

平成 28 年度

糸状菌遺伝子研究会

第 37 回例会

プログラム・講演要旨

日時 平成 28 年 6 月 16 日 (木)

場所 北とぴあ第二研修室

東京都北区王子 1 丁目 11 番地 1 号

糸状菌遺伝子研究会ホームページ <http://fungi.mysterious.jp/MAIN-J/Welcome.html>

e-mail アドレス info@fungi.mysterious.jp

プログラム

日時 平成 28 年 6 月 16 日 (木) 13 時 00 分～16 時 40 分 (開場:12 時 40 分)
会場 北とぴあ 第 2 研修室 (7F)
東京都北区王子 1 丁目 11 番地 1 号 Tel 03-5390-1100

1. 総会 13:00～13:20

2. 糸状菌遺伝子研究会賞授賞式

13:20～13:30 奨励賞、技術賞授与、選考経過報告

13:30～13:50 奨励賞受賞講演

崇城大学 生物生命学部 応用微生物工学科 准教授 岡 拓二 先生
受賞題目「*Aspergillus* 属糸状菌に特異な糖鎖の生合成に関する研究」

公益財団法人 野田産業科学研究所 研究員 小川 真弘 先生
受賞題目「麴菌糖質分解酵素群の遺伝子発現制御機構に関する研究」

13:50～14:15 技術賞受賞講演

キッコーマン株式会社 チームリーダー 五味 恵子 先生 (代表者)
研究員 廣川 浩三
研究員 一柳 敦
部長 梶山 直樹

受賞題目「糸状菌由来フルクトシルペプチドオキシダーゼを用いた新規糖化ヘモグロビン測定法の開発」

3. 例会講演 第一部

14:15～14:45 東北大学未来科学技術共同研究センター 研究員 吉見 啓 先生
「*Aspergillus* 属菌における細胞壁 α -1, 3-グルカン研究からの新展開」

14:45～15:15 筑波大学生命環境科学研究科 助教 梶尾 俊介 先生
「糸状菌の芳香族化合物の代謝と芳香族ポリマー原料の生産」

15:15～15:30 — 休憩 —

4. 例会講演 第二部

15:30～16:00 東京大学大学院農学生命研究科 特任助教 菊間 隆志 先生
「麴菌におけるオートファジーの生理機能と異種タンパク質生産への応用」

16:00～16:40 明治大学大学院農学研究科 教授 中島 春紫 先生
「麴菌のヒドロフォービンの表層改変機能の解析と応用」

5. 懇親会

北とぴあ 1F のキリンシティにおいて、例会終了時から 19 時まで懇親会を開催します。

Aspergillus 属糸状菌に特異な糖鎖の生合成に関する研究

崇城大学 生物生命学部 応用微生物工学科
准教授 岡 拓二

アスペルギルス属糸状菌由来のタンパク質の多くには糖鎖が付加されている。タンパク質糖鎖は、細胞壁の構成成分として細胞壁を物理的に補強する役割や細胞表層の種々タンパク質の安定性や機能に関わっている。また、細胞内の輸送経路におけるタンパク質の品質管理や局在化の指標としての機能も報告されている。糸状菌のタンパク質糖鎖には、*N*-結合型糖鎖と *O*-マンノース型糖鎖が知られている。*N*-結合型糖鎖も *O*-マンノース型糖鎖も酵母からヒトまで広く存在する糖鎖であり、還元末端側の構造は共通している。しかし、その非還元末端側の構造は種間でかなり異なっている。私は 2004 年に小胞体に局在するプロテイン *O*-マンノース転移酵素 (PmtA) が *O*-マンノース型糖鎖の合成開始を担うことを酵素的に明らかにした (Oka T. *et al.*, 2004)。また、*pmtA* の遺伝子破壊株は、菌糸が膨らむバルーン構造を示し、分生子形成能が著しく減少するなどの異常を示した。これらのことから、糸状菌において *O*-マンノース型糖鎖が細胞壁形成において重要な役割を果たしていることを示した (Oka T. *et al.*, 2004, Oka T. *et al.*, 2005)。

一方で、糸状菌の *N*-結合型糖鎖および *O*-マンノース型糖鎖には、ガラクトフラノース(Gal_f)という、ユニークな糖が含まれていることが知られている (Oka T. and Goto M., 2016; 図 1)。それまでに、糖供与体として機能する UDP-Gal_f の生合成遺伝子 (*ugmA/glfA*) や輸送体遺伝子 (*ugtA/glfB*) の解析から Gal_f 糖鎖が糸状菌の正常な細胞壁形成に必要な不可欠であることが明らかにされていた。また、Gal_f はヒトを含む動物や植物には含まれていないことから、その生合成に関わる酵素が新規な抗真菌剤の標的となることが期待されている。Gal_f 糖鎖は 1930 年代には既に構造が知られていた糖鎖であり、現在でも肺アスペルギルス症の診断の指標として広く用いられている。しかし、Gal_f 糖鎖の生合成を担う糖転移酵素に関する情報は、遺伝子のもとより、その酵素活性測定法さえも全く不明であった。そこで私共は、逆遺伝学的手法と生化学的手法を組み合わせた手法により、Gal_f 含有糖鎖の生合成に関わる遺伝子の同定を試み、世界で初めて菌類由来の Gal_f 転移酵素遺伝子 (*gfsA*) を同定

