

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580132

研究課題名(和文) 麹菌の細胞内ポリリン酸代謝とストレス応答等における機能の解明

研究課題名(英文) Investigation of intracellular polyphosphate metabolism and its function in stress response in koji mold

研究代表者

楠本 憲一 (Kusumoto, Ken-Ichi)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品総合研究所・応用微生物研究領域・上席研究員

研究者番号：80353978

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：Aspergillus oryzaeは、醸造・食品産業で麹菌として用いられる重要な微生物である。担当者らは、麹菌のポリリン酸の各種培養条件における消長を解明すると共に、麹菌のポリリン酸代謝遺伝子群破壊株のポリリン酸蓄積、重金属塩や酸化等のストレス負荷培養環境における生育に与える影響を明らかにした。特に、特定のストレス条件下においてポリリン酸蓄積量が増加し、ストレス応答にポリリン酸が関与すると考えられた。本研究により、糸状菌でほとんど知られていなかったポリリン酸に関する新たな知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：Aspergillus oryzae is known as an important microorganism utilized as koji mold in fermentation food industry. In this study, the amount of polyphosphate was examined under several culture condition, and found that some effects were observed under the stress of metal ions, oxidation etc. Especially, polyphosphate was found to increase in response to some stress conditions. From these studies, new information concerning on polyphosphate was obtained, which was not known among filamentous fungi.

研究分野：応用微生物学

キーワード：麹菌 ポリリン酸代謝

1. 研究開始当初の背景

Aspergillus oryzae{以下、ここでは本菌を麹菌(こうじきん)と呼ぶ}は、味噌、醤油、清酒等、我が国の伝統発酵食品の醸造に使用される重要な糸状菌である。麹菌は糖質やタンパク質等、高分子加水分解酵素群の生産力が高いことが知られている。醸造の際は麹菌を蒸煮した米や大豆等の表面に生育させる固体培養を行う。固体培養では、麹菌は空気に直接さらされており、さらに混合されることで、酸化ストレスや物理的ストレスを受ける。その酸化ストレス応答の仕組みは解明されつつある(Sakamoto 2009, Fungal Genet. Biol. 46: 887)。一方、醸造業界では、作業効率向上のため、現状の菌株よりもさらに短時間で培養が終了する増殖力の高い菌株や、分生子形成が現状よりも盛んな菌株が望まれており、これらの要望に答えるための方策の一つとして、環境ストレスに対する耐性の高い菌株、生育の速い菌株の育種が喫緊に必要とされる。

一方で、申請者は、調味味噌(だし入り味噌)の旨味成分であるイノシン酸からリン酸を遊離するホスファターゼ群の解明に取り組んだ。この中で、申請者がリン酸獲得系タンパク質であるホスファターゼやリン酸トランスポーターの遺伝子発現を解析した結果、外部リン酸濃度でこれらの遺伝子発現が制御される他、細胞内リン酸濃度とこれらの遺伝子発現が密接に関連することを示唆するデータが得られた。また、リン酸獲得系遺伝子群転写因子の遺伝子破壊株は、極めて生育が悪く、培地への高濃度リン酸の添加により生育が若干回復した。このように、リン酸獲得能力は麹菌生育に大きな影響を及ぼすと共に細胞内リン酸濃度がリン酸獲得能力に関わることが明らかになった。このリン酸獲得能力は、麹菌が固体培養において、米や大豆中の限られたリン酸源を利用する上で重要である。

細胞内リン酸の蓄積形態の一つとして、ポリリン酸が知られている。ポリリン酸は、3~数百のリン酸単位から構成される生物の無機リン酸蓄積形態の化合物であり、原核生物から真核生物まで全ての生物の細胞内に維持されている。酵母では乾燥重量で10%程度までのポリリン酸が含まれている(Kornberg, 1999, Annu. Rev. Biochem. 68:89)。ポリリン酸の細胞内における役割としては、リン酸蓄積とエネルギー物質が主要なものであるが、これ以外に近年では、主として大腸菌(*Escherichia coli*)において、種々のストレスと飢餓等の危急状態等に対する応答に必要であることが報告されている(Kuroda, 2001, Science 293: 705; Nishii, 2005, FEBS Lett. 579: 6846)。また、哺乳類ではミトコンドリアのポリリン酸量低下により、ミトコンドリアのカルシウム蓄積能力が増加することが解明された(Abramov, 2007, J. Biol. Chem. 282: 9302)。ポリリン酸は大腸菌ではポリリ

