

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成12年度博士課程入学
氏名 大根田 守
指導教官名 北本 勝ひこ

論文題目

麹菌 *Aspergillus oryzae* の液胞機能に関する遺伝学的研究

高等植物及び真核微生物の細胞内には液胞と呼ばれる酸性のオルガネラが存在する。液胞は主として老廃物の分解と蓄積，細胞質イオン恒常性の維持に働く。液胞内には動物細胞におけるリソソームと同様に，多種類の加水分解酵素が含まれており，不要となったタンパク質，核酸，脂質など生体高分子の分解に働いている。このような加水分解酵素は産業においても非常に有用であり，食品加工や医薬品製造などに利用することにより飛躍的な効率化が期待できる。リソソーム/液胞酵素を工業的な規模で生産することが課題であり，安全かつ低コストな生産系の構築が待望されている。

酵素剤などの生産に広く用いられている糸状菌は，酵母などに比べて遙かに多量のタンパク質を細胞外に分泌する能力を持つ。なかでも麹菌 *Aspergillus oryzae* は，日本において清酒，味噌，醤油などの醸造に古来より用いられている産業微生物であり，麹菌を用いた加工食品の安全性は世界的に高い評価を得ている。これら産業的有用性に加えて，生物学的見地からも液胞機能やタンパク質輸送機構に関する糸状菌特有の現象が報告されている。例えば，菌糸の先端成長，分岐形成，オルガネラの配置，分生子柄の形成などには，液胞による膨圧が重要な役割をしていると考えられている。また，糸状菌は生育可能な環境の pH 領域が広いことから，液胞による pH 調節機能が発達していると考えられる。タンパク質輸送に関しても，菌糸先端部における特異的なタンパク質分泌と細胞成長が示唆されており，酵母や他の微生物とは全く異なる細胞極性が，細胞内小胞輸送やタンパク質分泌に少なからず影響を与えていると予想さ

れる。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* では、液胞酵素 carboxypeptidase Y を細胞外に分泌する 50 以上の *vps* (*vacuolar protein sorting*) 変異株が取得され、それらを解析することによってタンパク質輸送機構や液胞機能などの解析が行われている。しかし現在のところ、麹菌をはじめとする糸状菌の液胞に関する遺伝学的知見は非常に少ない。

本研究では、糸状菌における液胞機能及びタンパク質輸送機構を解明するとともに、麹菌をリソソーム/液胞タンパク質分泌生産の宿主に利用することを目的とした。

1. CPY::EGFP による *A. oryzae* の液胞の可視化

A. oryzae の液胞タンパク質の挙動を可視化するために、*A. nidulans* 由来の液胞内酵素である carboxypeptidase Y (CPY) と蛍光タンパク質 EGFP の融合タンパク質をコードする *cpyA-egfp* 遺伝子を発現ベクター上に構築し、*A. oryzae* NS4 株 (*niaD*, *sC*) を形質転換した。得られた *sC*⁺ の形質転換体 (NSCE1 株) を蛍光顕微鏡で観察したところ、液胞に EGFP 蛍光が認められることを確認した。EGFP 蛍光は、菌糸の基部では大きく発達した液胞を、菌糸先端部においては微分干渉顕微鏡では判別できない様な未発達の小さい液胞をも可視化した。液胞における EGFP の蛍光強度は培養条件によって大きく変動し、例えば、pH 5.5 の酸性培地で培養した場合には蛍光は大変弱くなり、逆に pH 8.0 のアルカリ性培地で培養した場合には強い蛍光が認められた。一般に EGFP の蛍光は酸性下で著しく低下することが知られているが、NSCE1 株より抽出したタンパク質中の EGFP 蛍光も低 pH 感受性を示した。また、GFP 抗体による Western 解析を行ったところ、酸性条件下で生育した NSCE1 株では細胞内の EGFP 量が減少していた。更に、酸性条件下で培養した場合でも、液胞型 ATPase の阻害剤である Bafilomycin A1 を培地中に添加すると、濃度依存的に液胞内の蛍光が強くなった。液胞内の酸性化及びそれによる液胞内プロテアーゼの活性化が、酸性条件下における蛍光低下の原因であると推定した。

NSCE1 株では、通常の球状の液胞以外にチューブ状又はリング状の構造体が EGFP 蛍光によって可視化された。これらの構造体は、液胞などの酸性オルガネラを染色する蛍光色素である CMAC によって染色されなかった。また、チューブ状の構造体を経時的に観察したところ、チューブ状の構造からリング状の構造に変化する様子が観察された。これらの構造体は、窒素源飢餓培地で培養した場合や、最小培地で数日間培養した古い細胞を観察した際に頻繁に出現することから、栄養源の枯渇と関連したものであることが予想された。

2. *A. oryzae* CPY::EGFP 発現株からの *vps* (*vacuolar protein sorting*) 変異株の取得

CPY::EGFP の蛍光を指標として液胞タンパク質を培地中に分泌生産する変異株を取得するために、NSCE1 株の分生子を UV 照射により変異処理した。

酵母の *vps* 変異株には液胞型 ATPase のサブユニットを液胞膜に局在化することが

できないために、液胞内の酸性化ができないものが含まれている。また、麴菌の分生子において CPY::EGFP を液胞に輸送できない変異株は、菌糸において CPY::EGFP を分泌する可能性が高い。EGFP は液胞内の酸性 pH やプロテアーゼの影響によって蛍光強度が低下するので、液胞内の酸性化或いは CPY::EGFP の局在化に異常を持つ変異株では細胞内の EGFP 蛍光が強くなると予想し、変異株ライブラリーから分生子内蛍光の強い *hfc* 変異株 (hyper-EGFP fluorescence in conidia mutants) 18 株を FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorter) を用いて取得した。

また、より単純な発想から、CPY::EGFP を細胞外に分泌する変異株では、細胞内の蛍光が低下することが予想された。そこで *hfc* 変異株とは逆に、分生子内蛍光の弱い *dfc* 変異株 (dark EGFP fluorescence in conidia mutants) 18 株を FACS を用いて取得した。

更に、菌体から細胞外に分泌された CPY::EGFP を直接検出することにより、*vps* 変異株を取得することを試みた。96 穴マイクロプレートの各 well 内で個別に培養された変異株の培地蛍光をマイクロプレート蛍光リーダーを用いて測定し、培地中の EGFP 蛍光が強い *hfm* 変異株 (hyper-EGFP fluorescence in the medium mutants) 22 株を取得した。

3. *A. oryzae vps* 変異株の表現型の解析

各変異株の液体培養時における生育を測定したところ、*hfc-1* 変異株の生育がアルカリ性培地の時に極度に低下することが分かった。また、この変異株の液胞は微分干涉顕微鏡では野生株のものと変わらないが、CMAC による染色が著しく弱いことから、液胞内の酸性化に異常を持つことが示唆された。更に、アルカリ性培養の際の菌体重量当たりの培地中の EGFP 蛍光強度が野生株に比べて約 12 倍に増大していた。*hfc-3* 変異株は酸性条件下で瘤状の菌糸を形成する形態異常を示し、この時に野生株の 2~3 倍の EGFP 蛍光が培地中より検出された。*hfc-4* 変異株はアルカリ性培養の時に多分岐の菌糸を形成する形態異常を起こして液胞のフラグメント化が認められ、この時に野生株の 4 倍程度の EGFP 蛍光が培地中より検出された。*dfc-14* 変異株及び *hfm-4* 変異株は酸性培養時に多分岐を形成し、この時に野生株の 10 倍以上の EGFP 蛍光が培地中より検出された。更に、これら 2 株では、酸性の時にはフラグメント化した液胞に、アルカリ性の時には液胞周辺のドット状の構造に EGFP 蛍光が観察された。*hfm-7* 変異株では酸性アルカリ性両方の培養条件において野生株の 4~6 倍の EGFP 蛍光が培地中より検出された。更に、*hfm-21* 変異株ではアルカリ性培養時に野生株の 40 倍以上の EGFP 蛍光が培地中に検出され、興味深いことに、菌糸先端付近に EGFP 蛍光が観察された。糸状菌ではタンパク質は主に菌糸先端から分泌されると言われているので、CPY::EGFP が菌体外分泌酵素と同様の分泌経路を通して分泌されている可能性が高いと考えられる。また、上記変異株のほとんどで細胞内における CPY::EGFP の安定化が

認められ、液胞酵素の分泌によるタンパク質分解機能の低下が示唆された。更に、CPY::EGFP だけでなく、本来 *A. oryzae* が持つ液胞酵素 Tripeptidylpeptidase I の培地中への生産も認められた。これらの変異株は有用なリソソーム/液胞タンパク質を培地中に分泌生産する宿主としての利用が期待される。

4. *A. oryzae vps* 変異株の原因遺伝子の同定

これまで *A. oryzae* では、有性生活環を持たないことや分生子が多核であることから古典遺伝学による解析が困難なため、遺伝学的研究が遅れていた。実際、*A. oryzae* から多数の変異株が取得されているもののその原因遺伝子を同定した例は殆どない。そこで、*A. oryzae* における変異株の原因遺伝子同定法を確立することを目的として、本研究で取得された *vps* 変異株の原因遺伝子を同定することを試みた。麹菌ゲノムコスミドライブラリーと自律複製領域 *AMA1* を持つプラスミドを用いて、*hfc-1* 変異株を co-transformation した。得られた形質転換体から液体アルカリ性培地で正常に生育する株を取得し、そこからプラスミドを回収した。回収されたプラスミドにはコスミドに挿入されていたと思われるゲノム断片の一部が残っており、麹菌ゲノム情報のデータベースを用いてその配列を検索したところ、その配列付近に細胞内の pH 調節及びゴルジ体から液胞への小胞輸送に関与する酵母の遺伝子と相同性を持つ ORF が見つかった。またこの ORF は、アルカリ耐性形質転換体が持つプラスミドに保持されていることが確認された。現在、この ORF が *hfc-1* 変異株の原因遺伝子かどうかの確認を行っている。

本研究では、産業的に重要な微生物でありながらこれまで遺伝学的研究が遅れていた麹菌を用いて、液胞タンパク質の挙動を可視化する系の構築、CPY::EGFP を指標とした *vps* 変異株の取得と表現型の解析、及びプラスミドレスキューによる原因遺伝子の特定を行った。これにより、麹菌においても酵母と同等の研究が可能であることを示した。本研究で得られた知見が、糸状菌の液胞機能やタンパク質輸送機構の解明の手がかりとなり、産業的にも有効に利用されることが期待される。

1) Ohneda, M., Arioka, M., Nakajima, H., and Kitamoto, K. (2002)

Visualization of vacuoles in *Aspergillus oryzae* by expression of CPY-EGFP
Fungal Genetics and Biology 37 (1) 29-38.

2) Ohneda, M., Arioka, M., and Kitamoto, K.

Isolation and characterization of vacuolar protein sorting mutants from *Aspergillus oryzae* expressing CPY::EGFP (投稿準備中)