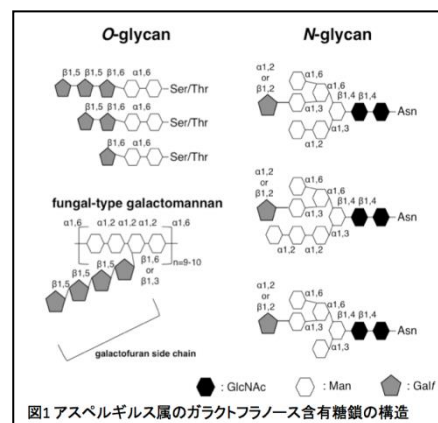
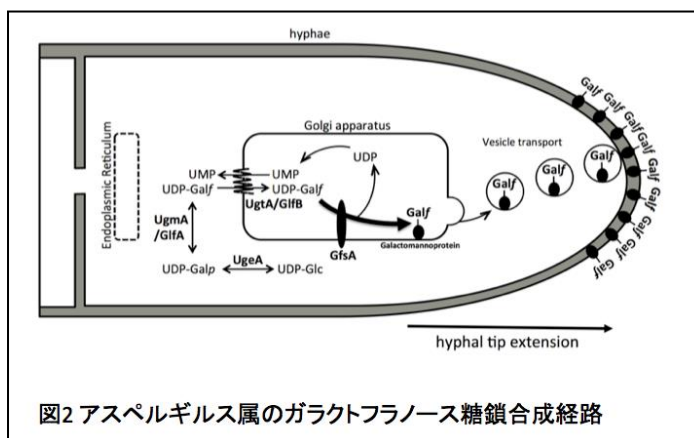


図1 アスペルギルス属のガラクトフラノース含有糖鎖の構造

した (Komachi *et al.*, 2013)。GfsA は、細菌類や原生生物において知られていた Gal₁ 転移酵素とは全く異なる一次構造を有する新規な糖転移酵素であり、*O*-マンノース型糖鎖の非還元末端の β1,5-Gal₁ 残基を UDP-Gal₁ を糖供与体として転移する、ゴルジ体局在酵素であった (図 2)。gfsA 遺伝子の破壊は糸状菌の菌糸伸長を抑制し、菌糸を湾曲させ、分生子形成能を著しく低下させた。また、gfsA 遺伝子はアスペルギルス属のみならず子囊菌門のうち最も大きな分類群であるチャワントンタケ亜門に広く分布する遺伝子であった。チャワントンタケ亜門に属する菌には、多くの人畜病原菌 (白癬菌、肺アスペルギルス症病原菌等) や植物病原菌 (イネいもち病菌、うどんこ病菌等) が含まれており、その阻害剤は多くの感染症や植物病の新しい治療薬、農薬として期待できると考えている。



【参考文献】

- Oka T *et al.*, (2004) *Microbiology-SGM*, 150: 1973-1982.
 Oka T *et al.*, (2005) *Microbiology-SGM*, 151: 3657-3667.
 Oka T. and Goto M., (2016) *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*. 28 1-14.
 Komachi Y *et al.*, (2013) *Mol Microbiol.* 90: 1054-1073.

ご略歴

- 平成 11 年 3 月 九州大学農学部農芸化学科卒業
 平成 13 年 3 月 九州大学大学院生物資源環境研究科修士課程修了
 平成 16 年 3 月 九州大学大学院生物資源環境科学府博士課程修了
 平成 16 年 4 月 産業技術総合研究所・博士研究員 (地神芳文研究室)
 平成 20 年 4 月 崇城大学生物生命学部応用微生物工学科・助教
 平成 22 年 4 月 崇城大学生物生命学部応用微生物工学科・准教授

麴菌糖質分解酵素群の遺伝子発現制御機構に関する研究

公益財団法人 野田産業科学研究所
研究員 小川 真弘

麴菌は高い菌体外酵素生産能を有しており、その性質は発酵産業にとって非常に重要な性質の一つである。また麴菌は発酵産業だけでなく、産業用酵素の生産菌としても利用されている。麴菌における菌体外酵素遺伝子の転写制御因子遺伝子の解析は、目的とする酵素の高生産につながる知見が得られることが期待されるため、精力的に研究が行われてきた。私が本研究を始めた当初、本菌では、アミラーゼの遺伝子発現を制御する *amyR*、そしてキシラナーゼおよびセルラーゼの遺伝子発現を制御する *xlnR* などが既に見出されていた。しかしマンナナーゼについては、産業的に利用される酵素であるにもかかわらず、その遺伝子発現を制御する転写制御因子遺伝子は糸状菌を含む真核生物では知られていなかった。そこで私は、麴菌マンナナーゼ遺伝子の発現を制御する転写制御因子遺伝子 (*manR*) を同定することを試みた。

麴菌転写制御因子遺伝子破壊株ライブラリーの作製

麴菌の機能未知遺伝子の解析を目的とし、本菌の転写制御因子遺伝子を網羅的に破壊したライブラリーの作製を、野田産研と産総研 町田博士のチームとの共同で実施した。宿主には *Aspergillus oryzae ku70* 破壊株を使用した。約 500 個の転写制御因子遺伝子の破壊を試み、約 380 個を破壊することに成功した。