ン酸キナーゼにより、出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)ではポリリン酸ポリメラーゼにより合成され(Hothorn, 2009, Science, 324: 513)、エンドポリホスファターゼ(PPN)およびエキソポリホスファターゼ(PPX)により段階的に加水分解される(Lichko, 2006, Biosci Rep. 26(1):45)。しかし、大腸菌で明らかにされつつある各種ストレス応答へのポリリン酸の関与については、アカパンカビ(*Neurospora crassa*)において浸透圧ストレスでポリリン酸消費(Yang, 1993, Biochim. Biophys. Acta. 1179(2):141)の知見がある以外は、糸状菌で解明が進んでいない。以上のようなことから、本研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、麹菌のポリリン酸含有量の動態解明と、ポリリン酸代謝酵素遺伝子破壊株の生育速度や各種ストレス耐性等の特性解明により麹菌におけるポリリン酸の生理的機能を明らかにすることを目的とする。栄養条件やストレス負荷条件を組み合わせた培養におけるポリリン酸について、麹菌細胞内における動態及び生理機能を明らかにすることにより、将来的には麹菌が本来持っているストレス耐性をさらに高め、生育速度や分生子形成力を増大させるような育種手段が開発されることが期待される。

3. 研究の方法

麹菌のポリリン酸含有量の動態解明のため、栄養条件やストレス負荷条件による培養を行う。このため、ポリリン酸の定量を確立後、様々な培養形態におけるポリリン酸を定量し、その経時的变化を明らかにする。そこで、最少培地、完全培地を用いた液体培養、及びプレート培養(寒天培地による半固体培養)で経時的にポリリン酸量を測定することで、基本的な麹菌のポリリン酸代謝の知見を得る。また、これにより麹菌の生育ステージ(菌糸、場合により分生子)におけるポリリン酸の動態に関する情報を得る。ポリリン酸の定量はWerner et al. (Fungal Genet. Biol. 44(9): 845-852)を参照し、麹菌菌体から1M硫酸を用いてポリリン酸を抽出後、Qiagen PCR purification columnsを用いて単離後、出芽酵母エキソポリホスファターゼ(Ppx1p、大腸菌で生産させた組換え酵素を精製して使用)を用いて加水分解後、リン酸定量キットを用いてリン酸量を測定することにより算出する。

出芽酵母では、ポリリン酸合成に関与するポリリン酸ポリメラーゼと分解に関与するエンドポリホスファターゼをコードする遺伝子はリン酸獲得系遺伝子群転写因子pho4の支配下にあり、リン酸飢餓条件で発現することが明らかとなっている(Ogawa, 2000, Mol. Biol. Cell. 11(12):4309)。そこで、低リン酸条件、高リン酸条件での液体培養、プレー

ト培養における麹菌のポリリン酸蓄積量について明らかにする。また、出芽酵母では、低リン酸の液体培地で培養し、その後、高リン酸の培地に移すとポリリン酸の過剰生産が起こることも明らかになっている (polyphosphate “overplus” と表現されている; Werner, 2005; Harold, 1966)。そこで、同様の polyphosphate “overplus” 現象が *A. oryzae* でも起こるかを確認する。

また、プレート培養では、リン酸濃度を変えた培地から回収した分生子のポリリン酸の蓄積量に変化があるか確認する。変化が見られた場合は、さらにそれらの分生子の液体培養 (低リン酸、リン酸飢餓条件を含む) での増殖に変化がみられるかも検証する。

