

麹菌におけるペルオキシソームの新規機能の発見

丸山潤一（東京大学大学院農学生命科学研究科）

amarujun@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

はじめに

麹菌は古くから日本の醸造で日本酒・醤油・味噌の製造に用いられるとともに、タンパク質を大量に分泌する能力を有することから酵素生産や異種タンパク質生産にも利用されている。

演者は、麹菌は糸状菌であり、細長い菌糸を伸長させながら生長することに着目し、麹菌の細胞レベルで起こっている現象が、産業的な利用の面でも重要な役割を担っていると考えた。そして、麹菌研究に、緑色蛍光タンパク質 GFP (Green Fluorescent Protein) を用いた細胞内可視化技術を導入し、様々なオルガネラやタンパク質の局在を可視化、菌糸状の形態に特有の動態を見出した¹⁻³⁾。そのなかで、真核生物に普遍的に存在するオルガネラであるペルオキシソームについて、その新規機能を発見した。

糸状菌に特異的なオルガネラ Woronin body の形成にペルオキシソームが必要である

麹菌は多細胞生物であり、隣接する細胞は隔壁にあいた小さな穴である隔壁孔を通して、細胞間連絡を行っている。演者は、寒天培地上の麹菌のコロニーに水を添加して低浸透圧ショックを与えた結果、菌糸先端から溶菌する現象を発見した(図1)⁴⁾。しかし、溶菌した先端細胞と隔壁孔を介して連絡している2番目の細胞を観察すると、溶菌は伝播せず、細胞内容物が維持されていた。

糸状菌に特異的に存在するオルガネラ Woronin body は、菌糸損傷時に隔壁孔をふさぎ、隣接する細胞への溶菌の伝播を防ぐことが、透過型電子顕微鏡観察などにより示唆されてきたが、つい最近まで分子レベルからの解析は進んでいなかった。

演者は、Woronin body を構成するタンパク質 AoHex1 を蛍光タンパク質と融合して発現することで、生きた糸状菌細胞でこのオルガネラを初めて可視化した。その結果、低浸透圧ショックにより溶菌した先端細胞に隣接する隔壁孔を、Woronin body がふさいで溶菌の伝播を防ぐ様子を蛍光顕微鏡により観察することに成功した(図2)⁴⁾。また AoHex1 をコードする遺伝子の破

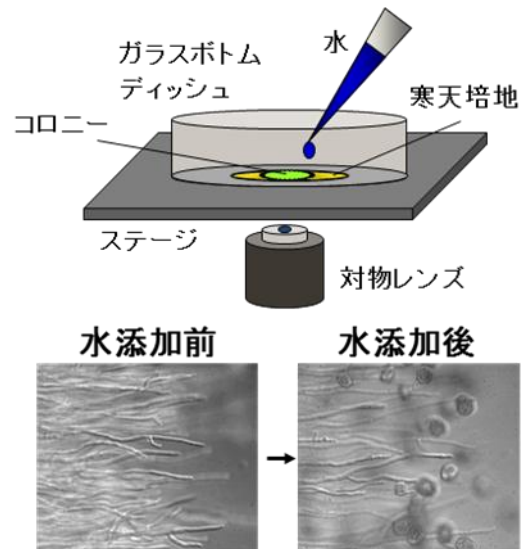


図1 低浸透圧ショックによる麹菌の菌糸先端の溶菌

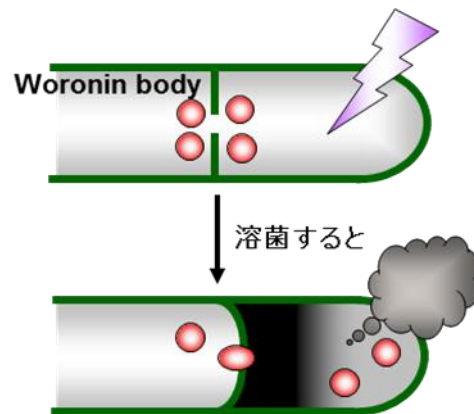


図2 Woronin body は溶菌時に隔壁孔をふさぐ

壊株を作製した結果、Woronin body が消失し、低浸透圧ショック時の溶菌の伝播を防ぐことができないことを明らかにした。以上の実験により、低浸透圧ショック時に隔壁孔をふさぎ、溶菌の伝播を防ぐ機能に Woronin body が必要であることを証明した。さらに、ストレスに応答して隔壁孔に凝集するタンパク質として見出した AoSO が、溶菌の伝播を防ぐ機能に関与することも明らかにした⁵⁾。

