

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25292045

研究課題名(和文) 麹菌のタンパク質高分泌能の細胞生物学的理解とセルファクトリーの構築

研究課題名(英文) Cell biologically understanding high productivity of protein secretion in Koji mold

## 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・研究員

研究者番号：20272437

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：麹菌(*Aspergillus oryzae*)は我が国で、日本酒などの醸造に古くから使用されている安全な微生物であり高いタンパク質分泌生産能力を持つ。そのため様々な食品や医療などに利用される有用タンパク質生産の宿主としても注目されている。そこで、麹菌のもつ高い分泌生産能を細胞生物学的に明らかにすることを目的として研究を行い、1)小胞体-ゴルジ体間で機能しているカーゴレセプターの機能解明、2)分泌生産にも関与するオートファジー関連遺伝子の機能解析、3)核を選択的に除去するヌクレオファジーの発見、4)異種タンパク質高分泌変異株(AUT株)の変異遺伝子の同定、などの成果を得た。

研究成果の概要(英文)：Koji mold (*Aspergillus oryzae*) is an important microorganism used to brew sake etc in Japan. Koji mold is also useful for the protein production such as enzymes. Its safety is guaranteed due to its long history of use in the food manufacturing industry, and much attention is gained as an attractive host for the useful protein production used in various foods and medical treatments, etc. In this research we tried to elucidate high capability of protein secretion with koji mold by molecular and cellular biology techniques and by making good use of genome information, for the purpose of using as a cell factory for useful protein production. Finally I could get following results; 1) functional analysis of cargo receptor genes, 2) Elucidation of autophagy related genes, 3) Discovery of filamentous fungi specific autophagy, nucleophagy, and 4) Identification of a new gene responsible for hyper secretion.

研究分野：微生物生理学

キーワード：麹菌 セルファクトリー タンパク質生産 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安全な微生物であり、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おり、2005年の麹菌ゲノム解析プロジェクト完了後は、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されるようになっていたが、細胞内輸送・分泌経路などの理解は、酵母に比べて格段に遅れていた。

### 2. 研究の目的

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、通常の小胞体 ゴルジ体経路、それ以外の新規分泌経路、オートファジーなどの観点から分子細胞生物学的手法により解析する。また、麹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、これまで得ている変異株の変異遺伝子の同定などを行うことにより、さらなる生産宿主の開発を行う。

### 3. 研究の方法

(1) すでに取得している高分泌変異株 (AUT 1 - 6 株) を次世代型 DNA シーケンサーにより塩基配列を決定し、親株との比較から高分泌変異の原因となっている遺伝子を特定する。

(2) 麹菌の小胞体 ゴルジ体間でのカーゴレセプターと推定される遺伝子を単離して、その機能解析を行う。

(3) オートファジー機能を制御することにより異種タンパク質を高生産させることを明らかにしているが、その分子機構を明らかにするために、様々なオートファジー関連遺伝子の解析を進める。

(4) 高分泌能と密接な関連があると予想されるエンドサイトーシスについて、関与する遺伝子の単離と機能解析を進める。

(5) 上記の解析により得られる知見をもとにして、さらなる高分泌宿主の開発を行い、必要に応じて様々な異種タンパク質を生産する。

### 4. 研究成果

(1) 以前取得した異種タンパク質高分泌変異株 (AUT 株) を用いて、比較ゲノム解析による麹菌の異種タンパク質高生産に関与する変異遺伝子を明らかにし、遺伝子名を autA と命名した。

(2) 麹菌の小胞体 ゴルジ体間で機能しているカーゴレセプターについて、関連遺伝子を単離して、その機能解析を行った。

(3) オートファジー機能を抑制することにより、異種タンパク質生産が向上するという現象のメカニズムを解明するために、様々な

オートファジー関連遺伝子を単離し機能解析を進めた。その結果、麹菌のような糸状菌に特有のオートファジーについての理解を深める結果を得た。

(4) 糸状菌における選択的オートファジーの解析を進め、それに関連する多数の atg 遺伝子機能を解析した。また、核を選択的に除去するヌクレオファジーの存在を明らかにした。

(5) 麹菌における小胞体 ゴルジ体を経由しない、新規分泌経路の存在について、Acyl-CoA binding protein の挙動観察により詳細な観察を行った。

(6) 麹菌による異種タンパク質生産として、植物由来オスモチンの生産について改良方法を検討した。

(7) 高分泌株の育種の効率化に貢献する、ゲノム編集と非相同組換え修復欠損を用いた高効率遺伝子操作技術の開発に成功した。

### 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 13 件)

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, e62512 (2013) 査読有り

Functional analysis of Abp1p-interacting proteins involved in endocytosis of the MCC component in *Aspergillus oryzae*  
K. Matsuo, Y. Higuchi, T. Kikuma, M. Arioka, K. Kitamoto  
Fungal Genet. Biol., 56, 125-134 (2013) 査読有り

Further enhanced production of heterologous proteins by double-gene disruption (AosedD Aovps10) in a hyper-producing mutant of *Aspergillus oryzae*  
L. Zhu, J. Maruyama, K. Kitamoto  
Appl. Microbiol. Biotechnol., 97, 6347-6357 (2013) 査読有り

Functional analysis of Aogat1 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

Vesicle trafficking, organelle functions, and unconventional secretion in fungal physiology and pathogenicity

Jun-ya Shoji, Takashi Kikuma, Katsuhiko Kitamoto

Current Opinion in Microbiology, 20, 1-9 (2014) 査読有り

糸状菌のオートファジーと物質生産

菊間隆志、北本勝ひこ

化学と生物、52, 757-763 (2014) 査読有り

Development of a genome editing technique using the CRISPR/Cas9 system in the industrial filamentous fungus *Aspergillus oryzae*

T. Katayama, Y. Tanaka, T. Okabe, H. Nakamura, W. Fujii, K. Kitamoto, J. Maruyama

Biotechnol. Lett., in press (2015) 査読有り

Functional analysis of AoAtg11 in selective autophagy in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*

T. Tadokoro, T. Kikuma, K. Kitamoto

Fungal Biol., 119, 560-567 (2015) 査読有り

Modulating ER-Golgi cargo receptors for improving secretion of carrier-fused heterologous proteins in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*

H. Hoang, J. Maruyama, K. Kitamoto

Appl. Environ. Microbiol., 81, 533-543 (2015) 査読有り

Cell biology of the Koji mold *Aspergillus oryzae*

K. Kitamoto

Biosci. Biotechnol. Biochem., 79, 863-869 (2015) 査読有り

Vesicle trafficking, organelle functions, and unconventional secretion in fungal physiology and pathogenicity

Jun-ya Shoji, Takashi Kikuma, Katsuhiko Kitamoto

Current Opinion in Microbiology, 20, 1-9 (2014) 査読なし

糸状菌のオートファジーと物質生産

菊間隆志、北本勝ひこ

化学と生物、52, 757-763 (2014) 査読なし

Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition).

D.J. Klionsky, K. Kitamoto et al.

Autophagy. 2016;12(1):1-222. doi: 10.1080/15548627.2015.1100356. 査読有り

り

〔学会発表〕(計 19 件)

Effect of deleting two putative cargo receptors on heterologous protein production in *Aspergillus oryzae*

Dung Huy Hoang, Jun-ichi Maruyama, Katsuhiko Kitamoto

日本生物工学会大会(平成25年9月18日～20日 広島)

Developing *Aspergillus oryzae* as a host for heterologous protein production

Katsuhiko Kitamoto

XI International Fungal Biology Conference (Plenary session: Biotechnology)

(September 29 - October 3, 2013 Karlsruhe, Germany)

Functional analysis of selective autophagy-related genes, Aoatg11 and Aoatg26 in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*

Takashi Kikuma, Takayuki Tadokoro, Shin Yanagisawa, Katsuhiko Kitamoto

XI International Fungal Biology Conference (Poster session)

(September 29 - October 3, 2013 Karlsruhe, Germany)

麹菌オートファジーのユニークな生理機能とその応用(シンポジウム)

菊間隆志、北本勝ひこ

日本農芸化学会大会(平成26年3月27日～30日 東京)

麹菌 *A. oryzae* におけるオートファジー関連ステロール-グルコシルトランスフェラーゼ様遺伝子 Aoatg26 の解析

菊間隆志、田所隆之、北本勝ひこ

日本農芸化学会大会(平成26年3月27日～30日 東京)

麹菌 *A. oryzae* におけるオートファジー関連膜タンパク質 AoAtg9 の機能解析

藤木耕平、菊間隆志、北本勝ひこ

日本農芸化学会大会(平成26年3月27日～30日 東京)

麹菌 *A. oryzae* における2つの acyl-CoA binding protein の局在及び機能解析

川口航平、菊間隆志、北本勝ひこ

日本農芸化学会大会(平成26年3月27日～30日 東京)

麹菌 *A. oryzae* における Aoste23 の機能解析

三谷隆宏、川口航平、菊間隆志、丸山潤一、北本勝ひこ

日本農芸化学会大会(平成26年3月27日～30日 東京)

Adjusting the cargo receptor

composition of ER-Golgi secretory pathway for enhancing heterologous protein production in *Aspergillus oryzae*  
Huy Dung Hoang, Jun-ichi Maruyama, Katsuhiko Kitamoto  
日本農芸化学会大会 (平成 26 年 3 月 27 日 ~ 30 日 東京)

麹菌の PH036 ホモログ破壊株を用いた植物由来オスモチンの生産  
伊藤 大修、丸山 潤一、永田 宏次、田之倉 優、北本 勝ひこ  
日本農芸化学会大会 (平成 26 年 3 月 27 日 ~ 30 日 東京)

麹菌 *A. oryzae* におけるストレス応答調節因子様遺伝子 *Aorim15* の解析  
中村 英淳、菊間 隆志、金 鋒杰、丸山 潤一、北本 勝ひこ  
日本生物工学会大会 (平成 26 年 9 月 9 日 ~ 11 日 札幌)

比較ゲノム解析による麹菌の異種タンパク質高生産に関与する変異遺伝子の同定  
金 鋒杰、丸山 潤一、北本 勝ひこ  
日本生物工学会大会 (平成 26 年 9 月 9 日 ~ 11 日 札幌)

麹菌 *A. oryzae* におけるオートファジー関連タンパク質 *AoAtg9* の推定リン酸化部位変異体の解析  
藤木 耕平、菊間 隆志、北本 勝ひこ  
日本農芸化学会大会 (平成 27 年 3 月 26 日 ~ 29 日 岡山)

麹菌 *A. oryzae* におけるオートファジーによる核の分解の誘導条件探索  
三谷 隆宏、菊間 隆志、北本 勝ひこ  
日本農芸化学会大会 (平成 27 年 3 月 26 日 ~ 29 日 岡山)

麹菌 *A. oryzae* における *Acyl-CoA binding protein* の機能及び特殊な分泌経路の解析  
川口 航平、菊間 隆志、北本 勝ひこ  
日本農芸化学会大会 (平成 27 年 3 月 26 日 ~ 29 日 岡山)

麹菌における CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集技術の確立  
片山 琢也、中村 英淳、田中 勇氣、岡部 知弥、藤井 涉、北本 勝ひこ、丸山 潤一  
日本生物工学会大会 (平成 27 年 10 月 26 日 ~ 28 日 鹿児島)

麹菌実用株におけるゲノム編集と非同組換え修復欠損を用いた高効率遺伝子操作技術の開発  
中村 英淳、片山 琢也、岡部 知弥、岩下 和裕、藤井 涉、有岡 学、北本 勝ひこ、丸山 潤

—  
日本農芸化学会大会 (平成 28 年 3 月 27 日 ~ 30 日 札幌)

麹菌 *A. oryzae* における核の自食機構ヌクレオファジーの解析  
三谷 隆宏、菊間 隆志、北本 勝ひこ  
日本農芸化学会大会 (平成 28 年 3 月 27 日 ~ 30 日 札幌)

麹菌 *A. oryzae* におけるオートファジー関連タンパク質 *AoAtg26* の局在解析  
菊間 隆志、有岡 学、北本 勝ひこ  
日本農芸化学会大会 (平成 28 年 3 月 27 日 ~ 30 日 札幌)

〔図書〕(計 2 件)  
麹菌におけるオートファジーの生理的役割  
菊間隆志、北本勝ひこ  
発酵・醸造食品の最前線、シーエムシー出版、73-80 (2015)

和食とうま味のミステリー: 国産麹菌オリゼがつむぐ千年の物語  
北本勝ひこ  
河出書房新社 (2016)

〔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](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, Katsuhio)  
東京大学・農学生命科学研究科・研究員  
研究者番号: 20272437