

## 研究 成 果 報 告 書

(国立情報学研究所の民間助成研究成果概要データベース・登録原稿)

研究テーマ (和文) AB		転写因子を標的とした分子育種によるバイオエタノール高生産糸状菌の創製			
研究テーマ (欧文) AZ		Bioethanol production by filamentous fungi carrying genetically modified transcription factors.			
研究氏 代 表 名 者	カナ CC	姓)コバヤシ	名)テツオ	研究期間 B	2004 ~ 2005 年
	漢字 CB	小林	哲夫	報告年度 YR	2006 年
	ローマ字 CZ	Kobayashi	Tetsuo	研究機関名	名古屋大学
研究代表者 CD 所属機関・職名		名古屋大学大学院生命農学研究科・教授			
<p>概要 EA (600 字～800 字程度にまとめてください。)</p> <p>XlnRはキシラン、セルロース分解酵素遺伝子群の転写を制御する転写活性化因子である。XlnR制御下の遺伝子を一括して高発現させるため、構成的高発現を示すTEF 1 プロモーターにXlnR遺伝子を融合し、<i>A. oryzae</i>に多コピー導入してXlnR高発現株を構築した。XlnR高発現株の生育は、誘導物質であるキシランにより阻害されたため、グルコースを炭素源として十分量生育させた菌体を、キシラン培地に添加したところ、培養48時間でキシランが完全に可溶化した。培養上清をSDS-PAGEにより解析したところ、10種以上のタンパク質が高発現していた。また、XlnR高発現株では、キシランだけでなくセルロースの分解能も向上していた。</p> <p>キシランは、キシロースからなる主鎖に様々な修飾基が導入された複雑な構造を持つため、その完全分解には多数の酵素を必要とする。XlnR高発現株で発現上昇している遺伝子を同定するため、<i>A. oryzae</i>の全遺伝子を搭載したDNAマイクロアレイによる解析を行った。その結果、75遺伝子が同定され、その中にはキシラン、セルロースの完全分解に必要な全ての酵素遺伝子が含まれていた。</p> <p>エタノール生産能を強化するため、TEF1プロモーターに出芽酵母のピルビン酸脱炭酸酵素(PDC)、アルコール脱水素酵素遺伝子(ADH)を融合し、XlnR高発現株への導入を試みた。取得したPDC導入株ではPDC活性の上昇は見られなかった。RT-PCRを行ったところ3本のDNAが増幅したが、いずれの断片も予想されるサイズより短く、イントロンの誤認識が起こっていると考えられた。ADH導入株はまったく取得できなかった。</p> <p>以上のように、エタノール生産能の強化は今後の課題であるが、XlnR遺伝子を増強するのみで、キシラン、セルロース分解能が極めて高い混合酵素製剤を生産可能であることが示された。</p>					
キーワード FA	<i>Aspergillus oryzae</i>	XlnR	xylan	cellulose	

(以下は記入しないでください。)

助成財団コード TA					研究課題番号 AA								
研究機関番号 AC					シート番号								

発表文献（この研究を発表した雑誌・図書について記入してください。）									
雑誌	論文標題 <sup>GB</sup>								
	著者名 <sup>GA</sup>		雑誌名 <sup>GC</sup>						
	ページ <sup>GF</sup>	～	発行年 <sup>GE</sup>					巻号 <sup>GD</sup>	
雑誌	論文標題 <sup>GB</sup>								
	著者名 <sup>GA</sup>		雑誌名 <sup>GC</sup>						
	ページ <sup>GF</sup>	～	発行年 <sup>GE</sup>					巻号 <sup>GD</sup>	
雑誌	論文標題 <sup>GB</sup>								
	著者名 <sup>GA</sup>		雑誌名 <sup>GC</sup>						
	ページ <sup>GF</sup>	～	発行年 <sup>GE</sup>					巻号 <sup>GD</sup>	
図書	著者名 <sup>HA</sup>								
	書名 <sup>HC</sup>								
	出版者 <sup>HB</sup>		発行年 <sup>HD</sup>					総ページ <sup>HE</sup>	
図書	著者名 <sup>HA</sup>								
	書名 <sup>HC</sup>								
	出版者 <sup>HB</sup>		発行年 <sup>HD</sup>					総ページ <sup>HE</sup>	

#### 欧文概要<sup>EZ</sup>

XlnR is the transcriptional activator that regulates xylanolytic and cellulolytic genes in *Aspergillus*. In order to over-express all genes under control of XlnR, XlnR over-producing *A. oryzae* was constructed by introducing multiple copies of the *TEF1p::XlnR* fusion gene. *TEF1p* is a strong constitutive promoter of *A. oryzae*. Since xylan, the inducer of the xylanolytic genes inhibited growth of the XlnR over-producer, the mycelia was grown on glucose and transferred to xylan-containing media. Xylan in the media was completely dissolved within 48 hours. The culture supernatant contained more than 10 over-expressed proteins based on SDS-PAGE. The XlnR over-producer showed enhanced degradation of not only xylan but also cellulose.

Xylan has a complex structure with various chemical modifications attached to the main chain of xylose polymer. Therefore, many enzymes are required for complete hydrolysis to monomers. In order to identify the genes highly expressed by over-production of XlnR, DNA microarray analysis was performed. As a result, 75 genes were identified that included all enzymes required for complete hydrolysis of xylan and cellulose.

Aiming bioethanol production by the XlnR over-producer, we tried to introduce *S. cerevisiae* pyruvate decarboxylase (PDC) and alcohol dehydrogenase (ADH) genes fused to *TEF1p* into the organism. Transformants carrying the PDC gene did not show elevated levels of PDC activity. RT-PCR analysis revealed that the length of the PDC mRNA was shorter than the native, suggesting mis-excision of introns. Transformants carrying the ADH gene were not obtained.

Although bioethanol production was unsuccessful, we were able to show that over expression of XlnR led to production of enzyme mixture with extremely strong degradation activity of xylan and cellulose.