Woronin body 構成タンパク質 AoHex1 は C 末端にペルオキシソーム移行配列 PTS1 (Peroxisome Targeting Signal 1) を有する。このことから、Woronin body がペルオキシソームから派生するオルガネラである可能性が考えられた。演者らは、ペルオキシソームの分裂・増殖装置を利用して Woronin body が分化すると予想し、この過程に必要な Pex11 に着目した。麴菌には *PEX11* 遺伝子と相同性を有する遺伝子が 2 つ (*Aopex11-1*、*Aopex11-2*) 存在するが、遺伝子破壊株の表現型から *Aopex11-1* 遺伝子がペルオキシソームの分裂・増殖に必要であることがわかった。さらに *Aopex11-1* 遺伝子破壊株では、低浸透圧ショック下で隣接する細胞に溶菌が伝播するようになり、ペルオキシソームに留まったまま分化できない Woronin body が観察された⁶⁾。以上の結果から、AoPex11-1 がペルオキシソームの分裂・増殖とともに、Woronin body の分化にも関与することが明らかになった。

図 3 には演者らが明らかにした Woronin body の形成機構を示す。AoHex1 タンパク質はペルオキシソームに輸送され、重合化することで Woronin body の前駆構造を形成する。演者らは、AoHex1 の重合化がリン酸化修飾により調節されることを明らかにした⁷⁾。その後、ペルオキシソームの分裂・増殖装置を利用して、Woronin body は独立し、隔壁へと運ばれる。

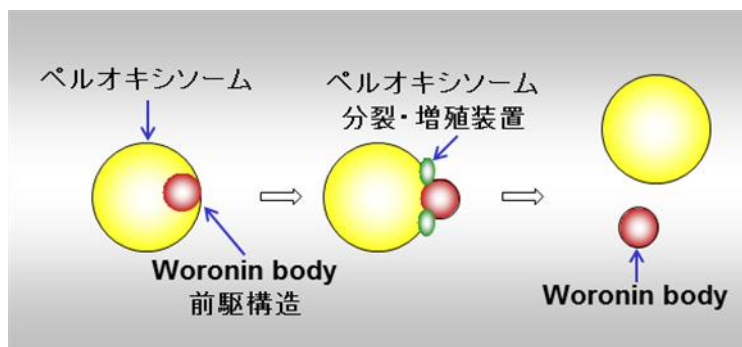


図 3 Woronin body はペルオキシソームから分化する

ビオチン生合成におけるペルオキシソームの関与の発見

ビタミンの一つであるビオチンは、カルボキシル基転移酵素の補酵素であり、細菌、植物、一部の菌類により生合成される。真核生物のビオチン生合成経路については植物での研究が先行していたが、ミトコンドリアでビオチンが合成されることが報告されていたのみであり、上流の経路は不明であった (図 4)。

ペルオキシソーム移行シグナルには PTS1 と PTS2 の 2 種類があり、それぞれの受容体 Pex5 と Pex7 により認識される。当初、演者らは Woronin body の分化機構をさらに解析することを目的に、麴菌のペルオキシソーム移行シグナルの受容体をコードする遺伝子 *Aopex5*、*Aopex7* の破壊株を作製した。これらの遺伝子破壊株は、ペルオキシソームの一般的な機能である脂肪酸の β 酸化を行うことができず、脂肪酸を炭素源とした最少培地では生育できない。ところが意外なことに、グルコースを炭素源とした最少培地でも、これらの株が生育できないことに気付いた。一方で栄

養が豊富な培地では正常な生育が見られたことから、その生育に必須の栄養成分を絞り込んだ。その結果、ビタミンの一種であるビオチンが、その株の正常な生育に必要であることを突き止めた。

さらにタンパク質配列データベースを検索した結果、ビオチン生合成経路の酵素のひとつ BioF (KAPA [7-keto-8-aminopelargonic acid] synthase)がペルオキシソーム移行シグナル配列を有することを見出し、そのペルオキシソームへの局在を示した。そして、BioF のペルオキシソーム局在が、ビオチンの生合成に必要であることを機能的に証明した (図4)⁸⁾。

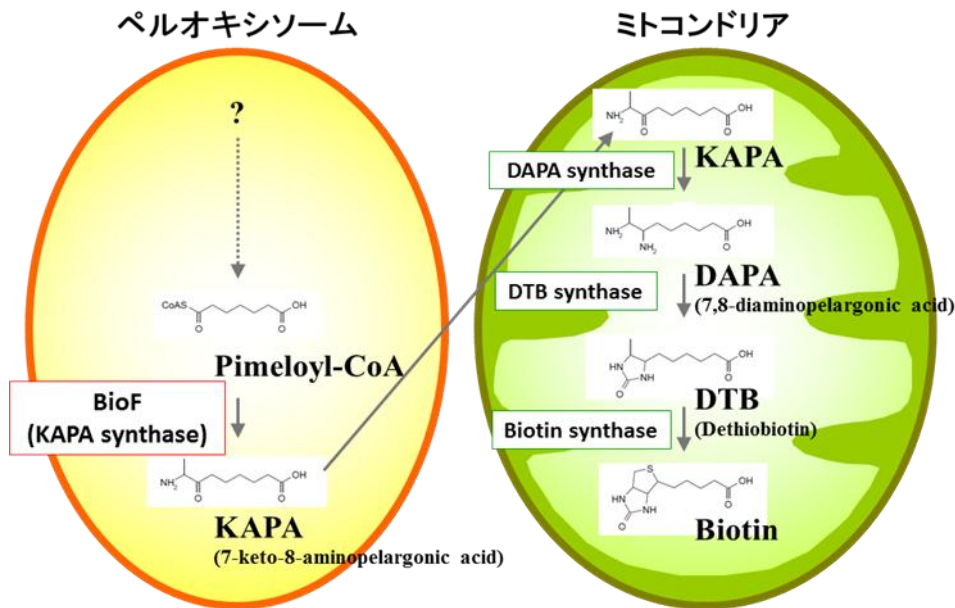


図4 真核生物におけるビオチンの生合成経路

以上の結果から演者らは、ペルオキシソームがビオチンの生合成に関与することを、世界で初めて発見した。また、植物の BioF タンパク質についてもペルオキシソームに局在することを明らかにしたことで、ビオチンを生合成する真核生物に普遍的な現象であることを明らかにした。

おわりに

演者らによるペルオキシソームの新規機能の発見は、基礎にとどまらず、以下の理由で農学に貢献するものと期待される。

麹菌を用いた酵素生産において、固体培養での生産性は液体培養と比べて優れている。図1で行った低浸透圧ショックの実験は、固体培養で水を添加することで酵素抽出を行う過程を模倣したものである⁹⁾。一方で、液体培地で培養した菌体では、このような溶菌は起こらなかった。溶菌するということは細胞内に残っている酵素が漏出することであり、観察された現象は固体培養における高い酵素生産性を説明する一つの理由であると考えられる。そして、ペルオキシソームからの Woronin body 形成を操作することにより、固体培養での酵素生産性がさらに向上する可能性を示した。

ペルオキシソームのビオチン生合成への関与は、麹菌だけではなく植物でも起きている普遍的な現象を発見したものである。このことは、ペルオキシソームの形成や代謝を制御してビオチン生合成をコントロールするという新しい方法論を提案し、将来、ビオチンに関連する食品機能性

の開発に波及効果を与えることが期待される。

謝辞

本研究は、東京大学大学院農学生命科学研究科 応用生命工学専攻 微生物学研究室で行われたものです。本研究のご指導、ご支援を賜りました微生物学研究室教授・北本勝ひこ先生に心より御礼申し上げます。また本研究の成果は、同研究室の方々、共同研究者の皆様、ならびにご支援くださいました皆様方のご協力によるものであり、深く感謝いたします。最後に、本賞にご推薦頂きました東京大学大学院農学生命科学研究科長・長澤寛道先生に厚く御礼申し上げます。

引用文献

1. J. Maruyama, H. Nakajima, K. Kitamoto (2001) Visualization of nuclei in *Aspergillus oryzae* with EGFP and analysis of the number of nuclei in each conidium by FACS. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* Vol. 65, 1504-1510.
2. J. Maruyama, S. Kikuchi, K. Kitamoto (2006) Differential distribution of endoplasmic reticulum network as visualized by the BipA-EGFP fusion protein in hyphal compartments across the septum of the filamentous fungus, *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genet. Biol.* Vol. 43, 642-654.
3. J. Maruyama, K. Kitamoto (2007) Differential distribution of the endoplasmic reticulum network in filamentous fungi. *FEMS Microbiol. Lett.* Vol. 272, 1-7.
4. J. Maruyama, P. R. Juvvadi, K. Ishi, K. Kitamoto (2005) Three-dimensional image analysis of plugging at the septal pore by Woronin body during hypotonic shock inducing hyphal tip bursting in *Aspergillus oryzae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Vol. 331, 1081-1088.
5. J. Maruyama, C. S. Escaño, K. Kitamoto (2010) AoSO protein accumulates at the septal pore in response to various stresses in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Vol. 391, 868-873.
6. C. S. Escaño, P. R. Juvvadi, F. J. Jin, T. Takahashi, Y. Koyama, S. Yamashita, J. Maruyama, K. Kitamoto (2009) Disruption of the *Aopex11-1* gene involved in peroxisome proliferation leads to impaired Woronin body formation in *Aspergillus oryzae*. *Eukaryot. Cell* Vol. 8, 296-305.
7. P. R. Juvvadi, J. Maruyama, K. Kitamoto (2007) Phosphorylation of the *Aspergillus oryzae* Woronin body protein, AoHex1, by protein kinase C: evidences for its role in the multimerization and proper localization of the Woronin body protein. *Biochem. J.* Vol. 405, 533-540.
8. Y. Tanabe, J. Maruyama, S. Yamaoka, D. Yahagi, I. Matsuo, N. Tsutsumi, K. Kitamoto (2011) Peroxisomes are involved in biotin biosynthesis in *Aspergillus* and *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* Vol. 286, 30455-30461.
9. 丸山潤一 (2010) 多細胞生物としての糸状菌の生存戦略 -隔壁孔を介した細胞間連絡の制御機構- バイオサイエンスとインダストリー (バイオインダストリー協会) Vol. 68, 341-345.

Discovery of novel peroxisomal functions in *Aspergillus oryzae*

Jun-ichi Maruyama (The University of Tokyo)

amarujun@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp