

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 5 月 10 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：23658071

研究課題名（和文） “不完全菌” 麹菌からの有性世代の発見

研究課題名（英文） Attempts to discover a sexual cycle in *koji* mold *Aspergillus oryzae*

研究代表者

丸山 潤一 (MARUYAMA JUN-ICHI)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教

研究者番号：00431833

研究成果の概要（和文）：

麹菌は日本の伝統的醸造産業に利用されている糸状菌であるが、有性世代が発見されていないため交配育種が不可能である。本研究では、麹菌実用株に 2 つの接合型遺伝子が機能することを明らかにし、麹菌が菌糸融合能をもつことを約 50 年ぶりに再発見した。さらに、有性生殖器官の一種、菌核の形成を促進することにより、その内部に有性胞子様の構造が観察されるようになった。以上の結果により、麹菌が有性生殖を行うポテンシャルをもつことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

The filamentous fungus *Aspergillus oryzae* has been long used in Japanese traditional food fermentation. As its sexual cycle has not been found, it is not possible to obtain industrially useful strains by cross breeding. In this study, we demonstrated the functionality of mating-type genes and re-discovered a hyphal fusion ability of *A. oryzae* for the first time in ~50 years. Promoting sclerotia production led to the formation of sexual spore-like structures. This study demonstrates the potential of *A. oryzae* for sexual reproduction.

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：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：麹菌、有性世代、接合型、菌糸融合、菌核

1. 研究開始当初の背景

麹菌 *Aspergillus oryzae* は、日本酒、醤油、味噌の製造など日本の伝統的醸造産業で長年にわたり使用されている糸状菌である。また、麹菌は有用タンパク質生産の宿主としても利用されている。しかし、麹菌では有性世代が発見されておらず交配ができないため、複数の株の優良な表現型を備えた株の育種を効率的に行うことは困難である。

2005 年にゲノム配列が解読された麹菌

RIB40 株は、接合型遺伝子座に *MAT1-1* 遺伝子をもつことがわかっていた。我々はこれまでに、醸造用の麹菌株について接合型を調べた結果、*MAT1-1* 型株と *MAT1-2* 型株が約半数ずつ存在することを明らかにした。このことから、麹菌がヘテロタリック（雌雄異型）な有性生殖を行う可能性を示した。

また、有性生殖を発見するためには、異なる 2 つの接合型株が菌糸融合を行う必要がある。しかし、麹菌の菌糸融合については、

約 50 年前の坂口謹一郎東京大学名誉教授らの報告以降、ほとんど研究が行われていない。

「菌核」は菌糸が接着・融合を繰り返して形成する耐久構造であり、他の糸状菌で菌核内に有性胞子が形成されることが報告されている。麴菌では菌核形成能力が低下していることから、有性生殖を行うにはその形成能力を向上させることが必要である。

2. 研究の目的

本研究では、接合型遺伝子の機能および菌糸融合能を解析し、菌核形成を促進することで、麴菌の有性世代を初めて発見することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 麴菌の接合型遺伝子の機能解析

我々は以前、麴菌実用株に 2 つの接合型があることを明らかにしたが、本研究では、それぞれの接合型遺伝子が機能しているかどうか検討した。RIB40 株由来の MAT1-1 型株と、その接合型遺伝子座にある *MAT1-1* 遺伝子を *MAT1-2* 遺伝子に置換した株を用い、DNA マイクロアレイ解析により遺伝子発現を比較した。

(2) 麴菌の菌糸融合能の解析

麴菌において菌糸融合を検出するため、アデニン要求性をもち緑色蛍光で可視化した株、ウリジン/ウラシル要求性をもち赤色蛍光で可視化した株をそれぞれ作製した。

これらの株の分生子（無性胞子）を寒天培地上で混合培養したのち、形成した分生子をアデニン、ウリジン/ウラシルを欠く最少培地に塗布した。混合培養中に菌糸融合が起こっていれば、多核である分生子内には、それぞれの栄養要求性をもつ核が共存し、最少培地において生育することができる。

