

黄麹菌における栄養源応答に関する分子機構解析

樋口 裕次郎

九州大学 大学院農学研究院

研究の目的

細胞が栄養源を認識して適切に応答することは、生物にとって根本的で重要な機構である。細胞内における栄養源認識の分子機構として、真核生物においては TOR (target of rapamycin) 複合体が広く知られている。TOR 複合体 (TOR complex) には TORC1 と TORC2 が存在し、栄養源認識には TORC1 が主に機能し、TORC2 はアクチン細胞骨格の制御等に機能する。真核微生物のモデルである出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* においては TORC1 に関する研究は進んでいるものの¹⁾、モデル糸状菌である黄麹菌 *Aspergillus oryzae* においては TORC1 に関する知見が未だに無い。黄麹菌は、2006 年の日本醸造学会大会にて“国菌”に認定されており、日本において古くから発酵・醸造産業に用いられてきた有用微生物であり、高い安全性でアミラーゼなどの有用タンパク質を菌体外に大量に分泌する能力を持つが、栄養源応答機構に関してはほぼ未解析である。出芽酵母において、TORC1 は主に液胞膜に局在し栄養源応答を引き起こしていると考えられていた。しかし近年になり、TORC1 が液胞膜だけでなく、液胞近傍に存在するシグナリングエンドソームにおいても機能することが明らかになってきた²⁾。一般的に、TORC1 の活性化は同化過程であるタンパク質、核酸、脂質の生合成を促進する一方で、異化過程であるオートファジーを抑制することが知られている。また、黄麹菌を含む糸状菌は、菌糸と呼ばれる細長い細胞形態に沿って多核多細胞を形成する。そうした特徴的な細胞内において、mRNA がいつ・どこで・どのように生成されているのかはほとんどわかっていない。そこで本研究では、特にアミノ酸などの栄養源応答に関与すると考えられる TORC1 および糖源によって発現制御されるグルコアミラーゼ遺伝子に焦点を絞り、黄麹菌細胞内における栄養源応答に関わる分子機構の理解を目指した。

方法

出芽酵母には TORC1 構成タンパク質として、Tor1p/Tor2p (パラログ)、Kog1p、Lst8p が存在する。黄麹菌においても出芽酵母同様に、TORC1 構成タンパク質のオルソログとして AoTor1 (AO090011000608)、AoKog1 (AO090026000590)、AoLst8 (AO090012000914) が存在し、それぞれアミノ酸配列レベルで 47%/49%、41%、68% の相同性を有することから機能が保存されていると予想された。本研究ではまず、黄麹菌における TORC1 の機能解析を行った。出芽酵母においては、Tor1p/Tor2p、Kog1p をコードする遺伝子は致死性である。そこで、AoTor1、AoKog1 とともに遺伝子の条件発現株を作製した。これまでに、致死性遺伝子の機能解析には *nmtA* プロモーター (*PnmtA*) 置換でのチアミン添加による遺伝子発現抑制ができる条件発現株解析がなされている。そこで、AoTor1、AoKog1 の機能解析のために、それぞれのプロモーター部位を *PnmtA* に置換した株を作製し、生育比較を中心とした表現型解析を行った。

黄麹菌においてグルコアミラーゼをコードする遺伝子である *glaA* の mRNA を生細胞で可視化する目的で MS2 システムを導入した。*glaA* 遺伝子座の下流に 36 コピ

一の MBS 配列を導入し、また MBS に特異的に結合する MCP に 2 コピーの改変型緑色蛍光タンパク質 (EGFP) を融合発現することで *glaA* mRNA を生細胞で可視化した。また、核、小胞体をラベルする目的で核局在化シグナル NLS および AoSec61 に赤色蛍光タンパク質である mCherry をそれぞれ融合発現する株も作製した。蛍光顕微鏡解析には、THUNDER imaging system (Leica) を用いた。

結果

1. 黄麹菌における TORC1 構成因子の機能解析

Aotor1 および *Aokog1* において内在性のプロモーターを *nmtA* プロモーターに置換した条件発現株を作製し、チアミンを添加した培地においてそれぞれの遺伝子発現を抑制した場合において生育比較を行った。その結果、想定外に *Aotor1* と *Aokog1* 発現抑制時においても、致死性遺伝子程の生育阻害は見られなかった (図 1A)。そこで、他の生物で TORC1 の阻害物質として知られるラパマイシンを添加したところ、*Aotor1* と *Aokog1* 発現抑制時において致死的な生育の表現型が見られた (図 1B)。以上のことから、*nmtA* プロモーターのチアミン存在下においても残存する AoTor1 と AoKog1 をラパマイシンが阻害することにより致死性が見られたと示唆された。

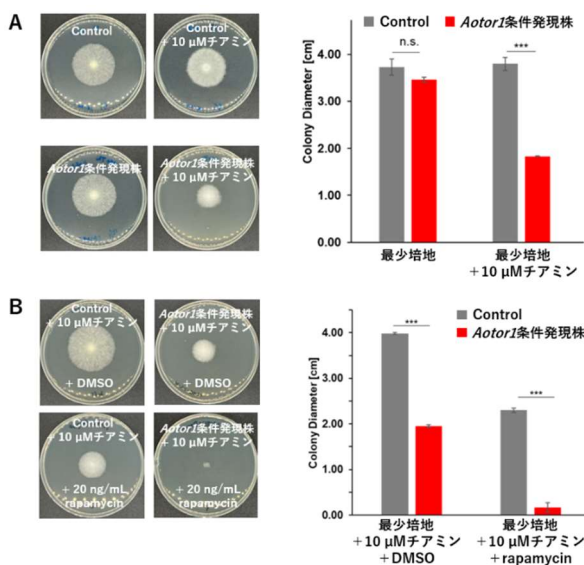


図1 *Aotor1*条件発現株の生育比較

2. グルコアミラーゼをコードする *glaA* mRNA の発現動態解析³⁾

MS2 システムにより *glaA* mRNA を可視化する株 (*glaA*-MS2 株) を作製し、蛍光顕微鏡解析を行った。まずグルコース培地条件において *glaA* mRNA が細胞質に見られないことを確認した (図 2)。そしてマルトース培地にシフトすると、*glaA* mRNA による細胞質のドット様蛍光が見られた (図 2)。このことから、これまでに生化学的に *glaA* mRNA の転写がマルトース存在下で誘導されることが細胞生物学的に確認できた。

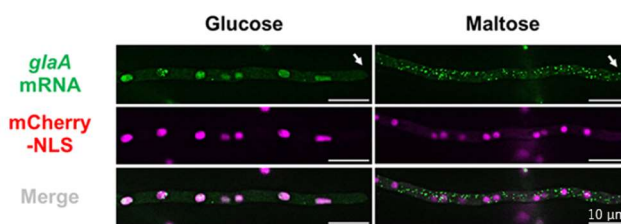


図2 *glaA* mRNAの可視化

白矢印は菌糸先端を示す。

さらに、菌糸細胞のどの部位で *glaA* mRNA が生成されるかを解析したところ、菌糸先端部や隔壁近傍といった分泌の盛んな部位の核から生成されることが明らかになった (図 3)。

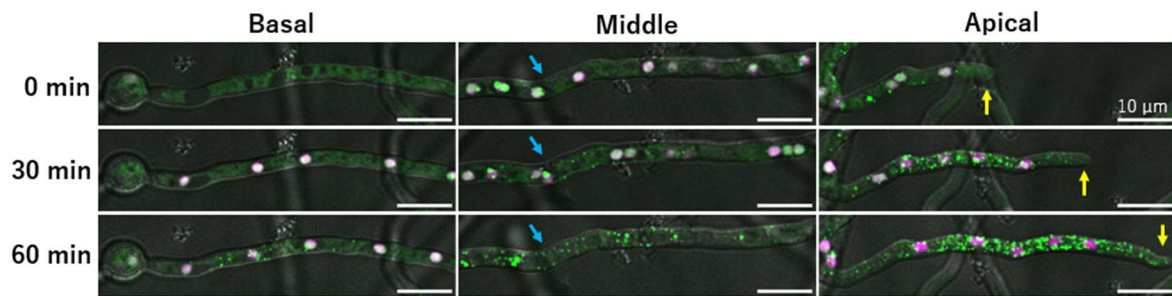


図3 *glaA* mRNA生成の経時変化
黄矢印は菌糸先端、青矢印は隔壁を示す。

また、ほとんどの *glaA* mRNA は小胞体膜上に局在しており、一部はキネシンモーター依存的に動態を示すことが明らかになった (図 4)。以上から、*glaA* mRNA は小胞体膜上を拡散しつつ翻訳されていることが想定された。

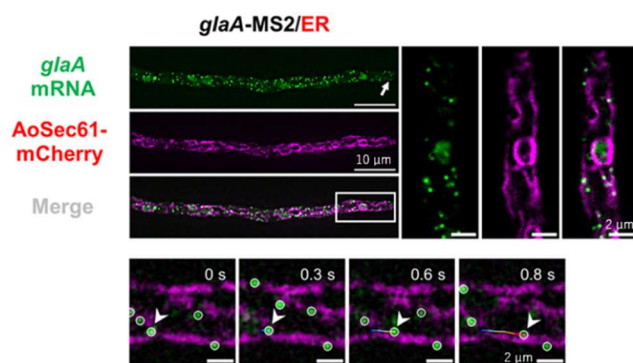


図4 *glaA* mRNAと小胞体の可視化
白矢印は菌糸先端、白矢頭は動く *glaA* mRNAを示す。

結論

本研究により、黄麹菌における TORC1 関連因子による栄養源応答機構の一端を明らかにした。今後の研究により、AoTor1 と AoKog1 を介したさらなる栄養源応答の分子機構を解明する必要がある。また、黄麹菌におけるグルコアミラーゼ遺伝子に関して、糖源の変化による時空間的な発現制御機構が明らかになった。今後は、他の mRNA や翻訳制御機構についても明らかにすることで、黄麹菌における栄養源応答の分子生理機構を解明し、有用物質生産といった応用研究にも結び付けたい。

文献

- 1) Morozumi Y, Shiozaki K. Conserved and divergent mechanisms that control TORC1 in yeasts and mammals. *Genes* (2021) 12(1): 88. doi: 10.3390/genes12010088.
- 2) Chen Z, Malia PC, Hatakeyama R, Nicastro R, Hu Z, Péli-Gulli MP, Gao J, Nishimura T, Eskes E, Stefan CJ, Winderickx J, Dengjel J, De Virgilio C, Ungermann C. TORC1 determines Fab1 lipid kinase function at signaling endosomes and vacuoles. *Curr Biol*. (2021) 31(2): 297-309.e8. doi: 10.1016/j.cub.2020.10.026.
- 3) Morita Y, Takegawa K, Collins BM, Higuchi Y. Polarity-dependent expression and localization of secretory glucoamylase mRNA in filamentous fungal cells. *Microbiol Res*. (2024) 282:127653. doi: 10.1016/j.micres.2024.127653.