遺伝子破壊株ライブラリーからのスクリーニングによる *manR* の同定¹⁾

上記ライブラリーにて作製した破壊株を、コンニャクグルコマンナンを唯一の炭素源とした培地によるマンナナーゼのハロアッセイに供した。その結果、生育は低下せずマンナナーゼによるハローが消失した遺伝子破壊株を 1 つ見出した。本株は機能未知の Zn(II)₂Cys₆ 型 DNA 結合タンパク質をコードする遺伝子の破壊株であった。次にこの遺伝子を *tef1* プロモーターを使用し *A. oryzae* にて強制発現させたところ、コントロールよりも非常に高いマンナナーゼ生産性を示した。以上の結果から、本遺伝子はマンナナーゼの発現を正に制御する *manR* であると結論した。

ManR はマンナン加水分解酵素群の遺伝子発現を包括的に制御する¹⁾

manR の遺伝子破壊株および強制発現株を、コンニャクマンナンを唯一の炭素源とした培地にて培養後、菌体から total RNA を抽出し、各株の遺伝子発現状態を DNA マイクロアレイにより調べた。その結果、ManR はエンド型のマンナーゼの遺伝子だけでなく、 α -ガラクトシダーゼや β -マンノシダーゼの遺伝子など、マンナン加水分解酵素群の遺伝子を包括的に制御することがわかった。また、ゲルシフトアッセイの結果から、ManR はマンナーゼ遺伝子のプロモーターに直接結合することも分かった。

ManR はセルロース加水分解酵素群の遺伝子発現も制御する²⁾

manR の遺伝子破壊株および強制発現株を、カルボキシメチルセルロースを唯一の炭素源とした培地によるセルラーゼのハロアッセイに供した。その結果、破壊株ではハローがコントロールと比べ著しく減少し、強制発現株では顕著に増加した。また各株を、アビセルを唯一の炭素源として培養した時の遺伝子発現状態を、DNA マイクロアレイにより調べたところ、ManR は *eglA*、*celC* そして *celD* など、複数のセルラーゼ遺伝子群についても正に制御していた。

ManR は醤油麹菌でもマンナンおよびセルロース加水分解酵素群の遺伝子発現を包括的に制御する³⁾

麹菌 *A. oryzae* の近縁種である醤油麹菌 *A. sojae* においても ManR の機能を調べた。その結果、醤油麹菌の ManR も、*A. oryzae* のものと同様に機能していることが確認された。また、*manR* を強制発現させた醤油麹菌を使用し、醤油原料の分解を試みたところ、*manR* を強制発現させた醤油麹菌では原料の多糖類の分解が促進され、コントロールと比べ諸味の粘度が有意に低下した。

manR のスクリーニングに使用した麹菌転写制御因子遺伝子破壊株ライブラリーについては、麹菌の分生子形成制御系の解析にも利用することができた。このように、本遺伝子破壊株ライブラリーは、今後も様々な転写制御因子遺伝子のスクリーニングに利用できると考えられる。本研究により得られた ManR に関する知見、並びに転写制御因子遺伝子破壊株ライブラリーが、今後も糸状菌遺伝子研究の発展に寄与していくことを期待している。

【謝辞】

本研究の一部は生物系特定産業技術研究支援センター(生研センター)の支援を得て実施したものである。

【参考文献】

1. Ogawa, M., et al (2012) *Fungal Genet. Biol.* **49**, 987-995.
2. Ogawa, M., et al (2013) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **77**, 426-429.
3. 小川ら、国内出願特許 (特開 2015-167475).

ご略歴

平成 16 年 3 月 日本大学大学院 生物資源科学研究科 生物資源利用科学専攻
博士後期課程修了 博士 (生物資源科学)

平成 16 年 4 月～同 17 年 9 月 日本大学生物資源科学部 日本大学 21 世紀 COE
プログラム 博士研究員

平成 17 年 10 月～同 22 年 3 月 財団法人野田産業科学研究所 生研センター
プロジェクト 博士研究員

平成 22 年 4 月～同 26 年 7 月 キッコーマン株式会社 研究開発本部 研究員

平成 26 年 8 月～現在 公益財団法人野田産業科学研究所 研究員

平成 28 年 4 月～現在 東京大学大学院 農学生命科学研究科 応用生命工学専攻
細胞遺伝学研究室受託研究員 (兼任)

技術賞受賞講演

糸状菌由来フルクトシルペプチドオキシダーゼを用いた 新規糖化ヘモグロビン測定法の開発

キッコーマン株式会社
チームリーダー 五味 恵子 先生（代表者）
研究員 廣川 浩三
研究員 一柳 敦
部長 梶山 直樹

厚生労働省によると、国内の糖尿病患者は316万人(2014年)に達し、2011年からの3年間で17%の増加となっている。また、2014年現在、成人男性の1/7以上が「糖尿病が強く疑われる」という調査結果もあり、今後も糖尿病患者の増大が危惧される。糖尿病の初期段階は自覚症状がないため見過ごされやすいが、治療を受けずに長く放置しておく、網膜症・腎症・神経障害などの重篤な合併症を引き起こす危険性が増大する。またアルツハイマー病や歯周病など広範にわたる病態と糖尿病との関連性が報告されるようになり、糖尿病がさまざまな病気の温床となっている可能性が示唆されている。そのため、適切な検査による糖尿病診断と病態コントロールが非常に重要であると考えられている。糖尿病の発症や合併症を予防するには、血糖の状態を正確に把握することが大切である。ヘモグロビンのβ鎖N末端のバリン残基に血中のグルコースが結合した糖化ヘモグロビン（HbA1c）は過去1～2ヶ月の平均血糖値を反映することから、糖尿病の診断および血糖のコントロールに最適な指標として受け入れられている。さらに2010年には糖尿病診断基準が改定され、HbA1cをより積極的に診断に取り入れることが糖尿病診断基準に定められるなど、近年最も注目を浴びている診断マーカーのひとつである。

