

令和元年5月27日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07663

研究課題名(和文) 有用糸状菌のミトコンドリア機能を利用した生育促進

研究課題名(英文) Development of fugal growth through the function of mitochondria

研究代表者

金丸 京子 (Kanamaru, Kyoko)

名古屋大学・生命農学研究科・講師

研究者番号：00420365

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリアが機能を失って膜電位レベルが低下すると、ATP合成量が減少し、通常フィラメント状であるミトコンドリアが断片化、活性酸素種(ROS)が発生してタンパク質やDNAが酸化されるなど、さまざまな変化が細胞にとってダメージとなり、細胞死を引き起こす。本研究では、モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* の環境応答因子 HysA が環境変化に応じてミトコンドリア機能を調節することを解析した。ストレス環境下でも生育が低下しない HysA 変異株の培養条件を確立し、麹菌 *Aspergillus oryzae* の固体培養の改善に利用することをめざした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

酵母やヒトなどの高等真核生物を中心に、細胞周期やアポトーシス、細胞内カルシウム濃度の調節など、ミトコンドリアがATP合成以外のさまざまな生命現象にも関与することが明らかになっている。糸状菌の生育にもミトコンドリアが不可欠であることは知られているが、酸素を必要としない培養がこれまで重要視されていたため、機能について不明な点が多い。本研究では、環境応答因子である HysA によるミトコンドリア機能調節を解析し、糸状菌の生育分化におけるミトコンドリアの生理的役割を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：When mitochondria lose function and level of the membrane potential decreases, the amount of ATP decreases, and mitochondria, which are usually filamentous, become fragmented. Reactive oxygen species (ROS) are also generated, and proteins and DNA are oxidized by them. These all changes can damage cells and cause cell death. In this study, we analyzed that a histidine kinase HysA of the model filamentous fungus *Aspergillus nidulans* regulates mitochondrial function in response to environmental changes. We established culture conditions of HysA mutant that does not reduce growth even under stress environment, and aimed to use it for improving solid culture of *Aspergillus oryzae*.

研究分野：応用微生物学

キーワード：糸状菌 ミトコンドリア 環境応答

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

糸状菌は、空気中に伸長した菌糸（気中菌糸）の先端に無性孢子である分生子を形成し、空気中に放出する（無性生殖期）（図1）。気中菌糸の先端には膜電位を発生したミトコンドリアが局在し、分生子形成に必要な ATP のエネルギーを細胞に供給する。

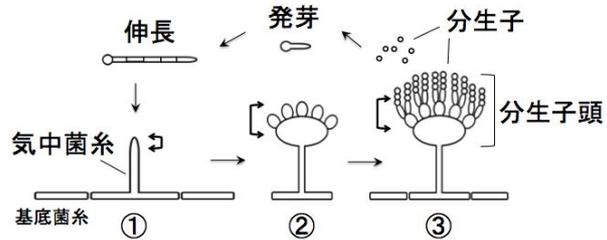


図1 *Aspergillus nidulans* の無性生殖期

□の部位にミトコンドリアが局在

一般に、ミトコンドリアが機能を失って

膜電位レベルが低下すると、ATP 合成量が減少し、通常フィラメント状であるミトコンドリアが断片化、活性酸素種 (ROS) が発生してタンパク質や DNA が酸化されるなど、さまざまな変化が細胞にとってダメージとなり、細胞死を引き起こす。

モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* の環境応答因子である HysA の欠損株を Mito Tracker Red で染色し、膜電位を発生したミトコンドリアを検出すると、過分極や脱分極を示して膜電位が安定でないこと、その変化が菌糸や分生子の形態形成に大きく影響することを顕微鏡下で観察した（菌糸の肥大化や分岐化、分生子形成部位（分生子頭）の形態異常など）。HysA タンパク質は、環境変化に応答して自己リン酸化し、下流の因子にリン酸基を転移することで情報を細胞内に伝達する環境応答機構のセンサータンパク質である。すなわち、HysA は環境の変化に応じてミトコンドリア機能を調節し、糸状菌の正常な生育を促す重要な因子であると考えられる。

そこで本研究では、糸状菌の生育を促進する新たな手段として、HysA を介したミトコンドリア機能調節に着目した。ストレス環境下でも生育が低下しない HysA 変異株の培養条件を確立し、麹菌 *Aspergillus oryzae* の固体培養の改善に利用することにした。

2. 研究の目的

(1) HysA 変異によるミトコンドリア機能変化と生育速度への効果

HysA 欠損株は、2% エタノールを含むストレス培地で、気中菌糸や分生子の形成速度が野生株より速い。HysA 欠損株のミトコンドリア膜電位は安定ではないものの、生育環境の変化（ストレス）による低下が起きない可能性が考えられた。酢酸やグリセロールなどの他の炭素源や酸化剤の添加、高浸透圧条件など、野生株において膜電位が低下する複数のストレス培地でも生育速度を比較することにした。さらに、HysA の機能変異（環境変化の認識や情報伝達、細胞内局在などの変異）についても検討した。

(2) ミトコンドリア機能低下による生育阻害に関する因子の同定と利用

ミトコンドリア膜電位の調節能が低下した HysA 変異株において、ストレス条件下でも生育が低下しないことはカビにとっては正常ではないため、高い頻度で分生子形成が低下した株が出現する。生育環境に応じて膜電位を調節できないと障害が発生し、新たに別の変異によって生育停止を促すと考えられる。その変異部位を同定し、ミトコンドリア機能を介した生育のコントロールを明らかにすることにした。

(3) ミトコンドリア機能を利用した麹菌固体培養の改良

植物性バイオマスの糖化酵素（セルラーゼ、キシラナーゼ、アミラーゼ）を高生産する麹菌 *Aspergillus oryzae* は、米ぬかや小麦フスマの固体培養で良好な生育を示す。しかし、固体培養槽の内部は、低酸素、低栄養、あるいは物質の流動性が低いため部分的に高浸透圧の状態、一定環境が保たれていないストレスな環境である。麹菌においても HysA 変異によるミトコンドリア機能改変を行い、環境変化に影響されない固体培養で糖化酵素の生産性が向上するか検討

することにした。

3. 研究の方法

ミトコンドリア機能が糸状菌の生育分化に与える影響を理解するために、以下の3つの実験を実施した。

(1)ミトコンドリア膜電位の定量比較

HysA 欠損株では、分生子を活発に形成する分生子頭でミトコンドリア膜電位が部分的に低下したり、逆に、すでに生育を停止した菌糸や分生子で高い活性を示したりと生育や分化に対応した調節ができない。糸状菌におけるミトコンドリア機能と生育速度との関係を理解するためには、ミトコンドリアの膜電位変化を定量化する必要があったため、以下の複数の方法を試みた。

Mito Tracker Red 染色の蛍光強度の数値化

ミトコンドリアで合成される ATP 量の測定

ミトコンドリアから遊離する ROS によって酸化されたタンパク質の検出

活性を失って断片化したミトコンドリアの割合

では、無性生殖期の *A.nidulans* のミトコンドリアを Mito Tracker Red で染色し、顕微鏡観察で得られた画像データの蛍光強度を Image J などの解析ソフトを用いて数値化を試みた。分生子は形態的にほぼ均一であるため、分生子のミトコンドリア染色から統計的なデータを得ることにした。

はミトコンドリアの活性評価として一般的で、ルシフェラーゼの発光反応に ATP が必須であることを利用した。

タンパク質の酸化としてアルギニン、プロリン、リジンのカルボニル化がある。2,4-ジニトロフェニルヒドラジン (DNPH) を用いてカルボニル基を誘導体化し、抗 DNP 抗体で検出した。

CoxA (チトクローム C オキシダーゼ) と GFP (緑色蛍光タンパク質) の融合タンパク質を糸状菌に導入し、GFP シグナルを指標にミトコンドリア形態を観察した。液体培地で分生子を発芽伸長させ、断片化ミトコンドリアの割合を顕微鏡下でカウントすることで定量化を試みた。上記 から について、HysA のシグナル認識、情報伝達、細胞内局在の変異株も併せて検討した。

(2)HysA 変異株に生じる新たな変異の同定

使用した変異株として、HysA の欠損株、リン酸リレーによる情報伝達に機能する自己リン酸化部位とリン酸基転移部位の各アミノ酸置換株を用いた。培養の過程で分生子形成が低下した株はリン酸基転移部位の置換株から出現した。複数単離された変異株について、変異部位の同定を試みるとともに、様々なストレス培地に対する感受性をテストした。

(3)麹菌 HysA オルソログの同定と固体培養への応用

麹菌 *A.oryzae* は *A.nidulans* の類縁菌であり、麹菌にも HysA のオルソログ (AoHysA) が存在することが考えられた。しかしながら、*A.nidulans* には HysA と同じ環境センサー (ヒスチジンキナーゼ) のファミリーに分類される遺伝子が 8 つ存在するため、アミノ酸配列の特徴から麹菌の AoHysA を推定することができない。複数存在する麹菌の候補遺伝子を *A.nidulans* の HysA 欠損株に導入し、膜電位の不安定性を相補するかで AoHysA を同定することにした。同定した AoHysA 遺伝子の欠損株を麹菌で構築し、ミトコンドリアの機能変化を確認後、固体培養を行うことにした。固体培養後の菌体量の測定や回収分生子の数および糖質分解酵素の生産量 (アミラーゼ活性やセルラーゼ、キシラナーゼ活性測定による定量) を野生株と比較し、麹菌固体培養におけるミトコンドリア機能について明らかにすることにした。

(4)SOD 欠損によるミトコンドリア機能への直接的な影響の観察

HysA は環境センサーであり、制御下遺伝子の発現を調節することで環境応答に機能する因子である。すなわち、HysA 変異株によるミトコンドリア機能変化は制御下遺伝子の発現異常によると考えられる。HysA の制御下遺伝子が複数存在すると、ミトコンドリアと関連しない変化によって明確な結果が得られないことが推定された。糸状菌の生育への直接的な影響を理解するために、ミトコンドリアマトリックスに局在する活性酸素種除去酵素、スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) の破壊株を作成し解析することにした。

4. 研究成果

(1)ミトコンドリア膜電位の定量比較

Mito Tracker Red 染色の蛍光強度の数値化

寒天培地で培養後の *A. nidulans* から回収した分生子を Mito Tracker Red で染色し、蛍光顕微鏡下で観察すると、直径約 2 μm の分生子の内部がさまざまに偏って染色され、野生株でもそれぞれの分生子内でミトコンドリアの活性や局在部位が均一でないことが確認できた。HysA 破壊株の分生子での偏りは野生株に比べてさらに極端であった。ミトコンドリアの活性や局在部位を定量的に比較するために、電子伝達系複合体 IV 構成因子であるチトクローム C オキシダーゼ (CoxA) と GFP の融合タンパク質を用いることにした。CoxA-GFP のシグナル強度が分生子内のミトコンドリア量を反映すると判断し、GFP の蛍光強度に対する Mito Tracker Red 染色の強度の割合を算出し比較した。測定に用いた野生株の分生子数 1113 個の平均の値は 1.42 ± 0.024 であった。HysA 欠損株の分生子数 1745 個の平均の値は 0.959 ± 0.015 であり、野生株の 32.4% の減少を示した。ただし、破壊株の分生子で頻繁に観察される極端に強い蛍光シグナルが単純な定量化の平均値では反映されないため、定量化には検討を加える必要があった。

ミトコンドリアで合成される ATP 量の測定

液体培養後の菌体から全タンパク質を抽出し、一定タンパク質量あたりの ATP 量を測定した。破壊株は正常な生育を示すにもかかわらず、野生株の 10% 程度の ATP 合成量であった。ATP 量の減少は生育に大きく影響しないことが明らかになった。糸状菌においてミトコンドリアはエネルギー獲得以外で重要な役割を担うことを意味する。今後は、生育に酸素の存在が大きく影響する寒天培地で培養した菌体や分生子を用いて ATP 測定を試みる。

ミトコンドリアから遊離する ROS によって酸化されたタンパク質の検出

液体培養した菌体からタンパク質を抽出し SDS-PAGE 後、メンブレンに転移した。DNPH を用いて誘導体化し、カルボニル化を抗 DNP 抗体で検出した。抽出したタンパク質を核、細胞質、ミトコンドリアに分画するとミトコンドリア画分に強いシグナルを検出した。さらに液体培養に過酸化水素を添加するとミトコンドリア画分でさらに強いカルボニル化を検出した。しかしながら、野生株と HysA 破壊株でカルボニル化の程度に差異が認められなかった。カルボニル化はミトコンドリア機能低下の指標にはならないことが明らかになった。

活性を失って断片化したミトコンドリアの割合

CoxA-GFP の融合タンパク質を利用して、各生育段階にある糸状菌のミトコンドリア形態を観察した。通常、フィラメント状の正常なミトコンドリアもしくは断片化や融合し、菌体内で不均一に分布した機能低下のミトコンドリアを検出することが可能である。寒天培地上で生育した無性生殖期の糸状菌を顕微鏡下で観察し、GFP シグナルが不均一である分生子柄の数を測定した。野生株においても生育の過程でミトコンドリア機能が低下するため、観察した 25 のうち 32% の分生子柄にシグナルの偏りが観察された。それに対して HysA 破壊株では 88% の偏りが確認できた。

以上、HysA の情報伝達の変異株も併せて検討したところ、ミトコンドリアの機能低下の定量化には、 から の結果を総合的に判断する方が適切であると結論した。

(2)HysA 変異株に生じる新たな変異の同定

HysA のリン酸基転移部位の置換株 HysADN から分生子形成能が低下した株が得られた。その変異部位の同定を試みるとともに、ストレス培地に対する感受性をテストした。hysA 遺伝子内には元のアミノ酸置換を生じさせる変異以外に変化を認めなかった。hysA 遺伝子以外の染色体上に何らかの変異が生じたと考えられる。また、野生株や HysA 欠損株、元の HysADN 株と比較して過酸化水素に対する耐性が確認された。今後、変異の同定には全塩基配列の決定を行う必要があるが、さらに複数の変異株を単離し表現型の変化を検討することで、変異の生じた遺伝子がミトコンドリア機能低下による生育抑制に関与する因子か判断する。

(3)麹菌 HysA オルソログの同定と固体培養への応用

麹菌 *A. oryzae* の HysA のオルソログ (AoHysA) として 8 つの候補遺伝子が存在する。候補遺伝子を *A. nidulans* の HysA 欠損株に導入し、膜電位の不安定性を相補するかで AoHysA の同定を試みた。8 つの候補遺伝子クローニングし HysA 欠損株に導入した株の作成は完了し、膜電位の低下を相補するかを検証中である。麹菌での HysA の発現や機能が *A. nidulans* と異なる可能性があり、膜電位の変化を観察する培養条件を検討する必要がある。候補遺伝子 8 つの破壊株を麹菌において作成しミトコンドリア機能への影響を検証していく。

(4)SOD 欠損によるミトコンドリア機能への影響

SOD はスーパーオキシドアニオンを過酸化水素に変換する重要な抗酸化酵素である。一般的にミトコンドリアの膜間腔には SodA、マトリックスには SodB がそれぞれ局在し、ROS の除去に機能している。ただし、SodA は細胞質にも多く存在する。出芽酵母の Sod1 と Sod2 に多くの報告があるが、同じ真菌の糸状菌ではほとんど研究されていない。近年、動物細胞やガン細胞を中心に活性酸素種に関するさまざまな研究が進行しており、糸状菌の SOD を解析することでミトコンドリア機能について新たな知見が得られることが期待された。そこで、麹菌において *sodA*, *sodB* の欠損株を作製し生育への影響を観察することにした。その結果、それぞれの欠損株はミトコンドリア内で ROS を発生させる酸化剤のメナジオンに対して感受性を示し、*sodB* の欠損株についてはエタノールを単一の炭素源にして生育することができなかった。ミトコンドリアでの ROS の除去が麹菌の生育に重要であることが示された。今後は、植物バイオマスを用いた固体培養で *sodA*, *sodB* 欠損の影響を詳細に解析する予定で、ミトコンドリア機能を利用して麹菌の産業利用が向上すると期待する。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

(1) Kunitake E, Li Y, Uchida R, Nohara T, Asano K, Hattori A, Kimura T, Kanamaru K, Kimura M, Kobayashi T: CreA-independent carbon catabolite repression of cellulase genes by trimeric G-protein and protein kinase A in *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet* DOI: 10.1007/s00294-019-00944-4 (2019) 査読あり

(2) Ishikawa K, Kunitake E, Kawase T, Atsumi M, Noguchi Y, Ishikawa S, Ogawa M, Koyama Y, Kimura M, Kanamaru K, Kato M, Kobayashi T: Comparison of the paralogous transcription factors AraR and XlnR in *Aspergillus oryzae*; *Curr Genet*, 64, 1245-1260 (2018) 査読あり

〔学会発表〕(計 7 件)

(1) 玉城彰悟、李諾、國武絵美、金丸京子、木村眞、小林哲夫：糸状菌 *Aspergillus nidulans*

におけるマンナーゼ遺伝子群の発現制御機構、日本農芸化学会 2019 年度大会、2019 年 3 月、東京

(2) 玉城彰悟、李諾、國武絵美、金丸京子、木村眞、小林哲夫：糸状菌 *Aspergillus nidulans* におけるマンナーゼ分解酵素遺伝子群の転写因子 ManS の DNA 結合特性、第 18 回糸状菌分子生物学コンファレンス、2018 年 11 月、新潟

(3) 前田祐未子、金丸京子、木村眞、小林哲夫：糸状菌におけるミトコンドリア局在性 Superoxide dismutase (Mn-SOD) の機能的役割、日本農芸化学会 2018 年度大会、2018 年 3 月、名古屋

(4) 金丸京子、平川卓実、木村眞、小林哲夫：His-Asp リン酸リレー情報伝達機構を介した糸状菌ミトコンドリアの機能調節、日本農芸化学会 2018 年度大会、2018 年 3 月、名古屋

(5) 金丸京子、木村眞、小林哲夫：His-Asp リン酸リレー情報伝達機構を介した糸状菌ミトコンドリアの機能調節、日本農芸化学会中部支部例会、2017 年 9 月、名古屋

(6) 金丸京子、稲葉真由子、木村眞、小林哲夫：*Aspergillus nidulans* のミトコンドリア機能調節と菌体内分布、第 16 回糸状菌分子生物学コンファレンス、2016 年 11 月、京都

(7) 金丸京子、林早紀、小島憲介、平川卓実、木村眞、小林哲夫：糸状菌の環境応答におけるミトコンドリアの機能的役割、日本農芸化学会中部支部例会、2016 年 9 月、名古屋

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。