発現は窒素源なしの条件と比べグルタミンで減少していた(Fig. 4-16D)。*T. reesei* AreI も細胞内グルタミン濃度に応じてその活性が抑制されていると推測される。それゆえに、グルタミン培養は窒素源異化抑制を引き起こすことが示唆された。また、QM9414 では 0.01 M 硫酸アンモニウムと比較し、0.05 M 硫酸アンモニウムで *xylI* 発現量の減少が観察され、グルタミンではさらに発現量の減少が観察された(Fig. 4-6)。アンモニウムはグルタミンに同化されるため、0.01 M よりも 0.05 M の硫酸アンモニウムを窒素源として使用した場合のほうが *T. reesei* の細胞内グルタミン濃度が上昇する。そのため、*xylI* の発現は細胞内グルタミン濃度によって調節されていることが推測される。細胞内グルタミン濃度に応答した転写抑制は、AreA が中心因子として働く窒素代謝産物抑制として知られている(136, 137)。したがって *xylI* は AreI 依存的に発現し、セルラーゼ生産は窒素源異化抑制の影響を受けグルタミンによって抑制されることが推測される。

AreI は既知の AreA ホモログと高い相同性を示した(Fig. 4-9A)。さらに、AreI をコードする遺伝子の破壊は様々な窒素源の資化能が減少した(Fig. 4-11)。他の真菌においても AreA/Nit-2 の欠損により様々な窒素源での生育が減少することが報告されている(119)。*T. reesei* における *areI* の破壊と他の真菌の間で同様の表現型を示すことから、真菌間でその機能が保存されていることが示唆された。そのため、TR76817 を AreI と名付けた。*areI* の欠損は著しいアンモニウム代謝能の低下を引き起こし(Fig. 4-11B)、アンモニウム同化に異常が生じていることが推測された。実際に *A. nidulans* におけるアンモニウム

ム取り込み能は細胞内アンモニウムおよびグルタミン濃度によって制御されており、AreAがアンモニウムパーミアーゼの発現を活性化している(199)。2つの *T. reesei* 推定アンモニウムトランスポーター遺伝子 *tr82095* および *tr43671* は窒素源がない場合に最も発現し、*tr82095* はアンモニウムおよびグルタミン存在下で発現が強く抑制された(Fig. 4-12)。アミノ酸配列の相同性および窒素源に応じた発現パターンから、Tr82095 は MepA(相同性 66.5%)型、Tr43671 は MeaA(相同性 73.6%)型であると推測される。MeaA は *A. nidulans* における主要なアンモニウム輸送活性を構成しており、アンモニウムおよびグルタミン存在下でも輸送活性を示す。MepA は窒素飢餓条件下で発現する高親和性のトランスポーターである(200)。MeaA および MepA はどちらも AreA 依存的な発現を示すが、*meaA* は *areA* を欠失しても低レベルの発現を示すためアンモニウム存在下で正常に生育することができる(199)。しかし、*tr43671* の発現は *are1* 欠損株では観察されなかった(Fig. 4-12)。一方で、グルタミン合成関連酵素群の発現に両株間で変化が少ないことから(Fig. 4-13)、QMΔ*are1* のアンモニウム利用能の著しい低下はアンモニウムを細胞内に取り込めていないためであると考えられる。この結果は *T. reesei* のアンモニウム利用が Are1 に大きく依存していることを示し、アンモニウムおよびグルタミン存在下であっても Are1 の活性は完全に消失せず、活性を保っていること示唆している。

*are1* 欠損によるセルラーゼ・キシラナーゼ生産性の低下は使用した窒素源によって異なるパターンを示した(Fig. 4-14)。*are1* 破壊株の 0.05 M 硫酸アンモニウムおよび 0.01 M グルタミンでの酵素活性は、QM9414 のグルタミン存在下での減少したセルラーゼ・キシラナーゼ活性と同等もしくは差が小さかった(Fig. 4-14)。窒素源に応答した *xyl1* の発現パターンに着目すると、QM9414 の 0.01 M グルタミンと *are1* 破壊株の 0.01 M グルタミンおよび 0.05 M 硫酸アンモニウムは同等の *xyl1* の発現レベルである(Fig. 4-15)。また、QM9414 は 0.01 M グルタミンで良好な生育を示すことから(Fig. 4-5)、細胞内グルタミン濃度が高いことが考えられる。同時に低い硝酸同化遺伝子の発現量(Fig. 4-7)からグルタミンによる Are1 活性の抑制が生じていると推測できる。一方で、*are1* 破壊株は Are1 の活性を持たないが、グルタミン代謝に関わる酵素群の発現に影響が見られないことからグルタミンは QM9414 と同等に利用できると考えられる(Fig. 4-13)。そのため、*are1* 破壊株の細胞内グルタミンは十分に存在していると考えられる。一方、0.05 M 硫酸アンモニウムでは、*are1* 破壊株はアンモニウム取り込み能が減少していると推測されているが(Fig. 4-12)、培地中にアンモニウムが高濃度で存在するため細胞内に一定量のグルタミンが存在すると推測できる。これらの条件は Are1 活性がないあるいは低レベルであること、細胞内グルタミンレベルが一定量あることが共通している。先に述べたグルタミンによるセルラーゼ遺伝子の発現抑制と合わせると、QM9414 の 0.01 M グルタミンおよび *are1* 破壊株の

0.05 M 硫酸アンモニウムと 0.01 M グルタミンの *xyr1* 発現量のライン①から QM9414 の 0.01 M 硫酸アンモニウムの場合の *xyr1* 発現量のライン②までの発現量は Are1 の活性に依存していることが推測される(Fig. 4-25)。 *A. nidulans* の *areA* mRNA レベルは自己転写制御と *areA* の 3'UTR の存在に依存したグルタミンによる分解によって制御されているため(131)、 *T. reesei* における *are1* の発現においても同様の制御が推測される。そのため、 *are1* の発現量(mRNA 量)は細胞内グルタミンレベルおよび核内の Are1 活性に依存しており、 *xyr1* 発現パターンと *are1* 発現パターンが一致していることは、 *xyr1* の発現がグルタミン濃度や Are1 活性もしくはその両方に依存性を持つことを示す(Fig. 4-16)。また、 *are1* 破壊株は 0.01 M 硫酸アンモニウムを用いた場合細胞内に十分なグルタミンが存在しないと推測されるため、窒素源を用いない条件の *xyr1* 発現量のライン③から①までの発現量は細胞内グルタミン依存的な発現であると推測できる(Fig. 4-25)。窒素源を添加しないと、 QM9414 および *are1* 破壊株どちらにおいても *xyr1* の発現が低レベルであることから、グルタミンはセルラーゼの誘導的発現(*xyr1* の誘導的発現)に必須であると考えられる。

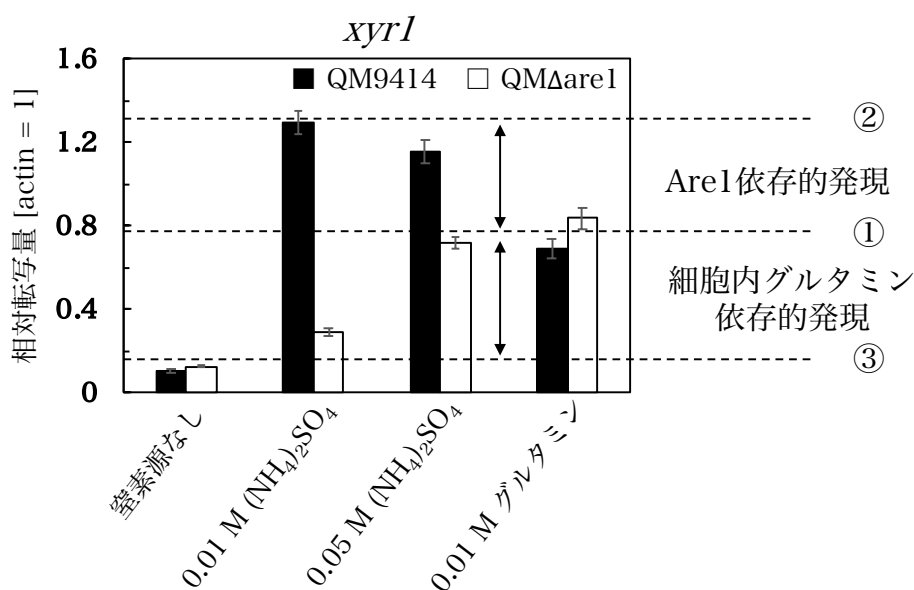


Fig. 4-25 *xyr1* 発現から見るセルラーゼ生産への窒素源の影響

QM9414 (black bar)および QM $\Delta$ are1 (white bar)を 1% Avicel 培地で 5 日間培養した。セルラーゼ転写調節因子遺伝子 *xyr1* の転写解析は qRT-PCR により行った。すべての値はハウスキーピング遺伝子 *act1* の発現により標準化した。各値は独立した 3 実験の平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。

*xyr1* 上流領域の Site I への変異はセルラーゼ生産の低下を引き起こした(Fig. 4-23)。転写レベルにおいても mSite I は WT 型プロモーターを持った株(WTp)と比較して *cbh1* および *egl1*、 *xyn1* 発現が低下した(Fig. 4-24)。Site I の(G→T)変異は Are1 DNA

binding domain のコンセンサス配列への結合を阻害していることから(Fig. 4-20)、このセルラーゼ遺伝子の発現低下は *xyr1* プロモーター領域の Site I へ AreI が結合しないことに起因していると推測される。しかし、酵素活性は *are1* 破壊株のレベルまでは低下しなかった(Fig. 4-14,23)。mSite I 株は *are1* 破壊株と異なり AreI が機能しているため、0.01 M 硫酸アンモニウム条件下においても親株と同等にアンモニウム代謝が可能であると考えられる。実際に、mSite I 株は WTp 株と同等の生育能を示している(Fig. 4-21)。それゆえに、mSite I 株と QM $\Delta$ *are1* のセルラーゼ生産能の違いは、アンモニウム代謝能の違いによる細胞内グルタミン濃度によって引き起こされると推測した。これらのことから、AreI は *xyr1* の上流-140 bp のコンセンサス配列に結合し、*xyr1* の転写を調節することでセルラーゼ生産を転写レベルで活性化することが示唆された。

しかしながら、mSite I 株はセルラーゼ生産能の低下はみられたものの、48 時間以降の *xyr1* 発現量は WTp と一致し、*cbh1* および *egl1*、*xyn1* の発現も時間と共に増加しており、96 時間目では *cbh1* は WTp 以上、*egl1* および *xyn1* では WTp と同等の発現を示した(Fig. 4-25)。 *A. nidulans* の AreA は *niiA-niaD* 遺伝子間領域で閉じているヌクレオソームを緩め、他の転写調節因子の結合を促進させるクロマチンリモデリングを行っている(201)。*xyr1* の-216 bp から+35 領域はクロマチンにより閉じられており(202)、AreI が結合すると推測される-140 bp と TATA Box はこの領域内に存在した。このことから、mSite I への変異は初期の *xyr1* 発現を減少させ、セルラーゼ・キシラナーゼ遺伝子の発現遅延をおこすと推測された。

## 第5章 総括

セルロース系バイオマスから獲得できる糖は、大気中の二酸化炭素の増加抑制を目指した燃料用エタノールや様々な化成品の原料の生産、食料への利用が可能である。糖化酵素によるバイオマスの効率的な糖化にはセルラーゼ高生産性糸状菌 *Trichoderma reesei* の利用が必須である。*T. reesei* を産業用のセルラーゼ供給源として利用するためには、生産される種々のセルラーゼの機能解析やバイオマス糖化に必要なセルラーゼ成分の同定とともにセルラーゼの転写制御機構を明らかにする必要がある。これまでの遺伝子工学を利用した *T. reesei* の菌株改良はその多くがセルラーゼプロモーターの制御下で糖質加水分解酵素などの糖化において有用な酵素を発現させることで行われてきた。しかしながら、バイオマスや前処理の種類によってセルロース、ヘミセルロースの組成は変化するため、それぞれに最適な比率で糖質加水分解酵素を生産することが可能である菌株の造成が必要である。*T. reesei* のセルラーゼ・ヘミセルラーゼの発現は炭素原により協調的に誘導されるが、その他の環境因子によってその発現が変化することが知られている。しかしながら、そのメカニズムはほぼ明らかとなっていない。また、セルラーゼプロモーターの多重利用は転写活性因子の過剰利用によりタイトレーションが引き起こされることも知られている。本論文は、近年の遺伝子組み換えを用いた菌株改良における問題点である転写活性化因子のタイトレーションの解決や種々の前処理バイオマスへの酵素組成の最適化を目指し、*T. reesei* におけるセルラーゼ遺伝子の発現制御メカニズムの解析を行った。それによって、自然界に存在する多種多様なバイオマスに対応してその分解に必要な種々のセルラーゼを最適な比率で大量に生産することができる *T. reesei* 工業用糖化酵素生産菌株を造成することが可能となる。

第1章では、本研究を推進する意義および目的を明らかにすると共に *T. reesei* における菌株改良および糸状菌における環境因子の応答について網羅的にまとめた。

第2章では、セルロース系基質とキシラン系基質の誘導メカニズムの解明を目指し、セルロース系炭素源でのみ誘導される *xyn3* プロモーターにセルロースおよびキシラン系炭素源の両方で誘導される *xyn1* プロモーターのシス配列を導入することで、炭素源応答性の変化を評価した。その結果、*xyn3* シス配列を *xyn1* シス配列と置換することによって *xyn3* プロモーターにキシランに対する誘導能を付与することができた。これにより、キシラン誘導において、*xyn1* シス配列の Xyr1 結合モチーフ間のスペーサー配列が Xyr1 の結合に関与していることが示唆された。また、相補的に2つの *xyn1* シス配列を導入した2RBox プロモーターの制御下で高機能 BGL である *A. aculeatus* BGLI を発現させたセルロース性バイオマスの糖化に適した組み換え *T. reesei* 株を構築した。本形質転換体 X3-2 RB\_AB1 株はこれまでに構築された工業用菌株と同等の前処理バイオマスの糖化を示した。さらに、2RBox プロモーターは XYNIII が発現していない QM9414 株においても機能することが示された。これは *xyn3* 改変プロモーターが効率的な酵素発現に使用することがで

き、XYNIII が発現していない QM9414 由来の変異株にも応用することができることを証明するものである。

第 3 章では、標準株 QM9414 と高生産変異株 PC-3-7 の表現型の比較解析を通して日本型変異株のセルラーゼ生産性について評価した。これにより、PC-3-7 においてセルラーゼ、キシラナーゼの酵素組成が培養 pH に応答して変化することを明らかにした。さらに、この現象が転写レベルで制御されていることも明らかとなった。PacI を介する既知の pH シグナル伝達経路は変異株間で同様に機能しており、PacI 破壊の影響が pH 3.5 のみでセルラーゼ遺伝子と転写活性化因子 *xyl1* の転写パターンが一致しないことから、セルラーゼ生産における新規の pH 応答メカニズムの存在が示唆された。また、低 pH 依存のおよび高 pH 依存のセルラーゼ生産は異なるメカニズムにより引き起こされていることが推測された。さらに、N-25 において生じた変異は低 pH での低下したセルラーゼ生産にも寄与している可能性が見出され、この表現型は次の変異株である K-14 より回復していることから、K-14 に生じた変異によりマスクされていることが示唆された。これら変異のさらなる解析は環境 pH に対する新たなセルラーゼ生産メカニズムを解明することができるだろう。また、培養 pH による酵素組成の変化を利用して工業用糖化酵素生産菌株の糖化能の変化を評価した。工業用糖化酵素生産菌株においても、低 pH、高 pH の培養を使い分けることで酵素組成を簡便に操作することが可能であり、種々の環境因子に対するセルラーゼ生産性の解析は培養条件による酵素比率の改変に多様性を持たすことが期待される。

第 4 章では、タンパク質生産にとって重要な影響を与える窒素源のセルラーゼ生産への影響を評価した。セルラーゼ生産の減少が窒素源異化抑制により引き起こされることが示唆され、*T. reesei* において窒素源異化抑制に関わる包括的な窒素代謝活性化因子 AreI がセルラーゼの転写制御に関与していることが *in vitro* および *in vivo* において明らかとなった。また、同時に細胞内グルタミン濃度がセルラーゼの基礎的な誘導的発現に転写レベルで関与することが推察された。AreI は広く真菌に保存されていることから、この制御は *T. reesei* のセルラーゼ生産特異的なものではなく、真菌全体におけるタンパク質生産において保存されているのであろう。以上の結果は、*T. reesei* によるセルラーゼ生産だけでなく真菌における菌体外タンパク質生産に関する研究へ与えるインパクトが非常に大きいものであるといえる。

以上のことから、本研究の成果はセルラーゼ誘導メカニズムを明らかにするための手がかりを与えるだけでなく、*T. reesei* が生産するセルラーゼ比率の改変に応用できる可能性を示すものである。



## 第6章 参考文献

1. 日経バイオテク: 日経バイオ年鑑 2017: 研究開発と市場・産業動向, (日経BP社, 2016).
2. Oecd: The Bioeconomy of 2030, The Bioeconomy to 2030 Designing a Policy Agenda, (2009).
3. バイオ燃料技術革新協議会: バイオ燃料技術革新計画, (2008).
4. 森川康: バイオマスアルコール生産技術, in 月刊エコインダストリー, 54-63 (シーエムシー出版, 2003).
5. Schmoll, M. & Schuster, A.: Biology and biotechnology of *Trichoderma*, Appl. Microbiol. Biotechnol., **87**, 787-799 (2010).
6. Häkkinen, M., Arvas, M., Oja, M., Aro, N., Penttilä, M., Saloheimo, M. & Pakula, T. M.: Re-annotation of the CAZy genes of *Trichoderma reesei* and transcription in the presence of lignocellulosic substrates, Microb. Cell Fact., **11**, 134 (2012).
7. Shoemaker, S., Schweickart, V., Ladner, M., Gelfand, D., Kwok, S., Myambo, K. & Innis, M.: Molecular cloning of exo-cellobiohydrolase I derived from *Trichoderma reesei* strain L27, Nat. Biotechnol., **1**, 691-696 (1983).
8. Penttilä, M., Lehtovaara, P., Nevalainen, H., Bhikhabhai, R. & Knowles, J.: Homology between cellulase genes of *Trichoderma reesei*: complete nucleotide sequence of the endoglucanase I gene, Gene, **45**, 253-263 (1986).
9. Teeri, T. T., Lehtovaara, P., Kauppinen, S., Salovuori, I. & Knowles, J.: Homologous domains in *Trichoderma reesei* cellulolytic enzymes: Gene sequence and expression of cellobiohydrolase II, Gene, **51**, 43-52 (1987).
10. Ilmén, M., Saloheimo, A., Onnela, M. L. & Penttilä, M. E.: Regulation of cellulase gene expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*, Appl. Environ. Microbiol., **63**, 1298-1306 (1997).
11. Saloheimo, M., Lehtovaara, P., Penttilä, M., Teeri, T. T., Ståhlberg, J., Johansson, G., Pettersson, G., Claeysens, M., Tomme, P. & Knowles, J. K. C.: EGIII, a new endoglucanase from *Trichoderma reesei*: the characterization of both gene and enzyme, Gene, **63**, 11-21 (1988).
12. Saloheimo, M., Kuja-Panula, J., Ylösmäki, E., Ward, M. & Penttilä, M.: Enzymatic properties and intracellular localization of the novel *Trichoderma reesei*  $\beta$ -glucosidase BGLII (Cel1A), Appl. Environ. Microbiol., **68**, 4546-4553 (2002).
13. Fowler, T. & Brown, R. D.: The *bglI* gene encoding extracellular  $\beta$ -glucosidase from *Trichoderma reesei* is required for rapid induction of the cellulase complex., Mol. Microbiol., **6**, 3225-3235 (1992).
14. Saloheimo, A., Henrissat, B., Hoffrén, A. M., Teleman, O. & Penttilä, M.: A novel, small endoglucanase gene, *egl5*, from *Trichoderma reesei* isolated by expression in yeast, Mol. Microbiol., **13**, 219-228 (1994).
15. Okada, H., Tada, K., Sekiya, T., Yokoyama, K., Takahashi, A., Tohda, H., Kumagai, H. & Morikawa, Y.: Molecular characterization and heterologous expression of the gene encoding a low-molecular-mass endoglucanase from *Trichoderma reesei* QM9414, Appl. Environ. Microbiol., **64**, 555-563 (1998).
16. Karlsson, J., Saloheimo, M., Siika-Aho, M., Tenkanen, M., Penttilä, M. & Tjerneld, F.: Homologous expression and characterization of Cel61A (EG IV) of *Trichoderma reesei*, Eur. J. Biochem., **268**, 6498-6507 (2001).
17. Foreman, P. K., Brown, D., Dankmeyer, L., Dean, R., Diener, S., Dunn-Coleman, N. S., Goedegebuur, F., Houfek, T. D., England, G. J., Kelley, A. S., and others: Transcriptional regulation of biomass-degrading enzymes in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*, J. Biol. Chem., **278**, 31988-31997 (2003).
18. Tenkanen, M., Puls, J. & Poutanen, K.: Two major xylanases of *Trichoderma reesei*, Enzyme Microb. Technol., **14**, 566-574 (1992).
19. Tenkanen, M., Vršanská, M., Siika-Aho, M., Wong, D. W., Puchart, V., Penttilä, M., Saloheimo, M. & Biely, P.: Xylanase XYN IV from *Trichoderma reesei* showing exo- and endo-xylanase activity, FEBS J., **280**, 285-301 (2013).
20. Herrmann, M. C., Vrsanska, M., Jurickova, M., Hirsch, J., Biely, P. & Kubicek,

- C. P.: The  $\beta$ -D-xylosidase of *Trichoderma reesei* is a multifunctional  $\beta$ -D-xylan xylohydrolase., *Biochem. J.*, **321**, 375–381 (1997).
21. **Xu, J., Takakuwa, N., Nogawa, M., Okada, H. & Morikawa, Y.:** A third xylanase from *Trichoderma reesei* PC-3-7, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **49**, 718–724 (1998).
  22. **Herold, S., Bischof, R., Metz, B., Seiboth, B. & Kubicek, C. P.:** Xylanase gene transcription in *Trichoderma reesei* is triggered by different inducers representing different hemicellulosic pentose polymers., *Eukaryot. Cell*, **12**, 390–398 (2013).
  23. **Cherry, J. R. & Fidantsef, A. L.:** Directed evolution of industrial enzymes: An update, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **14**, 438–443 (2003).
  24. **Gritzali, M. & Brown, R. D.:** The cellulase system of *Trichoderma*, in *Hydrolysis of Cellulose: Mechanisms of Enzymatic and Acid Catalysis*, **181**, 12–237 (AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, 1979).
  25. **Bisaria, V. S., Mishra, S. & Eveleigh, D. E.:** Regulatory aspects of cellulase biosynthesis and secretion, *Crit. Rev. Biotechnol.*, **9**, 61–103 (1989).
  26. **Kubicek, C. P., Messner, R., Gruber, F., Mach, R. L. & Kubicek-Pranz, E. M.:** The *Trichoderma* cellulase regulatory puzzle: From the interior life of a secretory fungus, *Enzyme Microb. Technol.*, **15**, 90–99 (1993).
  27. **Suto, M. & Tomita, F.:** Induction and catabolite repression mechanisms of cellulase in fungi, *J. Biosci. Bioeng.*, **92**, 305–311 (2001).
  28. **Nogawa, M., Goto, M., Okada, H. & Morikawa, Y.:** L-sorbose induces cellulase gene transcription in the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei*, *Curr. Genet.*, **38**, 329–334 (2001).
  29. **Mach-Aigner, A. R., Grosstessner-Hain, K., Poças-Fonseca, M. J., Mechtler, K. & Mach, R. L.:** From an electrophoretic mobility shift assay to isolated transcription factors: a fast genomic-proteomic approach., *BMC Genomics*, **11**, 644 (2010).
  30. **Zeilinger, S., Mach, R. L., Schindler, M., Herzog, P. & Kubicek, C. P.:** Different inducibility of expression of the two xylanase genes *xyn1* and *xyn2* in *Trichoderma reesei*, *J. Biol. Chem.*, **271**, 25624–25629 (1996).
  31. **Xu, J., Nogawa, M., Okada, H. & Morikawa, Y.:** Regulation of *xyn3* gene expression in *Trichoderma reesei* PC-3-7., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **54**, 370–375 (2000).
  32. **Rauscher, R., Würleitner, E., Wacenovsky, C., Aro, N., Stricker, A. R., Zeilinger, S., Kubicek, C. P., Penttilä, M. & Mach, R. L.:** Transcriptional regulation of *xyn1*, encoding xylanase I, in *Hypocrea jecorina*., *Eukaryot. Cell*, **5**, 447–56 (2006).
  33. **Stricker, A. R., Grosstessner-Hain, K., Würleitner, E. & Mach, R. L.:** Xyr1 (Xylanase Regulator 1) regulates both the hydrolytic enzyme system and D-xylose metabolism in *Hypocrea jecorina*, *Eukaryot. Cell*, **5**, 2128–2137 (2006).
  34. **Stricker, A. R., Mach, R. L. & de Graaff, L. H.:** Regulation of transcription of cellulases- and hemicellulases-encoding genes in *Aspergillus niger* and *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*)., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **78**, 211–20 (2008).
  35. **Furukawa, T., Shida, Y., Kitagami, N., Mori, K., Kato, M., Kobayashi, T., Okada, H., Ogasawara, W. & Morikawa, Y.:** Identification of specific binding sites for XYR1, a transcriptional activator of cellulolytic and xylanolytic genes in *Trichoderma reesei*, *Fungal Genet. Biol.*, **46**, 564–574 (2009).
  36. **Lichius, A., Seidl-Seiboth, V., Seiboth, B. & Kubicek, C. P.:** Nucleo-cytoplasmic shuttling dynamics of the transcriptional regulators XYR1 and CRE1 under conditions of cellulase and xylanase gene expression in *Trichoderma reesei*., *Mol. Microbiol.*, **94**, 1162–1178 (2014).
  37. **Ghassemi, S., Lichius, A., Bidard, F., Lemoine, S., Rossignol, M.-N., Herold, S., Seidl-Seiboth, V., Seiboth, B., Espeso, E. A., Margeot, A., and others:** The  $\beta$ -importin KAP8 (Pse1/Kap121) is required for nuclear import of the cellulase transcriptional regulator XYR1, asexual sporulation and stress resistance in *Trichoderma reesei*., *Mol. Microbiol.*, **96**, 405–418 (2015).
  38. **Mach-Aigner, A. R., Pucher, M. E., Steiger, M. G., Bauer, G. E., Preis, S. J. &**

- Mach, R. L.:** Transcriptional regulation of *xyr1*, encoding the main regulator of the xylanolytic and cellulolytic enzyme system in *Hypocrea jecorina*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 6554–6562 (2008).
39. **Aro, N., Saloheimo, A., Ilmén, M. & Penttilä, M.:** ACEII, a novel transcriptional activator involved in regulation of cellulase and xylanase genes of *Trichoderma reesei*, *J. Biol. Chem.*, **276**, 24309–24314 (2001).
  40. **Schmoll, M. & Kubicek, C. P.:** Regulation of *Trichoderma* cellulase formation: lessons in molecular biology from an industrial fungus, *Acta Microbiol. Immunol. Hung.*, **50**, 125–145 (2003).
  41. **Zeilinger, S., Ebner, A., Marosits, T., Mach, R. & Kubicek, C. P.:** The *Hypocrea jecorina* HAP 2/3/5 protein complex binds to the inverted CCAAT-box (ATTGG) within the *cbh2* (cellobiohydrolase II-gene) activating element, *Mol. Genet. Genomics*, **266**, 56–63 (2001).
  42. **Kato, M.:** An overview of the CCAAT-box binding factor in filamentous fungi: assembly, nuclear translocation, and transcriptional enhancement, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **69**, 663–672 (2005).
  43. **Würleitner, E., Pera, L., Wacenovský, C., Cziferszky, A., Zeilinger, S., Kubicek, C. & Mach, R.:** Transcriptional regulation of *xyn2* in *Hypocrea jecorina*, *Eukaryot. Cell*, **2**, 150–158 (2003).
  44. **Stricker, A. R., Trefflinger, P., Aro, N., Penttilä, M. & Mach, R. L.:** Role of Ace2 (Activator of Cellulases 2) within the *xyn2* transcriptosome of *Hypocrea jecorina*, *Fungal Genet. Biol.*, **45**, 436–445 (2008).
  45. **Zeilinger, S., Schmoll, M., Pail, M., Mach, R. L. & Kubicek, C. P.:** Nucleosome transactions on the *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) cellulase promoter *cbh2* associated with cellulase induction, *Mol. Genet. Genomics*, **270**, 46–55 (2003).
  46. **Häkkinen, M., Valkonen, M. J., Westerholm-Parvinen, A., Aro, N., Arvas, M., Vitikainen, M., Penttilä, M., Saloheimo, M. & Pakula, T. M.:** Screening of candidate regulators for cellulase and hemicellulase production in *Trichoderma reesei* and identification of a factor essential for cellulase production., *Biotechnol. Biofuels*, **7**, 14 (2014).
  47. **Strauss, J., Mach, R. L., Zeilinger, S., Hartler, G., Stöffler, G., Wolschek, M. & Kubicek, C. P.:** Cre1, the carbon catabolite repressor protein from *Trichoderma reesei*, *FEBS Lett.*, **376**, 103–107 (1995).
  48. **Portnoy, T., Margeot, A., Linke, R., Atanasova, L., Fekete, E., Sándor, E., Hartl, L., Karaffa, L., Druzhinina, I. S., Seiboth, B., and others:** The CRE1 carbon catabolite repressor of the fungus *Trichoderma reesei*: a master regulator of carbon assimilation, *BMC Genomics*, **12**, 269 (2011).
  49. **Takashima, S., Iikura, H., Nakamura, A., Masaki, H. & Uozumi, T.:** Analysis of Cre1 binding sites in the *Trichoderma reesei cbh1* upstream region, *FEMS Microbiol. Lett.*, **145**, 361–366 (1996).
  50. **Mach, R. L., Strauss, J., Zeilinger, S., Schindler, M. & Kubicek, C. P.:** Carbon catabolite repression of xylanase I (*xynI*) gene expression in *Trichoderma reesei*, *Mol. Microbiol.*, **21**, 1273–1281 (1996).
  51. **Ilmén, M., Onnela, M. L., Klemsdal, S., Keränen, S. & Penttilä, M.:** Functional analysis of the cellobiohydrolase I promoter of the filamentous fungus *Trichoderma reesei*, *Mol. Gen. Genet.*, **253**, 303–314 (1996).
  52. **Porciuncula, J. de O., Furukawa, T., Shida, Y., Mori, K., Kuhara, S., Morikawa, Y. & Ogadsawara, W.:** Identification of major facilitator transporters involved in cellulase production during lactose culture of *Trichoderma reesei* PC-3-7, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **77**, 1014–1022 (2013).
  53. **Cziferszky, A., Mach, R. L. & Kubicek, C. P.:** Phosphorylation positively regulates DNA binding of the carbon catabolite repressor Cre1 of *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*), *J. Biol. Chem.*, **277**, 14688–14694 (2002).
  54. **Lockington, R. A. & Kelly, J. M.:** The WD40-repeat protein CreC interacts with and

- stabilizes the deubiquitinating enzyme CreB in vivo in *Aspergillus nidulans*, **43**, 1173–1182 (2002).
55. **Boase, N. A. & Kelly, J. M.:** A role for creD, a carbon catabolite repression gene from *Aspergillus nidulans*, in ubiquitination, Mol. Microbiol., **53**, 929–940 (2004).
  56. **Xiong, Y., Sun, J. & Glass, N. L.:** VIB1, a Link between Glucose Signaling and Carbon Catabolite Repression, Is Essential for Plant Cell Wall Degradation by *Neurospora crassa*, PLoS Genet., **10**, (2014).
  57. **Saloheimo, A., Aro, N., Ilmén, M. & Penttilä, M.:** Isolation of the *ace1* gene encoding a Cys<sub>2</sub>-His<sub>2</sub> transcription factor involved in regulation of activity of the cellulase promoter *cbh1* of *Trichoderma reesei*, J. Biol. Chem., **275**, 5817–5825 (2000).
  58. **Aro, N., Ilmén, M., Saloheimo, A. & Penttilä, M.:** ACEI of *Trichoderma reesei* is a repressor of cellulase and xylanase expression, Appl. Environ. Microbiol., **69**, 56–65 (2003).
  59. **Chilton, I. J., Delaney, C. E., Fincham, D. A., Hooley, P., Whitehead, M. P. & Peterson, S. W.:** The *Aspergillus nidulans* stress response transcription factor StzA is ascomycete-specific and shows species-specific polymorphisms in the C-terminal region, Mycol. Res., **112**, 1435–1446 (2008).
  60. **Derntl, C., Rassinger, A., Srebotnik, E., Mach, R. L. & Mach-Aigner, A. R.:** Xpp1 regulates the expression of xylanases, but not of cellulases in *Trichoderma reesei*, Biotechnol. Biofuels, **8**, 112 (2015).
  61. **Liu, R., Chen, L., Jiang, Y., Zou, G. & Zhou, Z.:** A novel transcription factor specifically regulates GH11 xylanase genes in *Trichoderma reesei*, Biotechnol. Biofuels, **10**, 194 (2017).
  62. **Nitta, M., Furukawa, T., Shida, Y., Mori, K., Kuhara, S., Morikawa, Y. & Ogasawara, W.:** A new Zn(II)<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub>-type transcription factor BglR regulates β-glucosidase expression in *Trichoderma reesei*, Fungal Genet. Biol., **49**, 388–397 (2012).
  63. **Cao, Y., Zheng, F., Wang, L., Zhao, G., Chen, G., Zhang, W. & Liu, W.:** Rce1, a novel transcriptional repressor, regulates cellulase gene expression by antagonizing the transactivator Xyr1 in *Trichoderma reesei*, Mol. Microbiol., **105**, 65–83 (2017).
  64. **Henrique-Silva, F., El-Gogary, S., Carle-Urioste, J. C., Matheucci Jr., E., Crivellaro, O. & El-Dorry, H.:** Two regulatory regions controlling basal and cellulose-induced expression of the gene encoding cellobiohydrolase I of *Trichoderma reesei* are adjacent to its TATA box, Biochem. Biophys. Res. Commun., **228**, 229–237 (1996).
  65. **Stangl, H., Gruber, F. & Kubicek, C. P.:** Characterization of the *Trichoderma reesei* *cbh2* promoter, Curr. Genet., **23**, 115–122 (1993).
  66. **Zeilinger, S., Mach, R. L. & Kubicek, C. P.:** Two adjacent protein binding motifs in the *cbh2* (cellobiohydrolase II-encoding) promoter of the fungus *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) cooperate in the induction by cellulose, J. Biol. Chem., **273**, 34463–34471 (1998).
  67. **Carle-Urioste, J. C., Escobar-Vera, J., El-Gogary, S., Henrique-Silva, F., Torigoi, E., Crivellaro, O., Herrera-Estrella, A. & El-Dorry, H.:** Cellulase induction in *Trichoderma reesei* by cellulose requires its own basal expression, J. Biol. Chem., **272**, 10169–10174 (1997).
  68. **Seiboth, B., Hakola, S., Mach, R. L., Suominen, P. L. & Kubicek, C. P.:** Role of four major cellulases in triggering of cellulase gene expression by cellulose in *Trichoderma reesei*, J. Bacteriol., **179**, 5318–5320 (1997).
  69. **Shida, Y., Furukawa, T., Ogasawara, W., Kato, M., Kobayashi, T., Okada, H. & Morikawa, Y.:** Functional analysis of the *egl3* upstream region in filamentous fungus *Trichoderma reesei*, Appl. Microbiol. Biotechnol., **78**, 515–524 (2008).
  70. **Rauscher, R., Würleitner, E., Wacenovsky, C., Aro, N., Stricker, A. R., Zeilinger, S., Kubicek, C. P., Penttilä, M. & Mach, R. L.:** Transcriptional regulation of *xyn1*,