さて、糖尿病が社会的問題となるにしたがってHbA1cの測定件数が増加していたが、従来、HbA1cに関しては酵素測定法が存在せず、他の方法（HPLC法と免疫法）により測定されていた。HbA1c測定等の臨床検査は主に検査センターや病院の検査室で行われているが、多量の検体を正確・迅速・簡便に測定するニーズの高まりに伴い、酵素測定法が待望されるという背景があった。そこで我々は、HbA1cをプロテアーゼで分解し遊離するフルクトシルジペプチド（F-ValHis）を測定することを特徴とする新規なHbA1c酵素測定法を考案し、本測定系に必要な酵素であるフルクトシルペプチドオキシダーゼ（FPOX）のスクリーニングを行うこととした。

我々は糸状菌を始めとした微生物を対象にしたスクリーニングを通して、F-ValHisに作用する酵素（FPOX）を見出すことに成功した。酵素生産菌として8つの属に及ぶ21株の糸状菌が選抜され、目的の酵素活性が広く糸状菌に存在することを見出した。それらの中から測定に適した性能を有する酵素FPOX-CEを選定し、遺伝子クローニング、

および当社オリジナルの遺伝子組換え酵素高発現系による大量発現検討を経て、測定法開発に十分な量の酵素生産が可能になった。さらに組換え生産した FPOX-CE とプロテアーゼを組み合わせることによって、HbA1c を正確に測定する実用的な方法を確立した。現在、FPOX-CE やその変異体を用いた HbA1c 新規酵素測定法キットが臨床診断薬メーカー数社から販売されている。

さて、一般的に酵素の安定性を高めることは、常温流通等のさらなる利便性がもたらされると考えられる。そこで、directed evolution の手法を用いた FPOX の安定化に取り組み、耐熱性・プロテアーゼ耐性を大幅に向上させることに成功した。一方、FPOX-CE のさらなる改良のため、タンパク質結晶構造の解析を行い、基質アナログ-FPOX 複合体の結晶構造を解くことに成功した。得られた情報から部位特異的変異導入を繰り返し、FPOX-CE の基質特異性に優れた新たな変異体を取得している。また、基質特異性以外の酵素性能についてもタンパク質構造をデザインすることにより順次改良が進んでいる。これらの変異を組み合わせ最適化することにより、さらに次世代となるプロテアーゼを使用しない測定法「ダイレクト法」の開発にも成功している。

糸状菌由来新規酵素の発見により今回初めて実用化に成功した HbA1c 酵素測定法は、迅速・簡便・正確な検査を可能にするため、糖尿病の診断に非常に有効であり、病気の予防や健康管理、QOL 向上に大きく貢献できるものと考えられる。本方法は既に国内の大手検査センターや病院で採用され、広く実用化されている。国際糖尿病連合の「糖尿病アトラス第7版 2015」によると世界の糖尿病患者は 2015 年の 4.1 億人から、2040 年には 6.4 億人に達するとの見通しがあるなど、糖尿病患者の増加は国内のみならず世界的な問題である。HbA1c 酵素測定法は国内のみならず、海外においても市場導入が着々と進行中であり、日本で発見された糸状菌由来酵素が世界の糖尿病診断で活躍するようになってきている。

ご略歴

1994 年 東京理科大学 理工学研究科 修了

1994 年 キッコーマン株式会社 入社

2001 年 学位取得（理学博士）

Aspergillus 属菌における細胞壁 α -1,3-グルカン研究からの新展開

東北大学・未来科学技術共同研究センター

研究員 吉見 啓

糸状菌の細胞壁は、グルカンやキチン、マンナンなどの多糖を主要成分として構成されている。この構造体は、菌の生育に必須であり、真菌独自のものであることから、長らく抗真菌剤の標的として注目されてきた。演者らは、新規抗真菌剤のターゲット探索の観点から、モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* の細胞壁構築 (CWI) シグナル伝達経路に着目して研究を展開してきた。^{1,2,4)} その成果として、*A. nidulans* の CWI 経路において MAP キナーゼ MpkA は、出芽酵母とは全く異なり、出芽酵母には存在しない α -1,3-グルカン (AG) の生合成制御に強く関与していることを明らかにしている。¹⁾ さらに、*A. nidulans* において、2つの AG 合成酵素遺伝子 (*agsA*, *agsB*) の機能を解析し、本菌の栄養生育時における AG 合成には主に *AgsB* が関与していること、生育自体に AG は必須ではないことを明らかにしている。³⁾ また、本菌の AG は、ある種の細胞壁ストレスから細胞を保護する役割だけでなく、菌糸同士の接着因子としても機能していることを見出した。³⁾ 本講演では、*A. nidulans* において見出した細胞壁 AG の機能と、細胞壁多糖の生化学解析に関連して展開している以下 3つの研究課題について紹介する。

I. 麴菌における細胞壁 AG 欠損株の特性を利用した高密度培養研究

通常、*Aspergillus* 属糸状菌を液体培養すると菌糸が絡まり合い、ボール状に菌糸の塊を形成しながら生育する。一方、*A. nidulans* の AG 欠損株は、菌糸同士が接着しないため菌糸塊を形成せず、菌糸が培地中に均一に分散する。この現象は、糸状菌を用いた物質生産において長年達成されなかった高密度培養技術に繋がるものと考えられた。そこで演者らは、AG 欠損株においてモデル酵素やモデル化合物の生産性を評価し、AG 欠損株を用いた高密度培養による物質高生産が達成できるか否かを検証した。まず、検証には、産業応用を見据えて麴菌 *A. oryzae* を用いることとし、麴菌における 3種の AG 合成酵素遺伝子 (*agsA*, *agsB*, *agsC*) を全て破壊した株を造成した (本学農学研究科・五味勝也教授の支援)。この麴菌 AG 欠損株の培養性状を観察したところ、予想に反して菌糸は完全分散せず、小さな菌糸塊を形成した (野生株比約 60%)。次に、AG 欠損株の酵素生産能を比較するため、野生株および AG 欠損株にモデル酵素遺伝子としてクチナーゼ *cut11* 遺伝子を導入した。これらの菌株について菌体量・酵素生産量を比較したところ、培養中期以降、AG 欠損株の菌体量・酵素生産量が野生株のそれらを上回った。⁵⁾ これらの結果から、菌糸塊の小さな AG 欠損株は、菌糸総表面積が野生株より大きく、菌糸もより好氣的な環境で生育できるため酵素生

産に有利であると考えられた。一方、AG 欠損株の菌糸が完全分散しなかったことから、麴菌では AG の他に未知の菌糸接着因子が存在することが予想された。この因子については、現在探索中である。

II. AG オリゴ糖生産とステルス素材としての利用

演者らが、糸状菌における CWI 経路の転写制御メカニズムを報告したころ、ヒト感染性酵母において細胞壁表層の AG が下層の β -1,3-グルカン (BG) を被覆することによって、動物の免疫システムによる BG の認識を回避すること (ステルス機能) が報告された。その後、我々を含むグループは、植物病原糸状菌においても、AG がステルス機能を示すことを報告した。これらの事実から、演者らは AG をステルス素材として利用できるのではないかと考えた。既に糸状菌細胞壁の解析を通して AG の抽出・分析法は確立していたことから、不溶性多糖を可溶化する技術開発に取り組んだ。まず、亜臨界水抽出装置による AG のオリゴ糖化条件を検討し、2~25 糖の AG オリゴ糖の生成条件を確立した。次に、AG オリゴ糖の機能を評価するため、AG オリゴ糖の免疫細胞刺激性を評価した。その結果、AG オリゴ糖は免疫刺激性を示さず (ステルス素材)、逆に AG を除去した BG やキチンを含む画分は免疫刺激活性を示すことが明らかになった。現在、これらの化成品への応用開発を進めている。

III. 細胞壁 AG 低減株スクリーニング法の開発

A. nidulans および麴菌の AG 欠損株は、BG が細胞表層に露出することから、BG に吸着能のあるコンゴレッド感受性を示す。³⁾ 演者らは、この性質を利用して麴菌の AG 低減株が育種できるのではないかと考えた。まず、麴菌野生株を変異処理し、コンゴレッド感受性に基づく選抜条件を検討した。その結果、野生株より 3 割程度 AG が低減した菌株を複数株取得できた (AG 低減株スクリーニング法の確立)。⁶⁾ これらの麴菌 AG 低減株を用いてマウス樹状細胞刺激性を評価したところ、野生株で樹状細胞を刺激した場合よりもサイトカイン産生量が増加することが明らかになった。これらの結果に基づき、民間企業と共同で AG 低減麴菌株を用いた機能性飲料の開発を進めている。

【参考文献】

- 1) Fujioka et al. Eukaryot. Cell. 2007; 6:1497-1510
- 2) Yoshimi et al. Biosci. Biotechnol. Biochem. 2015;79:836-844.
- 3) Yoshimi et al. PLoS one. 2013; 8:e54893.
- 4) Yoshimi et al. Biosci. Biotechnol. Biochem. 2016; Published online.
- 5) Miyazawa et al. Biosci. Biotechnol. Biochem. 投稿中.
- 6) 吉見ら: 特願 2015-205934 「麴菌の細胞壁変異株の選抜方法、当該細胞壁変異株、当該細胞壁変異株を用いた米製品およびその製造方法」

