

黄麹菌におけるデンプン分解酵素遺伝子とタンパク質分解酵素遺伝子の発現制御機構の解明

東京農工大学大学院 農学研究院 田中 瑞己

はじめに

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* は、大量のデンプン分解酵素や多様なタンパク質分解酵素を分泌生産する特徴を有しており、発酵産業をはじめとする様々な産業分野において利用されている。本研究では、*A. oryzae* におけるデンプン分解酵素遺伝子とタンパク質分解酵素遺伝子の発現制御機構を分子レベルで明らかにすることを目的とした。

デンプン分解酵素遺伝子の転写発現誘導機構の解明

A. oryzae のデンプン分解酵素遺伝子の発現は、マルトースによって誘導されることが知られていたが、その詳細な分子機構は不明であった。デンプン分解酵素遺伝子の発現制御に関与することが示されていた2つの転写因子 (AmyR, MalR) の機能解析を行い、細胞内でのマルトースからイソマルトースへの変換によるデンプン分解酵素遺伝子の発現誘導機構を明らかにした(図1)¹。また、*A. oryzae* が生産するグルコamilラーゼ (GlaB) などの一部の加水分解酵素は、固体培養において特異的に高生産されることが知られていたが、この固体培養特異的な遺伝子発現を制御する転写因子は長年不明であった。そこで、*A. oryzae* の転写因子破壊株ライブラリーからスクリーニングを行い、F1bCが *glaB* の固体培養における転写発現に必須であることを明らかにした²。

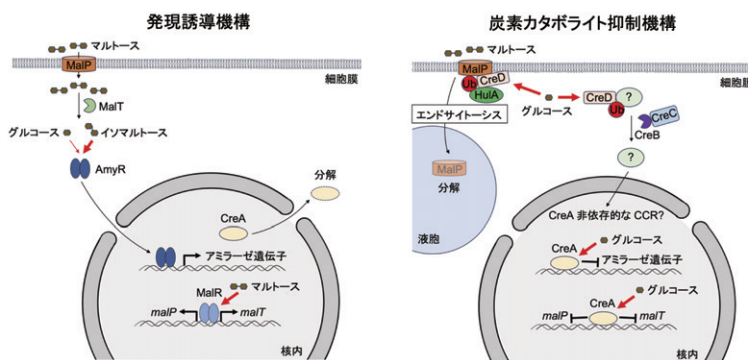


図1 黄麹菌におけるデンプン分解酵素遺伝子の発現誘導機構と炭素カタボライト抑制機構

タンパク質分解酵素遺伝子の転写発現誘導機構の解明

A. oryzae のタンパク質分解酵素遺伝子の発現は、大豆ペプチドの存在などによって誘導されることが知られているが、その発現制御機構はほとんど明らかになっていなかった。タンパク質分解酵素遺伝子の発現は、タンパク質分解によって生じたオリゴペプチドの取り込みと関連することが予想された。そこで、出芽酵母の唯一のジ・トリペプチドトランスポーターであるPtr2と高い相同性を示すトランスポーターの機能解析を行い、*A. oryzae* では3つのトランスポーターがジ・トリペプチドの取り込みを担っていることを明らかにした³。出芽酵母における *PTR2* の発現は、タンパク質寿命決定機構を制御するユビキチンリガーゼUbr1依存的な転写抑制因子の分解によって誘導される。*A. oryzae* におけるUbr1オルソログ (UbrA) の機能解析を行い、糸状菌におけるタンパク質寿命決定機構を初めて明らかにするとともに、ジ・トリペプチドトランスポーター遺伝子だけでなく、多くのタンパク質分解酵素遺伝子の発現もUbrA依存的に制御されていることを明らかにした⁴。