- encoding xylanase I, in *Hypocrea jecorina*, Eukaryot. Cell, **5**, 447–456 (2006).
71. **Ogasawara, W., Shida, Y., Furukawa, T., Shimada, R., Nakagawa, S., Kawamura, M., Yagyu, T., Kosuge, A., Xu, J., Nogawa, M., and others:** Cloning, functional expression and promoter analysis of xylanase III gene from *Trichoderma reesei*, Appl. Microbiol. Biotechnol., **72**, 995–1003 (2006).
  72. **Furukawa, T., Shida, Y., Kitagami, N., Ota, Y., Adachi, M., Nakagawa, S., Shimada, R., Kato, M., Kobayashi, T., Okada, H., and others:** Identification of the cis-acting elements involved in regulation of xylanase III gene expression in *Trichoderma reesei* PC-3-7., Fungal Genet. Biol., **45**, 1094–1102 (2008).
  73. **Peterson, R. & Nevalainen, H.:** *Trichoderma reesei* RUT-C30 - Thirty years of strain improvement, Microbiology, **158**, 58–68 (2012).
  74. **Eveleigh, D. E. & Montencourt, B. S.:** Increasing Yields of Extracellular Enzymes, in *Advances in Applied Microbiology*, 57–74 (1979). doi:10.1016/S0065-2164(08)70146-1
  75. **Mandels, M., Weber, J. & Parizek, R.:** Enhanced cellulase production by a mutant of *Trichoderma viride*, Appl. Microbiol., **21**, 152–4 (1971).
  76. **Mandels, M.:** Microbial sources of cellulase., Biotechnol Bioeng Symp, 81–105 (1975).
  77. **Kawamori, M., Morikawa, Y. & Takasawa, S.:** Induction and production of cellulases by L-sorbose in *Trichoderma reesei*, Appl. Microbiol. Biotechnol., **24**, 449–453 (1986).
  78. **Ilmén, M., Thrane, C. & Penttilä, M.:** The glucose repressor gene *cre1* of *Trichoderma*: isolation and expression of a full-length and a truncated mutant form., Mol. Gen. Genet., **251**, 451–460 (1996).
  79. **Geysens, S., Pakula, T., Uusitalo, J., Dewerte, I., Penttilä, M. & Contreras, R.:** Cloning and characterization of the glucosidase II alpha subunit gene of *Trichoderma reesei* : A frameshift mutation results in the aberrant glycosylation profile of the hypercellulolytic strain Rut-C30, Appl. Environ. Microbiol., (2005).
  80. **Seidl, V., Gamauf, C., Druzhinina, I. S., Seiboth, B., Hartl, L. & Kubicek, C. P.:** The *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei* ) hypercellulolytic mutant RUT C30 lacks a 85 kb (29 gene-encoding) region of the wild-type genome., BMC Genomics, **9**, 327 (2008).
  81. **Le Crom, S., Schackwitz, W., Pennacchio, L., Magnuson, J. K., Culley, D. E., Collett, J. R., Martin, J., Druzhinina, I. S., Mathis, H., Monot, F., and others:** Tracking the roots of cellulase hyperproduction by the fungus *Trichoderma reesei* using massively parallel DNA sequencing, Proc. Natl. Acad. Sci., (2009). doi:10.1073/pnas.0905848106
  82. **Porciuncula, J. D. O., Furukawa, T., Mori, K., Shida, Y., Hirakawa, H., Tashiro, K., Kuhara, S., Nakagawa, S., Morikawa, Y. & Ogasawara, W.:** Single nucleotide polymorphism analysis of a *Trichoderma reesei* hyper-cellulolytic mutant developed in Japan., Biosci. Biotechnol. Biochem., **77**, 534–543 (2013).
  83. **Shida, Y., Yamaguchi, K., Nitta, M., Nakamura, A., Takahashi, M., Kidokoro, S., Mori, K., Tashiro, K., Kuhara, S., Matsuzawa, T., and others:** The impact of a single-nucleotide mutation of *bgl2* on cellulase induction in a *Trichoderma reesei* mutant, Biotechnol. Biofuels, **8**, 230 (2015).
  84. **Miettinen-Oinonen, A. & Suominen, P.:** Enhanced production of *Trichoderma reesei* endoglucanases and use of the new cellulase preparations in producing the stonewashed effect on denim fabric., Appl. Environ. Microbiol., **68**, 3956–64 (2002).
  85. **Miettinen-Oinonen, A., Paloheimo, M., Lantto, R. & Suominen, P.:** Enhanced production of cellobiohydrolases in *Trichoderma reesei* and evaluation of the new preparations in biofinishing of cotton, J. Biotechnol., **116**, 305–317 (2005).
  86. **Wang, T.-H., Liu, T., Wu, Z.-H., Liu, S.-L., Lu, Y. & Qu, Y.-B.:** Novel cellulase profile of *Trichoderma reesei* strains constructed by *cbh1* gene replacement with *eg3* gene expression cassette, Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai), **36**, 667–672

- (2004).
87. **Mäntylä, A., Paloheimo, M., Hakola, S., Lindberg, E., Leskinen, S., Kallio, J., Vehmaanperä, J., Lantto, R. & Suominen, P.:** Production in *Trichoderma reesei* of three xylanases from *Chaetomium thermophilum* : A recombinant thermoxyylanase for biobleaching of kraft pulp, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **76**, 377–386 (2007).
  88. **Paloheimo, M., Mäntylä, A., Kallio, J., Puranen, T. & Suominen, P.:** Increased production of xylanase by expression of a truncated version of the *xynIIA* gene from *Nonomuraea flexuosa* in *Trichoderma reesei*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 3215–3224 (2007).
  89. **Gruno, M., Väiljamäe, P., Pettersson, G. & Johansson, G.:** Inhibition of the *Trichoderma reesei* cellulases by cellobiose is strongly dependent on the nature of the substrate, *Biotechnol. Bioeng.*, **86**, 503–511 (2004).
  90. **Zhang, J., Zhong, Y., Zhao, X. & Wang, T.:** Development of the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei* strain with enhanced  $\beta$ -glucosidase and filter paper activity using strong artificial cellobiohydrolase I promoter, *Bioresour. Technol.*, **101**, 9815–9818 (2010).
  91. **Rahman, Z., Shida, Y., Furukawa, T., Suzuki, Y., Okada, H., Ogasawara, W. & Morikawa, Y.:** Application of *Trichoderma reesei* cellulase and xylanase promoters through homologous recombination for enhanced production of extracellular  $\beta$ -glucosidase I, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 1083–1089 (2009).
  92. **Ma, L., Zhang, J., Zou, G., Wang, C. & Zhou, Z.:** Improvement of cellulase activity in *Trichoderma reesei* by heterologous expression of a beta-glucosidase gene from *Penicillium decumbens*, *Enzyme Microb. Technol.*, **49**, 366–371 (2011).
  93. **Nakazawa, H., Kawai, T., Ida, N., Shida, Y., Kobayashi, Y., Okada, H., Tani, S., Sumitani, J.-I., Kawaguchi, T., Morikawa, Y., and others:** Construction of a recombinant *Trichoderma reesei* strain expressing *Aspergillus aculeatus*  $\beta$ -glucosidase I for efficient biomass conversion., *Biotechnol. Bioeng.*, **109**, 92–99 (2012).
  94. **Nakazawa, H., Kawai, T., Ida, N., Shida, Y., Shioya, K., Kobayashi, Y., Okada, H., Tani, S., Sumitani, J.-I., Kawaguchi, T., and others:** A high performance *Trichoderma reesei* strain that reveals the importance of xylanase III in cellulosic biomass conversion, *Enzyme Microb. Technol.*, **82**, 89–95 (2016).
  95. **Dashtban, M. & Qin, W.:** Overexpression of an exotic thermotolerant  $\beta$ -glucosidase in *Trichoderma reesei* and its significant increase in cellulolytic activity and saccharification of barley straw., *Microb. Cell Fact.*, **11**, 63 (2012).
  96. **Xue, X., Wu, Y., Qin, X., Ma, R., Luo, H., Su, X. & Yao, B.:** Revisiting overexpression of a heterologous  $\beta$ -glucosidase in *Trichoderma reesei* : Fusion expression of the *Neosartorya fischeri* Bgl3A to *cbhI* enhances the overall as well as individual cellulase activities, *Microb. Cell Fact.*, **15**, 1–13 (2016).
  97. **Colabardini, A. C., Valkonen, M., Huuskonen, A., Siika-aho, M., Koivula, A., Goldman, G. H. & Saloheimo, M.:** Expression of two novel  $\beta$ -glucosidases from *Chaetomium atrobrunneum* in *Trichoderma reesei* and characterization of the heterologous protein products, *Mol. Biotechnol.*, **58**, 821–831 (2016).
  98. **Viikari, L., Alapuranen, M., Puranen, T., Vehmaanperä, J. & Siika-aho, M.:** Thermostable enzymes in lignocellulose hydrolysis, in *Biofuels*, 121–145 (Springer Berlin Heidelberg, 2007). doi:10.1007/10\_2007\_065
  99. **Kawai, T., Nakazawa, H., Ida, N., Okada, H., Ogasawara, W., Morikawa, Y. & Kobayashi, Y.:** A comprehensive analysis of the effects of the main component enzymes of cellulase derived from *Trichoderma reesei* on biomass saccharification, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **40**, 805–810 (2013).
  100. **Denison, S. H.:** pH regulation of gene expression in fungi., *Fungal Genet. Biol.*, **29**, 61–71 (2000).
  101. **Negrete-Urtasun, S., Denison, S. H. & Arst, H. N.:** Characterization of the pH signal transduction pathway gene *pala* of *Aspergillus nidulans* and identification of

- possible homologs, *J. Bacteriol.*, **179**, 1832–1835 (1997).
102. **Negrete-Urtasun, S., Reiter, W., Diez, E., Denison, S. H., Tilburn, J., Espeso, E. a., Peñalva, M. a. & Arst, H. N.:** Ambient pH signal transduction in *Aspergillus*: Completion of gene characterization, *Mol. Microbiol.*, **33**, 994–1003 (1999).
  103. **Denison, S. H., Orejas, M. & Arst, H. N.:** Signaling of ambient pH in *Aspergillus* involves a cysteine protease, *J. Biol. Chem.*, **270**, 28519–28522 (1995).
  104. **Denison, S. H., Negrete-Urtasun, S., Mingot, J. M., Tilburn, J., Mayer, W. a., Goel, A., Espeso, E. a., Peñalva, M. a. & Arst, H. N.:** Putative membrane components of signal transduction pathways for ambient pH regulation in *Aspergillus* and meiosis in *Saccharomyces* are homologous, *Mol. Microbiol.*, **30**, 259–264 (1998).
  105. **MacCheroni, W., May, G. S., Martinez-Rossi, N. M. & Rossi, A.:** The sequence of *palF*, an environmental pH response gene in *Aspergillus nidulans*, *Gene*, (1997).
  106. **Caddick, M. X., Brownlee, A. G. & Arst, H. N.:** Regulation of gene expression by pH of the growth medium in *Aspergillus nidulans*, *MGG Mol. Gen. Genet.*, (1986).
  107. **Gielkens, M., González-Candelas, L., Sánchez-Torres, P., Van De Vondervoort, P., De Graaff, L., Visser, J. & Ramón, D.:** The *abfB* gene encoding the major  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase of *Aspergillus nidulans*: Nucleotide sequence, regulation and construction of a disrupted strain, *Microbiology*, (1999).
  108. **Cristina, A., Antoni, C., Pedersoli, W. R., Santos, S., Helena, A., Maria, K., Nogueira, V., Silva-rocha, R., Rossi, A. & Silva, R. N.:** Deletion of pH regulator *pac-3* affects cellulase and xylanase activity during sugarcane bagasse degradation by *Neurospora crassa*, *PLoS One*, 1–15 (2017).
  109. **He, R., Ma, L., Li, C., Jia, W., Li, D., Zhang, D. & Chen, S.:** *Trpac1*, a pH response transcription regulator, is involved in cellulase gene expression in *Trichoderma reesei*, *Enzyme Microb. Technol.*, **67**, 17–26 (2014).
  110. **Häkkinen, M., Sivasiddharthan, D., Aro, N., Saloheimo, M. & Pakula, T. M.:** The effects of extracellular pH and of the transcriptional regulator PACI on the transcriptome of *Trichoderma reesei*, *Microb. Cell Fact.*, **14**, 1–15 (2015).
  111. **Bailey, M., Buchert, J. & Viikari, L.:** Effect of pH on production of xylanase by *Trichoderma reesei* on xylan- and cellulose-based media, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **40**, 224–229 (1993).
  112. **Xiong, H., Turunen, O., Pastinen, O., Leisola, M. & Von Weymarn, N.:** Improved xylanase production by *Trichoderma reesei* grown on L-arabinose and lactose or D-glucose mixtures, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **64**, 353–358 (2004).
  113. **Adav, S. S., Ravindran, A., Chao, L. T., Tan, L., Singh, S. & Sze, S. K.:** Proteomic analysis of pH and strains dependent protein secretion of *Trichoderma reesei*, *J. Proteome Res.*, **10**, 4579–4596 (2011).
  114. **Sternberg, D. & Mandels, G. R.:** Induction of cellulolytic enzymes in *Trichoderma reesei* by sophorose., *J. Bacteriol.*, **139**, 761–769 (1979).
  115. **Miyamoto, K.:** Renewable biological systems for alternative sustainable energy production, *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, **128**, (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1997).
  116. **Fu, Y. & Marzluf, G. A.:** Characterization of *nit-2*, the major nitrogen regulatory gene of *Neurospora crassa*., *Mol. Cell. Biol.*, **7**, 1691–1696 (1987).
  117. **Caddick, M. X., Arst, H. N., Taylort, L. H., Johnson, R. I. & Brownlee, A. G.:** Cloning of the regulatory gene *areA* mediating nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*, *EMBO J.*, **5**, 1087–1090 (1986).
  118. **Ravagnani, A., Gorfinkiel, L., Langdon, T., Diallinas, G., Adjadj, E., Demais, S., Gorton, D., Arst, H. N. & Scazzocchio, C.:** Subtle hydrophobic interactions between the seventh residue of the zinc finger loop and the first base of an HGATAR sequence determine promoter-specific recognition by the *Aspergillus nidulans* GATA factor AreA, *EMBO J.*, **16**, 3974–3986 (1997).
  119. **Tudzynski, B.:** Nitrogen regulation of fungal secondary metabolism in fungi, *Front.*

- Microbiol., **5**, 1–15 (2014).
120. **Christensen, T., Hynes, M. J. & Davis, M. A.:** Role of the regulatory gene *areA* of *Aspergillus oryzae* in nitrogen metabolism, *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 3232–3237 (1998).
  121. **Cook, R. J. & Anthony, C.:** Regulation by glutamine of ammonia transport in *Aspergillus nidulans*, *Microbiology*, **109**, 275–286 (1978).
  122. **Monahan, B. J., Monahan, B. J., Askin, M. C., Askin, M. C., Hynes, M. J., Hynes, M. J., Davis, M. & Davis, M.:** Differential expression of *Aspergillus nidulans* ammonium permease genes is regulated by GATA transcription factor AreA, *Microbiology*, **5**, 226–237 (2006).
  123. **Davis, M. A., Askin, M. C. & Hynes, M. J.:** Amino acid catabolism by an *areA*-regulated gene encoding an L-amino acid oxidase with broad substrate specificity in *Aspergillus nidulans*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 3551–3555 (2005).
  124. **Chen, X., Wang, Z., Guo, X., Liu, S. & He, X.:** Regulation of general amino acid permeases Gap1p, GATA transcription factors Gln3p and Gat1p on 2-phenylethanol biosynthesis via Ehrlich pathway, *J. Biotechnol.*, **242**, 83–91 (2017).
  125. **Caddick, M. X., Jones, M. G., Van Tonder, J. M., Le Cordier, H., Narendja, F., Strauss, J. & Morozov, I. Y.:** Opposing signals differentially regulate transcript stability in *Aspergillus nidulans*, *Mol. Microbiol.*, **62**, 509–519 (2006).
  126. **Koon, H. W., Hynes, M. J. & Davis, M. A.:** Recent advances in nitrogen regulation: A comparison between *Saccharomyces cerevisiae* and filamentous fungi, *Eukaryot. Cell*, **7**, 917–925 (2008).
  127. **Platt, A., Langdon, T., Arst, H. N., Kirk, D., Tollervey, D., Sanchez, J. M. & Caddick, M. X.:** Nitrogen metabolite signalling involves the C-terminus and the GATA domain of the *Aspergillus* transcription factor AREA and the 3' untranslated region of its mRNA., *EMBO J.*, **15**, 2791–2801 (1996).
  128. **Morozov, I. Y., Martinez, M. G., Jones, M. G. & Caddick, M. X.:** A defined sequence within the 3' UTR of the *areA* transcript is sufficient to mediate nitrogen metabolite signalling via accelerated deadenylation, *Mol. Microbiol.*, **37**, 1248–1257 (2000).
  129. **Morozov, I. Y., Galbis-Martinez, M., Jones, M. G. & Caddick, M. X.:** Characterization of nitrogen metabolite signalling in *Aspergillus* via the regulated degradation of *areA* mRNA, *Mol. Microbiol.*, **42**, 269–277 (2001).
  130. **Tao, Y. & Marzluf, G. A.:** The NIT2 nitrogen regulatory protein of *Neurospora*: expression and stability of *nit-2* mRNA and protein, *Curr. Genet.*, **36**, 153–158 (1999).
  131. **Langdon, T., Sheerins, A., Ravagnani, A., Gielkens, M., Caddick, M. X. & Arst, H. N.:** Mutational analysis reveals dispensability of the N-terminal region of the *Aspergillus* transcription factor mediating nitrogen metabolite repression, *Mol. Microbiol.*, **17**, 877–888 (1995).
  132. **Platt, A., Ravagnani, A., Arst, H., Kirk, D., Langdon, T. & Caddick, M. X.:** Mutational analysis of the C-terminal region of AREA, the transcription factor mediating nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*, *Mol. Gen. Genet.*, **250**, 106–114 (1996).
  133. **Andrianopoulos, A., Kourambas, S., Sharp, J. A., Davis, M. A. & Hynes, M. J.:** Characterization of the *Aspergillus nidulans* *nmrA* gene involved in nitrogen metabolite repression, *J. Bacteriol.*, **180**, 1973–1977 (1998).
  134. **Wong, K. H., Hynes, M. J., Todd, R. B. & Davis, M. A.:** Transcriptional control of *nmrA* by the bZIP transcription factor MeaB reveals a new level of nitrogen regulation in *Aspergillus nidulans*, *Mol. Microbiol.*, **66**, 534–551 (2007).
  135. **Todd, R. B., Fraser, J. A., Wong, K. H., Meryl, A., Hynes, M. J. & Davis, M. A.:** Nuclear accumulation of the GATA factor AreA in response to complete nitrogen starvation by regulation of nuclear export nuclear accumulation of the GATA factor AreA in response to complete nitrogen starvation by regulation of nuclear



- export, *Eukaryotic Cell*, **4**, 1646–1653 (2005).
136. **Herbert N. Arst, J. & Cove, D. J.:** Nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*, **141**, (1973).
  137. **Marzluf, G.:** Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi., *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **61**, 17–32 (1997).
  138. **Conlon, H., Zadra, I., Haas, H., Arst, H. N., Jones, M. G. & Caddick, M. X.:** The *Aspergillus nidulans* GATA transcription factor gene *areB* encodes at least three proteins and features three classes of mutation, *Mol. Microbiol.*, **40**, 361–375 (2001).
  139. **Divon, H. H., Ziv, C., Davydov, O., Yarden, O. & Fluhr, R.:** The global nitrogen regulator, FNRI, regulates fungal nutrition-genes and fitness during *Fusarium oxysporum* pathogenesis, *Mol. Plant Pathol.*, **7**, 485–497 (2006).
  140. **Bugeja, H. E., Hynes, M. J. & Andrianopoulos, A.:** AreA controls nitrogen source utilisation during both growth programs of the dimorphic fungus *Penicillium marneffeii*, *Fungal Biol.*, **116**, 145–154 (2012).
  141. **Xiong, Y., Wu, V. W., Lubbe, A., Qin, L., Deng, S., Kennedy, M., Bauer, D., Singan, V. R., Barry, K., Northen, T. R., and others:** A fungal transcription factor essential for starch degradation affects integration of carbon and nitrogen metabolism, *PLOS Genet.*, **13**, e1006737 (2017).
  142. **Ma, L., Chen, L., Zhang, L., Zou, G., Liu, R., Jiang, Y. & Zhou, Z.:** RNA sequencing reveals Xyr1 as a transcription factor regulating gene expression beyond carbohydrate metabolism, *Biomed Res. Int.*, **2016**, (2016).
  143. **Lockington, R. A., Rodbourn, L., Barnett, S., Carter, C. J. & Kelly, J. M.:** Regulation by carbon and nitrogen sources of a family of cellulases in *Aspergillus nidulans*., *Fungal Genet. Biol.*, **37**, 190–196 (2002).
  144. **Sternberg, D. & Dorval, S.:** Cellulase production and ammonia metabolism in *Trichoderma reesei* on high levels of cellulose, *Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 181–191 (1979).
  145. **Cochet, N.:** Cellulases of *Trichoderma reesei*: influence of culture conditions upon the enzymatic profile, *Enzyme Microb. Technol.*, (1991).
  146. **Jun, H., Bing, Y., Keying, Z., Xuemei, D. & Daiwen, C.:** Strain improvement of *Trichoderma reesei* Rut C-30 for increased cellulase production, *Indian J. Microbiol.*, (2009).
  147. **Rodriguez-Gomez, D. & Hobley, T. J.:** Is an organic nitrogen source needed for cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut-C30?, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **29**, 2157–2165 (2013).
  148. **Rahman, Z., Shida, Y., Furukawa, T., Suzuki, Y., Okada, H., Ogasawara, W. & Morikawa, Y.:** Evaluation and characterization of *Trichoderma reesei* cellulase and xylanase promoters, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **82**, 899–908 (2009).
  149. **Kawamori, M., Morikawa, Y., Ado, Y. & Takasawa, S.:** Production of cellulases from alkali-treated bagasse in *Trichoderma reesei*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **24**, 454–458 (1986).
  150. **Hynes, M. J., Corrick, C. M. & King, J. A.:** Isolation of genomic clones containing the *amdS* gene of *Aspergillus nidulans* and their use in the analysis of structural and regulatory mutations., *Mol. Cell. Biol.*, **3**, 1430–1439 (1983).
  151. **Maruyama, J. I. & Kitamoto, K.:** Multiple gene disruptions by marker recycling with highly efficient gene-targeting background ( $\Delta ligD$ ) in *Aspergillus oryzae*, *Biotechnol. Lett.*, **30**, 1811–1817 (2008).
  152. **Penttilä, M., Nevalainen, H., Rättö, M., Salminen, E. & Knowles, J.:** A versatile transformation system for the cellulolytic filamentous fungus *Trichoderma reesei*, *Gene*, **61**, 155–164 (1987).
  153. **Seiboth, B., Hartl, L., Pail, M., Fekete, E., Karaffa, L. & Kubicek, C. P.:** The galactokinase of *Hypocrea jecorina* is essential for cellulose induction by lactose but dispensable for growth on D-galactose, *Mol. Microbiol.*, **51**, 1015–1025 (2004).
  154. **Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D. & Nrel,**

- D. C.: Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass, (NREL Laboratory Analytical Procedures. [http://www.eere.energy.gov/biomass/analytical\\_procedures.html#LAP-002](http://www.eere.energy.gov/biomass/analytical_procedures.html#LAP-002). Accessed 17 July 2005, 2008).
155. **Minetoki, T., Kumagai, C., Gomi, K., Kitamoto, K. & Takahashi, K.:** Improvement of promoter activity by the introduction of multiple copies of the conserved region III sequence, involved in the efficient expression of *Aspergillus oryzae* amylase-encoding genes, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **50**, 459–467 (1998).
  156. **Liu, T., Wang, T., Li, X. & Liu, X.:** Improved heterologous gene expression in *Trichoderma reesei* by cellobiohydrolase I gene (*cbhI*) promoter optimization, *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*, **40**, 158–165 (2008).
  157. **Suboi, H. T., Oda, A. K., Oda, T. T., Inetoki, T. M., Irotsune, M. H. & Achida, M. M.:** Improvement of the *Aspergillus oryzae* Enolase promoter ( P-*enoA* ) by the introduction of cis-element repeats, **69**, 206–208 (2005).
  158. **Takada, G., Kawaguchi, T., Sumitani, J. & Arai, M.:** Expression of *Aspergillus aculeatus* No. F-50 cellobiohydrolase I (*cbhI*) and  $\beta$ -glucosidase I (*bglI*) genes by *Saccharomyces cerevisiae*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 1615–1618 (1998).
  159. **Selvig, K. & Alspaugh, J. A.:** pH response pathways in fungi: Adapting to host-derived and environmental signals, *Mycobiology*, **39**, 249–256 (2011).
  160. **Mandels, M. & Reese, E. T.:** Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals, *J. Bacteriol.*, **73**, 269–278 (1957).
  161. **Bradford, M. M.:** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, **72**, 248–254 (1976).
  162. **Miller, G. L.:** Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Anal. Chem.*, **31**, 426–428 (1959).
  163. **Kawai, T., Nakazawa, H., Ida, N., Okada, H., Tani, S., Sumitani, J., Kawaguchi, T., Ogasawara, W., Morikawa, Y. & Kobayashi, Y.:** Analysis of the saccharification capability of high-functional cellulase JN11 for various pretreated biomasses through a comparison with commercially available counterparts, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **39**, 1741–1749 (2012).
  164. **Bolger, A. M., Lohse, M. & Usadel, B.:** Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data, *Bioinformatics*, **30**, 2114–2120 (2014).
  165. **Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G. & Durbin, R.:** The sequence alignment/map format and SAMtools, *Bioinformatics*, **25**, 2078–2079 (2009).
  166. **Cingolani, P., Platts, A., Wang, L. L., Coon, M., Nguyen, T., Wang, L., Land, S. J., Lu, X. & Ruden, D. M.:** A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff, *Fly (Austin)*, **6**, 80–92 (2012).
  167. **Morikawa, Y., Kawamori, M., Ado, Y. & Shinsha, Y.:** Improvement of cellulase production in *Trichoderma reesei*, *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 1869–1871 (1985).
  168. **Shirai, Y. T., Suzuki, T., Morita, M., Takahashi, A. & Yamamoto, T.:** Multifunctional roles of the mammalian CCR4-NOT complex in physiological phenomena, *Front. Genet.*, **5**, 286 (2014).
  169. **Shida, Y., Furukawa, T. & Ogasawara, W.:** Deciphering the molecular mechanisms behind cellulase production in *Trichoderma reesei*, the hyper-cellulolytic filamentous fungus, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **80**, 1712–1729 (2016).
  170. **Rossi, A., Cruz, A. H. S., Santos, R. S., Silva, P. M., Silva, E. M., Mendes, N. S. & Martinez-Rossi, N. M.:** Ambient pH sensing in filamentous fungi: Pitfalls in elucidating regulatory hierarchical signaling networks, *IUBMB Life*, **65**, 930–935 (2013).
  171. **Peñalva, M. a., Tilburn, J., Bignell, E. & Arst, H. N.:** Ambient pH gene regulation in fungi: making connections, *Trends Microbiol.*, **16**, 291–300 (2008).
  172. **Rassinger, A., Gacek-Matthews, A., Strauss, J., Mach, R. L. & Mach-Aigner, A. R.:** Truncation of the transcriptional repressor protein Cre1 in *Trichoderma reesei*

- Rut-C30 turns it into an activator, *Fungal Biol. Biotechnol.*, **5**, 15 (2018).
173. **Xiong, H., von Weymarn, N., Leisola, M. & Turunen, O.:** Influence of pH on the production of xylanases by *Trichoderma reesei* Rut C-30, *Process Biochem.*, **39**, 731–736 (2004).
  174. **Törrönen, A., Mach, R. L., Messner, R., Gonzalez, R., Kalkkinen, N., Harkki, A. & Kubicek, C. P.:** The two major xylanases from *Trichoderma reesei* : Characterization of both enzymes and genes, *Nat. Biotechnol.*, **10**, 1461–1465 (1992).
  175. **Li, C., Yang, Z., Zhang, R. H. C., Zhang, D., Chen, S. & Ma, L.:** Effect of pH on cellulase production and morphology of *Trichoderma reesei* and the application in cellulosic material hydrolysis., *J. Biotechnol.*, **168**, 470–477 (2013).
  176. **Woolstencroft, R. N., Beilharz, T. H., Cook, M. a, Preiss, T., Durocher, D. & Tyers, M.:** Ccr4 contributes to tolerance of replication stress through control of CRT1 mRNA poly(A) tail length., *J. Cell Sci.*, **119**, 5178–5192 (2006).
  177. **Chen, Y., Shen, Y., Wang, W. & Wei, D.:** Mn<sup>2+</sup> modulates the expression of cellulase genes in *Trichoderma reesei* Rut-C30 via calcium signaling, *Biotechnol. Biofuels*, **11**, 54 (2018).
  178. **Chen, L., Zou, G., Wang, J., Wang, J., Liu, R., Jiang, Y., Zhao, G. & Zhou, Z.:** Characterization of the Ca<sup>2+</sup>-responsive signaling pathway in regulating the expression and secretion of cellulases in *Trichoderma reesei* Rut-C30, *Mol. Microbiol.*, **100**, 560–575 (2016).
  179. **Wang, H., Ayala, J. C., Benitez, J. A. & Silva, A. J.:** The LuxR-type regulator VpsT negatively controls the transcription of rpos, encoding the general stress response regulator, in *Vibrio cholerae* biofilms, *J. Bacteriol.*, **196**, 1020–1030 (2014).
  180. **Pei, X., Fan, F., Lin, L., Chen, Y., Sun, W., Zhang, S. & Tian, C.:** Involvement of the adaptor protein 3 complex in lignocellulase secretion in *Neurospora crassa* revealed by comparative genomic screening, *Biotechnol. Biofuels*, **8**, 124 (2015).
  181. **Callow, N. V, Ray, C. S., Kelbly, M. A. & Ju, L.-K.:** Nutrient control for stationary phase cellulase production in *Trichoderma reesei* Rut C-30, *Enzyme Microb. Technol.*, **82**, 8–14 (2016).
  182. **Todd, R. B., Fraser, J. A., Koon, H. W., Davis, M. A., Hynes, M. J., Wong, K. H., Meryl, A., Hynes, M. J. & Davis, M. A.:** Nuclear accumulation of the GATA factor AreA in response to complete nitrogen starvation by regulation of nuclear export nuclear, *Eukaryot. Cell*, **4**, 1646–1653 (2005).
  183. **MacCabe, A. P., Vanhanen, S., Sollewijn Gelpke, M. D., Van De Vondervoort, P. J. I., Arst, H. N. & Visser, J.:** Identification, cloning and sequence of the aspergillus niger *areA* wide domain regulatory gene controlling nitrogen utilisation, *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.*, **1396**, 163–168 (1998).
  184. **Limjindaporn, T., Khalaf, R. A. & Fonzi, W. A.:** Nitrogen metabolism and virulence of *Candida albicans* require the GATA-type transcriptional activator encoded by GAT1, *Mol. Microbiol.*, **50**, 993–1004 (2003).
  185. **Davis, M. A. & Hynes, M. J.:** Complementation of *areA*- regulatory gene mutations of *Aspergillus nidulans* by the heterologous regulatory gene *nit-2* of *Neurospora crassa*., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **84**, 3753–7 (1987).
  186. **Kudla, B., Caddick, M. X., Langdon, T., Martinez-Rossi, N. M., Bennett, C. F., Sibley, S., Davies, R. W. & Arst, H. N.:** The regulatory gene *areA* mediating nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*., *EMBO J.*, **9**, 1355–1364 (1990).
  187. **Tudzynski, B., Homann, V., Feng, B. & Marzluf, G. A.:** Isolation, characterization and disruption of the *areA* nitrogen regulatory gene of *Gibberella fujikuroi*, *Mol. Gen. Genet.*, **261**, 106–114 (1999).
  188. **Baroncelli, R., Piaggesechi, G., Fiorini, L., Bertolini, E., Zapparata, A., Pè, M. E., Sarrocco, S. & Vannacci, G.:** Draft whole-genome sequence of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* T6776, *Genome Announc.*, **3**, e00647-15 (2015).

189. Muro-Pastor, M. I., Gonzalez, R., Strauss, J., Narendja, F. & Scazzocchio, C.: The GATA factor AreA is essential for chromatin remodelling in a eukaryotic bidirectional promoter., *EMBO J.*, **18**, 1584–97 (1999).
190. Lieckfeldt, E., Kullnig, C., Samuels, G. J. & Kubicek, C. P.: Sexually competent, sucrose- and nitrate-assimilating strains of *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) from south american soils, *Mycologia*, **92**, 374 (2000).
191. Schmoll, M., Dattenböck, C., Carreras-Villaseñor, N., Mendoza-Mendoza, A., Tisch, D., Alemán, M. I., Baker, S. E., Brown, C., Cervantes-Badillo, M. G., Cetz-Chel, J., and others: The genomes of three uneven siblings: Footprints of the lifestyles of three *Trichoderma* species., *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **80**, 205–327 (2016).
192. FU, Y. & Marzluf, G. A.: *nit-2*, the major positive-acting nitrogen regulatory gene of *Neurospora crassa*, encodes a sequence-specific DNA-binding protein, *J. Environ. Eng. Landsc. Manag.*, **87**, 5331–5335 (1990).
193. Punt, P. J., Strauss, J., Smit, R., Kinghorn, J. R., van den Hondel, C. A. & Scazzocchio, C.: The intergenic region between the divergently transcribed *niaA* and *niaD* genes of *Aspergillus nidulans* contains multiple NirA binding sites which act bidirectionally., *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 5688–99 (1995).
194. Muro-Pastor, M. I., Strauss, J., Ramón, A. & Scazzocchio, C.: A paradoxical mutant GATA factor, *Eukaryot. Cell*, **3**, 393–405 (2004).
195. Schinko, T., Berger, H., Lee, W., Gallmetzer, A., Pirker, K., Pachlinger, R., Buchner, I., Reichenauer, T., Güldener, U. & Strauss, J.: Transcriptome analysis of nitrate assimilation in *Aspergillus nidulans* reveals connections to nitric oxide metabolism, *Mol. Microbiol.*, **78**, 720–738 (2010).
196. Narendja, F., Goller, S. P., Wolschek, M. & Strauss, J.: Nitrate and the GATA factor AreA are necessary for in vivo binding of NirA, the pathway-specific transcriptional activator of *Aspergillus nidulans*., *Mol. Microbiol.*, **44**, 573–583 (2002).
197. Slot, J. C. & Hibbett, D. S.: Horizontal transfer of a nitrate assimilation gene cluster and ecological transitions in fungi : A Phylogenetic Study, (2007).
198. Berger, H., Basheer, A., Böck, S., Reyes-Dominguez, Y., Dalik, T., Altmann, F. & Strauss, J.: Dissecting individual steps of nitrogen transcription factor cooperation in the *Aspergillus nidulans* nitrate cluster, *Mol. Microbiol.*, **69**, 1385–1398 (2008).
199. Monahan, B. J., Askin, M. C., Hynes, M. J. & Davis, M. A.: Differential expression of *Aspergillus nidulans* ammonium permease genes is regulated by GATA transcription factor AreA , *Eukaryot. Cell*, **5**, 226–237 (2006).
200. Monahan, B. J., Fraser, J. A., Hynes, M. J. & Davis, M. A.: Isolation and characterization of two ammonium permease genes, *meaA* and *mepA*, from *Aspergillus nidulans*, *Eukaryot. Cell*, **1**, 85–94 (2002).
201. Berger, H., Pachlinger, R., Morozov, I., Goller, S., Narendja, F., Caddick, M. & Strauss, J.: The GATA factor AreA regulates localization and *in vivo* binding site occupancy of the nitrate activator NirA, *Mol. Microbiol.*, **59**, 433–446 (2006).
202. Mello-de-Sousa, T. M., Rassinger, A., Derntl, C., J. Poças-Fonseca, M., L Mach, R. & R Mach-Aigner, A.: The relation between promoter chromatin status, Xyr1 and cellulase expression in *Trichoderma reesei*, *Curr. Genomics*, **17**, 145–152 (2016).

## 第7章 本学位論文に含まれる公表論文

(1) 平成30年3月 Applied Microbiology and Biotechnology 102 巻6号 pp 2737~2752 で公表

Engineering of the *Trichoderma reesei* xylanase3 promoter for efficient enzyme expression.

(Hiroki Hirasawa, Koki Shioya, Takanori Furukawa, Shuji Tani, Jun-ichi Sumitani, Takashi Kawaguchi, Yasushi Morikawa, Yosuke Shida and Wataru Ogasawara)

(2) 平成31年4月 Journal of Bioscience and Bioengineering にて公表

Cellulase productivity of *Trichoderma reesei* mutants developed in Japan varies with varying pH conditions.

(Hiroki Hirasawa, Koki Shioya, Kazuki Mori, Kosuke Tashiro, Sachiyo Aburatani, Yosuke Shida, Satoru Kuhara and Wataru Ogasawara)

## 第8章 謝辞

本学位論文は、2013年から2019年にかけて長岡技術科学大学大学院工学研究科生物機能工学専攻生物資源工学研究室において小笠原渉教授の指導の下に行った研究の成果をまとめたものである。

小笠原渉教授をはじめ、志田洋介助教、森川康名誉教授には、日々温かく、優しく、且つ熱心にご指導ご鞭撻を賜りましたこと、心からお礼申しあげます。

研究を行う上で、協力頂きました研究室の塩屋幸樹元研究員 (現 別府大学 講師)、古川隆紀元研究員 (現 マンチェスター大学)、後藤三容子さん、佐藤直美さん、高田恵さん、斉藤悦子さん、阿部倫代さんなどアシスタントの皆様および会田宏樹君や高橋圭太郎君、岡山大地君をはじめとする後輩諸氏に深くお礼申しあげます。

最後に、身勝手な行動に対して深い理解と多大なる協力を日々惜しまなかった家族に心から感謝いたします。