

論文内容の要旨

氏名 平沢 大樹

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。*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。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* シス配列がキシラン誘導に寄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 BGLI 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 X3-2RB_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。Pac1 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、Pac1 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た。変異解析の結果、*tr120879* および *tr22009* に生じた変異が低 pH 条件でのセルラーゼ生産に関与することが明らかとなった。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 Are1 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。Are1 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。