

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26292037

研究課題名(和文) 糸状菌MAPキナーゼ経路が制御する細胞壁多糖の生合成を介した細胞接着と性分化

研究課題名(英文) Hyphal adhesion and sexual development via cell wall polysaccharide controlled by MAP kinase cascades

研究代表者

阿部 敬悦 (Abe, Keietsu)

東北大学・農学研究科・教授

研究者番号：50312624

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* の細胞壁は、最外層が α -1,3-グルカン(AG)で菌糸接着に寄与する。*A. nidulans* は *agsA*, *agsB* の2種のAG合成酵素遺伝子を有し、無性生殖時には Cell Wall Integrity MAP kinase 経路支配の *agsB* がAGを合成し、有性生殖時には *agsA*, *agsB* の両方が発現することを明らかにした。また *agsA* と *agsB* は各々分子量150万と40万のAGを合成し、接着性に差があることを発見した。GPIアンカー型細胞外アミラーゼ *AgtA* がAGのスペーサー α -1,4-オリゴ糖を切断することでAG分子量を制御する可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：The model fungus *Aspergillus nidulans* possesses α -1,3-glucan (AG) at the outermost layer of cell wall and AG is involved in hyphal adhesion. *A. nidulans* has two AG synthase genes *agsA* and *agsB*. We revealed that AG biosynthesis in asexual cycle is regulated by Cell Wall Integrity MAP kinase cascade that positively regulates the gene expression of *agsB*. In sexual development, both the *agsA* and *agsB* genes were expressed. We further demonstrated that *agsA* and *agsB* synthesize 150 kDa and 40 kDa of AG, respectively, and the difference in Mw of AG led to difference in adhesive property in hyphal aggregation. Moreover, molecular mass of AG seems to be regulated by GPI-anchored amylase *AgtA* that might digest the spacer α -1,4-linked glucooligosaccharides between α -1,3-glucan repeating units.

研究分野：応用微生物学

キーワード：糸状菌 細胞壁 多糖 α -1,3-グルカン 菌糸 接着 分化 高密度培養

科学研究費助成事業 研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

糸状菌の細胞壁多糖の生合成制御機構には、酵母の α -1,3-グルカン(BG)やキチンの生合成モデルが長らく適用されてきた。酵母では、細胞壁損傷に応答するシグナル伝達系 Cell Wall Integrity MAP キナーゼ(CWI)経路が BG やキチンの生合成を制御する。我々は、糸状菌にも CWI 経路が保存されているが、糸状菌 CWI 経路は BG やキチンではなく酵母には存在しない新奇多糖 α -1,3-グルカン(AG)の生合成を制御することを発見した(引用 1)。動植物は糸状菌の感染を受けると、糸状菌表層の BG やキチンを認識して、防御応答を示す(引用 2)。近年、AG は糸状菌細胞壁の最外層に存在し、内層にある BG やキチンを被覆することで感染宿主の防御応答を回避するためのステルス因子であることが示された(図 1)(引用 3)。糸状菌は一般に菌糸細胞が接着し菌糸塊を形成するが、我々はモデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* において、AG 合成酵素遺伝子の欠損により菌糸細胞間の接着が不全となり菌糸分散することを発見し、AG が菌糸接着因子であることを明らかにした(引用 4)。しかし、不溶性多糖である AG そのもののどのような化学的特性が菌糸接着による菌糸塊形成に寄与しているのかは不明であり、性分化も含めた形態形成への AG の関与も不明である(成果論文)。

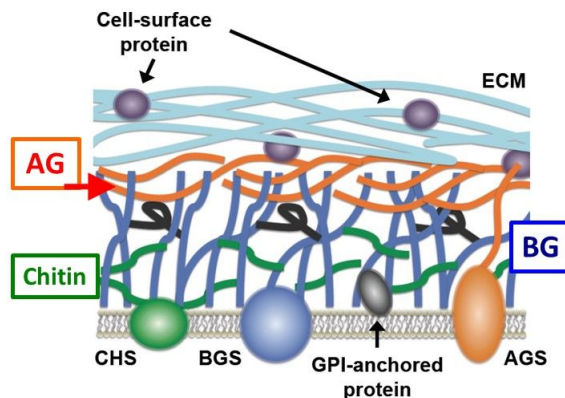


図 1. 糸状菌の細胞壁構造

2. 研究の目的

(1) CWI 経路-AG 生合成系による有性生殖制御機構の解析 ~ *A. nidulans* には、*agsA* と *agsB* の 2 種の遺伝子が存在し、通常は *agsB* が発現しており、*agsA* は発現していない。CWI 経路は栄養生長時には *agsB* の発現を通じて細胞表層への AG の提示と菌糸接着を制御すると考えられている。本研究では、有性生殖時に *agsA* および *agsB* の発現を通じた形態形成や性分化が起きるか否かを検証する。