さらに、この菌糸融合体について、蛍光顕微鏡により、緑色蛍光と赤色蛍光が同一の菌糸に観察されるかどうか検討した。

(3) 菌核の形成促進による有性生殖への効果

(2) で作製した異なる栄養要求性と蛍光色で標識した株で、さらに異なる接合型であるものを対峙培養する。その境界線上で菌核の形成が行われるかを検討した。

麴菌では菌核形成能力が低下していることから、有性生殖を行うにはその形成能力を向上させることが必要である。そこで、菌核形成を正に制御する転写因子 Sc1R の過剰発現、または菌核形成を負に制御する転写因子 EcdR の欠損により、麴菌の菌核形成を促進し、有性生殖が行われるかを検討した。

4. 研究成果

(1) 麴菌の接合型遺伝子の機能解析

DNA マイクロアレイ解析により、接合フェロモンなどの遺伝子発現が、接合型遺伝子依存的に制御されていることを明らかにした。このことは、麴菌の接合型遺伝子が、有性生殖において機能する可能性を示唆する結果である。

(2) 麴菌の菌糸融合能の解析

アデニン要求性をもち緑色蛍光で可視化した株、ウリジン/ウラシル要求性をもち赤色蛍光で可視化した株を混合培養した。そののち、形成した分生子を最少培地に塗布した結果、菌糸の生育が見られた。このことから、菌糸融合によって、お互いの株の栄養要求性の相補が確認された。菌糸融合体を蛍光顕微鏡で観察すると、緑色・赤色両方の蛍光がみとめられた。以上の実験により、麴菌が菌糸融合能をもつことを約 50 年ぶりに再発見した。

今回確立した実験方法は、菌糸融合の分子機構を解析する目的に用いることができる。その知見を利用することにより、麴菌の菌糸融合能を強化し、有性生殖が促進されるようになることが期待される。

(3) 菌核の形成促進による有性生殖への効果

作製した株を用いて対峙培養を行ったところ、コロニーの境界線に菌核の形成が見られた。得られた菌核は、栄養要求性および蛍光色から、菌糸融合体により形成されたものであることを確認した。

また、Sc1R 過剰発現および EcdR 欠損が、コロニーの境界線の菌核形成を促進するのに有効であることを明らかにした。

さらに、菌核を成熟させてその内部を観察した結果、有性胞子様の構造がみとめられた。

今後、栄養要求性や蛍光色の組み合わせを調べることにより、麴菌における有性世代の発見につながることを期待される。

以上の実験により、麴菌が有性生殖を行うポテンシャルがあることを示した。同様の解析を進めていくことで、麴菌の有性生殖が発見され、交配育種法が開発されることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 5 件）

1. R. J. Bleichrodt, G. J. van Veluw, B. Recter, J. Maruyama, K. Kitamoto, H.

- A. Wösten (2012) Hyphal heterogeneity in *Aspergillus oryzae* is the result of dynamic closure of septa by Woronin bodies. *Mol. Microbiol.* (査読有り) Vol. 86, 1334-1344. doi: 10.1111/mmi.12077.
2. Ö. Bayram, Ö. S. Bayram, Y. L. Ahmed, J. Maruyama, O. Valerius, S. O. Rizzoli, R. Ficner, S. Irniger, G. H. Braus (2012) The *Aspergillus nidulans* MAPK module AnStell-Ste50-Ste7-Fus3 controls development and secondary metabolism. *PLoS Genet.* (査読有り) Vol. 8, e1002816. doi: 10.1371/journal.pgen.1002816.
 3. R. Wada, J. Maruyama, H. Yamaguchi, N. Yamamoto, Y. Wagu, M. Paoletti, D. B. Archer, P. S. Dyer, K. Kitamoto (2012) Presence and functionality of mating-type genes in the supposedly asexual filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Appl. Environ. Microbiol.* (査読有り) Vol. 78, 2819-2829. doi: 10.1128/AEM.07034-11.
 4. J. Maruyama, S. Yamaoka, I. Matsuo, N. Tsutsumi, K. Kitamoto (2012) A newly discovered function of peroxisomes: Involvement in biotin biosynthesis. *Plant Signal Behav.* Vol. 7, 1589-1593. doi: 10.4161/psb.22405. (Review)
 5. J. Maruyama, K. Kitamoto (2011) Targeted gene disruption in *koji* mold *Aspergillus oryzae*. *Methods in Molecular Biology*, Strain engineering Methods and protocols, Edited by J. A. Williams. Humana Press, Vol. 765, 447-456. doi: 10.1007/978-1-61779-197-0_27. (Review)
- [学会発表] (計 18 件)
1. 田中 勇氣、矢萩 大貴、金 鋒杰、小山 泰二、丸山 潤一、北本 勝ひこ「麹菌 *A. oryzae* の菌核形成抑制因子 EcdR の欠損による有性生殖促進効果の検討」日本農芸化学会大会 (平成 25 年 3 月 24 日～28 日 仙台)
 2. 塚崎 和佳子、川畑 絢平、丸山 潤一、北本 勝ひこ「麹菌 *A. oryzae* における菌糸融合の分子機構の解析」日本農芸化学会大会 (平成 25 年 3 月 24 日～28 日 仙台)
 3. 川畑 絢平、佐伯 圭、丸山 潤一、北本 勝ひこ「麹菌 *A. oryzae* における菌糸損傷に対する細胞修復と再生の分子機構の解析」日本農芸化学会大会 (平成 25 年 3 月 24 日～28 日 仙台)
 4. 矢萩 大貴、丸山 潤一、金 鋒杰、BAYRAM Özgür、VALERIUS Oliver、BRAUS Gerhard H.、北本 勝ひこ「麹菌 *A. oryzae* の AoFus3 MAP キナーゼとその相互作用タンパク質の機能的関係の解析」日本農芸化学会大会 (平成 25 年 3 月 24 日～28 日 仙台)
 5. Pei HAN、Jun-ichi MARUYAMA、Katsuhiko KITAMOTO 「Functional analysis of Woronin body-tethering protein leashin in *Aspergillus oryzae*」日本農芸化学会大会 (平成 25 年 3 月 24 日～28 日 仙台)
 6. 丸山 潤一「糸状菌の“多”細胞生物学とペルオキシソームの新規機能」第 20 回酵母合同シンポジウム (平成 24 年 9 月 6 日～7 日 京都宇治) (招待講演)
 7. 丸山 潤一「“多細胞生物” 麹菌の危機管理術～細胞間をつなぐ穴をふさぐメカニズム」バイオインダストリー協会“未来へのバイオ技術”勉強会「微生物コミュニケーション-解明と応用」(平成 24 年 8 月 7 日 東京) (招待講演)
 8. 丸山 潤一「“多細胞生物” 麹菌の細胞間連絡を制御するオルガネラ Woronin body に関する研究」日本農芸化学会関東支部 2012 年度第 1 回支部例会 (平成 24 年 7 月 21 日 東京) (招待講演)
 9. Jun-ichi Maruyama, Yasuko Tanabe, Daiki Yahagi, Ichiro Matsuo, Katsuhiko Kitamoto 「Discovery of a novel peroxisomal function for biotin biosynthesis in *Aspergillus oryzae*」11th European Conference on Fungal Genetics (平成 24 年 3 月 30 日～4 月 2 日 マールブルグ、ドイツ)
 10. Özlem Sarikaya Bayram, Özgür Bayram, Yasar Luqman Ahmed, Jun-ichi Maruyama, Oliver Valerius, Ralf Ficner, Stefan Irniger, Gerhard H. Braus 「Shuttling of entire MAPK module from membrane to nuclear envelope links fungal development to secondary metabolism」11th European Conference on Fungal Genetics (平成 24 年 3 月 30 日～4 月 2 日 マールブルグ、ドイツ)
 11. 丸山 潤一「麹菌研究から発見したペルオキシソームの新規機能」日本農芸化学会大会 (平成 24 年 3 月 22～25 日 京都) (招待講演)
 12. 川畑 絢平、矢萩 大貴、丸山 潤一、北本 勝ひこ「麹菌 *A. oryzae* の微小管形成中心関連タンパク質 AoApsB の隔壁孔における機能」日本農芸化学会大会 (平成 24 年 3 月 22 日～25 日 京都)
 13. 矢萩 大貴、丸山 潤一、Özgür Bayram、

- Oliver Valerius、Gerhard H. Braus、北本 勝ひこ「麹菌の隔壁孔に局在するMAP キナーゼ AoFus3 と相互作用する新規タンパク質の機能解析」日本農芸化学会大会（平成24年3月22～25日 京都）
14. 佐伯 圭、ESCANO Christopher Salazar、丸山 潤一、北本 勝ひこ「麹菌 AoSO タンパク質のストレス応答性の凝集が隔壁孔に局在する機構の解析」日本農芸化学会大会（平成24年3月22日～25日 京都）
 15. 和田 龍太、金 鋒傑、小山 泰二、丸山 潤一、北本 勝ひこ「麹菌 *A. oryzae* の菌糸融合における菌核形成促進因子 Sc1R の過剰発現の効果」日本生物工学会大会（平成23年9月26日～28日 東京）
 16. 丸山 潤一、北本 勝ひこ「麹菌を用いた異種タンパク質高生産システムの開発」日本生物工学会大会（平成23年9月26日～28日 東京）
 17. 丸山 潤一、北本 勝ひこ「麹菌の細胞生物学的解析と応用へのアプローチ」日本生物工学会大会（平成23年9月26日～28日 東京）
 18. Jun-ichi Maruyama 「Intercellular communication via septal pore in the multicellular microorganism *Aspergillus oryzae*」Asian Mycological Congress（平成23年8月7日～11日 仁川、韓国）（招待講演）

〔図書〕（計3件）

1. 丸山 潤一、北本 勝ひこ「麹菌の分子育種のための新規宿主・ベクター系」改訂版 分子麹菌学、日本醸造協会、22-29（2012）
2. 菊間 隆志、丸山 潤一、北本 勝ひこ「GFPを用いた麹菌のオルガネラの可視化とオートファジー」改訂版 分子麹菌学、日本醸造協会、131-143（2012）
3. 丸山 潤一「多細胞生物麹菌の隔壁孔を介した細胞間コミュニケーション」改訂版 分子麹菌学、日本醸造協会、151-157（2012）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ

http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/Lab_Microbiology/hyousi.html

報道関連情報

- ・平成23年8月29日掲載、日本経済新聞（朝刊11面）「麹菌のビタミン合成の過程解明」
- ・平成23年8月29日掲載、読売新聞（夕刊2面）「甘酒の栄養成分合成の仕組み解明」
- ・平成23年9月1日掲載、朝日新聞（朝刊33面）「ビタミン作るこうじ菌の仕組み判明」
- ・平成23年10月26日掲載、ジャパンレッジ「注目の人物、丸山潤一／東京大学大学院農学生命科学研究科助教」
- ・平成24年5月1日発刊、日経ヘルズ誌（6月号 p.32~33）「麹が腸の健康や美容にいいといわれる理由 麹菌の生む「酵素」が胃腸の働きを助けてくれる」
- ・平成24年6月20日発刊、日経ヘルスブルミエ誌（夏号 p.21）「塩麹は酵素パワーは食品のうまみアップ ビタミンBで美肌、美髪」

6. 研究組織

(1)研究代表者

丸山 潤一 (MARUYAMA JUN-ICHI)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教
研究者番号：00431833

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし