



麹菌の細胞生物学的解析と応用に関する研究

東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻 教授 北本勝ひこ

麹菌 (*Aspergillus oryzae*) は、わが国で古くから日本酒、味噌、醤油などに使用されてきた産業上重要な微生物であり、「国菌」とも呼ばれている。麹菌は明治以来、多くの研究がなされているが、その多くが育種や麹製造方法などに関連するものが多く、真核微生物である酵母に比べて、基礎的な研究は大幅に遅れていた。その主な原因は、有性生活環をもたない不完全菌であり、古典的な遺伝学が適用できないことが挙げられる。そこで、下記に記すような、ゲノム情報を駆使して、麹菌の細胞生物学的解析と応用に関する研究を行った。

1. 麹菌ゲノム解析

1997年、産学官からなる麹菌 EST 解析プロジェクトを立ち上げ、その代表として、さまざまな培養条件で発現している mRNA の網羅的な解析を行った。その成果をもとに、2001年から NITE (製品評価機構) を中心とした産学官からなる麹菌ゲノムコンソーシアムによりゲノム解析が開始され、その中心メンバーとして膨大なアノテーション作業などを遂行し、8本の染色体上に、約 12,000 遺伝子があることを明らかにした。その結果は 2005年に *Nature* 誌に掲載された。これにより、遅れていた麹菌の分子生物学的研究が飛躍的に進展し、多くの研究成果が日本の研究グループにより発表されるようになっていく。

2. 緑色蛍光タンパク質を用いた麹菌の全オルガネラの可視化

麹菌などの糸状菌では、細胞内部の構造については、詳細な解析はなされていなかったため、酵母の知見をもとに推定されたものがほとんどであった。筆者は、麹菌を理解するためには、生きている麹菌細胞内部の構造を知ることが重要であると考へ、EGFP を用いたライブセルイメージングに取り組み、ゲ

ノム情報を利用して、オルガネラの可視化を試みた。これまでに、液胞、核、小胞体、ゴルジ体、ミトコンドリア、ペルオキシソーム、Woronin body など、すべてのオルガネラの可視化に成功した。

これにより、一つの細胞に多数の核が共存し、菌糸生長とともに運ばれる様子や細胞の部位により変わる液胞の形態などを明らかにした。また、EGFP と同時に赤色蛍光タンパク質 (DsRed) を用いた、2色同時可視化に関しても、技術を確立し、細胞内小胞輸送、エンドサイトーシス、オートファジーなどの解析を進めている。

以上の結果をもとにして、麹菌細胞の構造をまとめたものが図1である。麹菌は、隔壁により区画された多数の細長い細胞からなる多細胞生物であり、特に、先端生長することにより旺盛な生育を示すので、菌糸先端の細胞が最も活発であることが知られている。麹菌のような糸状菌の細胞には、酵母と異なり、多数の核が存在すること、隔壁孔のそばに存在する Woronin body (オロニン小体) や、先端部位には分泌酵素を含む分泌小胞が集まるスピッツェンケルパー (Spitzenkörper) といった糸状菌に特有のオルガネラも存在する。

3. 麹菌の細胞内タンパク質小胞輸送に関する解析

麹菌はアミラーゼなどを多量に分泌し、真核生物の中で最も高い分泌能をもつ生物の一つである。しかし、細胞内タンパク質小胞輸送に関する分子生物学的解析はほとんどなされていなかった。そこで、分泌小胞の膜融合で特異性を決める約 20 の SNARE タンパク質の局在を EGFP を用いて網羅的な局在解析を行った。これは、糸状菌で初めての報告であり、アカパンカビなど世界の糸状菌研究者から高い評価を得ている。これによ