ストレス負荷条件としては、酸化ストレス、浸透圧ストレス、高温ストレス条件を上述の培養条件に加味する。さらに生育ステージも考慮しながら培養を行い、ポリリン酸の動態を解明する。

次に、出芽酵母で知られているポリリン酸代謝関連遺伝子のオルソログ (相同遺伝子) 破壊麹菌株を作製し、ポリリン酸の蓄積量の変化が生育速度や分生子形成、酸化等のストレス応答に与える影響を明らかにする。麹菌ゲノム情報から、酵母のポリリン酸代謝に関わる酵素遺伝子のオルソログ (相同遺伝子) を抽出した。ポリリン酸の合成酵素遺伝子 (ポリリン酸ポリメラーゼ) としては、出芽酵母において vacuolar transporter chaperone (VTC complex) 内部にポリリン酸ポリメラーゼドメインが含まれていること (Hothorn, 2009, Science, 324: 513) を受けて、*vtcA*、*vtcB*、*vtcD* の 3 種類を対象とする。酵母では *vtc1* ~ *4* が複合体を形成するが、麹菌では *vtc2*、*vtc3* (相同性 56%) に対応するものが一つしか見出せない。また、ポリリン酸の分解酵素遺伝子として、*ppxA*、*ppnA* の 2 種類を対象とする。

これら 5 種類の遺伝子の破壊株を、麹菌の PEG 法による形質転換により作製する。各破壊株を上述のようなリン酸濃度による栄養条件、液体培養あるいはプレート培養条件、また、各種ストレス条件を組み合わせ、培養を行う。さらに生育ステージも考慮しながら培養を行い、各培養条件と生育ステージによるポリリン酸の動態を解明すると共に、生育速度や分生子形成力に関する情報を得る。

4. 研究成果

(1) 麹菌ポリリン酸の各種培養条件における消長

A. oryzae RIB40 株のポリリン酸蓄積量を、最少培地 (ツァベックドックス: CD)、完全培地 (YPD) のそれぞれで、液体培養、メンブレン固体培養を行った。その結果、液体培養では、CD、YPD 共に、培養に応じてポリリン酸量が増加した後、減少した。ポリリン酸量は総リン酸量の 10% 程度であり、総リン酸量は培養期間を通じてあまり変化が見られなかった。一方、メンブレン培養では、CD

培地において液体培養よりもポリリン酸、総リン酸量共に 50% 程度高かった。YPD 培地では逆に低く推移した。

次に、CD 液体培地中のリン酸濃度の違いによるポリリン酸量、総リン酸量の単位菌体当たりの消長について検討した (図 1) (A: CD 液体培養、B: CD メンブレン培養、C: CD 寒天培地培養後 7 日目に回収した胞子)。1mM リン酸では、24 時間後のポリリン酸量、総リン酸量をもっとも高く、48 時間、72 時間後はポリリン酸が約 10 分の 1 に、総リン酸は半量以下に低下した。10mM および 100mM リン酸下では、総リン酸量はいずれの培養時間においても同等であるが、一方ポリリン酸は漸次減少した。1mM リン酸下におけるポリリン酸量の変化が特に著しいことがわかった。CD メンブレン培養においても液体培養と同様の傾向であるが、100mM リン酸下では CD 液体培養よりも総リン酸量が高めに推移した。

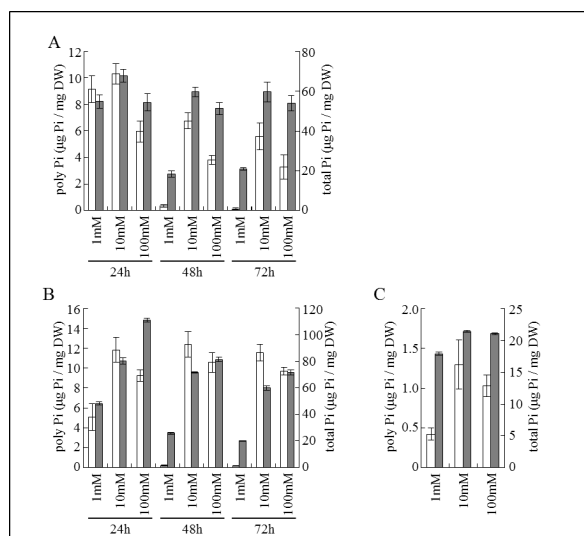


図 1 CD 液体培地へのリン酸添加量の違いによるポリリン酸量、総リン酸量の単位菌体当たりの消長

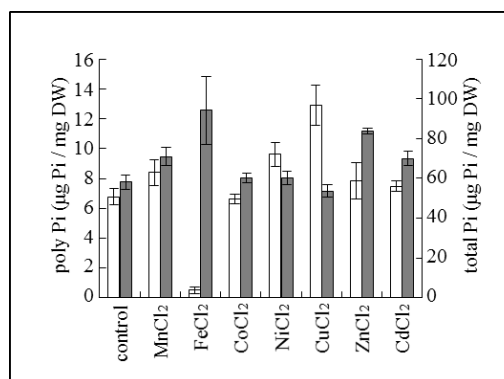


図 2 金属イオンのリン酸蓄積量に対する影響

次に、金属ストレスのリン酸蓄積量に対する影響について調べた(図2)。7種類の塩化物金属塩添加条件のうち、1mM 塩化鉄存在下において、ポリリン酸量は激減し、総リン酸量は1.5倍程度増加した。塩化銅存在下では、ポリリン酸量は1.5倍程度に増加し、総リン酸量は同等であった。

さらに、酸化ストレス下におけるリン酸等蓄積量に対する影響を調べるため、過酸化水素、あるいはメナジオンを24時間CD液体培養後に添加した。その結果、それぞれ、添加最少濃度においてポリリン酸量が対照よりも増加した。総リン酸量は同等であった。過酸化水素は二価鉄イオンが触媒してラジカル生成することが知られる。酸化ストレス発生により、ポリリン酸生成量が増加し、バキュオール内に細胞質から運搬された余分な金属イオンをポリリン酸でキレートすることにより、金属ストレスに対応していると考えられた。

次に、16mM 過酸化水素添加による酸化ストレス下におけるポリリン酸量の時間変化の推移とアコニターゼ活性比(酸化ストレス有無の比)を調べた結果、ポリリン酸量は酸化ストレス下で一過的に上昇後、減少した。細胞内酸化ストレスのセンサーたんぱく質であるアコニターゼは分子内に4個の鉄原子と4個の硫黄原子を有し、細胞内酸化ストレスのセンサーとして知られている。酸化ストレス下で一過的に減少した後、12時間後にかけて増加した。ポリリン酸合成量はこの酸化ストレスにより1.2倍に増加したため、酸化ストレスに対する応答としてポリリン酸量が増加したと考えられた。

次に、異なる濃度のリン酸下で培養して回収した分生子をCD寒天培地あるいはリン酸不含有CD培地に接種した際の生育の違いを調べた結果、CD培地中のリン酸の有無により、過酸化水素あるいは金属塩による生育阻害が異なった。リン酸含有CD培地では、高濃度の過酸化水素、塩化鉄存在下でもコロニー生育が見られたが、低リン酸(0.1mM)CD培地では生育しなかった。一方、銅、ニッケル塩存在下では逆にリン酸不含有CD培地のほうが明らかに生育良好であった。塩化鉄処理区のみで、低リン酸培養胞子は低リン酸培地に接種すると、顕著に成育阻害が見られた。

これらのことから、重金属ストレスおよび酸化ストレスはポリリン酸蓄積量に影響を与えることが考えられる。特に二価鉄イオン存在下ではポリリン酸がほぼすべて分解された。ポリリン酸含有量の低い分生子は鉄イオンに対して耐性が低かった。このことから、ポリリン酸とリン酸は鉄イオン耐性と関係することが示唆された。また、ポリリン酸は酸化ストレスにより合成が促進したため、ポリリン酸は酸化ストレス応答に関与することが示唆された。

なお出芽酵母と同様、低リン酸培地における培養から高リン酸培地に菌体を移動させ

た際、「polyphosphate “overplus”」現象の発生が観察された(図3)。次に、液体培養時の

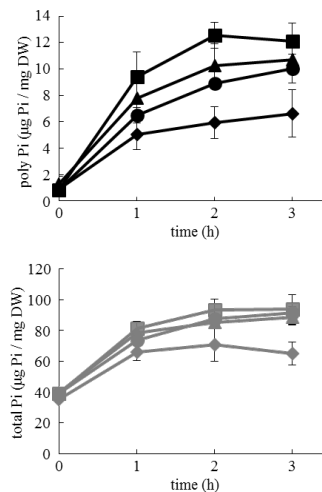


図3 polyphosphate “overplus”現象
上図、ポリリン酸量の消長；下図、総リン酸量の消長。
○、対照(0mM)；△、2.5mM；□、5mM；◇、10mM
の各リン酸濃度

各種ストレスによるポリリン酸蓄積量の変化について検証した。浸透圧ストレス条件下においてはアカバシカビにおける知見(Yang, 1993)と矛盾しない結果が得られた。高温ストレス条件下においては、37℃では顕著な変化はなかったが、42℃においては蓄積量に増加が見られた。また計画外の成果として、固体培養についても検討の結果、米麹ではほとんどポリリン酸の蓄積は見られなかったが、ふすま培養ではポリリン酸の蓄積が確認できた(図4)。

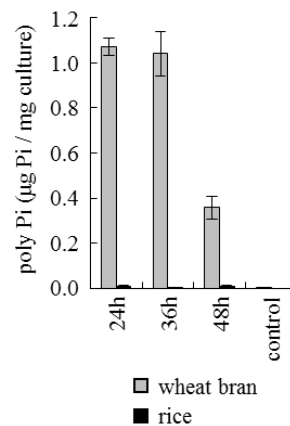


図4 麹菌固体培養におけるポリリン酸量の消長
□、小麦フスマ培養；■、米麹培養

(2) ポリリン酸代謝遺伝子破壊株の特性とポリリン酸等の消長

そこで、上記の結果を受けて、ポリリン酸合成および分解に関わると考えられる5遺伝子について、各遺伝子破壊株を作製し、以降の研究に用いた。まず、ポリリン酸合成遺伝子である *vtc* 遺伝子群のうち、*vtcA* 破壊株、*vtcD* 破壊株は対照株と同等の表現型(生育速度、胞子形成)を示した。ところが、*vtcB* 破壊株は対照株より明らかに生育が良好であった(CD 寒天培地上)。出芽酵母では、*vtc3* 破壊株は対照株よりも生育が低下することが知られている。麹菌の *vtcB* 破壊株が生育速度が高い理由は不明であるが、たいへん興味深い現象を発見することができた。

次に、*vtc* 破壊株について、リン酸濃度の異なる培地におけるポリリン酸および総リン酸量を調べた(図5)。その結果、3種の *vtc* 破壊株は11mMリン酸下においてもポリリン酸を蓄積しないことが明らかになった。したがって、*vtc* 遺伝子群は麹菌においてもポリリン酸合成酵素をコードすると考えられた。0.1mMリン酸下では、対照株もポリリン酸を蓄積しない。また、11mMリン酸条件下においては、*vtc* 破壊株における総リン酸量が対照株よりも減少していたが、0.1mMリン酸下では対照株と同等であった。

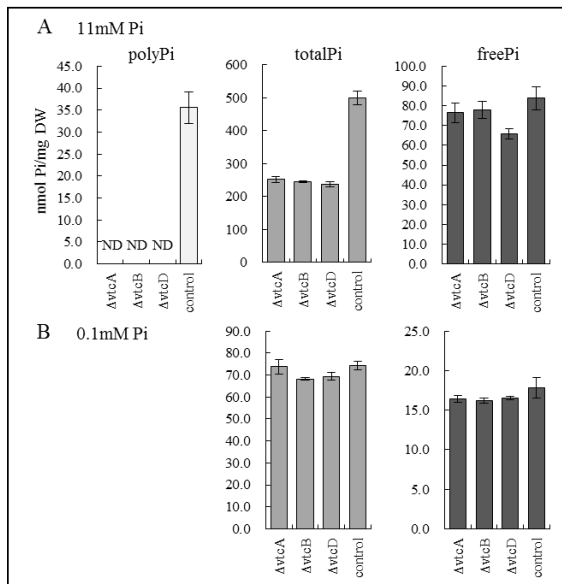


図5 *vtc* 破壊株におけるリン酸濃度の異なる培地におけるポリリン酸および総リン酸量

次に、*vtc* 破壊株の液胞観察を行った(図6)。FM4-64 はエンドサイトシスにより細胞に取り込まれる。出芽酵母では、*vtc2* 以外の *vtc* 破壊株は液胞の形状が異常になることが知られている。また *Vtc* タンパク質は液胞に局在する。この結果から、液胞形状の維持に関して麹菌と出芽酵母では *Vtc* タンパク質の機能が異なることが示唆された。

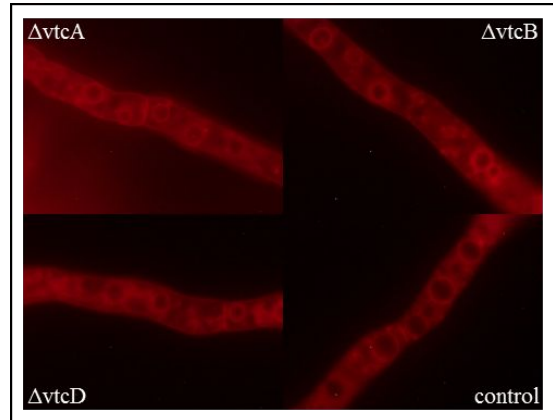
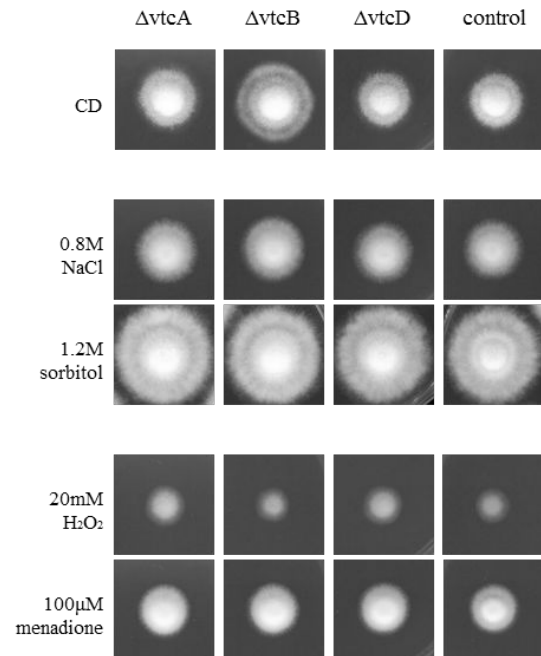


図6 *vtc* 破壊株の液胞観察

次に、*vtc* 破壊株の各種条件における生育特性を検討した(図7)。上述したとおり、*vtcB* 破壊株はCD 寒天培地上で対照株よりも生育がよいことがわかる。また、*vtc* 破壊株3種は対照株よりも塩化銅以外の重金属塩存在下でコロニー径が大きくなり、重金属塩であるコバルト、2価鉄、ニッケル、アルミニウム、3価鉄塩(塩化物)に対し耐性を示した。また、過酸化水素、メナジオン存在下では、*vtcA* 破壊株、*vtcD* 破壊株の生育が対照株よりも速くなり、*vtcB* 破壊株は対照株と同等であった。*vtc* 破壊株ではリン酸量が対照株より半減するため、リン酸とコトランスポートされる重金属イオンの取り込み量が減少したため、金属ストレスが低減した可能性が考えられる。



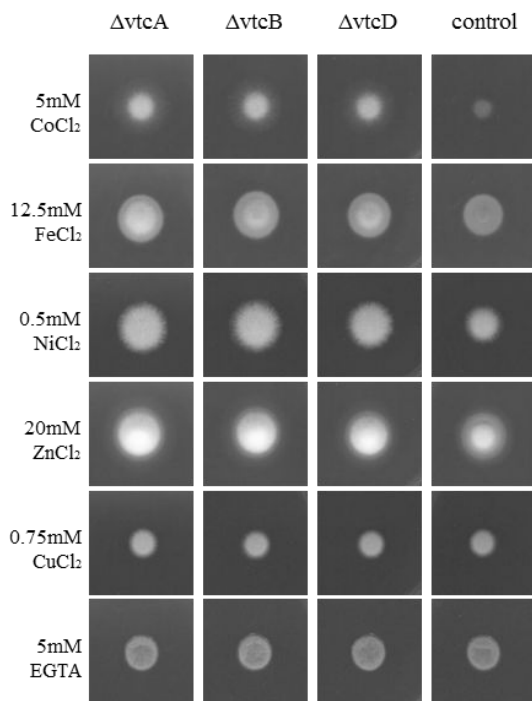


図7 *vtc* 破壊株の各種条件における生育特性

一方で、ポリリン酸分解遺伝子である *ppxA* あるいは *ppnA* 破壊株の各種ストレス条件における生育特性を調べた。その結果、*ppnA* 破壊株は塩化ニッケル塩、過酸化水素存在下で対照株よりも生育が低くなった。また、ニッケルイオン、過酸化水素に感受性を示した。この現象は、ポリリン酸が減少したことと関係があるかもしれない。

以上のことから、麹菌におけるポリリン酸代謝関連遺伝子群は、出芽酵母の同遺伝子群とは異なる特性を有することが示唆された。また、同合成遺伝子群破壊による重金属塩ストレス耐性向上は、総リン酸量の増加を介した金属塩取り込み量低下による可能性が考えられた。

本研究により、麹菌のポリリン酸蓄積量は高温、酸化、一部の金属による各ストレス下において増加が観察され、その合成とストレスとの関係が解明された。また、代謝遺伝子群破壊株のポリリン酸蓄積、重金属塩や酸化等のストレス負荷培養環境における生育に与える影響が明らかになった。これらの知見は糸状菌でほとんど知られていなかったため、研究成果が持つ重要性は大きい。また、出芽酵母のポリリン酸代謝酵素遺伝子破壊株の性質と異なる知見も得られた。従来の糸状菌に関する知見がないポリリン酸動態情報やその生理機能を麹菌で明らかにすることができたため、データを取りまとめた論文

投稿を行う予定である。また、麹菌において、ポリリン酸の蓄積量が固体培養における酸化等のストレス応答に与える影響、また、その蓄積量と生育速度への関連について一定の知見が得られたため、麹菌を利用する醸造産業や関連する研究者に本研究の成果をフィードバックしたい。

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)

〔学会発表〕(計2件)

- 1) 多田功生、大口ひかる、楠本憲一、麹菌 *Aspergillus oryzae* のポリリン酸代謝関連遺伝子の機能解析、第14回糸状菌分子生物学コンファレンス、2014年11月16日、東北大学川内北キャンパス(宮城県仙台市)
- 2) 多田功生、大口ひかる、楠本憲一、麹菌 *Aspergillus oryzae* のポリリン酸代謝とストレス応答、第13回糸状菌分子生物学コンファレンス、2013年11月20日、文部科学省研究交流センター(茨城県つくば市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

楠本 憲一 (KUSUMOTO KEN-ICHI)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品総合研究所・応用微生物研究領域・上席研究員

研究者番号：80353978

(3) 連携研究者

鈴木 聡 (SUZUKI SATOSHI)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品総合研究所・応用微生物研究領域・主任研究員

研究者番号：90353979