炭素カタボライト抑制制御機構の解明と糖質加水分解酵素生産への応用

A. oryzae の糖質分解酵素遺伝子の発現は、グルコースが存在すると炭素カタボライト抑制 (CCR) によって抑制される。糸状菌のCCRを制御する因子として、転写因子CreAとユビキチン修飾制御因子 (CreB, CreC, CreD) が1970年代に同定されていたが、CCRの詳細な制御機構は不明であった。*A. oryzae* においてCreAの機能解析を行い、糖質分解酵素遺伝子の発現誘導時にCreAが核内から細胞質に排出されて速やかに分解されることを明らかにした⁵。また、グルコースが存在するとデンプン分解酵素遺伝子の発現誘導に必要なマルトーストランスポーター (MalP) がユビキチン化され、エンドサイトーシス依存的に液胞へ輸送されるが、このMalPのユビキチン化の制御にはユビキチンリガーゼとMalPのアダプターとしてCreDが機能する必要があることを明らかにした(図1)⁶。さらに、CreAと脱ユビキチン化酵素CreBとの二重欠損や、CreBの欠損とCreDの脱リン酸化変異導入の組み合わせにより、デンプン分解酵素の生産量が著しく増加することを明らかにした^{6,7}。

分泌タンパク質高生産によって誘導される小胞体ストレス応答機構の解明

真核生物では、分泌タンパク質や膜タンパク質のmRNAは小胞体膜上で翻訳され、新生ポリペプチド鎖は小胞体内で折り畳まれる。真核細胞には、折り畳みに失敗したタンパク質が小胞体に蓄積するのを防ぐための小胞体ストレス応答機構が備わっており、Unfolded protein response (UPR) が代表的である。 *A. oryzae* がデンブリン分解酵素を生産する際にもUPRが誘導され、UPRの誘導がデンブリン分解酵素の生産条件での生育に必須であることを明らかにした⁸。また、UPR以外の小胞体ストレス応答機構として、小胞体膜上で翻訳されるmRNAが小胞体膜貫通エンドヌクレアーゼIre1によって切断されることで分解されるRegulated Ire1-dependent mRNA decay (RIDD) 機構が知られている。糸状菌においてはRIDDの存在が長年にわたって否定されていたが、*A. oryzae* においてデンブリン分解酵素の生産によって誘導される生理的な小胞体ストレスによって α -アミラーゼや *malP* のmRNAがRIDDによって分解されることを明らかにした(図2)⁹。

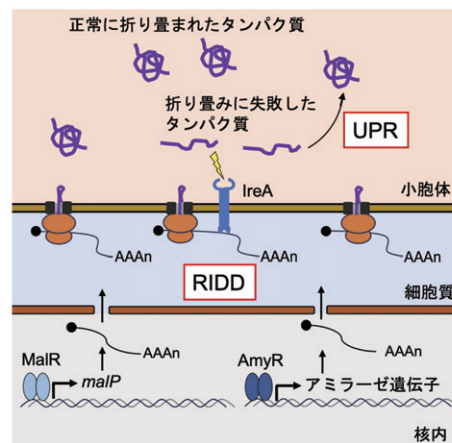


図2 アミラーゼ遺伝子発現誘導時における小胞体ストレス応答機構

今後の展望

タンパク質分解酵素遺伝子の発現を制御する転写因子の同定と機能解析、CCR制御に関与する因子の機能解析、加水分解酵素遺伝子の発現量制御におけるRIDDの寄与などを明らかにし、*A. oryzae* における加水分解酵素遺伝子の発現制御機構の全容を明らかにしたい。

謝辞

本研究は、東北大学、静岡県立大学、東京農工大学で行われました。本研究の遂行にあたり、東北大学の五味勝也名誉教授と新谷尚弘教授、東京農工大学の山形洋平教授をはじめ、多くの共同研究の先生方と学生の皆様に多大なるご支援・ご協力を賜りました。心より感謝申し上げます。

引用文献

1. Suzuki, K. et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **99**, 1805-1815 (2015)
2. Tanaka, M. et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **100**, 5859-5868 (2016)
3. Tanaka, M. et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **85**, 452-463 (2021)
4. Muromachi, W. et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, **91**, e0081325 (2025)
5. Tanaka, M. et al., *Mol. Microbiol.*, **110**, 176-190 (2018)
6. Tanaka, M. et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, **83**, e00592-17 (2017)
7. Ichinose, S. et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **98**, 335-343 (2014)
8. Tanaka, M. et al., *Fungal Genet. Biol.*, **85**, 1-6 (2015)
9. Tanaka, M. et al., *Commun. Biol.*, **6**, 1009 (2023)

略歴

- 2006年 3月 東北大学 農学部 生物化学科 卒業
- 2008年 3月 東北大学大学院 農学研究科 生物産業創成科学専攻 博士前期課程 修了
- 2009年 4月 日本学術振興会特別研究員(DC2)
- 2011年 3月 東北大学大学院 農学研究科 生物産業創成科学専攻 博士後期課程 修了
- 2011年 4月 東北大学大学院 農学研究科 博士研究員/特任助教
- 2017年 4月 静岡県立大学 食品栄養科学部 助教
- 2021年 7月 東京農工大学大学院 農学研究科 准教授(現在に至る)

Regulatory mechanisms of amylolytic and proteolytic enzyme genes expression in *Aspergillus oryzae*

Mizuki Tanaka, Graduate School of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology

Introduction

The koji mold *Aspergillus oryzae* secretes large amounts of amylolytic enzymes and a wide variety of proteolytic enzymes, and is widely utilized in various industrial fields, including fermentation industries. The objective of this study was to elucidate the regulatory mechanisms controlling the expression of genes encoding amylolytic and proteolytic enzymes in *A. oryzae*.

Mechanisms regulating the induction of amylolytic genes expression

The expression of amylolytic genes in *A. oryzae* is known to be induced by maltose. However, the detailed molecular mechanisms had remained unclear. Functional analyses of two transcription factors, AmyR and MalR, which are involved in the regulation of amylolytic genes expression, revealed induction mechanism of amylolytic genes expression mediated by intracellular conversion of maltose to isomaltose (Fig. 1)¹.

In addition, some hydrolases produced by *A. oryzae*, such as glucoamylase (GlaB), are specifically produced under solid-state culture condition. However, the transcription factor responsible for this culture-specific gene expression had long remained unidentified. By screening a transcription factor gene disruption library of *A. oryzae*, we identified FlbC as an essential factor for the transcriptional expression of *glaB* under solid-state culture condition².

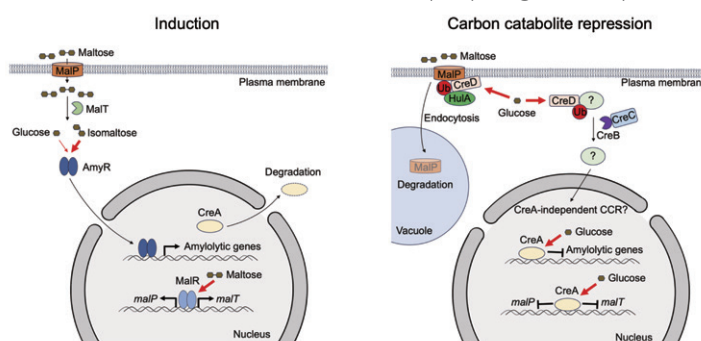


Fig. 1 Mechanisms of induction and carbon catabolite repression of amylolytic genes in *A. oryzae*

Mechanisms regulating the expression of proteolytic genes

The expression of proteolytic genes in *A. oryzae* is known to be induced by the presence of soybean peptides. However, the regulatory mechanisms have remained largely unclear. It was hypothesized that proteolytic genes expression is associated with the uptake of oligopeptides generated through protein degradation. We therefore performed functional analyses of *A. oryzae* transporters showing high homology to Ptr2, the sole di-/tripeptide transporter in budding yeast, and demonstrated that three transporters are responsible for the uptake of di-/tripeptides in *A. oryzae*³. In budding yeast, expression of *PTR2* is induced by degradation of a transcriptional repressor mediated by a ubiquitin ligase Ubr1 regulating the N-degron (N-end rule) pathway. Functional analysis of the Ubr1 ortholog (UbrA) in *A. oryzae* demonstrated that not only di-/tripeptide transporter genes but also many proteolytic genes are regulated in a UbrA-dependent manner⁴.

Mechanisms of carbon catabolite repression (CCR) and improved production of hydrolases through relief from CCR

The expression of genes encoding carbohydrate-degrading enzymes in *A. oryzae* is repressed in the presence of glucose through carbon catabolite repression (CCR). Although the transcription factor CreA and three ubiquitin-related regulatory factors (CreB, CreC, and CreD) were identified in the 1970s as regulators of CCR in filamentous fungi, the detailed regulatory mechanisms have remained unclear. Functional analysis of CreA in *A. oryzae* revealed that CreA is exported from the nucleus to the cytoplasm and rapidly degraded under the conditions inducing carbohydrate-degrading enzyme genes expression⁵. In the presence of glucose, maltose permease MalP, required for amylolytic genes expression, is ubiquitinated and transported to the vacuole via endocytosis, and this ubiquitination requires CreD to function as an adaptor for the ubiquitin ligase (Fig. 1)⁶. Furthermore, we demonstrated that the production of amylolytic enzymes is markedly increased by combining a double deletion of *creA* and *creB* encoding a deubiquitinating enzyme, or by combining *creB* deletion with a dephosphorylation-mimicking mutation of CreD⁶⁻⁷.

Endoplasmic reticulum stress response induced by production of amyolytic enzymes

In eukaryotes, mRNAs encoding secretory and membrane proteins are translated on the endoplasmic reticulum (ER), and nascent polypeptide chains are folded within the ER. Eukaryotic cells possess ER stress response mechanisms to prevent the accumulation of misfolded proteins, among which the unfolded protein response (UPR) is well known. We demonstrated that UPR is induced during the production of amyolytic enzymes in *A. oryzae*, and that its induction is essential for growth under amyolytic enzyme-producing conditions⁸. In addition to UPR, another ER stress response mechanism, regulated Ire1-dependent mRNA decay (RIDD), involves the cleavage and degradation of ER-associated mRNAs. Although the existence of RIDD in filamentous fungi had long been questioned, we demonstrated that physiological ER stress induced by amyolytic enzyme production triggers RIDD of mRNAs such as α -amylase and *malP* in *A. oryzae* (Fig. 2)⁹.

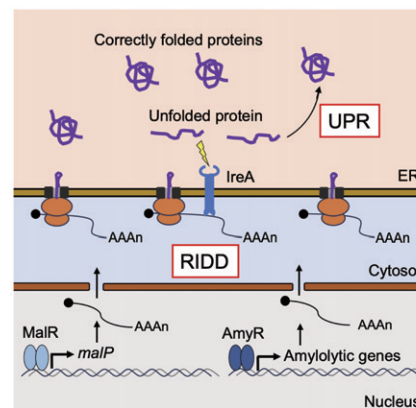


Fig. 2 ER stress response under amyolytic genes expression

Future Perspectives

Future studies will focus on the identification and functional analysis of transcription factors regulating proteolytic genes expression, further characterization of factors involved in CCR, and clarification of the contribution of RIDD to the regulation of hydrolase genes expression level.

Acknowledgements

This research was conducted at Tohoku University, University of Shizuoka, and Tokyo University of Agriculture and Technology. I would like to express my sincere gratitude to Professor Emeritus Katsuya Gomi and Professor Takahiro Shintani of Tohoku University, and Professor Youhei Yamagata of Tokyo University of Agriculture and Technology, as well as to all collaborators and students who provided invaluable support and assistance.

References

1. Suzuki, K. et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **99**, 1805-1815 (2015)
2. Tanaka, M. et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **100**, 5859-5868 (2016)
3. Tanaka, M. et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **85**, 452-463 (2021)
4. Muromachi, W. et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, **91**, e0081325 (2025)
5. Tanaka, M. et al., *Mol. Microbiol.*, **110**, 176-190 (2018)
6. Tanaka, M. et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, **83**, e00592-17 (2017)
7. Ichinose, S. et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **98**, 335-343 (2014)
8. Tanaka, M. et al., *Fungal Genet. Biol.*, **85**, 1-6 (2015)
9. Tanaka, M. et al., *Commun. Biol.*, **6**, 1009 (2023)

Brief Biography

April 2009	JSPS Research Fellow (DC2)
March 2011	Ph.D., Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University
April 2011	Postdoctoral Researcher, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University
April 2017	Assistant Professor, School of Food and Nutritional Sciences, University of Shizuoka
July 2021-Present	Associate Professor, Graduate School of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology