

機関番号： 12601
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

研究成果の概要(和文)：麹菌 (*Aspergillus oryzae*) は日本酒、醤油、味噌などの醸造に使用されている重要な微生物であり、大量に酵素などのタンパク質を分泌生産する能力を持つ。最近、解読された全ゲノム情報を利用してタンパク質の分泌経路に関して、分子生物学的及び細胞生物学的手法により解析を行った。これにより得られた成果に基づいて遺伝子破壊や突然変異株の単離などの手法により有用タンパク質を多量に生産する麹菌の育種に成功した。

研究成果の概要(英文)：Koji mold (*Aspergillus oryzae*) has been used for sake, soy sauce, and miso and is one of the most important microorganisms in Japan. *A. oryzae* has an ability of secreting a large amount of useful protein like enzymes. Protein secretion process in *A. oryzae* cell was precisely elucidated by molecular and cellular biological methods using the whole genome sequence information that was recently completed. Based on the results obtained above, koji mold strains producing a large amount of useful protein were successfully bred by gene disruption and mutant isolation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	20,700,000	6,210,000	26,910,000
2007年度	17,000,000	5,100,000	22,100,000
2008年度	17,000,000	5,100,000	22,100,000
2009年度	17,000,000	5,100,000	22,100,000
2010年度	14,500,000	4,350,000	18,850,000
総計	86,200,000	25,860,000	112,060,000

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、タンパク質分泌、タンパク質生産、エンドサイトーシス、小胞体ストレス、細胞工場、緑色蛍光タンパク質、オートファジー

1. 研究開始当初の背景

麹菌 (*Aspergillus oryzae*) は我が国で、日本酒、味噌、醤油などの醸造に古くから使用されている重要な微生物であり、1リットル培養で数グラムという高いタンパク質分泌生産能力を持つため、食品や医療などに利用される様々な有用タンパク質生産の宿主として注目を集めていたが、遺伝学的な解析手

法が確立されていなかったために分子生物学的な研究は非常に遅れていた。

しかし、2005年に麹菌のゲノム解析プロジェクトが完了し、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することが可能となった。

2. 研究の目的

(1) 全ゲノム情報を利用して、麴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する。

(2) 麴菌をタンパク質生産のためのセルファクリーとして利用するために、変異株の取得や遺伝子破壊などにより、異種タンパク質を高生産する麴菌を造成する。

(3) 上記のようにして育種した株により、様々な異種タンパク質の生産を試みる。

3. 研究の方法

(1) 麴菌の全遺伝子(約12000)の配列を搭載したマイクロアレイを作成し、様々な条件下での遺伝子の発現を網羅的に解析する。

(2) 分泌に関与するタンパク質の細胞内局在解析ならびにその挙動を観察するために蛍光タンパク質(EGFPやDsRedなど)との融合タンパク質を発現する麴菌を作成して、蛍光顕微鏡による局在観察(ライブセルイメージング)を行う。

(3) 分泌に関与するタンパク質の機能を解析するために、関連する遺伝子をクローニングし、遺伝子破壊株を作成することにより、その機能を解析する。

(4) 生産したタンパク質を分解してしまう多種類のプロテアーゼ活性をなくすため、該当する遺伝子の多重破壊株を取得する。また、生産に負の働きをする遺伝子を特定し、当該遺伝子の発現制御により異種タンパク質を高生産する株の育種を行う。

4. 研究成果

(1) 様々なウシキモシン発現プラスミド(キモシン単独、キャリアプロテインとの融合タンパクなど)とコントロール株から調製した mRNA を用いて異種タンパク質発現による mRNA 発現の変動を麴菌 DNA マイクロアレイを用いて網羅的に解析を行い、関連する遺伝子を明らかにした。

(2) 麴菌ゲノム解析の結果見いだされた約20種類のSNAREタンパク質についてEGFP融合タンパク質を発現する株を作成して蛍光顕微鏡によりその局在観察を行った。これは、糸状菌で初めて全SNAREタンパク質の網羅的な局在観察に成功したものであり、欧州糸状菌遺伝学会でSNAREタンパク質の局在から全オルガネラの可視化に関して招待講演を行い、参加者から注目をあつめた。SNAREタンパク質のライブセルイメージング観察から、麴菌の詳細な細胞内分泌経路を明らかにした。

(3) EGFPを付加した分泌酵素(α -アミラーゼ、リボヌクレアーゼT1、カルボキシペプ

チダーゼなど)による分泌小胞の動きの可視化を行った。麴菌細胞では、分泌小胞は主として、菌糸先端に運ばれて分泌されることを明らかにした。

また、菌糸先端の他に、一部は隔壁に向かう新たな分泌経路も存在することを糸状菌で初めて明らかにした。本成果を投稿論文(Mol. Microbiol., 81, 40-55 (2011))で発表したところ、特に注目される研究成果として、英国菌学会の会長の Prof. Read による注目される成果として同誌に紹介記事が掲載された。

(4) 麴菌では、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FM4-64染色やAmyB-EGFPやEGFP-Aosnc1の観察により見いだした。これは、麴菌が多量に酵素を分泌生産する能力を維持するためには、先端からの小胞分泌とそれを支えるV-SNAREであるAosnc1がエンドサイトーシスによりリサイクルされることが重要であることを明らかにしたものである。これにより、麴菌のもつ高い分泌能のしくみの一端を明らかにした。

エンドサイトーシスに関連する遺伝子Aoend4、Aoabp1などをクローニングし、それらの機能解析を行った。さらにAoabp1をbaitとして酵母ツーハイブリッド法により新規遺伝子(AipA, AipB, AipC, AipD)を見いだして解析を行った。

(5) 糖タンパク質品質管理機構に関連する4遺伝子(カルネキシン、グルコシダーゼII α サブユニット、 β 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)を麴菌からクローニングし、その遺伝子破壊株を作成して小胞体における品質管理機構への関与を明らかにした。

(6) 生産されたタンパク質を分解してしまうプロテアーゼ遺伝子破壊株を作成した。麴菌では、遺伝子破壊効率の低さが問題であったが、ligD遺伝子破壊により相同組換え効率が飛躍的に向上した株を取得し、さらにpyrGマーカールリサイクル法を組み合わせることにより、プロテアーゼ2重破壊株、続いてプロテアーゼ5重破壊株、さらにプロテアーゼ10重破壊株の造成に成功した。

(7) 液胞タンパク質ソーティングレセプター遺伝子(Aovps10)破壊による異種タンパク質を高生産することを見いだした。

(8) EGFPタグを付加した分泌タンパク質の細胞内挙動の観察から、ERに滞留したものの一部が液胞に運ばれて分解されることを示唆する結果を得た。そこで、

液胞でのバルクな分解に関与しているオートファジー欠損株 (Aogat4, Aogat 8 など) によりキモシンを生産させたところ、約2倍に生産性が向上することを見いだした。

(9) 麹菌は α アミラーゼをコードする遺伝子を3つもち、培地中へ多量の α アミラーゼを生産する。異種タンパク質高生産宿主にとって、この α アミラーゼ生産は抑制されることが望ましい。そこで、RNAiによる α アミラーゼ発現抑制株を育種した。この株を用いることによりウシキモシンが約1.6倍程度に増加することが確認された。

(10) 上記のようにして育種した麹菌を用いて、ウシキモシン、ヒトリゾチーム、味覚修飾タンパク質 (ネオクリン、ミラクリン)、シロアリ由来セルラーゼなどの有用タンパク質の生産に成功した。

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38件)

① A carrier fusion significantly induces unfolded protein response in heterologous protein production by *Aspergillus oryzae*
A. Ohno, J. Maruyama, T. Nemoto, M. Arioka, K. Kitamoto
Appl. Microbiol. Biotechnol., 92, 1197-1206 (2011) 査読有り

② Septum-directed secretion in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*
Y. Hayakawa, E. Ishikawa, J. Shoji, H. Nakano, K. Kitamoto
Mol. Microbiol., 81, 40-55 (2011) 査読有り

③ Functional analysis of the putative AAA ATPase AipA localizing at the endocytic sites in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*
Y. Higuchi, M. Arioka, K. Kitamoto
FEMS Microbiol. Lett., 320, 63-71 (2011) 査読有り

④ 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

⑤ Heterologous expression and characterization of a glucose-stimulated β -glucosidase from the termite *Neotermes koshunensis* in *Aspergillus oryzae*
C. A. Uchima, G. Tokuda, H. Watanabe, K. Kitamoto, M. Arioka
Appl. Microbiol. Biotechnol., 89, 1761-71 (2011) 査読有り

⑥ Disruption of ten protease genes in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae* highly improves production of heterologous proteins
J. Yoon, J. Maruyama, K. Kitamoto
Appl. Microbiol. Biotechnol., 89, 747-759 (2011) 査読有り

⑦ Macroautophagy-mediated degradation of whole nuclei in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*
J. Shoji, T. Kikuma, M. Arioka, K. Kitamoto
PLoS ONE, 5, e15650 (2010) 査読有り

⑧ In vivo imaging of endoplasmic reticulum and distribution of mutant α -amylase in *Aspergillus oryzae*
S. Kimura, J. Maruyama, T. Watanabe, Y. Ito, M. Arioka, K. Kitamoto
Fungal Genet. Biol., 47, 1044-1054 (2010) 査読有り

⑨ Enhanced production and secretion of heterologous proteins by the filamentous fungus *Aspergillus oryzae* via disruption of vacuolar protein sorting receptor gene Aovps10
J. Yoon, T. Aishan, J. Maruyama, K. Kitamoto
Appl. Environ. Microbiol., 76, 5718-5727 (2010) 査読有り

⑩ Promotion of efficient Saccharification with *Aspergillus fumigatus* AfSwol towards crystalline cellulose
X. Chen, N. Ishida, N. Todaka, R. Nakamura, J. Maruyama, H. Takahashi, K. Kitamoto
Appl. Environ. Microbiol., 76, 2556-2561 (2010) 査読有り

⑪ Distinct enzymatic and cellular characteristics of two secretory phospholipases A(2) in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*
T. Nakahama, Y. Nakanishi, A. R. Viscomi, K. Takaya, K. Kitamoto, S. Ottonello, M.

Arioka

Fungal Genet. Biol., 47, 318-331 (2010)

⑫ Isolation of *Aspergillus oryzae* mutants for heterologous protein production from a double proteinase gene disruptant
T. Nemoto, T. Watanabe, Y. Mizogami, J. Maruyama, K. Kitamoto

Appl. Microbiol. Biotechnol., 82, 1105-1114 (2009) 査読有り

⑬ 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

⑭ 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

⑮ Multiple gene disruptions by marker recycling with highly efficient gene-targeting background (Δ ligd) in *Aspergillus oryzae*

J. Maruyama, K. Kitamoto

Biotechnol. Lett., 30, 1811-1817 (2008) 査読有り

⑯ Aggregation of endosomal-vacuolar compartments in the Aovps24-deleted strain in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*

A. Tatsumi, J. Shoji, T. Kikuma, M. Arioka, K. Kitamoto

Biochem. Biophys. Res. Commun., 362, 474-479 (2007) 査読有り

⑰ Double disruption of the proteinase genes, *tpaA* and *pepE*, increases the production level of human lysozyme by *Aspergillus oryzae*

F. J. Jin, T. Watanabe, P. R. Juvvadi, J. Maruyama, M. Arioka, K. Kitamoto

Appl. Microbiol. Biotechnol., 76, 1059-1068 (2007) 査読有り

⑱ 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

⑲ Aovps24, a homologue of VPS24, is required for vacuolar formation which could maintain proper growth and development in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*

A. Tatsumi, T. Kikuma, M. Arioka, K. Kitamoto

Biochem. Biophys. Res. Commun., 347, 970-978 (2006) 査読有り

⑳ Functional analysis of the ATG8 homologue Aogatg8, and role of autophagy in differentiation and germination in *Aspergillus oryzae*

T. Kikuma, M. Ohneda, M. Arioka, K. Kitamoto

Eukaryot. Cell, 5, 1328-1336 (2006) 査読有り

㉑ Development of a versatile expression plasmid construction system for *Aspergillus oryzae* and its application to visualization of mitochondria

Y. Mabashi, T. Kikuma, J. Maruyama, M. Arioka, K. Kitamoto

Biosci. Biotech. Biochem., 70, 1882-1889 (2006) 査読有り

㉒ Extracellular production of neoculin, a sweet-tasting heterodimeric protein with taste-modifying activity, by *Aspergillus oryzae*

K. Nakajima, T. Asakura, J. Maruyama, Y. Morita, H. Oike, A. Shimizu-Ibuka, T. Misaka, H. Sorimachi, S. Arai, K. Kitamoto, K. Abe

Appl. Environ. Microbiol., 72, 3716-3723 (2006) 査読有り

その他 16件 (すべて査読有り)

[学会発表] (計98件)

① 誘導プロモーターを用いたオートファジー制御による麹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)

② 麹菌を用いた異種タンパク質高生産システムの開発

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)

③ Functional analyses of three endocytosis-related components in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*.

K. Matsuo, Y. Higuchi, M. Arioka, K. Kitamoto, 4th Congress of European Microbiologists, FEMS2011 (June 26-30, 2011, Geneva, Switzerland)

④ 麹菌 *A. oryzae* におけるエンドサイトーシス関連因子 AipC および AipD の機能解析
松尾 賢人、樋口 裕次郎、有岡 学、北本 勝ひこ、日本農芸化学会大会 (平成 23 年 3 月 京都)

⑤ Macroautophagy-mediated Degradation of Whole Nuclei in the Filamentous Fungus *Aspergillus oryzae*.

Jun-ya Shoji, Takashi Kikuma, Manabu Arioka, and Katsuhiko Kitamoto, 26th Fungal Genetics Conference at Asilomar (March 15-20, 2011 U. S. A.)

⑥ Septum-directed secretion in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*.

Jun-ya Shoji, Yugo Hayakawa, Eri Ishikawa, and Katsuhiko Kitamoto, 26th Fungal Genetics Conference at Asilomar (March 15-20, 2011 U. S. A.)

⑦ 異種タンパク質を高生産する麹菌 *Aspergillus oryzae* プロテアーゼ遺伝子 10 重破壊株の取得

尹載宇、丸山潤一、北本勝ひこ、日本生物工学会大会 (平成 22 年 10 月 27 日～29 日 宮崎)

⑧ Endocytic recycling at the tip region in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*
Yujiro Higuchi, Katsuhiko Kitamoto, 9th International Mycological Congress: The Biology of Fungi (August 1-6, 2010 Edinburgh, UK)

⑨ Disruption of a vacuolar protein sorting receptor gene, Aovps10, enhances production level of heterologous protein by the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*
Jaewoo Yoon, Tuerxun Aishan, Jun-ichi Maruyama, Katsuhiko Kitamoto, 10th European Conference on Fungal Genetics (29 March - 1 April 2010, Leeuwenhorst, The Netherlands)

⑩ Exploration of components related to endocytosis in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*.

Higuchi Y., Arioka M., Kitamoto K., The

Xth International Fungal Biology Conference

(December 6-10, 2009 Mexico)

⑪ 麹菌 *A. oryzae* における隔壁へ向かう輸送の分子機構の解析

早川 雄悟、石川 絵理、正路 淳也、有岡 学、北本 勝ひこ、日本生物工学会大会 (平成 21 年 9 月 23 日～25 日 名古屋大学東山キャンパス (名古屋市))

⑫ 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 載宇、丸山 潤一、北本 勝ひこ、日本農芸化学会大会 (平成 21 年 3 月 27 日～29 日 福岡)

⑬ Construction of quintuple protease gene disruptant for heterologous protein production in *Aspergillus oryzae*.

Jaewoo Yoon, Shinya Kimura, Jun-ichi Maruyama, and Katsuhiko Kitamoto, The 25rd Fungal Genetics Conference at Asilomar (March 17-22, 2009 U.S.A.)

⑭ 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、日本生物工学会大会(平成 20 年 8 月 27 日～29 日 仙台)

⑮ Impact of a golgi-located protein involved in secretion on morphogenesis of the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*
Jun-ya Shoji, Ayako Taura, Manabu Arioka, Katsuhiko Kitamoto, 9th European Conference on Fungal Genetics (April 5 - 8, 2008 Edinburgh, Scotland)

⑯ 麹菌 *A. oryzae* における Rab GTPase の網羅的局在解析

平田 恭子、正路 淳也、有岡 学、北本 勝ひこ、日本農芸化学会大会(平成 20 年 3 月 26 日～29 日 名古屋)

⑰ Analysis of the endosomal compartments in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*

Yujiro Higuchi, Junya Shoji, Manabu Arioka, Katsuhiko Kitamoto, 3rd European Federation of Biotechnology Conference on Physiology of Yeasts and Filamentous Fungi PYFF3 (June 13 - 16, 2007 Helsinki, Finland)

⑱ 麹菌 *A. oryzae* における Aoend4 条件発現

株を用いたエンドサイトーシスの解析
樋口 裕次郎、正路 淳也、有岡 学、北本 勝
ひこ、日本農芸化学会大会（平成19年3月
24日～27日 東京）

⑭ 麹菌 *A. oryzae* の異種タンパク質高生産
変異株によるキモシンの生産

根本 崇、丸山 潤一、有岡 学、北本 勝ひこ、
日本農芸化学会大会（平成19年3月24
日～27日 東京）

⑮ ゲノム情報を利用した麹菌 SNARE タン
パク質の網羅的局在解析

K. Kitamoto、日本生物工学会大会（平成1
8年9月11日～13日 大阪）

⑯ Visualization of the endocytic pathway
and endosomal structures in the
filamentous fungus *Aspergillus oryzae*

Yujirou Higuchi, Tomoyuki Nakahama,
Junya Shoji, Manabu Arioka, Katsuhiko
Kitamoto, Eighth International
Mycological Congress
(August 20 - 25, 2006 Cairns, Australia)
その他 77件

〔図書〕（計21件）

① 有用タンパク質生産のための麹菌セルフ
ァクトリー（細胞工場）の開発

北本勝ひこ

合成微生物工学の隆起 -有用物質生産の
新たな生産法構築をめざして-、シーエム
シー出版、26-33（2012）

② 改訂版 分子麹菌学

北本勝ひこ 編著

公益財団法人日本醸造協会（2012）

③ 異種タンパク質を高生産する麹菌宿主の
開発

北本勝ひこ、尹載宇

改訂版 分子麹菌学、日本醸造協会、91-99
（2012）

④ 麹菌のタンパク質分泌経路とエンドサイ
トーシス

樋口裕次郎、北本勝ひこ

発酵・醸造食品の最新技術と機能性Ⅱ、シー
エムシー出版、78-85（2011）

⑤ Targeted gene disruption in koji mold
Aspergillus oryzae

J. Maruyama, K. Kitamoto

Strain engineering Methods and protocols,
Edited by J. A. Williams. Humana Press,
447-456（2011）

⑥ タンパク質工場としての麹菌の利用

北本勝ひこ

微生物によるものづくり、シーエムシー出版、
15-23（2008）

⑦ 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）

⑧ Dissecting cellular components of the
secretory pathway in filamentous fungi:
insights into their application for
protein production

J. Shoji, M. Arioka, K. Kitamoto

Biotechnol. Lett., 30, 7-14（2008）

その他 13件

〔産業財産権〕

○出願状況（計2件）

名称：異種タンパク質を高生産する麹菌変異
株

発明者 北本勝ひこ、有岡学、丸山潤一、渡
辺泰祐、溝上豊

権利者：東京大学

種類：

番号：JP2007052715

出願年月日：2007年2月15日

国内外の別：国内 及び 国外

名称：異種タンパク質を高生産する麹菌の育
種方法

発明者 北本勝ひこ、尹 戴宇、丸山 潤
一、菊間 隆志

権利者：国立大学法人 東京大学

種類：

番号：

出願年月日：2011年3月1日

国内外の別：国内 B

〔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・大学院農学生命科学研究科・教
授 研究者番号：20272437

(2) 研究分担者

有岡 学 (ARIOKA, Manabu)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准
教授 研究者番号：20242159