ご略歴

2006年 京都大学大学院農学研究科博士後期課程

地域環境科学専攻修了・博士（農学）

2006～2009年 東北大学 未来科学技術共同研究センター 産学官連携研究員

2010～2013年 株式会社ファームラボ 技術部 研究員

2013年～ 東北大学 未来科学技術共同研究センター 助教

（現在に至る）

糸状菌の芳香族化合物の代謝と芳香族ポリマー原料の生産

筑波大学生命環境科学研究科
助教 梶尾 俊介

はじめに

ベンゼン環を有する芳香族化合物には、医薬品、香料あるいはプラスチック原料などとして利用可能な産業上重要な化合物が多く含まれる。これまで、微生物を用いてバイオマスから有用芳香族化合物を生産する試みが多くなされているが、これらにより生産可能な芳香族化合物の種類は限られている。本発表では、麴菌 *Aspergillus oryzae* の 2-フェニルエタノール(PE)の生合成経路と、これを含む様々な代謝経路を用いて構築した種々の芳香族化合物の生産システムについて紹介させていただきたい。

1. 麴菌が有する二つの PE 生合成経路¹⁾

フェニルアラニン単一窒素源とする最少培地で *A. oryzae* を培養したところ、培地中に PE が生産された。*A. oryzae* のゲノム配列情報から、二つの PE 合成経路を予測し、これら経路を構成する遺伝子の機能解析を行った。その結果、本菌が酵母でよく知られる PE 合成経路であるエールリッヒ経路に加えて、トマト等の植物で知られるフェニルエチルアミンを代謝中間体とする経路 (フェニルエチルアミン経路)を有することが明らかとなった。重水素標識したフェニルアラニンから生産された PE の質量スペクトルを解析した結果、*A. oryzae* は両方の経路を用いて PE を生産するものの、そのほとんどがエールリッヒ経路を経て合成されたものであることが明らかとなった。

2. 芳香族アミン類の発酵生産とポリマー原料としての利用²⁻⁴⁾

芳香族アミンは、ベンゼン環の水素原子がアミノ基に置き換わったアニリン骨格を有し、色素、医薬品あるいはポリマーの原料などとして広く用いられているなど、産業上重要な化合物であるが、バイオマスを原料としてこれらを生産した例はほとんどない。我々は、*Streptomyces* 属あるいは *Pseudomonas* 属細菌の遺伝子を異種発現させた組換え大腸菌を用いてグルコースから芳香族アミンの一種である 4-アミノフェニルアラニン(4APhe)を大量生産することに成功した。この 4APhe 生産菌にてエールリッヒ経路あるいはフェニルエチルアミン経路の遺伝子を発現させることで、4-アミノフェニル酢酸、4-アミノフェニルエタノールおよび 4-アミノフェニルエチルアミンを生産することに成功した。また、フェニルアラニンアンモニアリアーゼを発現させた大腸菌を用いて、発酵生産により得られた 4APhe を 4-アミノ桂皮酸に変換することに

も成功した。さらに、得られた 4-アミノ桂皮酸を原料としてバイオマス由来の高機能性ポリマーを合成することができた。

おわりに

本研究では、既存の代謝酵素を組み合わせることで、複数の芳香族アミンの微生物生産システムを構築した。しかしながら、このようなアプローチで生産可能な化合物は、既存の代謝酵素のバラエティにより制限されてしまう。これまでにない反応を行う新規酵素の探索は、微生物生産が可能な芳香族化合物を拡充していくためにも重要であると考えている。今後は、これについても検討していきたい。

【参考文献】

- 1) Masuo, S. *et al. Fungal Genet. Biol.* 77, 22-30 (2015)
- 2) Masuo, S. *et al. Sci. rep.* 6, 25764 (2016)
- 3) Tateyama, S. *et al. Macromolecules*, 49, 3336-3342 (2016)
- 4) Masuo, S. *et al. Appl. Microbiol. Biotechnol.* in press (2016)

ご略歴

- 2011 年 3 月 筑波大学大学院一貫制博士課程生命環境科学研究科生命共存科学専攻修了
- 2011 年 4 月 筑波大学大学院生命環境科学研究科生命共存科学専攻 研究員
(2011 年 6 月～2012 年 3 月 ジョージア州立大学にて研究に従事)
- 2012 年 4 月 筑波大学生命環境系 研究員
- 2015 年 6 月 筑波大学生命環境系 助教

麴菌におけるオートファジーの生理機能と異種タンパク質生産への応用

東京大学大学院 農学生命科学研究科
特任准教授 菊間 隆志

オートファジーとは

オートファジー（一般的にマクロオートファジーを指す）は、細胞質中のタンパク質やオルガネラを液胞/リソソームに輸送し分解する、真核生物に広く保存された細胞内分解機構である。一般に栄養飢餓などのストレスに応答して細胞内成分をリサイクルする機能を担っていると考えられているが、発生や分化、免疫応答、細胞死などにも重要な役割を果たしており、その欠損は神経変性疾患や癌などの様々な疾患にも関与していると報告されている。

オートファジーには多くのオートファジー関連（autophagy-related : *ATG*）遺伝子が機能しており、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* では現在約 40 個の *ATG* 遺伝子が同定されている。近年、多くの糸状菌のゲノム解読が完了し、多くのオートファジー関連遺伝子の解析が可能となった。麴菌 *Aspergillus oryzae* においても、オートファジーのマーカータンパク質として広く利用されている *Atg8* のホモログである *AoAtg8* と蛍光タンパク質との融合タンパク質を発現させることにより、PAS（preautophagosomal structure もしくは phagophore assembly site）様の構造、隔離膜、オートファゴソーム、オートファジックボディーといったオートファジー特異的な構造体が可視化され、またオートファジーの進行に伴い液胞に蓄積する蛍光を観察することにより、オートファジーの誘導、活性化レベルを評価できるようになった^(1,2)。

麴菌 *A. oryzae* の形態形成とオートファジー

Aoatg8 破壊株などのオートファジー欠損株のコロニーを横から見ると、気中菌糸をほとんど形成していないことが観察される^(1,2)。また、寒天培地の側面に分生子を植菌し、カバーガラスをかぶせて培養すると、野生株は気中菌糸を 7 mm 以上伸ばすことができるが、*Aoatg8* 破壊株は 1 mm 程度しか伸ばすことができない。そのため、野生株は気中菌糸を発達させることにより離れた場所に置いた寒天培地に到達することができるが、そこからさらに生長を始めるが、*Aoatg8* 破壊株は寒天培地に到達できず新たな生育を見せない。さらに、窒素源枯渇培地において分生子の *Aoatg8* の発現を抑制すると発芽が遅延する。外界から栄養源を取り込めない状況では、オートファジーが気中菌糸や分生子内の栄養源を供給すると共に、形態の変化に伴う細胞の再構築に関与

することを示唆した⁽³⁾。他の多くの糸状菌におけるオートファジー関連遺伝子破壊株でも、気中菌糸、分生子、有性生殖器官、感染器官などの形成に影響が出ることが知られており、オートファジーが糸状菌の形態分化にとって極めて重要であることがうかがえる。

麹菌 *A. oryzae* におけるオートファジーによるオルガネラの分解

A. oryzae では、分生子植菌後 48 時間培養した基部の細胞においてペルオキシソーム、ミトコンドリアが液胞に取り込まれることが観察される⁽⁴⁾。また、異常タンパク質を蓄積した小胞体もオートファジー依存的に液胞へ輸送される。*Aoatg8* 破壊株ではこれらのオルガネラの液胞への取り込みは観察されないことから、不要になったオルガネラはオートファジーによって分解されていることが考えられる。さらに興味深いことに、*A. oryzae* では 48 時間や 72 時間培養といった長期液体培養後の菌糸基部で、液胞内へ核の取り込みが観察される。核を丸ごと隔離し液胞で分解するオートファジーは、*A. oryzae* で初めて発見された現象である⁽⁴⁾。

これらオルガネラを特異的に分解するオートファジーを選択的オートファジーと呼び、酵母や哺乳動物細胞では選択的オートファジーに関与するタンパク質が同定されている。しかし、*A. oryzae* をはじめとする糸状菌はこれらのタンパク質のアミノ酸一次配列の保存性が低いため、糸状菌における選択的オートファジーの研究が酵母に比べて進んでいない。*A. oryzae* では選択的オートファジー関連タンパク質 *AoAtg11* の解析が唯一の例であり、ペルオキシソームとミトコンドリアの分解に関与するものの、通常のオートファジーには関与しないことが明らかとなった⁽⁵⁾。

麹菌オートファジーの有用物質生産への応用

A. oryzae において多量に分泌される α -アミラーゼ *AmyB* のジスルフィド結合を欠損した変異 *AmyB* を発現させると、小胞体内に蓄積した変異 *AmyB* がオートファジー依存的に液胞へ輸送される。そのため、有用異種タンパク質のオートファジーによる分解も高生産の障害の一つとなり得ることが推測された。実際、*A. oryzae* のオートファジー関連遺伝子破壊株 (*Aoatg1*、*Aoatg13*、*Aoatg4*、*Aoatg8*) において、ウシキモシンを発現させると、コントロール株に比べて最大で 3.1 倍 (*Aoatg4* 破壊株) の生産量の増加が見られた⁽⁶⁾。なぜ、オートファジー欠損によるウシキモシン生産性向上の詳細なメカニズムは不明であるが、少なくともこの結果から、正しいフォールディングができず小胞体内に蓄積した異種タンパク質が、プロテアソームでの分解経路 (小胞体関連分解) 以外に、オートファジーによっても分解されることが示唆される。

まとめ

A. oryzae をはじめとする糸状菌のオートファジー研究は、真核多細胞生物のモデルとして、また発酵、醸造食品の製造、有用物質生産に関して重要な意義を持つと予想される。麴造り（とくに吟醸麴）における蒸し米は窒素源が少ないため、植菌された *A. oryzae* ではオートファジーが誘導されているかもしれない。一方で、麴造りでは気中菌糸や分生子を形成させないことが重要であるとされており、分化におけるオートファジーは抑制されている可能性が考えられる。種麴を製造する場合は逆に分生子を大量に形成させることが重要である。さらに、清酒酵母におけるマイトファジーの研究からも、*A. oryzae* におけるオルガネラ特異的オートファジーがこれらのプロセスに大きく貢献している可能性がある。このように醸造食品製造の様々な過程でオートファジーが関与することが考えられ、*A. oryzae* におけるオートファジーの詳細な機構の解明は、オートファジー制御による有用麴菌株の育種という観点からも重要であると考えられる。

【参考文献】

- (1) Kikuma *et al.*, *Eukaryot. Cell* **5**:1328-36, 2006
- (2) Kikuma *et al.*, *FEMS Microbiol. Lett.*, **316**: 61-9,2011
- (3) Kikuma *et al.*, *Autophagy*, **3**, 128 2007
- (4) Shoji *et al.*, *PLoS One*, **5**:e15650, 2010
- (5) Tadokoro *et al.*, *Fungal Biol.* **119**: 560-7, 2015
- (6) Yoon *et al.*, *PLoS One.* **8**: e62512 ,2013

ご略歴

- | | | | |
|-------|----|--------------------------------------|----------------|
| 2001年 | 3月 | 東京理科大学基礎工学部生物工学科 | 卒業 |
| 2003年 | 3月 | 東京理科大学大学院基礎工学研究科生物工学専攻 | 修了 |
| 2007年 | 3月 | 東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻 | 修了
博士（農学）取得 |
| 2007年 | 4月 | 米国シアトルにてバイオベンチャーBio Architecture Lab | の立上げに参加 |
| 2008年 | 4月 | 東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻 | 特任研究員 |
| 2009年 | 4月 | 独立行政法人 理化学研究所 | 特別研究員 |
| 2011年 | 6月 | 東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻 | 特任助教 |

麴菌のハイドロフォービンの表層改変機能の解析と応用

明治大学農学部農芸化学科
教授 中島 春紫

糸状菌および担子菌類の孢子・気中菌糸等の空気に触れる細胞の表面はハイドロフォービンとよばれる低分子量タンパク質に覆われている。分泌されたハイドロフォービンは、細胞表層に自己集合して単層を形成し、菌体に撥水性を付与する。ハイドロフォービンは全体として疎水性で、特徴的に配置された 8 個の Cys 残基が保存されているが、アミノ酸配列の相同性は低く分子量にも大きな幅 (10 – 18 kDa) があることから、機能的な多様性が予想される。

筆者らは麴菌 *Aspergillus oryzae* からハイドロフォービンをコードすると考えられる遺伝子を 4 個単離している (*hypA - D*)。それぞれ 151, 146, 99, 207 アミノ酸のタンパク質をコードし、アミノ酸相同性は 25 – 65% であった。HypA – C に蛍光タンパク質を連結して蛍光顕微鏡観察を行ったところ、HypA だけが分生子表層に局在し、HypB と HypC は主として菌糸に局在することが観察された。

麴菌は分生子を接種して 2 日目までは菌糸が伸長し、3 日目から分生子の形成が始まる。RT-PCR 解析により、*hypA* 遺伝子は分生子形成期以降に発現し、*hypB* 遺伝子は菌糸伸長期に発現するが分生子形成期になると転写が大幅に減少することを見いだした。*hypA* 遺伝子のプロモーターの欠失解析により、(-280 ~ -200) 領域に存在する 3 つの分生子特異的発現転写因子 AbaA 結合領域が、HypA の分生子特異的発現に必須であることが判明した。

麴菌の *hypA - hypC* 遺伝子を破壊したところ、いずれも生育には影響がなかったが、*hypA* 遺伝子破壊株では分生子表層のシワ状構造が消失すること、*hypB* 遺伝子の破壊株では菌糸表層の粒状構造が消失し、コロニーの撥水性が低下することが観察された。

hypD 遺伝子には C 末端に極度に荷電性アミノ酸に富んだ 80 アミノ酸の超親水性ドメインが存在する。このドメインの機能は不明だが、*hypD* 遺伝子は水分が不足した環境で発現が誘導されることを見いだしており、環境適応に関する機能が予想される。

一般にハイドロフォービンは非常に吸着性が強く、親水性および疎水性の基材の表面に吸着層を形成し、基材の親水性度を変化させることが知られている。麴菌の液体培養により生産した HypA タンパク質を、疎水性カラム等を用いて精製した。HypA 水溶液を疎水性のテフロン板上に滴下すると、表面張力の低下のため、時間経過に伴って水滴の表面が平坦化することが観察された。さらに、HypA を吸着させたテフロン板は親水性度が大幅に低下することを、水滴の接触角測定法により観察した。

ハイドロフォービンの吸着性を環境浄化への応用に生かす方策として、HypA およ

び HypB の C 末端に Ni イオンを吸着する His8 タグを連結した機能性ハイドロフォービンを設計した。

菌糸に特異的に発現する HypB については、菌体に特定の機能を付与する細胞表面工学への応用を試みた。HypB-His8 を発現する麴菌を木綿の綿上で生育させ、菌糸が絡んだ綿をカラムに詰めて重金属吸着カラムを作製したところ、有意な Ni イオンの吸着が観察された。

精製系が確立している HypA については、麴菌の培養液から HypA-His8 を精製して吸着性を評価した。CD スペクトルおよび接触角測定法により、機能性 HypA にハイドロフォービンとしての構造と機能が保持されていることを確認した。HypA-His8 を吸着させた木綿の綿は、Ni イオンおよび Co イオンの吸着性が大幅に増加していることを観察し、環境浄化への応用の可能性を示すことができた。

ご略歴

- 1989 年 3 月 東京大学大学院農学研究科農芸化学専攻博士課程修了
(農学博士)
- 1989 年 4 月 東京工業大学生命理工学部 助手
- 1997 年 10 月 東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻 助教授
- 2004 年 10 月 明治大学農学部農芸化学科 助教授
- 2007 年 10 月 明治大学農学部農芸化学科 教授 (現職)