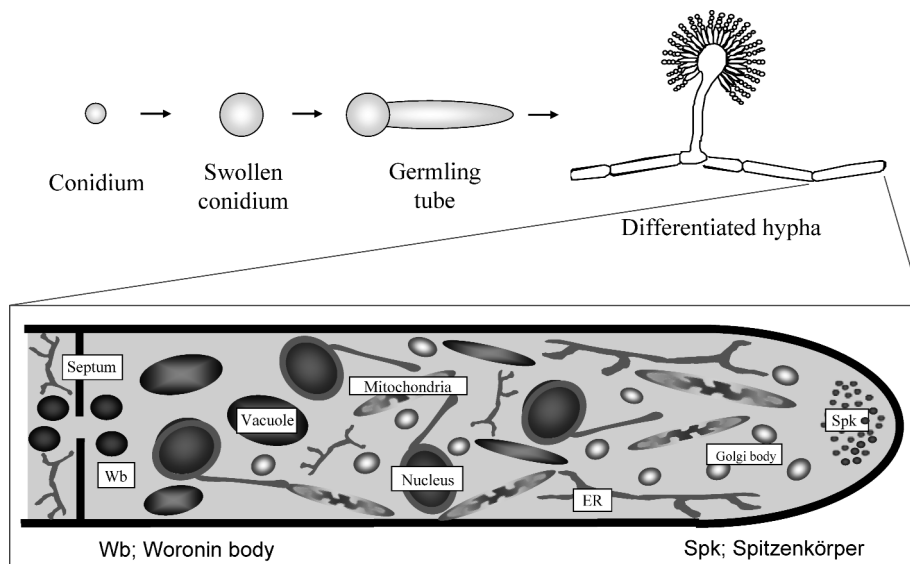
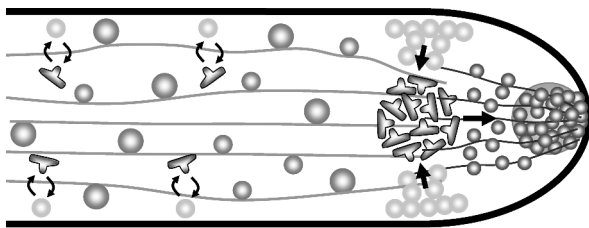


図1 EGFPを用いた可視化により明らかになった麹菌の細胞構造

り、麹菌における小胞体からゴルジ体, Spitzenkörper, 細胞膜への分泌経路が明らかになった。また、タンパク質分泌(エクソサイトーシス)と表裏の関係にあるエンドサイトーシスの可視化にも糸状菌で初めて成功した。エンドサイトーシスにより形成されたエンドソームが微小管上を高速で移動する(4~5 $\mu\text{m}/\text{秒}$)様子の撮影にも成功した。現在、分泌にかかわる Rab タンパク質の網羅的局在観察とともに、個々の機能解析により見いだした酵母と異なる機能について、高分泌能との観点から研究を進めている。図2に麹菌の高いタンパク質分泌能を支える菌糸先端部位でのエンドサイトーシスによるリサイクルのモデルを示す。麹菌では、分泌小胞は微小管を使った長距離移動により運ばれ、菌糸先端部位でアクチンケーブルに乗り換えて細胞外に分泌される。分泌小胞に存在する v-SNARE は、細胞膜と融合後、速やかにエンドサイトーシスにより取り込まれ、新たな分泌小胞のためにリサイクルされることを明らかにした。これは、麹菌のような糸状菌が高い分泌能をもつことに大きな貢献をしていると考えられる。

4. 麹菌の液胞機能に関する解析とオートファジー

麹菌は、多細胞からなり、先端細胞の生長により菌糸を伸ばすことによりコロニーを形成する。また、気中菌糸と呼ばれる菌糸を空中に向かって伸ばす。これまで、糸状菌の細胞生物学的理解は遅れており、常に栄養が供給される先端細胞のみを対象として研究が進められてきた。筆者は、液胞関連遺伝子の機能解析から、培地からの栄養供給がなされない細胞(気中菌



→ Vesicular trafficking flow — Microtubule — Actin cable
 ● Secretory vesicle ○ Endocytic vesicle ● Early endosome
 ▢ ERC; Endocytic recycling compartment ● Spitzenkörper

図2 麹菌の高いタンパク質分泌能を支える菌糸先端部位でのエンドサイトーシスによるリサイクル

糸, コロニー内部の菌糸など)では特殊な形態の液胞が発達しており、チューブ状の液胞により栄養が運ばれることを示した。また、オートファジー遺伝子の解析から、外部からの栄養供給が期待されない分生子形成や、分生子からの発芽時は、オートファジーにより自身の細胞質を栄養源としていることを明らかにした(図3)。

また、最近、栄養飢餓時には、麹菌は自分の核をまるごとオートファジーにより分解することを糸状菌で初めて発見した。これは、酵母のように多くの単核細胞生物では見られないことであるが、一つの細胞に多数の核が存在している糸状菌がもつ特有な能力といえる。遺伝情報の担い手の核を、いざというときの栄養源として利用しうるのは、麹菌のしたたかさを感じるとともに、これまで、どうして麹菌は多核なのかという疑問に対する一つの答えといえよう。

5. 糸状菌特異的オルガネラ Woronin body の機能解析

麹菌は多数の細長い細胞が連なり、隣接する細胞は隔壁で仕切られている。隔壁の中心には隔壁孔と呼ばれる穴があいており、隔壁孔を通じて細胞間連絡をしている。これは、ある細胞が損傷した場合、隣の細胞も溶菌に巻き込まれるリスクを伴うことでもある。そのため、麹菌などの糸状菌では Woronin body という球状のオルガネラが隔壁孔のそばに存在し、緊急の場合、隔壁孔をふさぐ働きをしている。筆者らは Woronin body を構成するタンパク質をコードする遺伝子 (*Aohex1*) をクローニングし、多細胞からなる糸状菌の生存戦略に必須の役割を果たしていることを明らかにした。また、さらに、隔壁孔はいつも開いているわけではなく、環境ストレスに応じて開閉することを別の AoSO タンパク質の挙動から明らかにしている。

6. 麹菌の異種タンパク質高生産宿主の開発

麹菌は高い分泌生産能力をもつが、高等生物由来のタンパク質の生産量は高くないことが多い。その原因の一つとして、麹菌のもつ多数のプロテアーゼによる分解があげられる。そこで、マイクロアレイ解析結果などから異種タンパク質分解に関与するプロテアーゼを特定するとともに、関与するプロテアーゼを順次多重破壊することにより高生産宿主株を造成した。現在までに10種のプロテアーゼを同時に破壊した株を取得している。また、UV変異により約80,000のコロニーから異種タンパク質を高生産する AUT (*A. oryzae* developed in Univ. of Tokyo) 変異株の取得にも成功した(特許出願中)。これらの

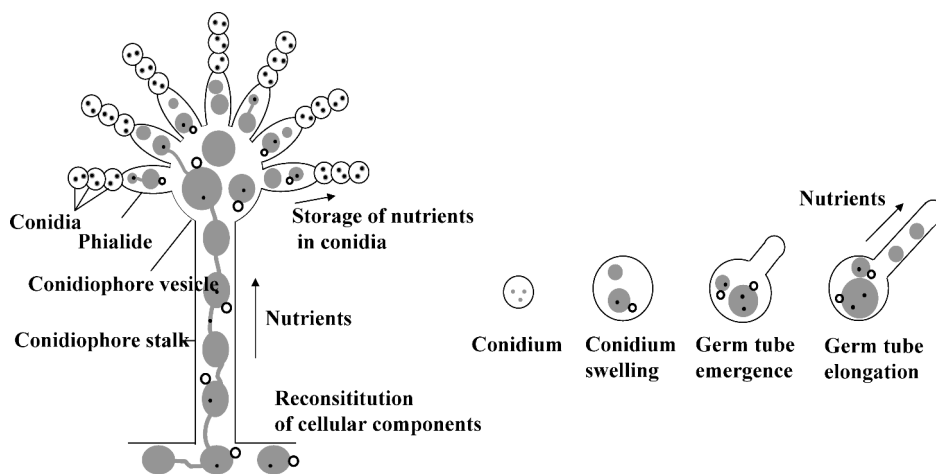


図3 分生子形成と発芽時におけるオートファジーの重要性

株を用いて、ウシキモシン、ヒトリゾチーム、味覚修飾タンパク質ミラクリンなどの高生産にも成功している。最近、ゴルジ体における Sorting nexin である AoVps10 遺伝子破壊株では培地中への異種タンパク質生産が大幅に向上することを発見した。これは、上述の細胞生物学的解析の過程で得た、異種タンパク質が液胞に運ばれて分解されることを示唆する結果から始められたものである。今後とも、ゲノム情報をもとにした麹菌の細胞生物学的解析を進めるとともに、これにより得られた知見に基づいて、「麹菌の底力」を発揮すべく、産業的利用につながる応用研究も進めていきたいと考えている。

本研究は、国税庁醸造試験所で、故 田村學造先生、秋山裕

一先生のご助言のもとに開始し、その後、東京大学微生物学研究室で山崎真狩先生のご指導のもとに基盤を作って今日に至ったものです。中島春紫、有岡 学、丸山潤一氏らの研究室新旧スタッフ、および多くの研究員、大学院生、学生諸君の熱意と努力、さらには、学内外の多くの研究者や企業の方々のご支援がこの研究を育ててくれました。ここに、深く感謝する次第です。最後に、研究者としてのスタートを切った東京大学微生物学研究室の恩師である故 田村學造先生、醸造試験所第二研究室（当時）の蓼沼 誠先生、東京大学理学部植物学教室（当時）の安楽泰宏先生、大隅良典先生に心より御礼申し上げます。