(2) AG 構造の化学的解析 ~ *A. nidulans* の AG 合成酵素遺伝子の *agsB* は、*amyG* (細胞内アミラーゼ遺伝子) - *agtA* (細胞外 GPI-アンカー型アミラーゼ) - *agsB* (細胞膜性 AG 合成酵素) と 3 遺伝子でクラスターを成している

(5)。一方、*agsA* (細胞膜性 AG 合成酵素遺伝子) は独立して存在する。本研究では、*AgsA*, *AgsB* が合成する AG の化学構造に差異、および、単独発現時の菌糸接着性等の表現型の差異があるかを検証することで、AG 化学構造と菌糸接着性の関係性を明らかにする。さらに、*AgsB* は *AmyG* および *AgtA* と共同して AG を合成していると考えられることから、AG 合成機構における *AmyG*, *AgtA* 両酵素の機能を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) CWI 経路-AG 生合成系による有性生殖制御機構の解析 ~

A. nidulans には *agsA* と *agsB* の 2 種の AG 合成酵素遺伝子が存在し、栄養生長時には主に *agsB* が発現して AG を合成しているが、*agsA* は殆ど発現していない。そこで *AgsA*, *AgsB* の発現時期および局在を解析するため、各 *AGS* 遺伝子のプロモーター領域に GFP 遺伝子を付加した株 (*PagsA-GFP* および *PagsB-GFP*) 株を作製し、栄養生長期および有性生殖期において蛍光顕微鏡観察を行った。さらに α -1,3-グルカナーゼのグルカン結合ドメインと GFP の融合タンパク質 (AGBD-GFP) を用いて有性世代の細胞を染色した。

(2) AG 構造の化学的解析 ~

(2-1) *AgsA* および *AgsB* の合成する AG の構造解析 : *A. nidulans* の *AgsA*, *AgsB* それぞれが合成する多糖成分を解析するため片方の *ags* 遺伝子破壊株を親株として、もう一方の *ags* 遺伝子のプロモーター領域を *Ptef1* に置換し、*ags* 遺伝子の高発現株を作製し (*agsA^{OE}* および *agsB^{OE}* 株) 各株の細胞壁成分を熱水アルカリ抽出法により分画した。次に、AG が主に含まれるアルカリ可溶 (AS) 画分について、 α -1,3-グルカナーゼ (AGase) による酵素分解、 ^{13}C NMR、メチル化分析、ゲルろ過による分子量分析を行って *AgsA*, *AgsB* が合成する多糖成分の化学構造を解析した。

(2-2) *AgtA* の AG 生合成機構における役割の解析 : *AgtA* は GPI アンカーを有し GH ファミリー-13 に属するアミラーゼと推定された。そこで *Pichia* 酵母で麹菌 *AgtA* (C 末端 His-tag 付加: *AgtA*-His6) を発現精製し、その酵素学的性質を決定した。併せて *AgtA* 高発現株および欠損株の細胞壁 AG の構造を解析した。

(2-3) *AmyG* の AG 生合成機構における役割の解析 : *AmyG* は菌体内アミラーゼと推定されている。そこで大腸菌で *AmyG* を発現精製して、酵素学的性質を解析する。また *A. nidulans amyG* 欠損株 (*amyG*) を作出し、細胞壁 AG の構造を解析する。

4. 研究成果

(1) CWI 経路-AG 生合成系による有性生殖制御機構の解析 ~ 栄養生長期における菌糸の GFP 蛍光を観察した結果、*PagsB-GFP* 株では

菌糸全体に蛍光が観察されたのに対し、*PagsA-GFP* 株の菌糸では殆ど蛍光は観察できなかった。一方、有性生殖期においては、いずれの株でも有性生殖器官近傍に存在する Hülle cell で強い GFP 蛍光が観察された(図 2)。さらに AGDB-GFP 染色においても、栄養生長菌糸と有性生殖期の Hülle cell で蛍光が観察され AG の存在が確認された。これらの結果は、*A. nidulans* の栄養生長時(無性世代)には CWI 経路が *agsB* の発現制御を通じて AG 合成を調節するが、有性生殖時にはフェロモンシグナル伝達系の MpkB 経路が両 AGS 遺伝子の転写を制御して有性生殖器官の形成に関与することを示唆している。

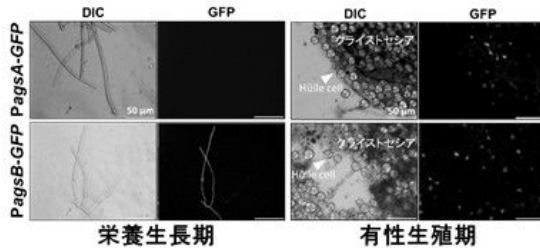


図 2. 有性生殖器官での *agsA*, *agsB* の発現

(2) AG 構造の化学的解析

(2-1) *AgsA* および *AgsB* の合成する AG の構造解析: *agsA^{OE}* および *agsB^{OE}* 株の表現型を観察した結果、*agsB^{OE}* 株は野生株と同様に菌糸細部が接着集めた密な菌糸塊を形成したが、*agsA^{OE}* 株は菌糸接着が緩く粗な菌糸塊を形成した(図 3)。

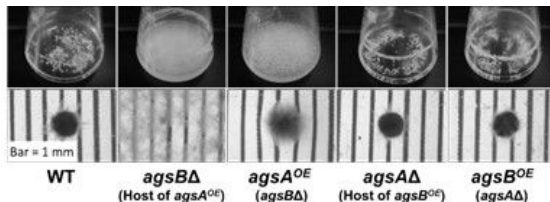


図 3. 液体振盪培養における AGS 遺伝子破壊株および AGS 遺伝子高発現株の表現型

両高発現株は、野生株の約 2 倍の細胞壁 AG 量を有し、¹³C NMR, メチル化分析の結果から、両株は共に構造的に類似の AG を合成しており、分岐率などには差が無かった。分子量分析の結果、*agsA^{OE}* 株の AG の分子量は 1,480 kDa (重合度 Dp= 9,160)、*agsB^{OE}* 株 370 kDa (Dp= 2,230)、野生株 150 kDa (Dp=910) と大きな差があることが明らかとなった(表 1)。さらに 1,4 結合を選択的に分解するスミス分解後の AG の平均分子量は、*agsA^{OE}* 株 41.6 kDa (Dp=257)、*agsB^{OE}* 株 38.3 kDa (Dp=237)、野生株 31.6 kDa (Dp=197) とほぼ同じであった。

表 1. *agsA^{OE}*, *agsB^{OE}* 株の AG の分子量

Samples	M _p ^a (kDa)	DP _n ^b
WT AS2	147 ± 52	908 ± 319
WT AS2, Smith-degraded	31.6 ± 3.7	195 ± 23
<i>agsA^{OE}</i> AS2	1,480 ± 80	9,160 ± 520
<i>agsA^{OE}</i> AS2, Smith-degraded	41.6 ± 5.8	257 ± 36
<i>agsB^{OE}</i> AS2	372 ± 47	2,230 ± 290
<i>agsB^{OE}</i> AS2, Smith-degraded	38.3 ± 3.0	237 ± 19

^aM_p, peak top molecular mass; ^bDP_n, degree of polymerization. ^cAS2, alkali-soluble fraction. Values represent the mean ± SD of three replicates.

以上の結果は、いずれの株の AG も、-1,4 結合のグルコースオリゴ糖のスペーサーを介して、Dp=200 程度の -1,3 グルカン鎖ユニットが繰り返し繋がった構造から出来ており、分子量差は繰り返しユニット数の差であることが明らかとなった。このことから、AG の示す菌糸接着能は、細胞壁中の AG 量のみならず合成される AG の分子量にも依存することを初めて明らかにした。

(2-2) *AgtA* の AG 生合成機構における役割の解析: 麹菌 *A. oryzae* や *A. nidulans* の *agtA* 遺伝子高発現株は、細胞壁 AG 量が減少し、野生株より小さな菌糸塊を形成した。それら、高発現株の AG 分子量は、10 kDa 以下に減少していた。(2-1) のスミス分解の結果より AG は 1,4 結合のスペーサーグルコースオリゴ糖を有していることも示唆されており、我々は、GPI アンカー型アミラーゼ *AgtA* が AG のスペーサーオリゴ糖部位を細胞外で切断して、AG 分子量を制御すると推定している。そこで麹菌の *AgtA*-His6 を *Pichia* 酵母で発現精製してその酵素学的性質を調べた。*AgtA* はマルトペンタオース (G5) を 2 糖と 3 糖に分解するエンド型活性を示し、G5 よりもマルトノナオース (G9) により強い活性を示した(図 4)。以上の結果は、*AgtA* が AG のスペーサー -1,4 結合オリゴ糖を切断する可能性を強く示唆する。

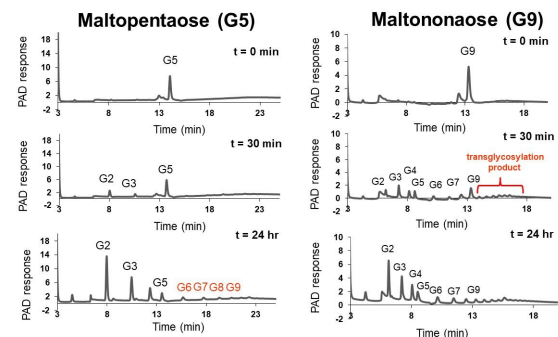


図 4. *AgtA* のマルトオリゴ糖分解

(2-3) *AmyG* の AG 生合成機構における役割の解析: 細胞内 *AmyG* は、AG の還元末端側のプライマー(スペーサーでもある)合成を行っている と推定されている。先に合成された DP=200 の -1,3-グルカン鎖サブユニットと次に合成されたサブユニットは、プライマー部位を介して AG 合成酵素の細胞外ドメインの転移反応により連結されると推定されている。*A. nidulans amyG* は、野生株より小さな菌糸塊を形成し、細胞壁 AG 量も 25% 以下に減少していた。AG 分子量も 10 万以下に減少していた。以上の結果は *AmyG* がプライマー・スペーサー合成の主要酵素ではあるが、まだ他に弱いプライマー合成機構が残っていることを示唆した。

以上、(2-1) ~ (2-3) までの成果より、糸状菌における菌糸接着性は、細胞壁中の AG 量のみならず AG の分子量に依存することを初めて明らかにした。

(3) AG の菌糸接着性を制御した産業糸状菌の

高密度培養新技術の開発

AG の糸状菌系接着能の発見と AG の生合成機構の解析の進展から、予想外に応用技術の開発に成功した。すなわち、AG 欠損株が高密度培養と酵素生産に適することを発見し、糸状菌の高密度培養技術の開発に成功した(図 5; 成果論文 ; 特許第 6132847 号; 特願 2017-091734)。現在、企業への技術移転を行っている。

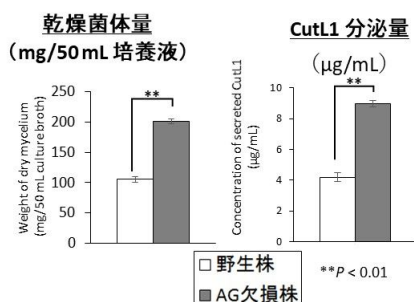


図 5. 麹菌 AG 欠損株の生育と酵素生産性

<引用文献>

- Fujioka T. et al., *Eukaryotic Cell* **6**:1497-1510 (2007)
Gastebois A. et al. *Future Microbiol.* **4**:583-595 (2009)
Rappleye C. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **104**: 1366-1370 (2007)
Yoshimi A. et al., *PLoS ONE* **8**:e54893 (2013)

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 10 件)

- Chang P-K et al. (6 人中 6 番目), *Aspergillus flavus* GPI-anchored protein-encoding *ecm33* has a role in growth, development, aflatoxin biosynthesis and maize infection. *Applied Microbiol. Biotechnol.* (2018) Accepted, doi:10.1007/s00253-018-9012-7. 査読有
Yoshimi A., Miyazawa K., Abe K.*, Function and biosynthesis of cell wall -1,3-glucan in fungi, *J. Fungi*, 3(4). pii E63 ; doi:10.3390/jof3040063 (2017) 査読有
Zhang S. et al. (9 人中 7 番目), Cell wall a-1,3-glucan prevents a-amylase adsorption onto fungal cell in submerged culture of *Aspergillus oryzae*. *J. Biosci. Bioengi.* ;**124**(1):47-53 (2017) doi: 10.1016/j.jbiosc.2017.02.013. 査読有
Yoshimi A. et al. (7 名中 7 番目), Characterization of cell wall -1,3-glucan-deficient mutants in *Aspergillus oryzae* which were isolated by a screening method based on their

sensitivities to Congo red or Lysing Enzymes. *J. Applied Glycobiol.* **64**(3):65-73 (2017) 査読有 doi: 10.5458/jag.jag.JAG-2017_004

Yoshimi A., Miyazawa K., Abe K.*, Cell wall structure and biogenesis in *Aspergillus* species, *Biosci. Biotech. Biochem.* **80** :1700-1711 (2016) 査読有 doi: 10.1080/09168451.2016.1177446. Miyazawa K. et al. (7 名中 7 番目), Increased enzyme production under liquid culture conditions in the industrial fungus *Aspergillus oryzae* by disruption of the genes encoding cell wall -1,3-glucan synthase. *Biosci. Biotech. Biochem.* **80**:1853-1863 (2016)doi:10.1080/09168451.2016.1209968. 査読有

Mizutani O. et al. (9 名中 9 番目), Substantial decrease in cell wall -1,3-glucan caused by disruption of the *kexB* gene encoding a subtilisin-like processing protease in *Aspergillus oryzae*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **80** :1781-1791 (2016) doi:10.1080/09168451.2016.1158632, 査読有

阿部敬悦, 吉見 啓, 高橋 徹, 醤油醸造微生物の温故知新 - 麹菌を例に-, 醤油の研究と技術 **41**:27-34 (2015)

吉見 啓, 阿部敬悦, 糸状菌の細胞壁多糖 -1,3-glucan 欠損株の物質生産への応用, *バイオサイエンスとバイオインダストリー* **73** :24-28 (2015)

Yoshimi A., et al. (6 名中 6 番目), Mitogen-activated protein kinases MpkA and MpkB independently affect micafungin sensitivity in *Aspergillus nidulans*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **79**:836-844 (2015) doi: 10.1080/09168451.2014.998619. 査読有

[学会発表](計 20 件)

宮澤 拳ら, 麹菌 *Aspergillus oryzae* の液体振盪培養における菌系接着機構の解析, 第 17 回糸状菌分子生物学コンファレンス, 2017

宮澤 拳ら, 麹菌 *Aspergillus oryzae* において菌系接着に関与する多糖の特定とその欠損株の表現型解析, 日本応用糖質学会平成 29 年度大会, 2017

吉見 啓ら, *Aspergillus* 属菌における菌系凝集因子の解析と高密度培養による物質生産への応用, 日本菌学会第 61 回大会・環境微生物系合同大会, 2017 年

吉見 啓ら, *Aspergillus oryzae* の -1,3-グルカンおよびガラクトサミノガラクトタンク欠損株の菌系完全分散性, 平成 29 年度応用糖質学会東北支部講演会, 2017 年

阿部敬悦, 醸造-古くて新しい生物産業-醸造に見出されるユニークな生物反応とその応用に向けて, 東京大学醸造微生物学寄付講座(キッコーマン)開設記念シンポジウム, 2017

Miyazawa K. et al., Comparative analysis of α -1,3-glucan synthases, AgsA and AgsB in *Aspergillus nidulans*, 29th Fungal Genetics Conference, 2017
宮澤 拳ら, *Aspergillus nidulans* における α -1,3-グルカン合成酵素 AgsA, AgsB の機能の比較解析, 第 16 回糸状菌分子生物学コンファレンス, 2016

菅原安寿美ら, 糸状菌 PKC に特異的な新規阻害剤 Z705 の作用機構解析, 第 16 回糸状菌分子生物学コンファレンス, 2016
吉見 啓ら, コンゴレッド感受性に基づく 麹菌の細胞壁多糖 α -1,3-グルカン低減株の分離とその性質, 日本応用糖質科学会平成 28 年度大会(第 63 回), 2016

阿部敬悦, 吉見 啓, 糸状菌細胞ストレス応答シグナル伝達系と細胞壁 α -1,3-グルカンの生物学的機能, 平成 28 年度応用糖質科学会関東支部シンポジウム, 2016 年(招待)

宮澤 拳ら, *Aspergillus* 属菌間における細胞壁 α -1,3-グルカン生合成機構の比較解析, 平成 28 年度応用糖質科学会東北支部講演会, 2016 年

Miyazawa K. et al., Growth characteristics and protein productivity of *Aspergillus oryzae* quintuple disruption mutants of α -1,3-glucan related genes. 13th European Fungal Genetics Conference, 2016 年

阿部敬悦, 発酵・醸造における麹菌の新たな開発の方向性, 第 4 回味噌技術研究会発表会(招待)2016 年

吉見 啓ら, 細胞壁多糖 α -1,3-グルカンが低減した麹菌のスクリーニング方法の開発, 第 15 回糸状菌分子生物学コンファレンス, 2015 年

宮澤 拳ら, 麹菌における α -1,3-グルカン生合成酵素関連遺伝群の五重破壊株における培養性状と物質生産性, 第 15 回糸状菌分子生物学コンファレンス, 2015 年

宮澤 拳ら, 麹菌における α -1,3-グルカン合成酵素遺伝とアミラーゼ遺伝子の五重破壊株における培養性状, 平成 27 年度応用糖質科学会東北支部講演会, 2015 年

庄司郁央ら, 糸状菌 PKC に特異的な新規阻害剤に対する酵母スクリーニング系の最適化 第 14 回糸状菌分子生物学コンファレンス, 2014 年

吉見 啓ら, 麹菌類の細胞壁 α -1,3-glucan(AG)の分析と AG の応用利用に向けたオリゴ糖化, 第 63 回応用糖質科学会大会, 2014 年

吉見 啓ら *Aspergillus* 属糸状菌

α -1,3-グルカン欠損株における細胞壁多糖の分析と培養性状, 応用糖質科学会平成 26 年度東北支部会, 2014 年

阿部敬悦, 醤油醸造微生物の温故知新 - 乳酸菌と麹菌を中心に, 第 78 回醤油研究発表会, 2014 年

〔図書〕(計 1 件)

Hagiwara D., Yoshimi A., Sakamoto K., Gomi K., and ***Abe K.**, "Response and adaptation to cell wall stress and osmotic stress in *Aspergillus* species." Stress Biology of Yeasts and Fungi: Application for Industrial Brewing and Fermentation. Takagi H., and Kitagaki H eds. Springer, Chapter 13 pp199-218 (2015).

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

名称: 麹菌の細胞壁変異株の選抜方法、当該細胞壁変異株、当該細胞壁変異株を用いた米製品およびその製造方法

発明者: 吉見 啓, 阿部敬悦, 川上和義

権利者: 国立大学法人東北大学

種類: 特許

番号: 特願 2015-205934

出願年: 2015 年

国内外の別: 日本

名称: 変異型糸状菌および当該変異型糸状菌を用いた物質生産方法

発明者: 阿部敬悦, 吉見 啓, 宮澤 拳, 田畑風華, 五味勝也, 佐野元昭

権利者: 国立大学法人東北大学

種類: 特許

番号: 特願 2017-091734

出願年: 2017 年

国内外の別: 日本(米国・欧州出願予定)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿部 敬悦 (ABE, Keietsu)

東北大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号: 50312624

(2) 研究分担者

佐野 元昭 (SANO, Motoaki)

金沢工業大学・ゲノム工学研究所・教授

研究者番号: 80410299

矢野 茂和 (YANO, Shigekazu)

山形大学・大学院理工学研究科・助教

研究者番号: 50411228

(3) 連携研究者

吉見 啓 (YOSHIMI, Akira)
東北大学・未来科学技術共同研究センター・准教授
研究者番号：60436102

金丸京子 (KANAMARU, Kyoko)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・助教
研究者番号：00420365

(4)研究協力者

宮澤 拳 (MIYAZAWA, Ken)
東北大学大学院農学研究科・D1