

## 麹菌のタンパク質高分泌能の分子細胞生物学的理解と セルファクトリーへの利用

Understanding of high protein secretion capability in *koji*  
mold by molecular and cellular biology techniques and its use as a cell factory

北本勝ひこ (KITAMOTO KATSUHIKO)  
東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授



### 研究の概要

麹菌 (*A. oryzae*) は、日本酒、味噌、醤油などの醸造に古くから使用されていることから安全が保証されている微生物であり、高いタンパク質分泌生産能力を持つため、酵素などの有用タンパク質生産にも利用されている。本研究は、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し、得られた成果をもとに有用なタンパク質を高生産する宿主を開発する。

研究分野：農学

科研費の分科・細目：細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：発酵生産、麹菌、タンパク質分泌、細胞工場、EGFP、タンパク質生産

### 1. 研究開始当初の背景

麹菌 (*A. oryzae*) ゲノム解析が終了し、全ゲノム情報が利用できるようになり、遅れていた分子生物学的、細胞生物学的研究が酵母とほぼ同様に進められる基盤が整備された。

### 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分子細胞生物学的手法により解析し、有用なタンパク質生産のためのセルファクトリーとして利用しようとするものである。

### 3. 研究の方法

下記のような方法を中心として研究を進めている。

- (1) 約 12000 遺伝子搭載のマイクロアレイをもちいたトランスクリプトーム解析。
- (2) EGFP などの蛍光タンパク質をリポーターとして、タンパク質小胞輸送に関わる分子の局在の可視化。(共焦点レーザー顕微鏡を用いたライブセルイメージング)
- (3) 麹菌の分子生物学的手法の開発。(発現プラスミドの効率的作製法、マーカーリサイクル法、*ligD*破壊株や *ku70*破壊株を用いた効率的な遺伝子破壊法の確立など)
- (4) タンパク質分泌に関わる遺伝子の同定と遺伝子破壊などによる機能解析。

### 4. これまでの成果

(1) 小胞体での分泌タンパク質の品質管理機構について、異種タンパク質発現によりおこる分泌ストレスにより変動する遺伝子を麹菌全 DNA 搭載マイクロアレイを用いて解析した。また、小胞体における分泌タンパク質の品質管理に関与する遺伝子として、糖タンパク質品質管理機構に関与する遺伝子 (カルネキシン、グルコシダーゼ II、グルコース転移酵素など) の遺伝子を単離し、局在解析、遺伝子破壊による機能解析を行った。

(2) タンパク質分泌経路に関わるオルガネラの可視化を目的として、19個の SNARE タンパク質遺伝子を単離し、その N 末に EGFP を融合したタンパク質として発現させ、それらの局在の可視化に成功した。これにより、核、小胞体、ゴルジ体、液胞などのオルガネラの局在を糸状菌で初めて明らかにした。

(3) タンパク質分泌に対するエンドサイトーシスの働きを明らかにすることを目的として、エンドサイトーシスに関与する遺伝子の条件発現株を作成することにより、その機能について解析を行い、麹菌の菌糸先端部位で活発にエンドサイトーシスが起きていることを見いだした。これは、高分泌能を維持するのに重要で

#### 〔4. これまでの成果 (続き)〕

あることを示唆している。

(4) 異種タンパク質高生産のための高機能宿主の開発

プロテアーゼ 2 重破壊株 (NS-tApE 株) を親株として、変異処理により異種タンパク質を高生産する変異株 (AUT 株) を取得した。

さらに、プロテアーゼ 2 重破壊株 (NS-tApE 株) をもとに、さらに 3 つのプロテアーゼ遺伝子の多重破壊を行い、異種タンパク質の生産性がさらに向上したプロテアーゼ 5 重破壊株を取得した。

また、異種タンパク質を高生産させるため  $\alpha$  アミラーゼ遺伝子を RNAi により発現抑制することにより、異種タンパク質生産が増大することを明らかにした。

(5) 育種した麹菌による分泌生産

上記のように取得した株により味覚修飾活性をもつ植物由来のネオクリンやミラクリンを培地中に活性のあるタンパク質として生産することに成功した。

#### 5. 今後の計画

(1) 分泌小胞の細胞内の動きを光変換型蛍光タンパク質等を用いて、詳細に解析する。

(2) 小胞輸送に関与するタンパク質の機能解析を進める。

(3) タンパク質分泌時に起こる分泌ストレスの解析を進める。

(4) 上記の知見をもとにして異種タンパク質をさらに効率よく生産することのできる宿主を開発する。

#### 6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

(研究代表者は太字、研究分担者は二重下線、連携研究者は一重下線)

1) Construction of quintuple protease gene disruptant for heterologous protein production in *Aspergillus oryzae*

J. Yoon, S. Kimura, J. Maruyama, **K. Kitamoto**, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 82, 691-701 (2009)

2) Endocytosis is crucial for cell polarity and apical membrane recycling in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*

Y. Higuchi, J. Shoji, M. Arioka, **K. Kitamoto**, *Eukaryot. Cell*, 8, 37-46 (2009)

3) Multiple gene disruptions by marker recycling with highly efficient gene-targeting background ( $\Delta$ ligD) in *Aspergillus oryzae*

J. Maruyama, **K. Kitamoto**, *Biotechnol Lett.*, 30, 1811-1817 (2008)

4) 糸状菌オルガネラの形態とその極性依存的な配置 - 麹菌の小胞輸送経路の解析からみえてきたもの

正路淳也、樋口裕次郎、丸山潤一、北本勝ひこ、*蛋白質核酸酵素*, 53, 753-759 (2008)

5) Systematic analysis of SNARE localization in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*

M. Kuratsu, A. Taura, J. Shoji, S. Kikuchi, M. Arioka, **K. Kitamoto**, *Fungal Genet Biol.*, 44, 1310-1323 (2007)

ホームページ等

[http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/Lab\\_Microbiology/](http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/Lab_Microbiology/)