

研究種目:基盤研究(S)

研究期間:2006-2010

課題番号:18108002

研究課題名(和文) 麹菌のタンパク質高分泌能の分子細胞生物学的理解とセルファクトリーへの利用

研究課題名(英文) Understanding of high protein secretion capability in *koji* mold by molecular and cellular biology techniques and its use as a cell factory

研究代表者 北本勝ひこ (KITAMOTO KATSUHIKO)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授

研究者番号 20272437

研究分野:農学

科研費の分科・細目:農芸化学・応用微生物学

キーワード:発酵生産、麹菌、タンパク質分泌、細胞工場

1. 研究計画の概要

麹菌 (*A. oryzae*) は、日本酒、味噌、醤油などの醸造に古くから使用されていることから安全が保証されている微生物であり、高いタンパク質分泌生産能力を持つため、酵素などの有用タンパク質生産にも利用されている。本研究は、全ゲノム情報を利用して、麹菌のもつ高いタンパク質分泌能を分子細胞生物学的手法により解析し、有用なタンパク質生産のためのセルファクトリーとして利用しようとするものである。小胞体での分泌タンパク質の品質管理機構、麹菌のタンパク質分泌経路に関わるオルガネラの可視化、分泌されるタンパク質の細胞内動態などを解析することにより、異種タンパク質を高生産する麹菌を分子育種する。

2. 研究の進捗状況

(1) 小胞体での分泌タンパク質の品質管理機構

分泌ストレスの解析

異種タンパク質発現によりおこる分泌ストレスにより変動する遺伝子を麹菌全 DNA 搭載マイクロアレイを用いて解析した。

小胞体における分泌タンパク質の品質管理に関与する遺伝子の機能解析

糖タンパク質品質管理機構に関与する遺伝子(カルネキシン、グルコシダーゼ II サブユニット、サブユニット、UDP-グルコース

-糖タンパク質グルコース転移酵素)の遺伝子を単離し、局在解析、遺伝子破壊による機能解析を行った。

(2) タンパク質分泌経路に関わるオルガネラの可視化

19個の SNARE タンパク質遺伝子を単離し、その N 末に EGFP を融合したタンパク質として発現させ、それらの局在の可視化に成功した。これにより、核、小胞体、ゴルジ体、液胞などのオルガネラの局在を糸状菌で初めて明らかにした。

(3) 分泌に対するエンドサイトーシスの働き

エンドサイトーシスに関与する遺伝子の条件発現株を作成することにより、その機能について解析を行った。麹菌の菌糸先端部位で活発にエンドサイトーシスが起きていることを見だし、高分泌能を維持するのに重要であることを示唆する結果を得た。

(4) 異種タンパク質高生産のための高機能宿主の開発

プロテアーゼ 2 重破壊株 (NS-tApE 株) を親株として、変異処理により異種タンパク質を高生産する変異株 (AUT 株) を取得した。

プロテアーゼ 2 重破壊株 (NS-tApE 株) をもとに、さらに 3 つのプロテアーゼ遺伝子の多重破壊を行い、異種タンパク質の生産性がさらに向上したプロテアーゼ 5 重破壊株を取得した。

異種タンパク質を高生産させるため アミラーゼ遺伝子を RNAi により発現抑制することにより、異種タンパク質生産が増大することを明らかにした。

(5) 育種した麹菌による分泌生産

上記のように取得した株により味覚修飾活性をもつ植物由来のネオクリンやミラクリンを培地中に活性のあるタンパク質として生産することに成功した。

3. 現在までの達成度

当初の計画以上に進展している。

(理由)

これまで一般に、糸状菌では遺伝子のターゲティング効率が非常に低いことが、遺伝子操作が酵母のように簡便に進まないことの大きな原因であった。4年ほど前に非相同性配列の組換えに関する遺伝子に変異を入れることにより、ターゲティング効率が向上する事が知られるようになり、様々な糸状菌でも利用されるようになっていく。麹菌においても、その変異を導入した株を作成することにより、酵母と同様に遺伝子破壊を効率よく行うことが可能となった。また、マーカーサイクルも効率よく行える系を構築することにも成功したことから、麹菌の遺伝子操作が極めて迅速に行えるようになり、研究開始時点に比べて大幅な実験のスピードアップがはかられた。

4. 今後の研究の推進方策

(1) 分泌小胞の細胞内の動きを光変換型蛍光タンパク質等を用いて、詳細に解析する。

(2) 小胞輸送に關与するタンパク質の機能解析を進める。

(3) タンパク質分泌時に起こる分泌ストレスの解析を進める。

(4) 上記の知見をもとにして異種タンパク質をさらに効率よく生産することのできる宿主を開発する。

5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 25件)

1) Construction of quintuple protease gene disruptant for heterologous protein production in *Aspergillus oryzae*

J. Yoon, S. Kimura, J. Maruyama, K. Kitamoto, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 82, 691-701 (2009) (査読有り)

2) Endocytosis is crucial for cell polarity and apical membrane recycling in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*

Y. Higuchi, J. Shoji, M. Arioka, K. Kitamoto, *Eukaryot. Cell*, 8, 37-46(2009) (査読有り)

3) Multiple gene disruptions by marker recycling with highly efficient gene-targeting background (ligD) in *Aspergillus oryzae*

J. Maruyama, K. Kitamoto, *Biotechnol Lett.*, 30, 1811-1817 (2008) (査読有り)

4) 糸状菌オルガネラの形態とその極性依存的な配置 - 麹菌の小胞輸送経路の解析からみえてきたもの

正路淳也、樋口裕次郎、丸山潤一、北本勝ひこ、*蛋白質核酸酵素*, 53, 753-759 (2008)

5) Systematic analysis of SNARE localization in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*

M. Kuratsu, A. Taura, J. Shoji, S. Kikuchi, M. Arioka, K. Kitamoto, *Fungal Genet Biol.*, 44, 1310-1323 (2007) (査読有り)

[学会発表](計 52件)

1) 麹菌 *A. oryzae* のプロテアーゼ遺伝子多重破壊株の育種とウシキモシンの生産、尹、丸山、北本、農芸化学学会大会 (平成21年3月27日~29日 福岡)

2) 麹菌 *A. oryzae* における菌糸先端部でのエンドサイトーシスの解析、樋口、有岡、北本、農芸化学学会大会 (平成21年3月27日~29日 福岡)

3) 麹菌 *Aspergillus oryzae* の ligD 遺伝子欠損によるプロテアーゼ遺伝子多重破壊株の取得 尹載宇、丸山潤一、北本勝ひこ、生物工学会大会 (平成20年8月27日~29日 仙台)

4) 麹菌 *A. oryzae* におけるエンドソーム局在 SNARE の機能解析、早川、樋口、正路、有岡、北本、農芸化学学会大会 (平成20年3月26日~29日 名古屋)

5) RNAi による麹菌 *A. oryzae* の α -amylase 発現抑制と異種タンパク質生産量の向上、根本、丸山、有岡、北本、農芸化学学会大会 (平成20年3月26日~29日 名古屋)