

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月3日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23658069

研究課題名（和文）糸状菌特異的なオートファジーの機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of the autophagy specific to filamentous fungi

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

研究成果の概要（和文）：オートファジーの分子生物学的解析は酵母で始められ、現在までに、酵母、動物、植物においてその重要性が次々に明らかにされているが、糸状菌でのオートファジーの研究は数少ない。麹菌などの糸状菌は、多細胞からなる菌糸を形成し、環境に応答して分生子形成など形態分化をする。麹菌ゲノム情報を利用して麹菌の様々なオートファジー関連遺伝子を単離し、その機能解析をすることにより、糸状菌特異的なオートファジーの役割を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Molecular biology of autophagy has started using yeast *S. cerevisiae*, and its important roles in eukaryotes have been revealed in not only yeast but also mammalian cells. However, little is known about filamentous fungi. Filamentous fungi such a Koji mold, *Aspergillus oryzae* differentiates into conidia formation upon environmental change. Many autophagy-related genes from *A. oryzae* were isolated and characterized. Function and roles of autophagy specific to filamentous fungi have been analyzed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：応用微生物学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：麹菌、オートファジー、糸状菌

1. 研究開始当初の背景

オートファジーの分子生物学的解析は酵母で始められ、現在までに、酵母、動物においてその重要性が次々に明らかにされているが、多細胞からなる糸状菌でのオートファジーの研究は遅れており、*Neurospora*, *Podospora*, *Aspergillus*などで、研究が始められたばかりであった。これまでオートファジー関連遺伝子として、*A. oryzae* から *Aovam3*, *Aoatg8* の機能解析を行い、分生子

形成や、分生子からの発芽においてオートファジーがきわめて重要な働きをしていることを明らかにしていた。また、麹菌は酵母などと同様に、栄養源飢餓条件下では、ミトコンドリア、ペルオキシソームなどがオートファジーにより液胞に取り込まれることを報告しているが、最近、基部の細胞では、上記のオルガネラその他、核が丸ごとオートファゴソーム膜に包まれて液胞に取り込まれることを発見した。

2. 研究の目的

麴菌などの糸状菌は、多細胞からなる菌糸を形成し、環境に応答して分生子形成など形態分化をする。そこで、ゲノム情報を利用して麴菌の様々なオートファジー関連遺伝子を単離し、その機能解析をすることにより、糸状菌特異的なオートファジーの役割を明らかにすることを目的とした。また、酵母でよく知られている cvt 経路関連のホモログ遺伝子はゲノム情報から、麴菌などの糸状菌にはみつからない。一方、cvt 経路で運ばれるアミノペプチダーゼのホモログは麴菌にも存在し、栄養条件下で液胞に運ばれることを観察している。そこで、糸状菌での cvt 経路に関わる特異的な遺伝子を探索することも目的とした。

3. 研究の方法

(1) 麴菌からオートファジーの各ステップごとの遺伝子の単離と破壊株による機能解析

初期ステップ(誘導)として *Aoatg1* と *Aoatg13* を、中期ステップ(オートファゴソーム形成)として *Aoatg4*、後期ステップ(液胞内での分解)として *Aoatg15* 遺伝子等の単離と破壊株の作成を行い、その表現型の解析から麴菌における役割を明らかにする。

(2) 麴菌の核のオートファジー(Nucleophagy)による分解、利用

核とオートファゴソームを同時に観察するため、*mDsRed H2B*、*EGFP-Aoatg8* 等を同時に発現する株の作製を行い、様々な環境下での核の取り込みの詳細な観察を行う。

(3) 麴菌における cvt 経路等の選択的オートファジーの探索

① 酵母で cvt 経路で運ばれるアミノペプチダーゼ (*Ape1*)、 α -マンノシダーゼ (*Ams1*) の麴菌ホモログ遺伝子の単離、ならびにこれらの他の cvt 経路で運ばれる可能性がある酵素遺伝子の単離を試みる。

② 酵母の cvt 経路でのレセプターである *ATG19* の麴菌ホモログの探索
麴菌ゲノム情報からは、*ATG19* ホモログは見いだされない。そこで、*AoApe1* や *AoAms1* を bait として酵母ツーハイブリッド法により、機能的なホモログの探索を行なう。

(4) 麴菌から選択的オートファジーに必要な *atg* 遺伝子の探索

ゲノム情報からは見いだされない上記遺伝子を機能的な方法などから探索を行なう。

4. 研究成果

麴菌からオートファジーの各ステップご

との遺伝子の単離と破壊株による機能解析を行った。初期ステップ(誘導)として *Aoatg1* と *Aoatg13* を、中期ステップ(オートファゴソーム形成)として *Aoatg4*、後期ステップ(液胞内での分解)として *Aoatg15* 遺伝子の単離と破壊株の作成を行った。解析した遺伝子破壊株は、程度の差はあるものの、分生子形成に欠損がみられた。

核とオートファゴソームを同時に観察するため、*mDsRed-H2B* と *EGFP-Aoatg8* を同時に発現する株の作製を行い、様々な環境下での核の取り込みの詳細な観察を行った。これらの結果から、一つの細胞に複数(約5から約10)の核をもつ麴菌は、栄養枯渇条件下では、核をまるごとオートファゴソームで取り囲み、液胞に運び込み分解していることを詳細に観察する系を構築できた。

酵母で cvt 経路で運ばれるアミノペプチダーゼ (*Ape1*)、 α -マンノシダーゼ (*Ams1*) の麴菌ホモログ遺伝子 (*Aoape1*, *Aoams1*) を単離し、麴菌においても cvt 経路が存在することを明らかにした。*AoApe1* および *Aoatg8* を bait として酵母ツーハイブリットスクリーニングを行い、麴菌での cvt 経路のレセプターの探索を試みたところ、候補遺伝子が複数えられたが、レセプター遺伝子として確定できるものは取得できなかった。

酵母での選択的オートファジーの認識アダプターである *ATG11* の麴菌ホモログ *Aoatg11* 遺伝子を単離し、機能解析を行った。*Aoatg11* 破壊株ではマイトファジーやペキソファジーで液胞への取り込み遅延が認められ、選択的オートファジーに関与していることを明らかにした。

さらに、*Pichia* 酵母でペキソファジーに関与しているが *S. cerevisiae* ではオートファジーに関与していないといわれている *ATG26* のホモログ *Aoatg26* 遺伝子の機能解析を行い、本遺伝子が糸状菌ではオートファジーで重要な働きをしていることを発見した。

上記の研究などから、オートファジーが、麴菌による異種タンパク質生産のボトルネックのひとつになっているのではないかと考え、麴菌の異種タンパク質生産性についてオートファジー欠損株を用いて検討した。まず、オートファジー関連遺伝子 (*Aoatg1* *Aoatg4* *Aoatg8* *Aoatg15* 遺伝子) 破壊株を作製し、それぞれの遺伝子破壊株で異種タンパク質のモデルとしてウシキモシンを発現させた。その結果、親株と比較して生産量

が2～3倍に増加することを見いだした。しかし、麴菌のオートファジー欠損株は、通常の培地での増殖は野生株と差はないものの、分生子をほとんど形成しない。このため、これらの株を工業的な規模で異種タンパク質生産に用いる場合、植菌のために必要な分生子を十分に得ることが困難であるという問題が生じるので、これらのオートファジー関連遺伝子が、分生子形成時には発現し、ウシキモシン生産時は発現しないように制御できる株 (*thiA* プロモーターを用いた *Aoatg* 遺伝子発現制御株) を作製した。その結果、十分量の分生子を得ることができ、またウシキモシン生産量が破壊株と同程度まで増加する実用的異種タンパク質生産株の育種に成功した。

分泌タンパク質は、小胞体で適切な形に折りたたまれることにより機能的なタンパク質として分泌経路の次のステップであるゴルジ体へと輸送される。しかし、異種タンパク質を多量に発現させるとその折りたたみが間に合わず、小胞体内部で凝集体を形成するものが多くなり、そのようなものはオートファジーで分解されると考えられた。オートファジーを抑制した場合、凝集タンパク質が分解されないため、小胞体内で折りたたみが何度も行われ適切な形になることにより、多量に発現した異種タンパク質が分泌経路にのり菌体外に分泌されると考えられた。

本成果は、糸状菌においてオートファジーに関する基礎生物学的研究から、糸状菌における異種タンパク質生産という応用的研究の成果を得た初めての研究といえる。

5. 主な発表論文等

(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4件)

① **Enhanced production of bovine chymosin by autophagy deficiency in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*** J. Yoon, T. Kikuma, J. Maruyama, K. Kitamoto *PLoS ONE*, 8(4), e62512 (2013), doi: 10.1371 査読有り

② **Functional analysis of *Aoatg1* and detection of the *Cvt* pathway in *Aspergillus oryzae*** S. Yanagisawa, T. Kikuma, K. Kitamoto *FEMS Microbiol. Lett.*, 338, 168-176 (2013) 査読有り

③ **Autophagy delivers misfolded secretory proteins accumulated in endoplasmic reticulum to vacuoles in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*** S. Kimura, J. Maruyama, T. Kikuma, M. Arioka, K.

Kitamoto *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 406, 464-470 (2011) 査読有り

[学会発表] (計3件)

① 麴菌 *A. oryzae* におけるオートファジー欠損株を用いた異種タンパク質の生産性向上 尹 載宇、○菊間 隆志、柳沢 晋、丸山潤一、北本 勝ひこ 日本生物工学会大会(平成23年9月26日～28日 東京)

② 誘導プロモーターを用いたオートファジー制御による麴菌からの実用的異種タンパク質高生産宿主の造成 ○菊間 隆志、尹 載宇、丸山潤一、北本 勝ひこ 日本農芸化学会大会 (平成24年3月22～25日 京都)

③ 麴菌 *A. oryzae* における選択的オートファジー関連遺伝子 *Aoatg11* の機能解析 ○田所 隆之、菊間 隆志、北本 勝ひこ 日本農芸化学会大会 (平成24年3月22～25日 京都)

[図書] (計1件)

① GFPを用いた麴菌のオルガネラの可視化とオートファジー 菊間隆志、丸山潤一、北本勝ひこ 改訂版 分子麴菌学、日本醸造協会、131-143 (2012)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等
http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/Lab_Microbiology/hyousi.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北本勝ひこ (KITAMOTO, Katsuhiko)
東京大学・農学生命科学研究科・教授
研究者番号：20272437

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：