

令和 5 年 5 月 10 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05823

研究課題名(和文) 麹菌が産生する細胞外膜小胞の解析 分泌酵素との関係を探る

研究課題名(英文) Analysis of Extracellular Vesicles Produced by Koji - Exploring Their Relationship with Secreted Enzymes -

研究代表者

浦山 俊一 (Urayama, Syun-ichi)

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：50736220

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：生物が細胞外に産生する膜小胞(以下eMV)は、『細胞外への物質輸送』を担う新たな機構として認識されつつある。糸状菌においてもeMVの産生が報告されているが、我々の食と密接な関係を有している発酵菌については研究例が少ない。そこで本研究では発酵菌に着目したeMV産生の基盤的知見を収集した。具体的には、液体培養後期にほぼすべての菌がeMVを産生する一方、一部の発酵菌は培養前期にもeMVを放出すること、培養後期のeMVには複数の菌種で共通する2つの主要タンパク質が存在すること、発酵にかかわる分解酵素はほとんどeMVに含まれていないこと、を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は発酵菌を主要な対象としつつも、多数の糸状菌種を用いることで糸状菌において普遍的なeMV産生関連の知見を蓄積することができた。特に、高度に精製したeMVを用いた点や、経時的なeMV産生状況の調査により、従来の糸状菌eMV研究では明らかでなかったeMV産生タイミングや普遍的な主要タンパク質の存在を明らかにすることができた。これらの知見は、麹菌などの家畜菌が有用な性質を示す機構の解明や、発酵食品中に含まれるeMVの機能解明や有効利用へとつながる足掛かりになると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Extracellular membrane vesicle (eMV), which are produced released from cellular organisms, are now recognized as a new mechanism for extracellular transport of biological molecules. Although eMV production has been reported in filamentous fungi, there are few studies on fermentative fungi used for food production. In this study, we collected basic knowledge on eMV production by fermentative fungi. Specifically, we found that (1) almost all filamentous fungi produce eMV in the late stage of liquid culture, while some one also release eMV in the early stage of culture, (2) there are two major proteins common to several species of eMV obtained from late stage, and (3) almost no degradation enzymes involved in fermentation are found in eMV.

研究分野：微生物生態学

キーワード：細胞外膜小胞 糸状菌 発酵

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 生物が細胞外に産生する膜小胞(以下 eMV)は、脂質二重膜で構成された 20-500 nm 程度の小胞で、産生細胞に由来するタンパク質や核酸、化合物など様々な分子を含んでいることが知られている(図1)。この eMV は生物界を越えた物質輸送を担う機構を担うものとして注目され、バクテリアや動物において病原性発現や遺伝子水平伝播、細胞間コミュニケーションに重要な役割を担っていることが知られている。

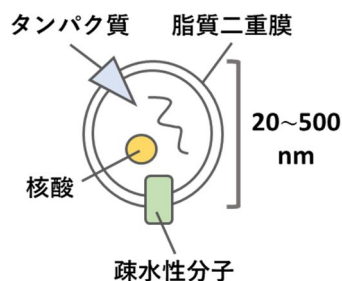


図1：eMVの構成

(2) eMV 研究が先行しているヒトやバクテリアにおいては、複数の eMV 産生経路が見出されている。また、それぞれの経路で産生される eMV は内包するタンパク質や核酸種、膜組成やサイズが異なっており、結果的に異なる機能を発揮する。

(3) 真菌においては酵母細胞を用いた研究が比較的多いが、現段階ではヒトやバクテリアにおいて確立しているような細分化した eMV の定義は確立していない。同じく真菌である糸状菌においてはより報告例が少ない。しかし、報告が極めて少ない中でも、ヒト病原糸状菌や植物病原糸状菌については eMV の存在が示されている。これは、これら病原真菌と宿主の相互作用は病原菌制御に重要であり、そこに eMV という新たな因子が加わることには大きなインパクトがあるからだと考えられる。そのため、宿主免疫や宿主細胞との相互作用に着目した解析が行われている。

(4) 糸状菌は人間と密接な関係を有している微生物の一つであり、病原体として以外にも、分解者としての機能や、発酵において重要な役割を担っている。これら病原体以外の機能発現においても eMV が何らかの役割を担っているのかを調査することは、糸状菌の幅広い利活用につながるだけでなく、糸状菌やそれを内包する真菌における eMV の普遍性などを明らかにする基礎的知見の取得にもつながることが期待される。これまでに申請者らは発酵菌の代表格とも言える麹菌 (*Aspergillus oryzae*) が eMV を産生することを見出し、これを足掛かりとして発酵菌由来 eMV の産生機構や発酵能との関連を調査することとした。

2. 研究の目的

本研究では糸状菌の中でも特に発酵菌に着目し、発酵菌由来 eMV の産生機構や性状の解析、発酵菌の特性と eMV の関係性を明らかにすることを目指す。

3. 研究の方法

(1) eMV の検出

菌体培養液や個体培養洗い出し液を 0.22 マイクロメートルフィルターに通し細胞などを除去した。透過液を超遠心分離に供し、eMV を沈殿させて微量のバッファーに再溶解することで粗精製 eMV 溶液とした。含まれる脂質量を、蛍光染色剤を用いて測定し、高い値を示したサンプルについては透過型電子顕微鏡観察により小胞構造を確認した。

(2) eMV の精製

粗精製 eMV 溶液には様々な細胞由来夾雑物が含まれている。これらを除去するため密度勾配遠心法により分画を行い、eMV が濃集している画分のみを集めることで精製 eMV 画分を得た。

(4) タンパク質や化合物の同定

精製 eMV 画分を SDS-PAGE/PMF 解析や LC-MS 解析に供することで、含まれているタンパク質や化合物を同定した。

4. 研究成果

(1) ほとんどの発酵関連糸状菌が定常期に eMV を産生する一方、一部の糸状菌は対数増殖期にも eMV(または小胞構造をとっていない脂質)を放出する

A. *oryzae* を含む多数の *Aspergillus* 属菌を中心に、経時的な eMV 産生調査を行った結果、ほとんどの発酵関連糸状菌において、定常期に eMV が培地中に増加する傾向が観察された。多くの菌は対数増殖期に eMV を

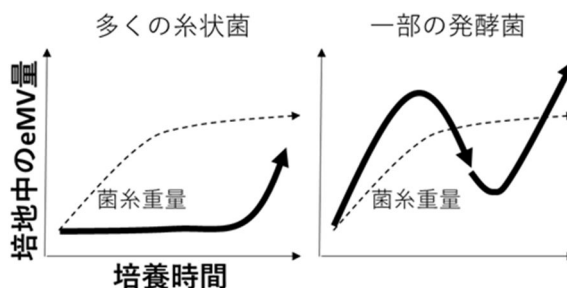


図2：糸状菌の eMV 放出パターン

産生しなかったが、一部の菌種では対数増殖期にも eMV 産生が確認された(図 2)。 *A. oryzae* は対数増殖期にも脂質を放出していたが、それらは小胞構造をとっていなかった(図 3)。

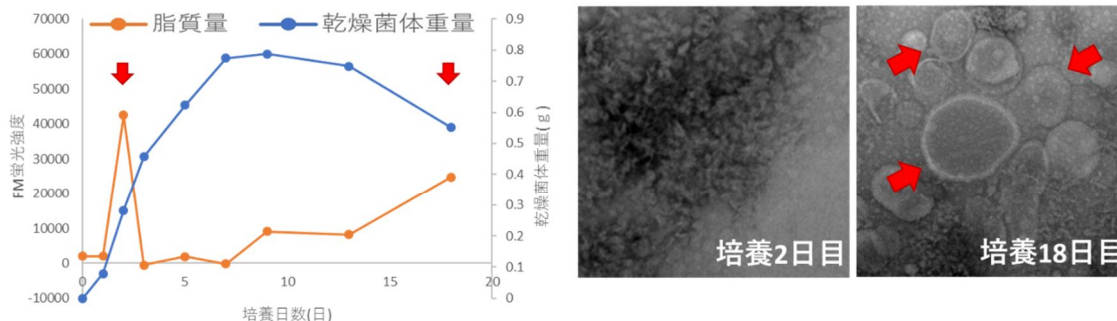


図 3 : *A. oryzae* における菌体生育と脂質放出の関係

(2) eMV 産生には培地の浸透圧や細胞壁の状態が関与している(図 4)
 定常期において、糸状菌細胞は細胞壁を始めとする自身を分解する酵素を放出し、自己溶菌を起こすことが知られている。その際、細胞壁に生じた小孔から膨圧により形質膜が細胞外へ押し出され、eMV (または脂質) の放出が起こることが予想された。そこで、培地の浸透圧など培養条件を変化させたり、浸透圧や細胞壁に関連する変異体を用いたりして eMV 産生能を評価した。その結果、通常の条件では小胞構造をとらない脂質を対数増殖期に放出していた *A. oryzae* において、対数増殖期にも小胞構造をもつ eMV が産生されるようになるなど、eMV 産生能に変化が見られた。

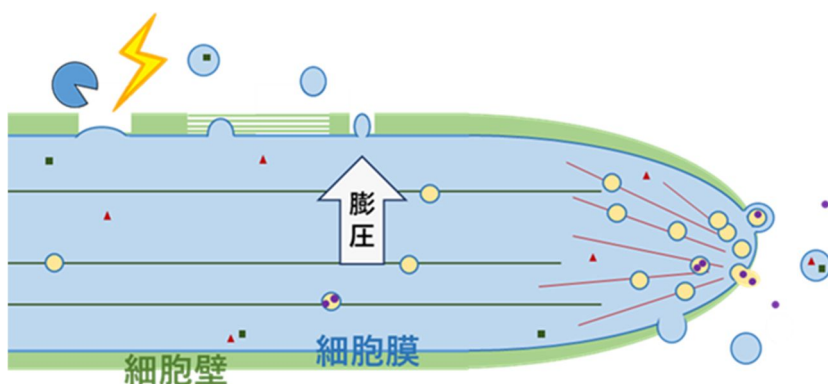


図 4 : 本研究成果に基づく eMV 産生機構の予測イメージ

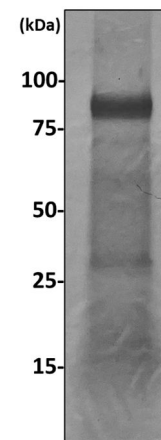


図 5 : 精製 eMV 画分の SDS-PAGE 像

(3) eMV には特定のたんぱく質や化合物が含まれている
 様々な発酵菌が定常期に共通して eMV を放出していたことから、これら eMV は共通の機構により産生されていることが示唆された。バクテリアの eMV 研究においては、eMV に含まれるタンパク質などの組成から、eMV がどのような機構で産生されたのかが議論されており、本研究においても定常期に産生された eMV に含まれるタンパク質を調査した。SDS-PAGE では 2 ~ 数本のバンドが確認され(図 5)、3 種の異なる糸状菌 eMV に共通する主要タンパク質を 2 つ見出した。1 つは GPI アンカーで形質膜に局在する細胞壁リモデリング関連酵素であり、もう 1 つは細胞壁に作用することが示唆されている分泌酵素であった。

糸状菌 eMV には二次代謝化合物も含まれていることを示唆する報告がなされているが、何れも明確な証明に至っていない。そこで、本研究では二次代謝化合物が含まれる eMV を探索し、その化合物が eMV に含まれていることを証明した。当該二次代謝化合物は抗菌や抗真菌活性が知られている化合物だった。

(4) 発酵において重要な分解酵素は極一部しか eMV に含まれていない
 発酵糸状菌は培養基質を強力に分解・資化するため高い酵素分泌能を有している。これら分泌酵素が eMV に含まれる可能性を検証するため、分泌酵素誘導培地にて *A. oryzae* を培養し、集めた精製 eMV 画分の酵素活性を調査した。その結果、微弱な アミラーゼ活性は検出されたものの、eMV 除去後の培養液に含まれる酵素活性が格段に高かったことから、アミラーゼは極一部しか eMV に含まれていないことが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岩橋由佳、浦山俊一、榎尾俊介、高谷直樹、野村暢彦、竹下典男、豊福雅典、萩原大祐
2. 発表標題 糸状菌における細胞外膜小胞産生能の普遍性
3. 学会等名 第20回糸状菌分子生物学コンファレンス
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩橋由佳、浦山俊一、榎尾俊介、兼松周作、高谷直樹、野村暢彦、竹下典男、豊福雅典、萩原大祐
2. 発表標題 糸状菌における細胞外膜小胞産生能の探索
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度関東支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岩橋由佳、浦山俊一、榎尾俊介、兼松周作、高谷直樹、野村暢彦、竹下典男、豊福雅典、萩原大祐
2. 発表標題 糸状菌が産生する細胞外膜小胞の特性
3. 学会等名 糸状菌分子生物学研究会若手の会第8回ワークショップ
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	竹下 典男 (Takeshita Norio) (20745038)	筑波大学・生命環境系・准教授 (12102)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	豊福 雅典 (Toyofuku Masanori) (30644827)	筑波大学・生命環境系・准教授 (12102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関