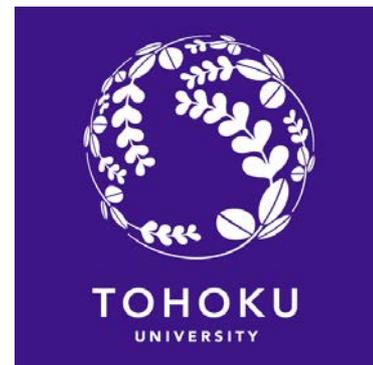


2020-6-5

(公財) 発酵研究所

2018年度大型研究助成 O-2



# 糸状菌の細胞接着制御による有用物質高生産 を目指した新規高密度培養技術の開発

東北大学大学院農学研究科  
生物産業創成科学専攻 応用微生物学分野  
阿部 敬悦  
(E-mail: [keietsu.abe.b5@tohoku.ac.jp](mailto:keietsu.abe.b5@tohoku.ac.jp))

# 発表内容

## 背景

糸状菌の産業利用の現状  
糸状菌の細胞表層構造

## Part-1

「モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* における細胞壁 $\alpha$ -1,3-グルカンの分子量及び細胞壁中の局在と菌糸凝集の関係性の解析」

## Part-2

「産業用糸状菌 *Aspergillus oryzae* における第二の菌糸凝集因子の探索及び菌糸凝集メカニズムの解析」

## まとめ

# 背景：糸状菌の液体培養時の形態

## 【糸状菌の工業培養】

酸素や基質の拡散が容易な液体培養で行われることが一般的。

## 【課題】

糸状菌は一般的に、液体培養時に菌糸が絡まりペレットを形成する。



ペレット内部が嫌氣的になるため、**物質生産効率の制限要因**



東洋紡 バイオケミカル事業部HPより  
[https://www.toyobo.co.jp/seihin/xr/enzyme/m\\_service\\_j.html](https://www.toyobo.co.jp/seihin/xr/enzyme/m_service_j.html)

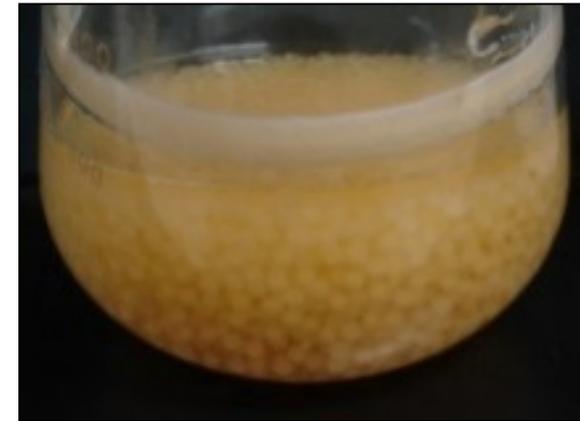


図. 麹菌のフラスコ培養

世界中の発酵生産メーカーから、生産効率改善に繋がる新技術の開発が強く望まれている。

# 背景：菌糸塊形成に関する知見とその対処法

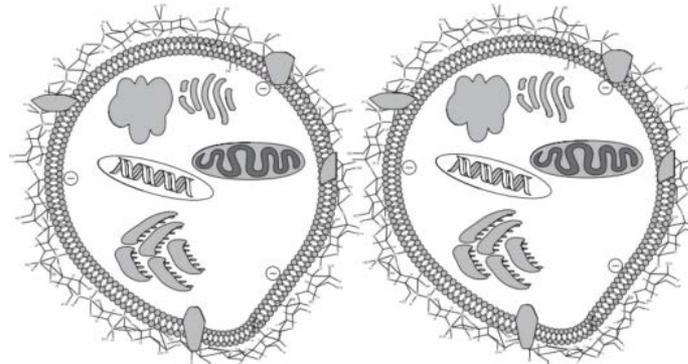
## 〈菌糸塊形成メカニズム〉

✓ 分生子接種時～膨潤時



疎水性相互作用, 静電的作用

✓ 分生子発芽以降



静電的作用, 細胞壁成分特異的な相互作用

Zhang & Zhang, *Crit. Rev. Biotechnol.* 2016

具体的な  
凝集因子は  
未解明。

## 〈対処法〉

### ● 古典的手法

pH, 接種孢子数, 培養温度の調整 (Kelly et al. (2004); Nielsen et al. (1995)他)

攪拌回転や通気による物理的ストレス誘導

(Bizukojc & Ledakowicz (2010); Lopez et al. (2005)他)

### ● 近年開発された手法

培養液への微粒子 (Talc, チタン等) の添加

(Driouch et al. *B&B* (2010); Gonciarz & Bizukojc *Eng. Life Sci.* (2014))

培養液浸透圧の調整 (Wucherpennig et al. *Microb. Cell Fact.* (2011))

完全な形態制御を可能にする技術は現在のところ開発されていない。

# 背景: 糸状菌の細胞壁

- 細胞壁の主成分は多糖
- 菌の生育に必須の役割
- 細胞壁の構成成分

多糖成分 (含有量%)	アルカリ可溶性	
	不溶	可溶
$\beta$ -1,3-Glucan	30	ND
Chitin	13	ND
$\alpha$ -1,3-Glucan	ND	42
Galactomannan	5	1.4
Galactosaminogalactan	4	2.3

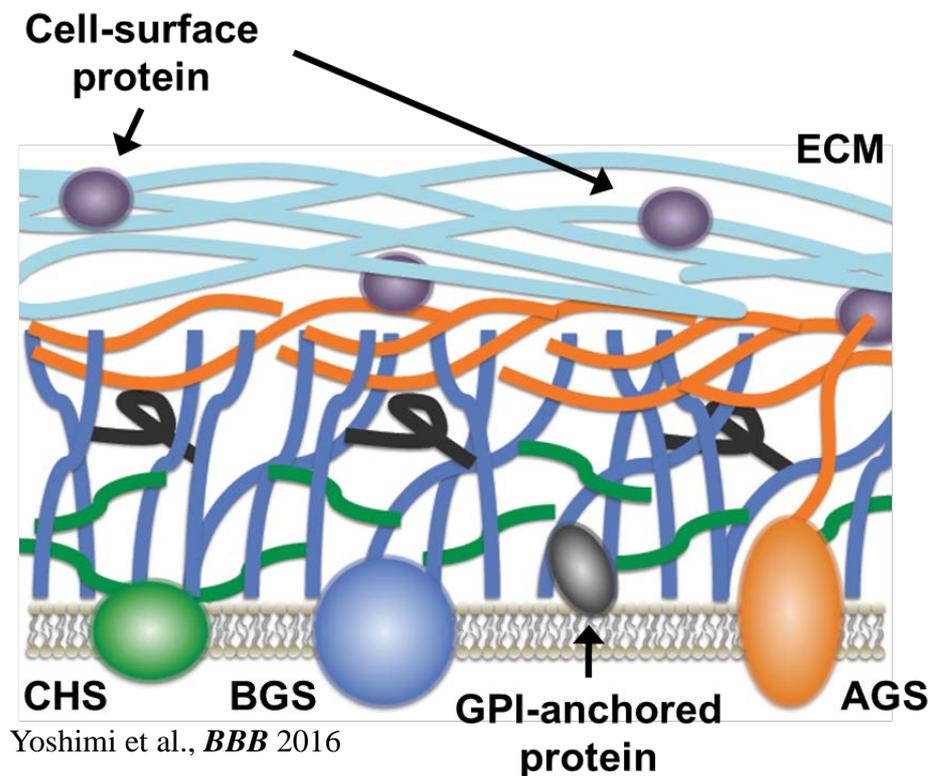


図. 糸状菌細胞壁構造の模式図

Yoshimi et al. (2016) *BBB* 80(9):1700-1711

抗真菌剤の標的となり得る。

## $\alpha$ -1,3-グルカン

- 出芽酵母には含まれない細胞壁成分である。
- 糸状菌におけるAGの機能には不明な点が多い。

⇒ CWIS経路の解析の結果を受けて、AGの機能解析が行われた。

Fujioka et al *Eukaryotic Cell* (2007)

# $\alpha$ -1,3-グルカンの生物学的機能

## ヒト感染真菌: *Histoplasma capsulatum*

Rappleye et al. (2007) *PNAS* 104, 1366-1370.

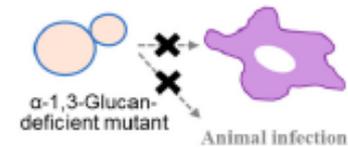
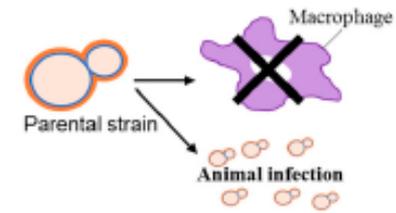
### *Histoplasma capsulatum* $\alpha$ -(1,3)-glucan blocks innate immune recognition by the $\beta$ -glucan receptor

Chad A. Rappleye\*, Linda Groppe Elissenberg, and William E. Goldman†

Department of Molecular Microbiology, Washington University, St. Louis, MO 63110

Edited by Emil C. Gotschlich, The Rockefeller University, New York, NY, and approved November 30, 2006 (received for review November 6, 2006)

Successful infection by fungal pathogens depends on subversion of host immune mechanisms that detect conserved cell wall components inhaled into the lung germinate into yeast, and this conversion is absolutely required for pathogenicity (3, 4), suggesting that yeast



Yoshimi et al.  
*J. Fungi* 2017

## 植物病原糸状菌: *Magnaporthe grisea*

Fujikawa et al. (2009) *Mol. Microbiol.* 73, 553-570.

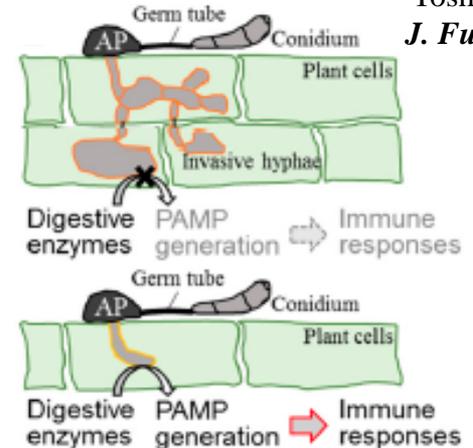
Molecular Microbiology [2009] 73(4), 553-570

doi:10.1111/j.1365-2958.2009.06786.x  
First published online 21 July 2009

### Dynamics of cell wall components of *Magnaporthe grisea* during infectious structure development

Takashi Fujikawa,<sup>1</sup> Yukari Kuga,<sup>2</sup> Shigekazu Yano,<sup>3</sup> Akira Yoshimi,<sup>4</sup> Takashi Tachiki,<sup>3</sup> Keietsu Abe<sup>4</sup> and Marie Nishimura<sup>1\*</sup>

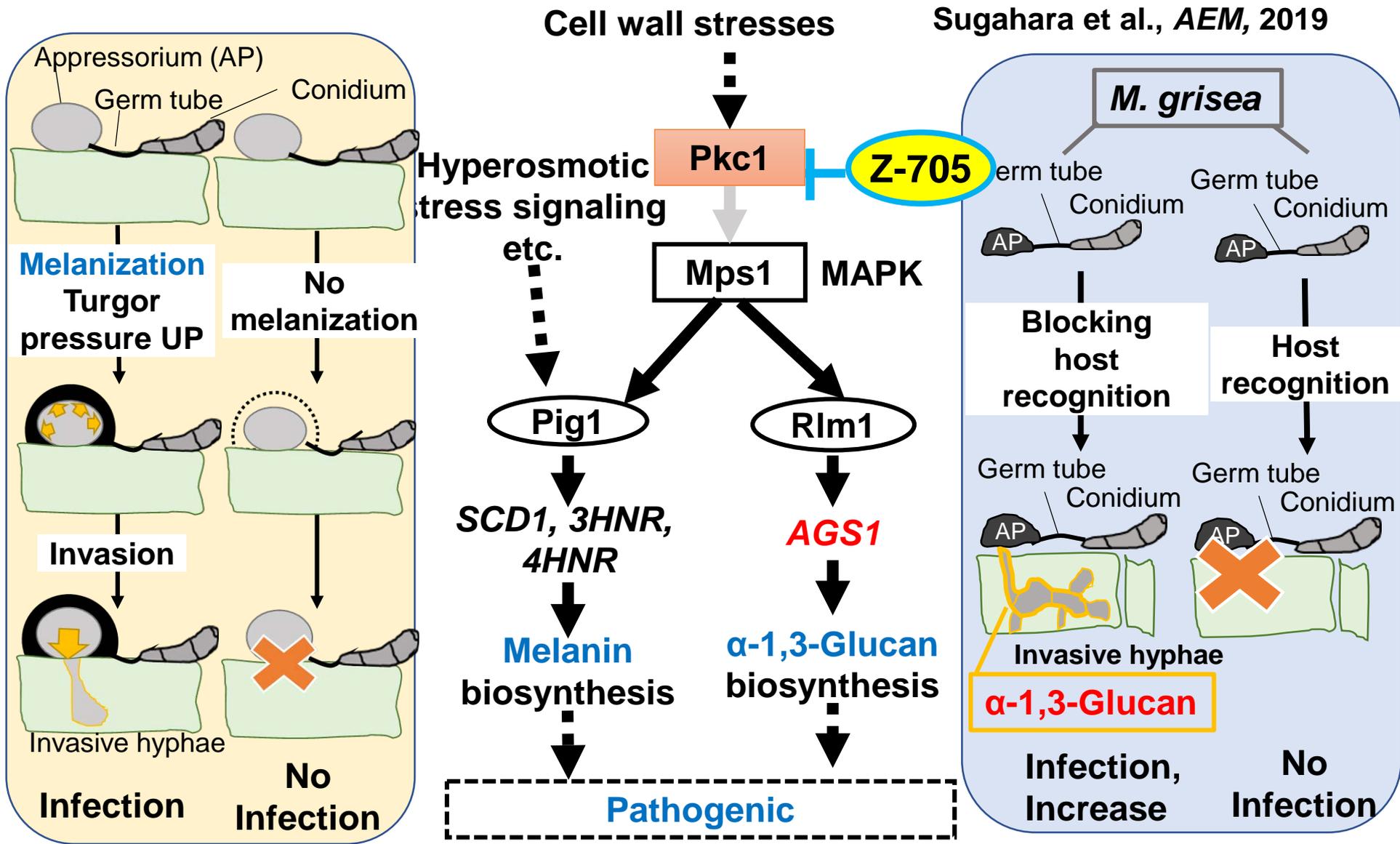
Thus, a dynamic change of composition of cell wall polysaccharides occurs during plant infection in *M. grisea*.



$\alpha$ -1,3-グルカンは、宿主の免疫応答反応からの回避機能(ステルス機能)に関与している。

非病原性真菌が $\alpha$ -1,3-グルカンを持つ意味は？  
その他の生物学的機能は？

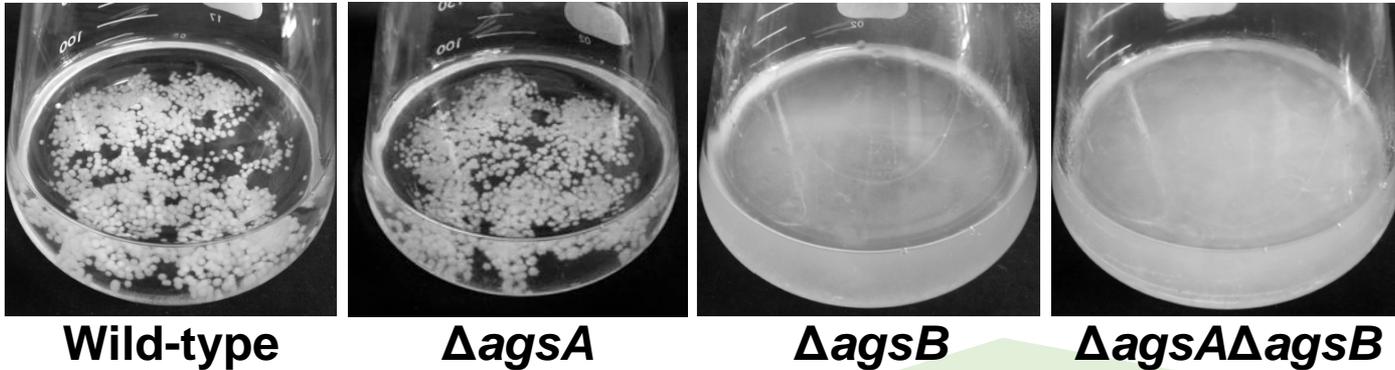
# 背景: イネいもち病菌CWI シグナル伝達阻害と感染阻害及び $\alpha$ -1,3-glucan



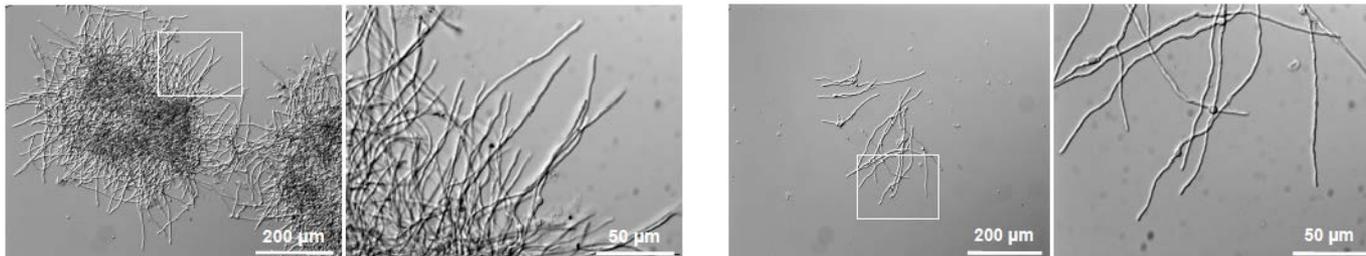
**PKC is directly or indirectly involved in pathogenicity of *M. grisea*.**

# 背景: *A. nidulans* AGS遺伝子破壊株の表現型

## ◆ 液体振盪培養時の生育



$\Delta agsB$ 株: 菌糸が培地中に完全分散



$\Delta agsB$ 株: 菌糸同士が凝集せず、絡まらない

Yoshimi et al., *PLoS One* (2013) 8:e54893

$\alpha$ -1,3-グルカンは菌糸の接着因子として機能することが示唆された。

# 背景：麴菌のAG欠損株の表現型

## 産業用糸状菌(麴菌) *Aspergillus oryzae*

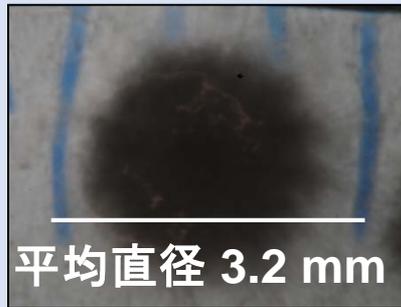
### AG合成酵素遺伝子3重破壊株 ( $\Delta agsA\Delta agsB\Delta agsC$ )

- 細胞壁からAGが欠損
- 野生株よりも小さな菌糸の塊を形成

→ 菌糸の露出面積が大きく、物質生産に好適な宿主株であることが示唆された。



培養性状



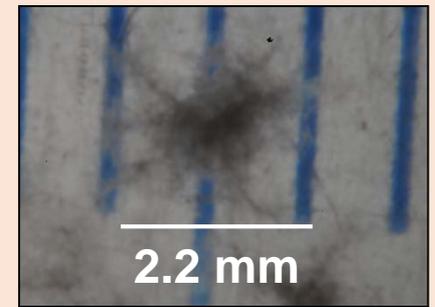
平均直径 3.2 mm

菌糸塊

野生株



培養性状



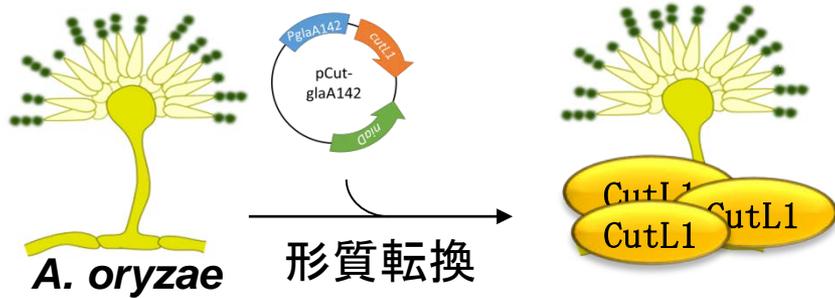
2.2 mm

菌糸塊

AG欠損株

# 背景：麴菌のAG欠損株の酵素生産性

## モデルタンパク質の高発現系の構築



- モデルタンパク質: クチナーゼ CutL1 (菌糸非吸着性)
- cutL1 高発現ベクターを各株に1コピー導入 [同一 locus (*niaD*)].

野生株

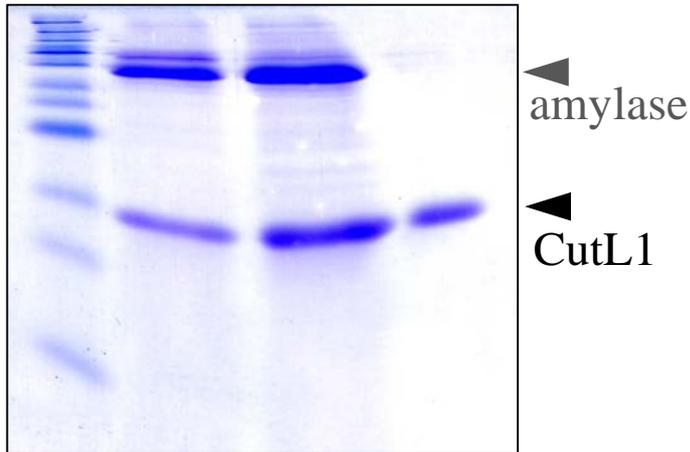
AG欠損株

CutL1高発現株の取得

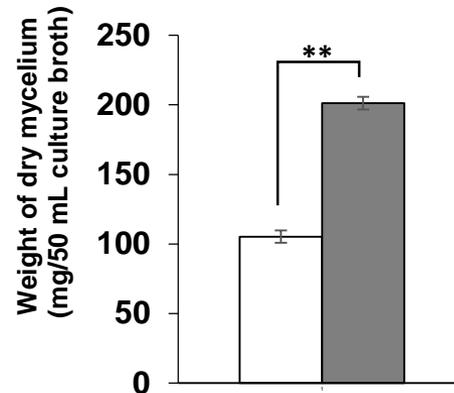
**AG欠損株の酵素生産量は野生株に比べて顕著に高い。**

## AG欠損株の酵素生産性

M WT AGΔ Ctrl.

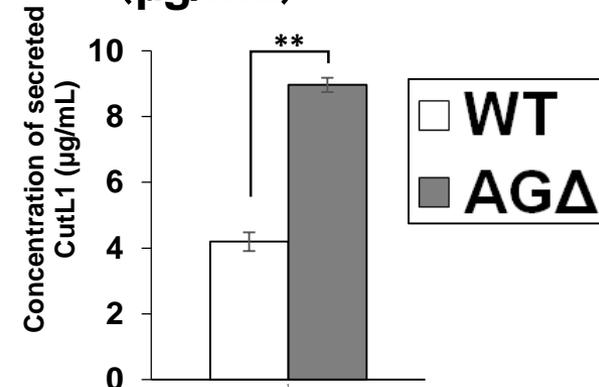


乾燥菌体量  
(mg/50 mL培養液)



\*\* $P < 0.01$

CutL1分泌量  
( $\mu\text{g/mL}$ )



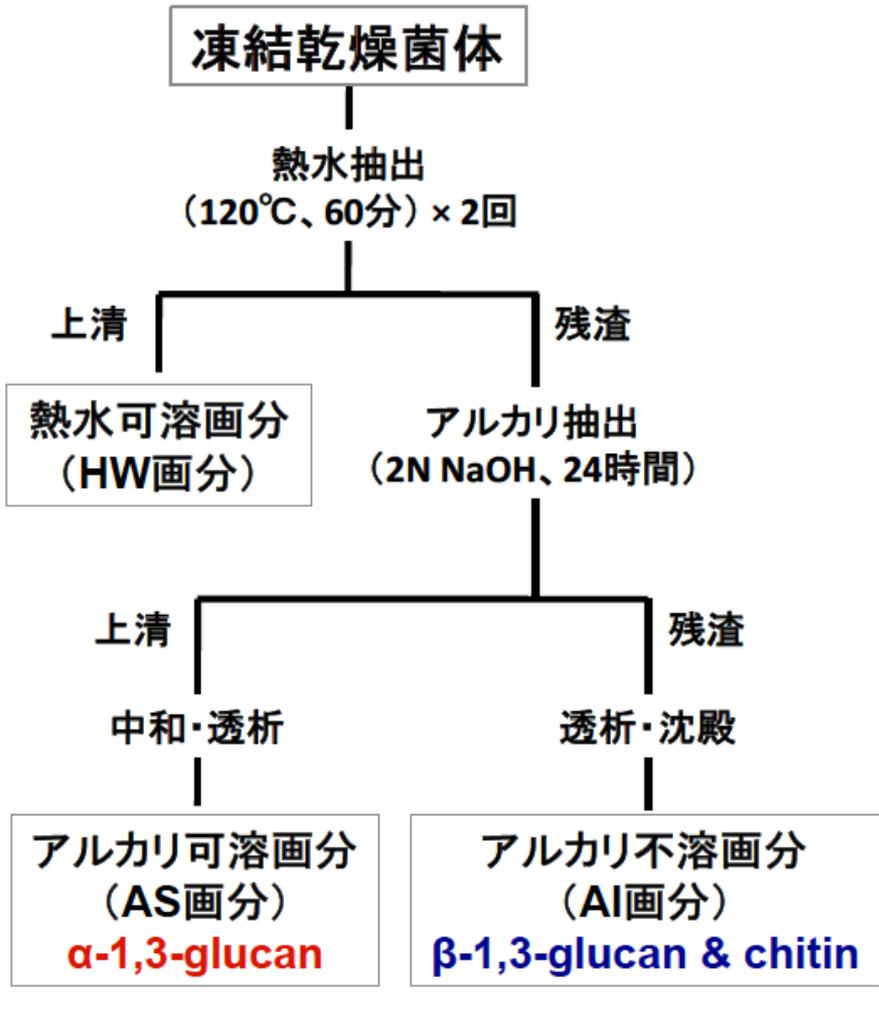
Miyazawa *et al.*, *BBB*, (2016) **80**(9):1853—1863

細胞表層改変による表現型の制御は物質生産に有効な手段である。

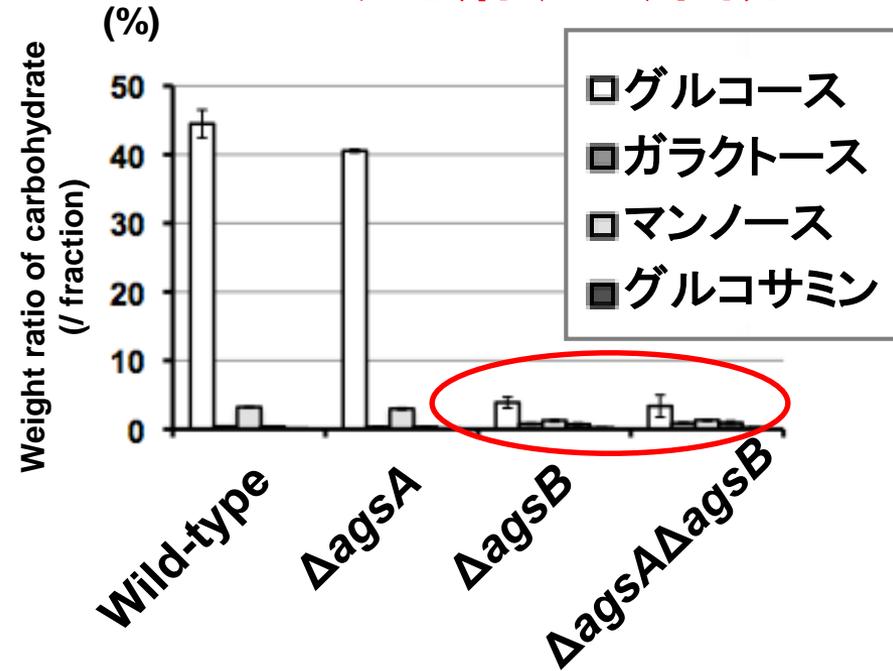
# 背景: AGS遺伝子破壊株の細胞壁多糖の分析

## ☆ 細胞壁多糖の分析

### 細胞壁多糖の熱水・アルカリ抽出



### アルカリ可溶(AS)画分



- ✓ 菌糸分散株 ( $\Delta agsB$ ,  $\Delta agsA\Delta agsB$ ) では細胞壁 $\alpha$ -1,3-グルカンが欠損。  
⇒  **$\alpha$ -1,3-グルカンは菌糸接着因子。**
- ✓  $\Delta agsA$ では細胞壁成分に変化なし。  
⇒  **$agsA$ の機能は？**

# Part 1の目的

## 【研究目的】

$\alpha$ -1,3-グルカン合成における

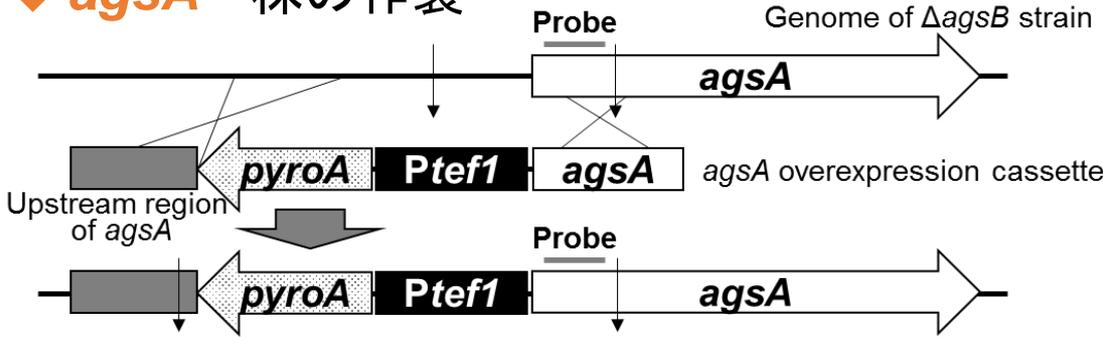
**AgsA**, **AgsB**の機能の解明

## 【研究方針】

- ① *agsA*, *agsB*高発現 (*agsA*<sup>OE</sup>, *agsB*<sup>OE</sup>)株の作製とその表現型の観察
- ② *agsA*<sup>OE</sup>, *agsB*<sup>OE</sup>株のASグルカンの化学構造解析
- ③ *agsA*<sup>OE</sup>, *agsB*<sup>OE</sup>株の細胞壁成分の蛍光ラベリングと顕微鏡観察

# *agsA*<sup>OE</sup>, *agsB*<sup>OE</sup>株の作製

## ◆ *agsA*<sup>OE</sup>株の作製



プロモータ領域を構成的高発現プロモータに置換

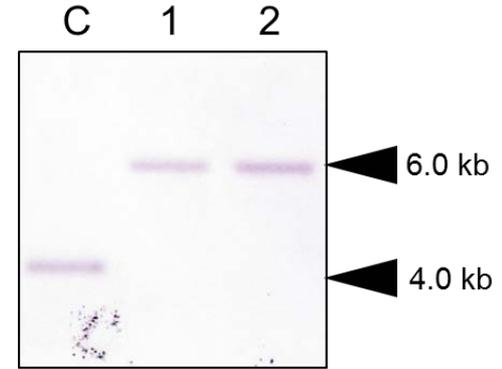


図. *agsA*<sup>OE</sup>株作製確認のサザン解析

## ◆ *agsB*<sup>OE</sup>株の作製

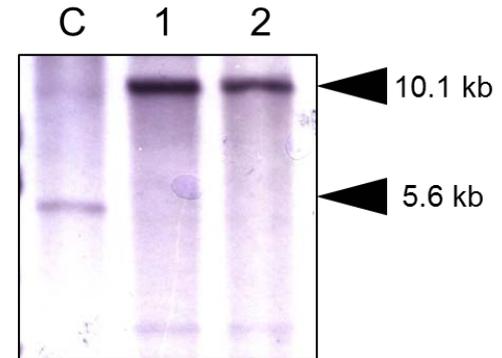
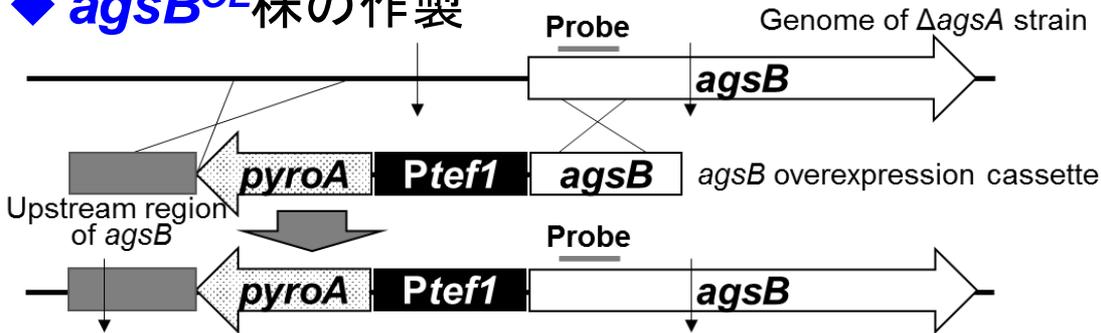
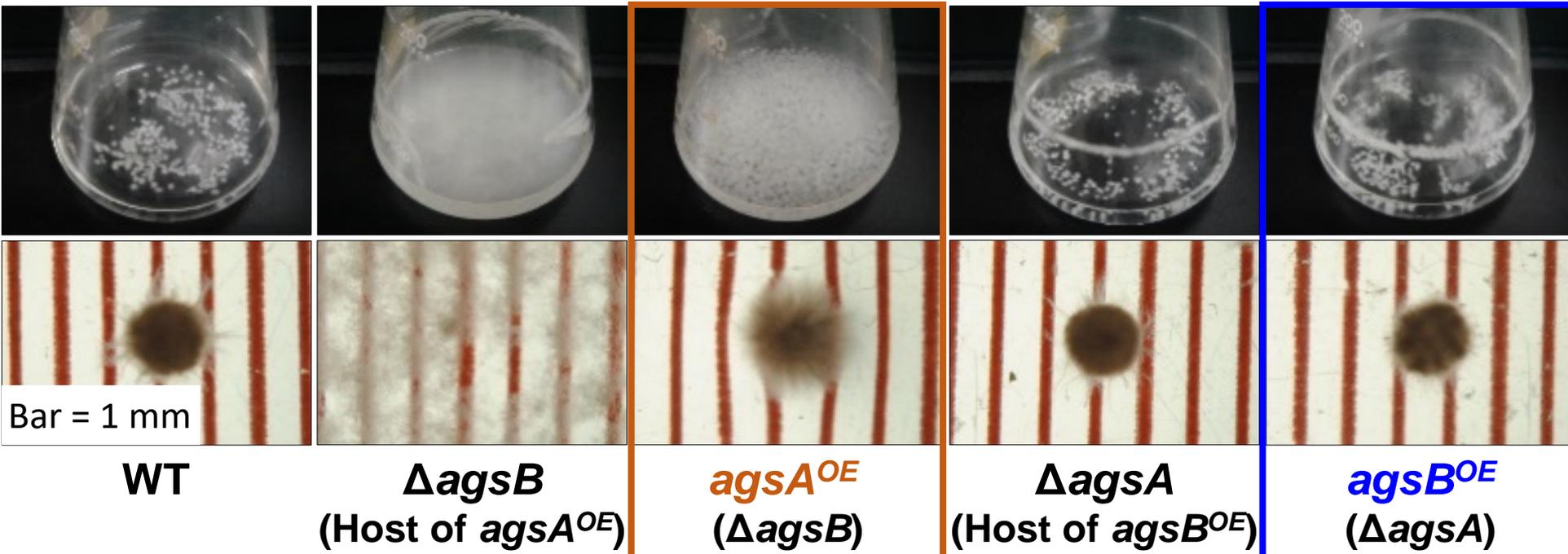


図. *agsB*<sup>OE</sup>株作製確認のサザン解析

一方のAGS遺伝子破壊株を親株として、  
もう一方のAGS遺伝子を構成的高発現化。

*agsA*<sup>OE</sup>, *agsB*<sup>OE</sup>株を取得した。

# $agsA^{OE}$ , $agsB^{OE}$ 株の培養性状



Miyazawa et al., *Front. Microbiol.* (2018) 9:2623

(培養条件)

CD 最少培地 50 mL / 200 mL 三角フラスコ

培養温度37°C, 回転数160 rpm

培養時間24 h, 接種胞子数 $5.0 \times 10^5$ /mL

$agsA^{OE}$  株 :  $\Delta agsB$ 株の菌糸分散性を失い菌糸塊を形成

$agsA^{OE}$  株 : 菌糸密度の低い菌糸の塊

$agsB^{OE}$  株 : 緊密な菌糸の塊(野生株と類似)

⇒ 構成多糖の成分が異なる可能性が示唆された。

# agsA<sup>OE</sup>, agsB<sup>OE</sup>株の細胞壁多糖の化学構造解析

## ● 細胞壁多糖の分画

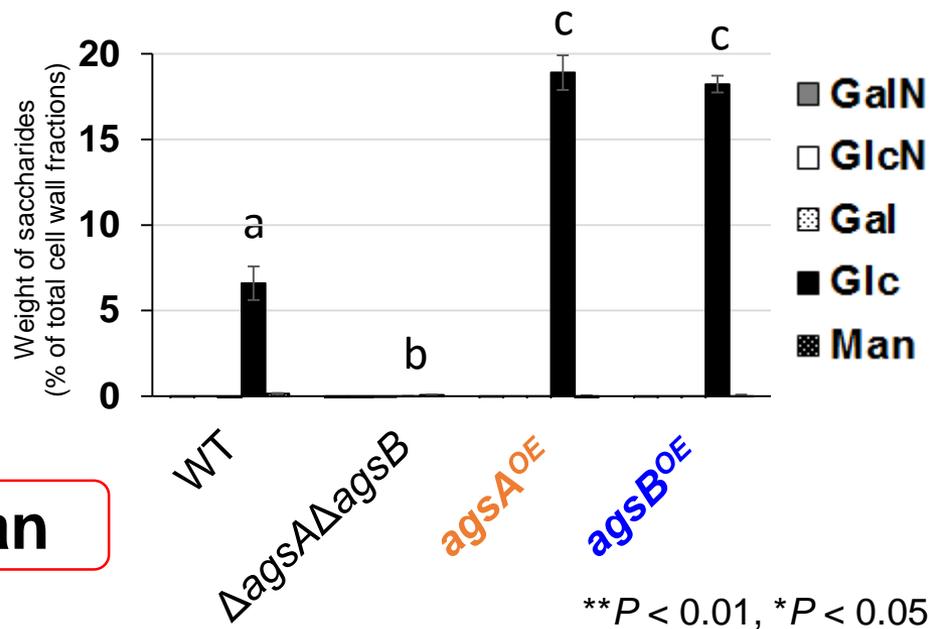
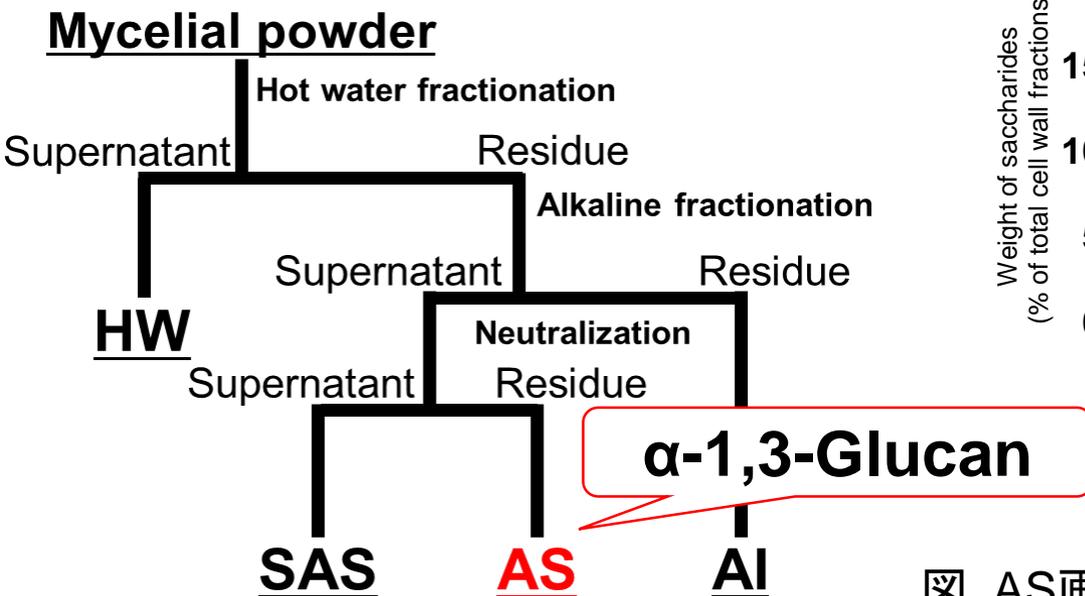
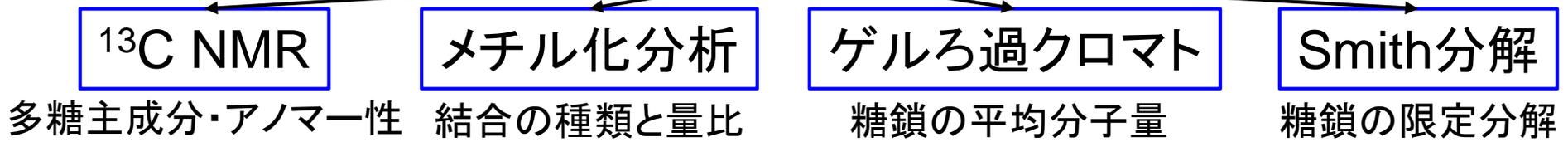


図. AS画分の構成単糖量 (%)

図. 細胞壁成分の分画法

agsA<sup>OE</sup>, agsB<sup>OE</sup>株ではAS画分の量比が増加。  
 (ASグルカン量は両株間でほぼ同じ)

### 各株のAS画分



agsA<sup>OE</sup>, agsB<sup>OE</sup>株間の接着性差をもたらす多糖構造差に迫る。

# $^{13}\text{C}$ NMR

WT AS



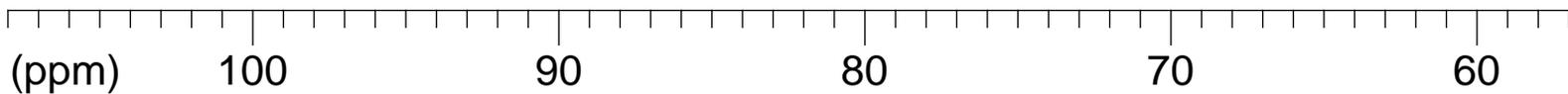
agsA<sup>OE</sup> AS



agsB<sup>OE</sup> AS



Mutan ( $\alpha$ -1,3-glucan)

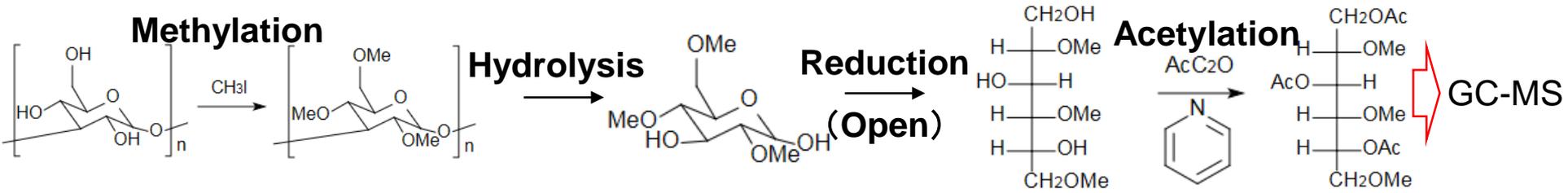


Miyazawa et al., *Front. Microbiol.* (2018) 9:2623

**agsA<sup>OE</sup> 株, agsB<sup>OE</sup> 株とも, AS 画分に含まれる  
多糖の主鎖は  $\alpha$ -1,3-グルカンである**

# ASグルカンのメチル化分析

- メチル化分析 — 多糖の結合の様式および量比を解析する方法



Alditol acetates	Linkage	RT (min)	Molar amounts (%)		
			WT	<i>agsA</i> <sup>OE</sup>	<i>agsB</i> <sup>OE</sup>
2,3,4,6-Tetra- <i>O</i> -Me-Glc	$\text{G}_1$	15.1	<u>0.69</u>	<u>0.46</u>	<u>0.73</u>
2,4,6-Tri- <i>O</i> -Me-Glc	${}_{-3}\text{G}_1$	16.4	<b>89.31</b>	<b>94.09</b>	<b>87.98</b>
2,3,6-Tri- <i>O</i> -Me-Glc	${}_{-4}\text{G}_1$	16.5	<b>5.41</b>	<b>1.74</b>	<b>7.01</b>
3,4,6-Tri- <i>O</i> -Me-Glc	${}_{-2}\text{G}_1$	17.4	<b>2.08</b>	<b>1.45</b>	<b>1.68</b>
2,4-Di- <i>O</i> -Me-Glc	${}_{-3}\text{G}_1$	17.9	<b>2.51</b>	<b>2.26</b>	<b>2.42</b>

( ${}_{-2}\text{G}_1$ , マンナン由来と予想;  ${}_{-3}\text{G}_1$ ,  $\beta$ -1,3/1,6-グルカンと予想) Miyazawa et al., *Front. Microbiol.* (2018) 9:2623

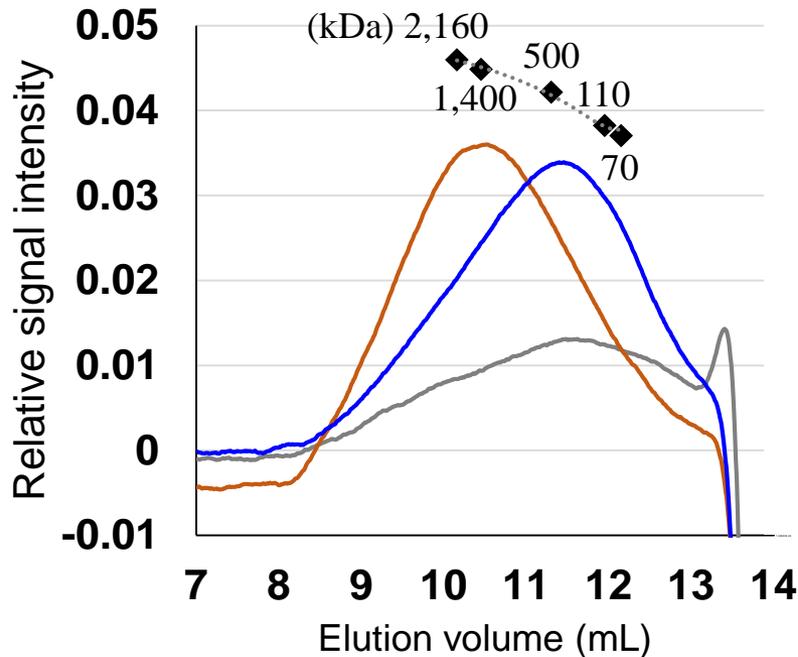
いずれの株でも、AS画分の構成糖の約90%は1,3-結合から成る。

$\text{G}_1$  (非還元末端) の量比 WT = *agsB*<sup>OE</sup> > *agsA*<sup>OE</sup>

⇒ AgsAとAgsBの合成多糖の化学構造は、糖鎖重合度に差異？

# ASグルカンの分子量分析

## ● AS2画分の分子量分析



Samples	$M_p$ (kDa)	$DP_n$
WT	$147 \pm 52$	$908 \pm 319$
<i>agsA</i> <sup>OE</sup>	<b><math>1,480 \pm 80</math></b>	$9,160 \pm 520$
<i>agsB</i> <sup>OE</sup>	<b><math>372 \pm 47</math></b>	$2,297 \pm 287$

— WT  
— *agsA*<sup>OE</sup>  
— *agsB*<sup>OE</sup>  
◆ Dextran

〈分析条件〉

- カラム  
SUGAR KS-G(ガードカラム)  
SUGAR KS-805
- 流速 1 mL/min for 25 min
- カラム温度 35°C
- 溶離液 1 M NaOH
- 示差屈折検出器(FLC-10)

Miyazawa et al., *Front. Microbiol.* (2018) 9:2623

*agsA*<sup>OE</sup>株のAS多糖の分子量は*agsB*<sup>OE</sup>株の約4倍大きい。



*agsA*<sup>OE</sup>株と*agsB*<sup>OE</sup>株の菌糸塊形状差

⇒ *agsA*<sup>OE</sup>株と*agsB*<sup>OE</sup>株のASグルカンの

分子量差に起因することが示唆された。

# ASグルカンのSmith分解

〈Smith分解〉1,2-, 1,4-, 1,6-結合の糖を選択的に分解する方法(1,3-グルカンは分解しない)。

〈想定される結果〉

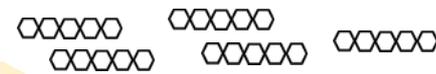
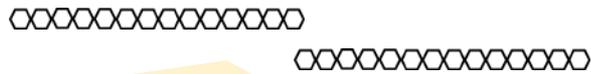
①AS糖鎖中に1,4-グルカンが一つの場合

②AS糖鎖中に複数の1,4-グルカンがある場合



↓ Smith degradation

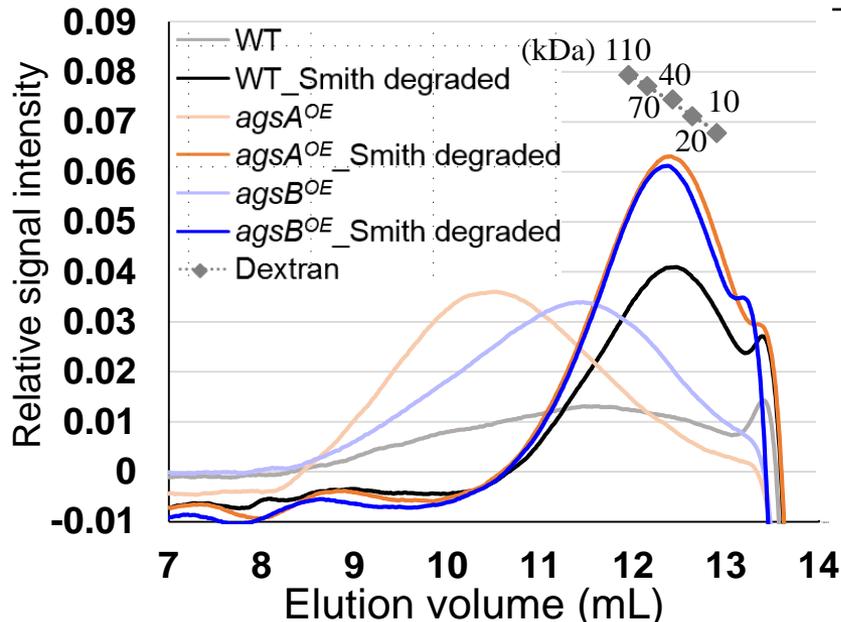
↓ Smith degradation



分子量は半減程度

分子量は大きく減少する

## 【結果】



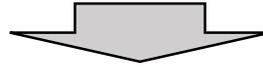
Samples	$M_p$ (kDa)	$DP_n$
WT (non-degraded)	$147 \pm 52$	$908 \pm 319$
<b>WT, Smith-degraded</b>	<b><math>31.6 \pm 3.7</math></b>	<b><math>195 \pm 23</math></b>
$agsA^{OE}$ (non-degraded)	$1,480 \pm 80$	$9,160 \pm 520$
<b><math>agsA^{OE}</math>, Smith-degraded</b>	<b><math>41.6 \pm 5.8</math></b>	<b><math>257 \pm 36</math></b>
$agsB^{OE}$ (non-degraded)	$372 \pm 47$	$2,297 \pm 287$
<b><math>agsB^{OE}</math>, Smith-degraded</b>	<b><math>38.3 \pm 3.0</math></b>	<b><math>237 \pm 19</math></b>

ASグルカンの分子量は各株とも大きく減少。

$\alpha$ -1,3-グルカン鎖には、複数の短い  
**スペーサーの糖が含まれる**ことを示唆。  
(約200残基の $\alpha$ -1,3-グルカン単位を隔てる)

# 菌糸中の細胞壁多糖の蛍光ラベリング

菌糸塊の凝集性は $\alpha$ -1,3-グルカンの量だけでなく、  
その分子量によっても制御される。



細胞壁中の $\alpha$ -1,3-グルカンの空間分布も  
凝集性に影響する可能性があるのではないか？



Outer layer  $\alpha$ -1,3-Glucan  
Inner layer  $\beta$ -1,3-Glucan & chitin



$\beta$ -1,3-Glucan & chitin  
 $\alpha$ -1,3-Glucan layer

$\alpha$ -1,3-Glucanase-  
 $\alpha$ -1,3-glucan  
binding domain



Hyphal cell

Alexa  
350



Chitin specific lectin  
(Wheat germ agglutinin)

Alexa  
594

Anti- $\beta$ -1,3-glucan  
antibody

細胞壁成分を蛍光ラベル

$\alpha$ -1,3-Glucan — GFP

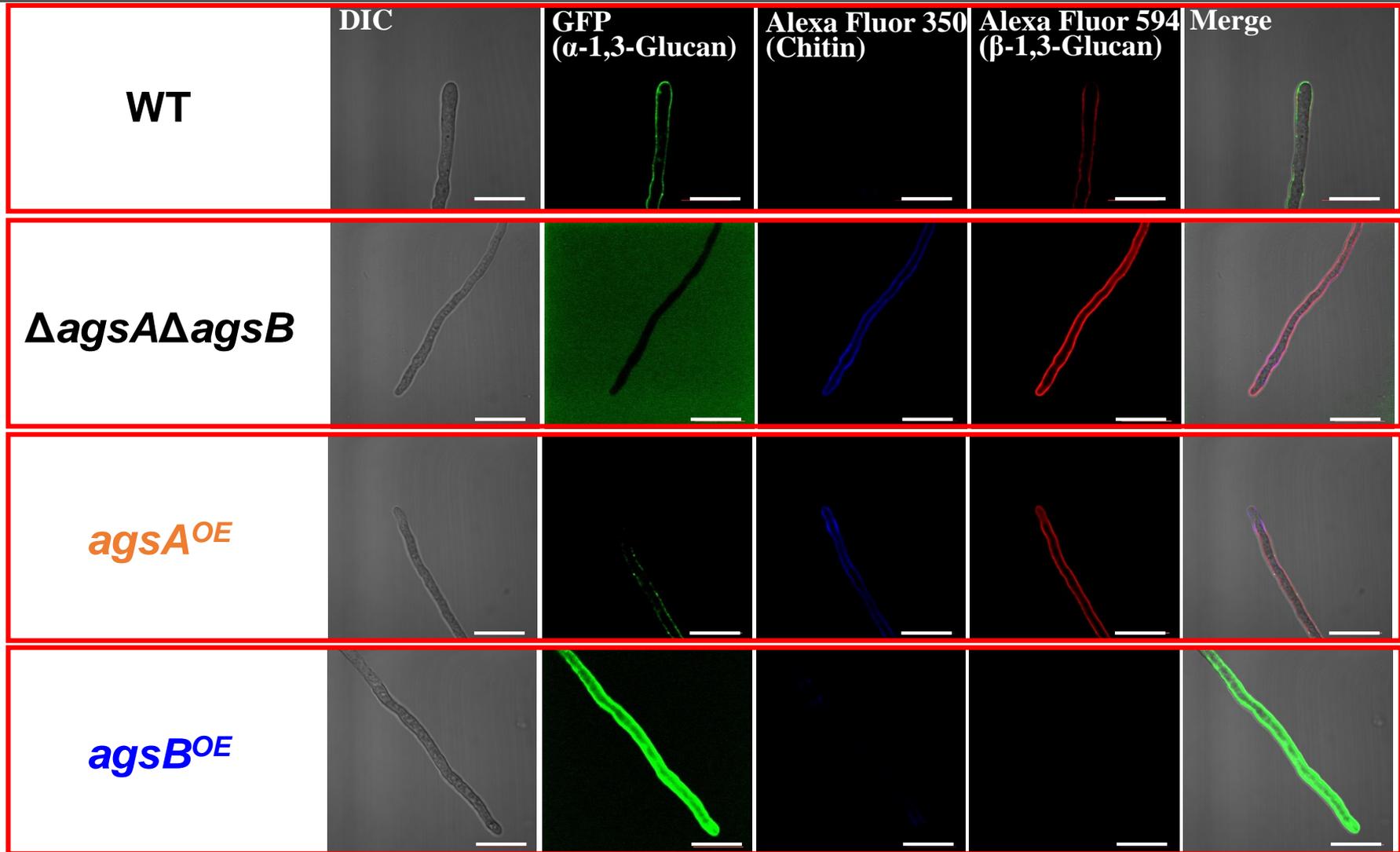
$\beta$ -1,3-Glucan — Alexa Fluor 594

Chitin — Alexa Fluor 350



共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

# 細胞壁多糖の空間分布(蛍光顕微鏡観察)



Miyazawa et al., *Front. Microbiol.* (2018) 9:2623

$agsA^{OE}$ — $\beta$ -1,3-グルカンやキチンが露出(外層の $\alpha$ -1,3-グルカンは僅か)

$agsB^{OE}$ —細胞壁外層に $\alpha$ -1,3-グルカンが局在

# 菌糸細胞の $\alpha$ -1,3-/ $\beta$ -1,3-glucanase処理と顕微鏡観察

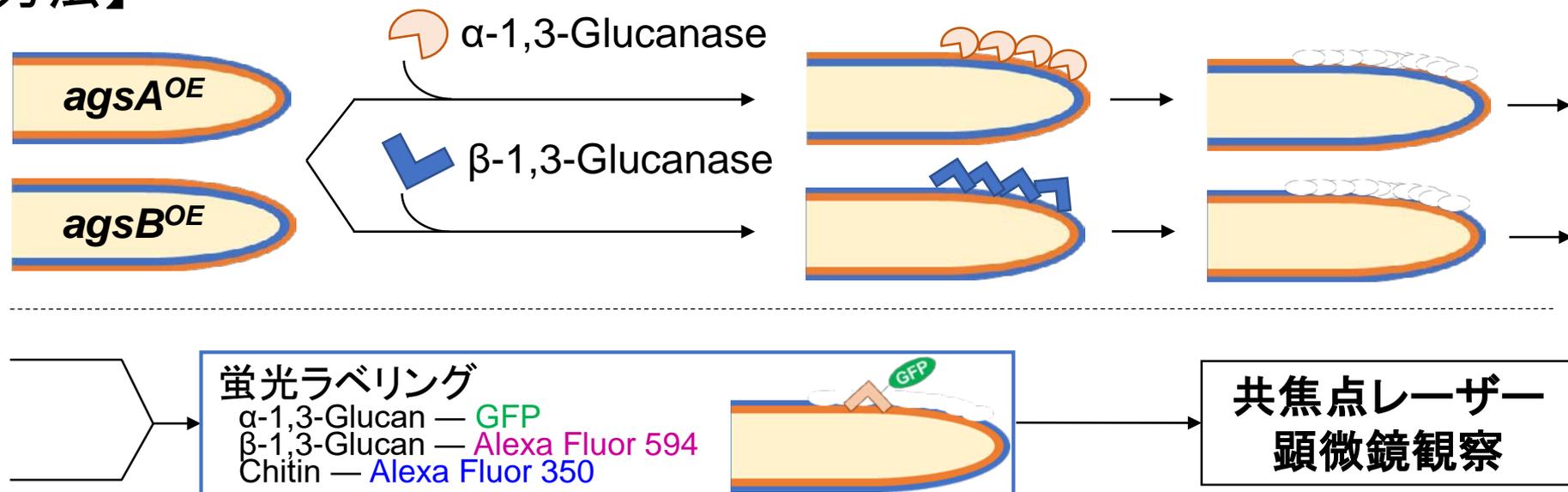
〈蛍光顕微鏡観察〉

$agsA^{OE}$ 株と $agsB^{OE}$ 株間で細胞壁中の $\alpha$ -1,3-グルカンの空間分布が異なることが示唆された。

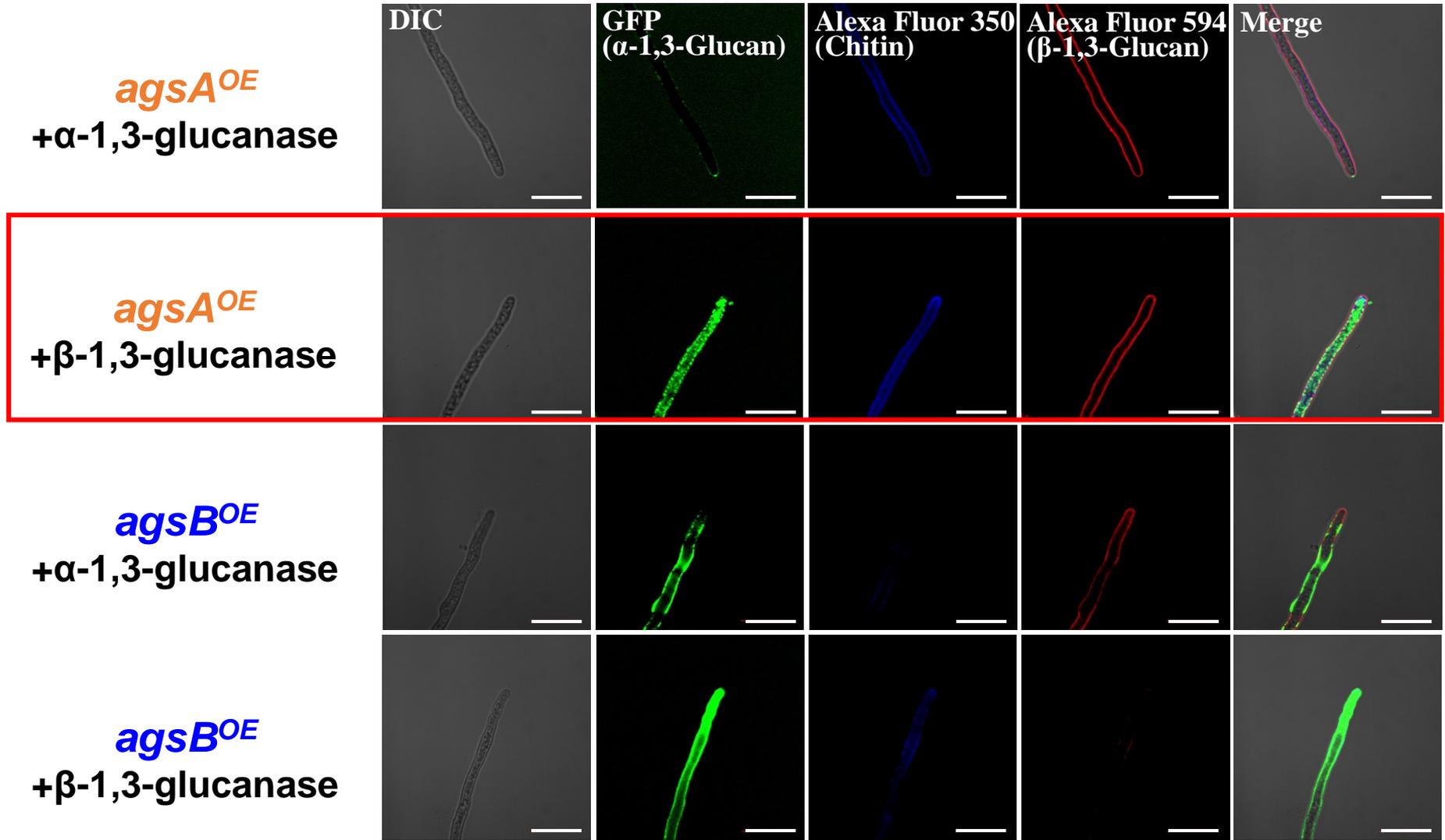


細胞壁多糖分解酵素で処理した細胞を蛍光ラベリングすることにより、細胞壁内の多糖の空間分布についてさらに検証する。

## 【方法】



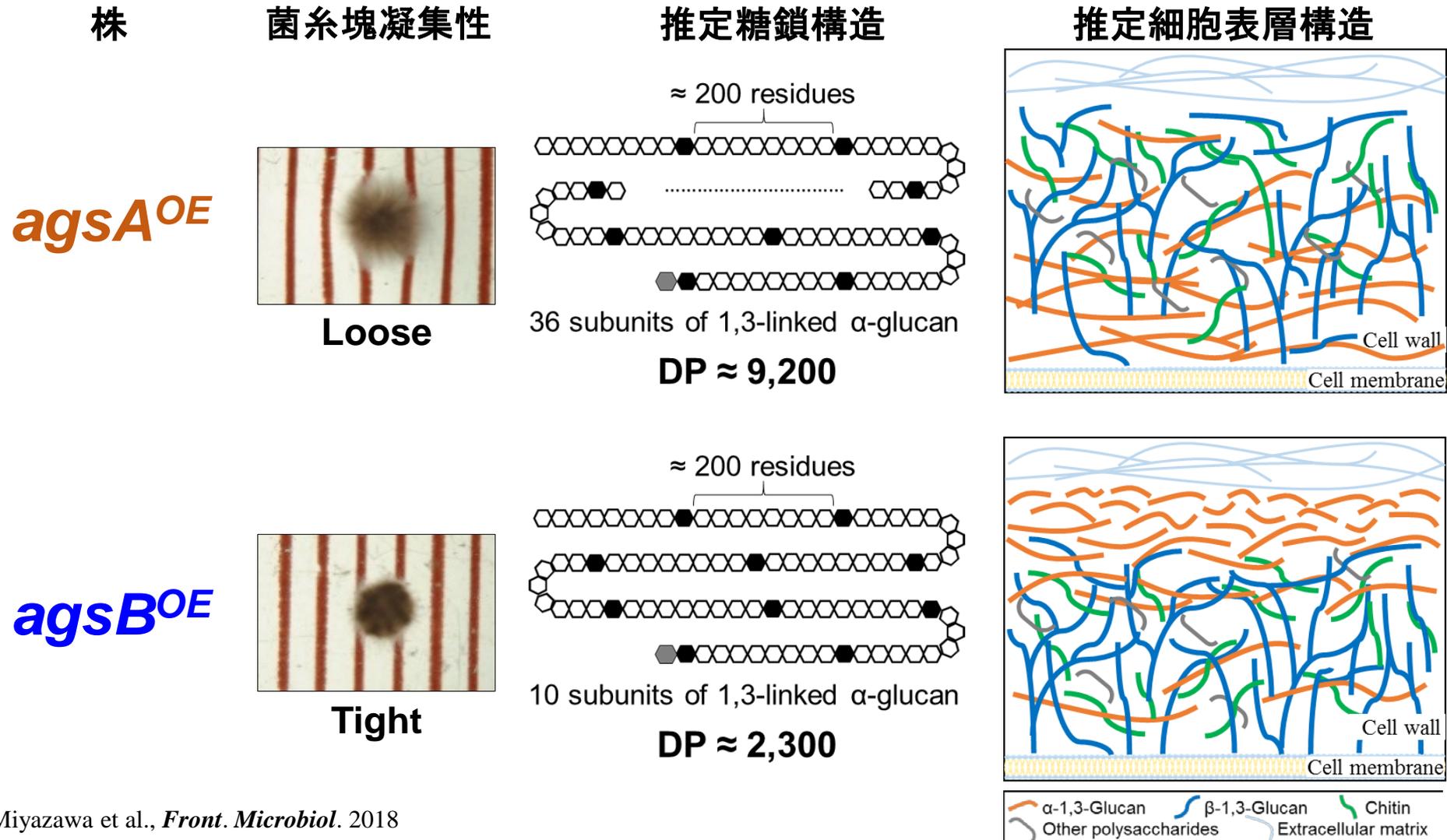
# $\alpha$ -1,3-/ $\beta$ -1,3-glucanase処理細胞の蛍光顕微鏡観察



Miyazawa et al., *Front. Microbiol.* (2018) 9:2623

***agsA*<sup>OE</sup>** —  $\beta$ -1,3-glucanase処理によって $\alpha$ -1,3-グルカンが露出  
⇒ $\alpha$ -1,3-グルカンは主に***agsA*<sup>OE</sup>**株で内層に、***agsB*<sup>OE</sup>**株で外層に局在

# $\alpha$ -1,3-グルカン鎖の推定化学構造と菌糸塊凝集性



Miyazawa et al., *Front. Microbiol.* 2018

菌糸塊  
凝集性

- ①  $\alpha$ -1,3-グルカンの量だけでなく
- ② 分子量、
- ③ 細胞壁中の空間分布が関与する。

# 発表内容

## 背景

糸状菌の産業利用の現状  
糸状菌の細胞表層構造

## Part 1

「モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* における細胞壁 $\alpha$ -1,3-グルカンの分子量及び細胞壁中の局在と菌糸凝集の関係性の解析」

## Part 2

「産業用糸状菌 *Aspergillus oryzae* における第二の菌糸凝集因子の探索及び菌糸凝集メカニズムの解析」

## まとめ

# Part 2の目的

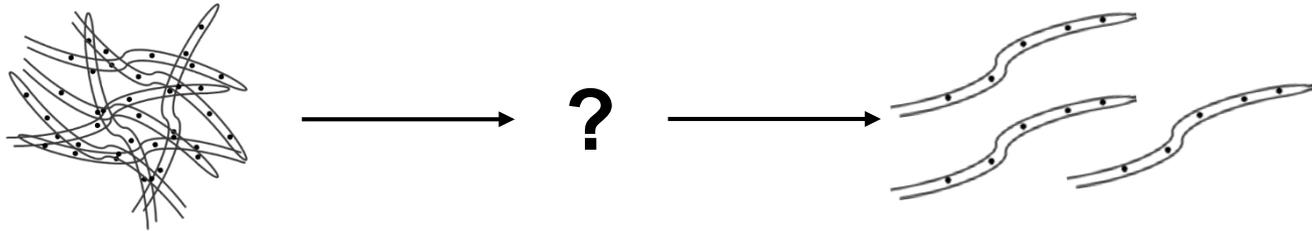
## 【課題】

麴菌のAG欠損株は菌糸完全分散に至らなかった。

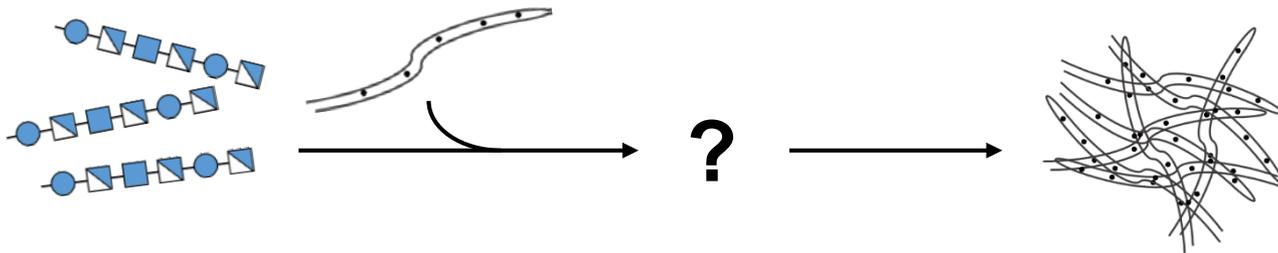
→ 未知の菌糸塊形成因子が存在することを示唆している。

## 【目的】

- 麴菌における第二の菌糸凝集因子の探索

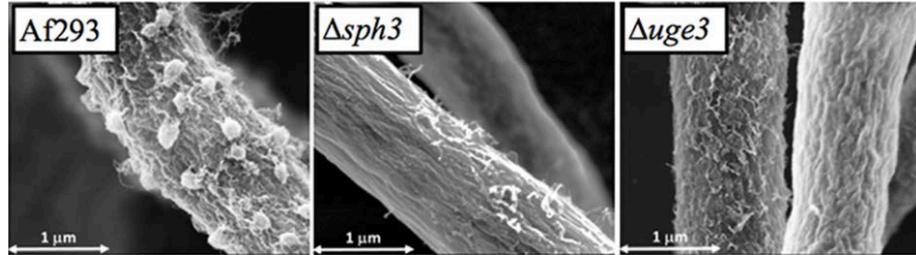


- 第二の接着因子を介した菌糸凝集メカニズムの解析



# A. oryzae における追加の菌糸接着因子の探索

## Galactosaminogalactan (GAG)



- ・2011年, A
- ・Gal, GalN
- ・細胞外に
- ・バイオフィ

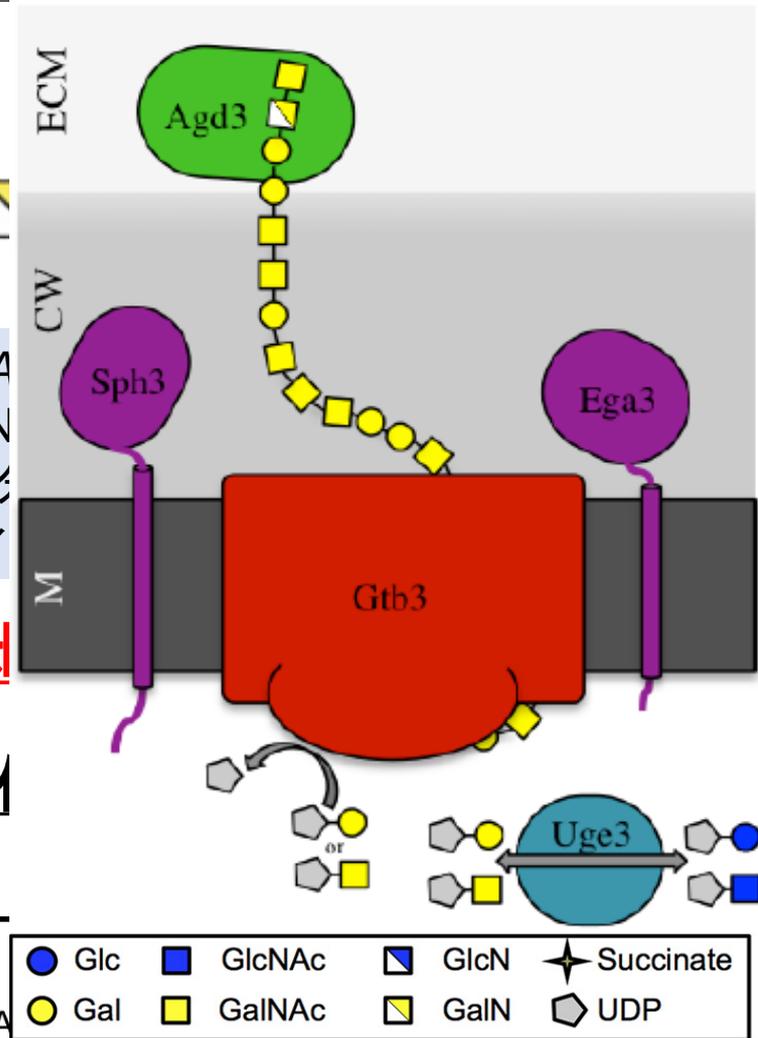
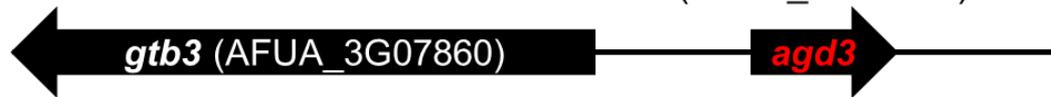
**A. fumigatus における GAG 欠損株の菌糸表面は野生株と異なる**

(Bamford *et al*, *J. Biol. Chem.*, (2015), 290, 27438—450)

⇒ **GAG が A. oryzae における未知**

## A. fumigatus における GAG 生合成遺伝子

(AFUA\_3G07870)



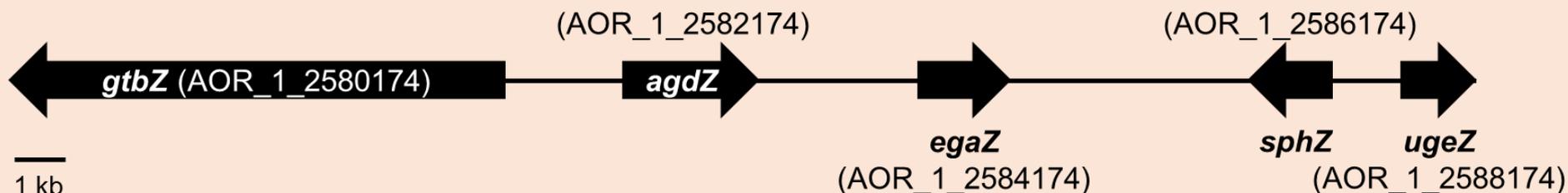
(AFUA\_3G07870) Sheppard & Howell, *J. Biol. Chem.*, (2015) 291,12529-12537

- 5遺伝子がクラスターを形成。
- 3遺伝子はその機能が報告されている。
- クラスターは複数の真菌種に保存。

A. oryzae における生合成クラスターの存在は不明。  
⇒BLAST検索によりクラスターを探索。

# GAG生合成遺伝子クラスターの同定と遺伝子破壊

## ● *A. oryzae* の推定 GAG 生合成遺伝子クラスター



Miyazawa et al. *Front. Microbiol.* (2019) 10:2090

⇒ *A. oryzae* にも同様の遺伝子クラスターが保存されている。

## ● 遺伝子破壊株の取得

WT  
↓

*sphZ*, *ugeZ*  
遺伝子破壊

AGΔ  
↓

**GAGΔ**

**AG-GAGΔ**

(*sphZ*Δ*ugeZ*Δ)

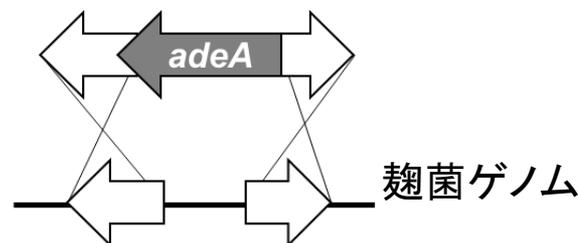
(*agsA*Δ*agsB*Δ*agsC*Δ*sphZ*Δ*ugeZ*Δ)

5遺伝子のうち、隣接する ***sphZ***, ***ugeZ*** の  
2遺伝子を同時に破壊。



**GAG 欠損株および AG-GAG 欠損株を取得。**

〈遺伝子破壊コンストラクト〉



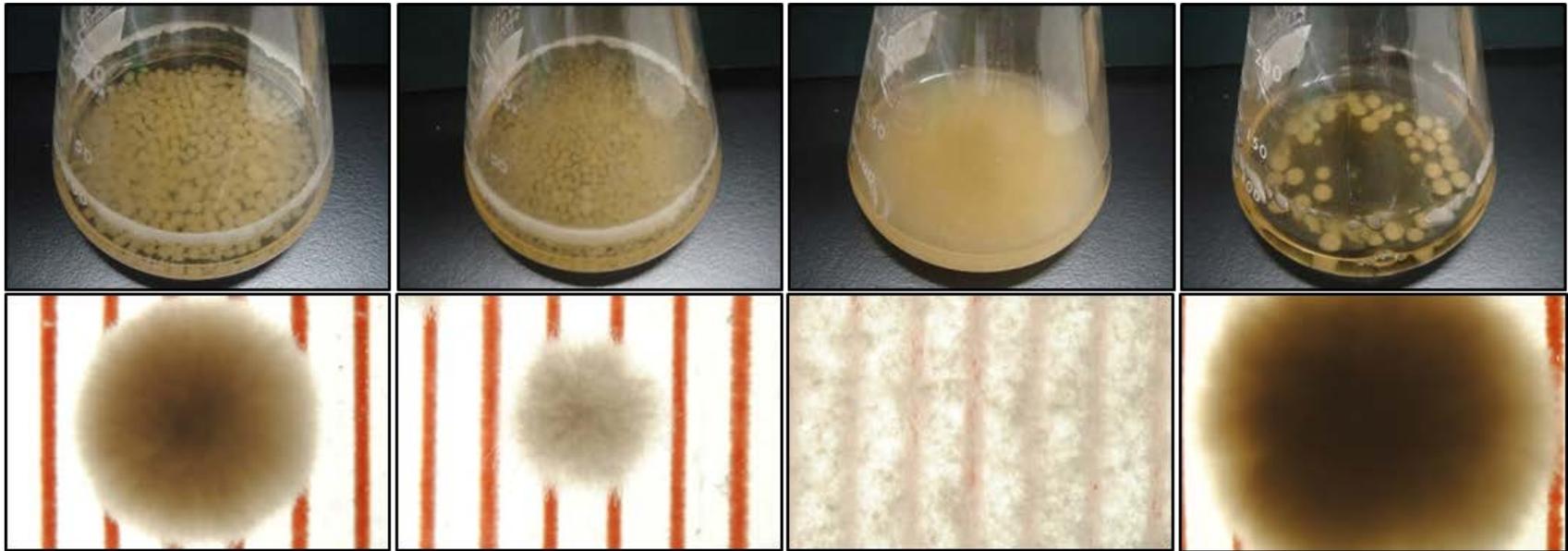
***sphZ* *ugeZ***



図. 遺伝子破壊確認のサザン解析

# GAG欠損株の表現型解析(液体振盪培養)

【培養条件】YPD培地 50 mL, 30°C, 120 rpm, 24 h, 分生子  $1.0 \times 10^5/\text{mL}$



WT

AG $\Delta$

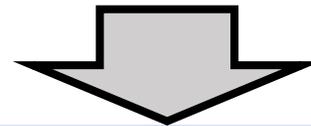
AG-GAG $\Delta$

GAG $\Delta$

Miyazawa et al. *Front. Microbiol.* (2019) 10:2090

**GAG 欠損株**: 野生株に比べて大きな菌糸塊を形成

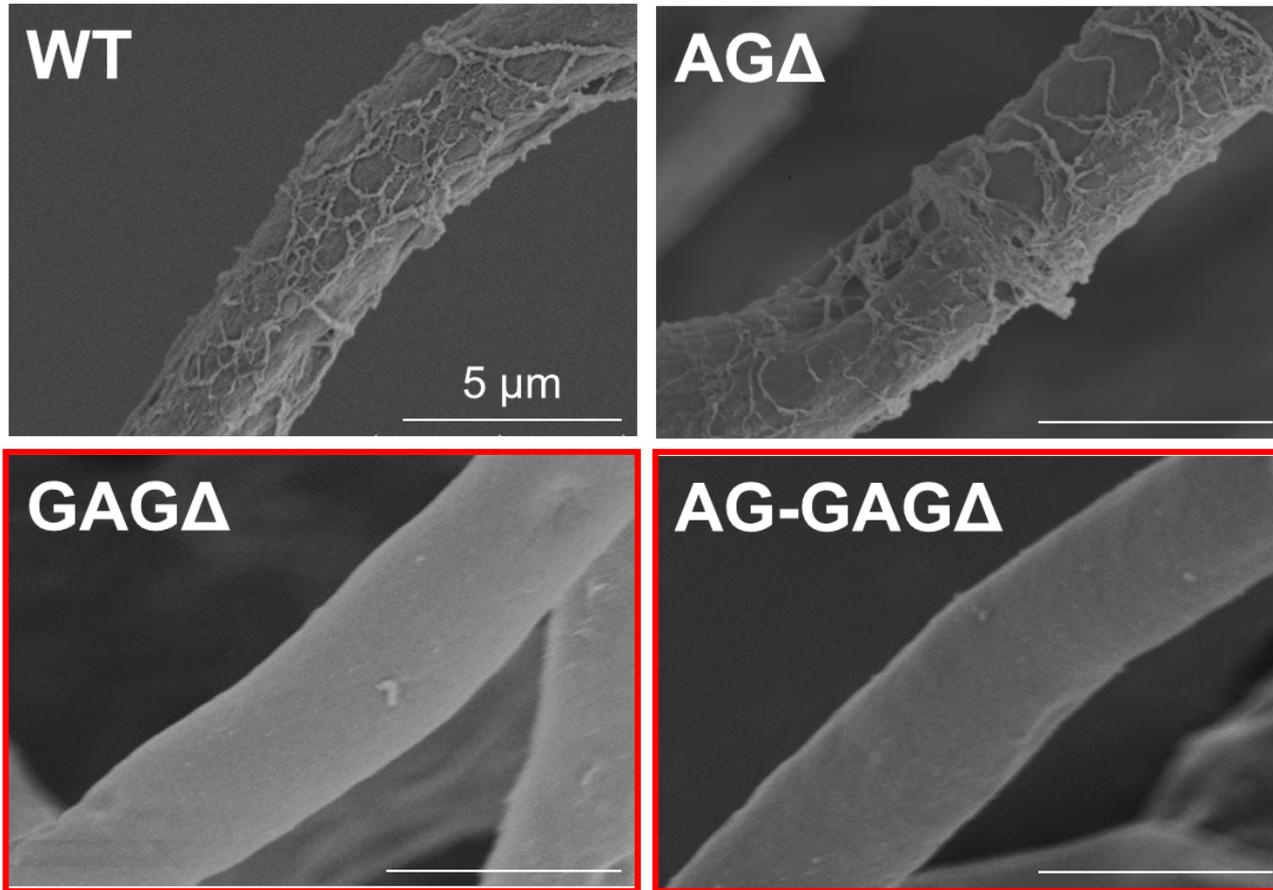
**AG-GAG 欠損株**: 菌糸が液体培地中に完全分散



*A. oryzae* における 菌糸完全分散を達成した。

*A. oryzae* においては、AG に加え GAG も菌糸接着因子 として機能。

# GAG欠損株の表現型解析 (SEM観察)



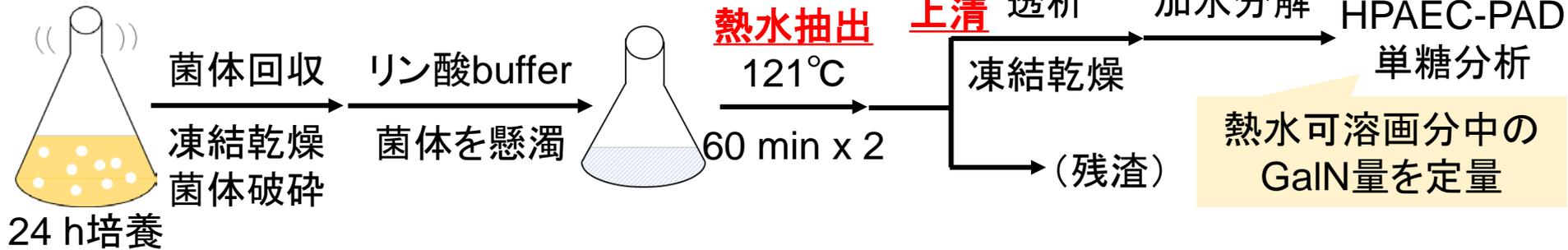
Miyazawa et al. *Front. Microbiol.* (2019) 10:2090

WT, AGΔ 株では、菌糸表面に凹凸が見られた。  
GAG 生合成遺伝子破壊株では、**凹凸が消失**。

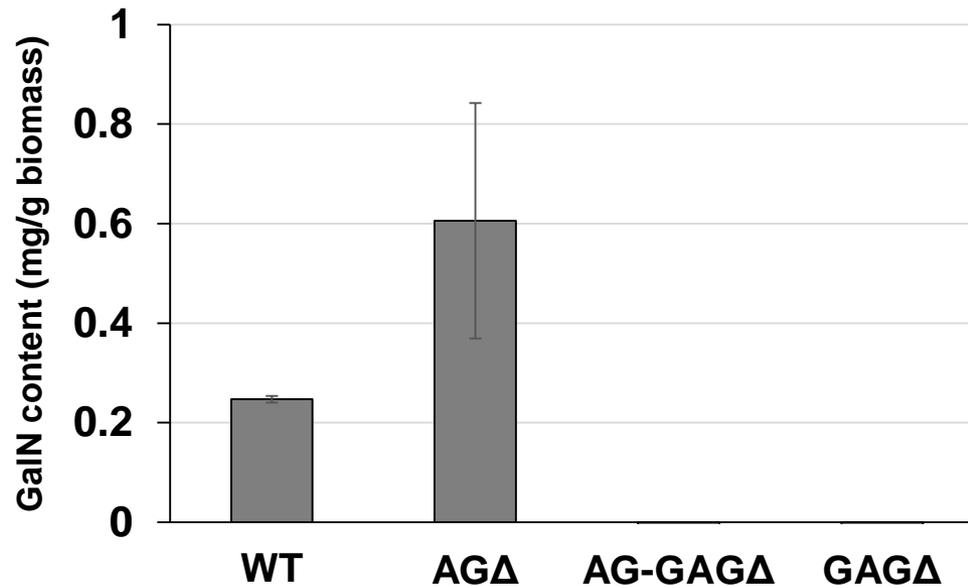
⇒ GAG が実際に細胞表層から消失したことが示唆される。

# 細胞壁中のGAGの定量

## 【方法】



## 【結果】



Miyazawa et al. *Front. Microbiol.* (2019) 10:2090

**AG-GAG 欠損株および GAG 欠損株 → 熱水可溶画分中の GalN が消失**

⇒ GAG 生合成遺伝子破壊により、  
実際に GAG が失われたことを確認した。

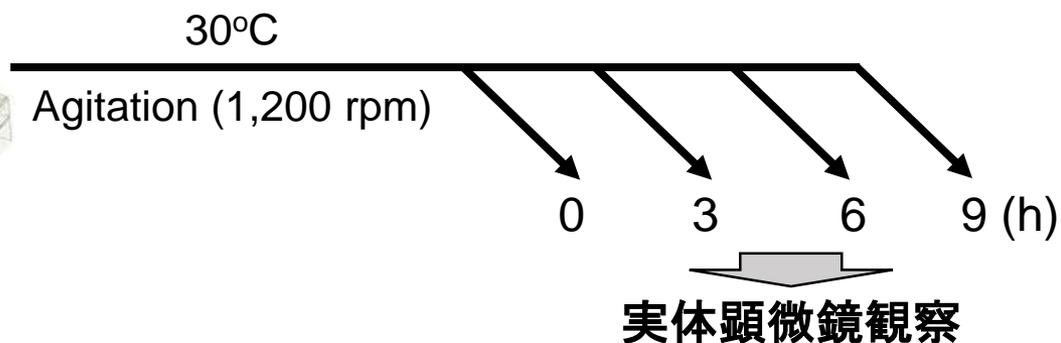
# 小スケールの分生子凝集評価系の構築

## 【方法】

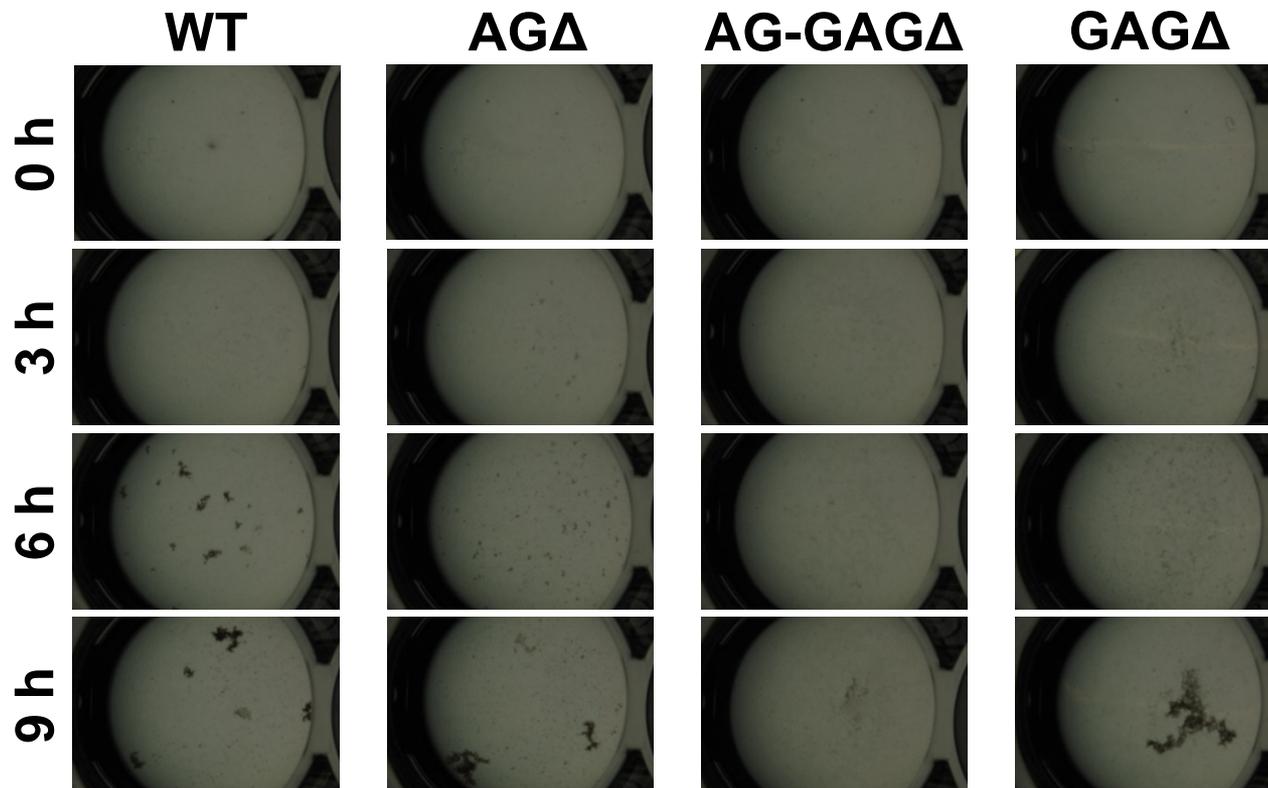
- (1) *Conidia*,  $10^6$ /mL
- (2) 500  $\mu$ L MM  
+0.05% Tween 20



48-well plate



## 【結果】

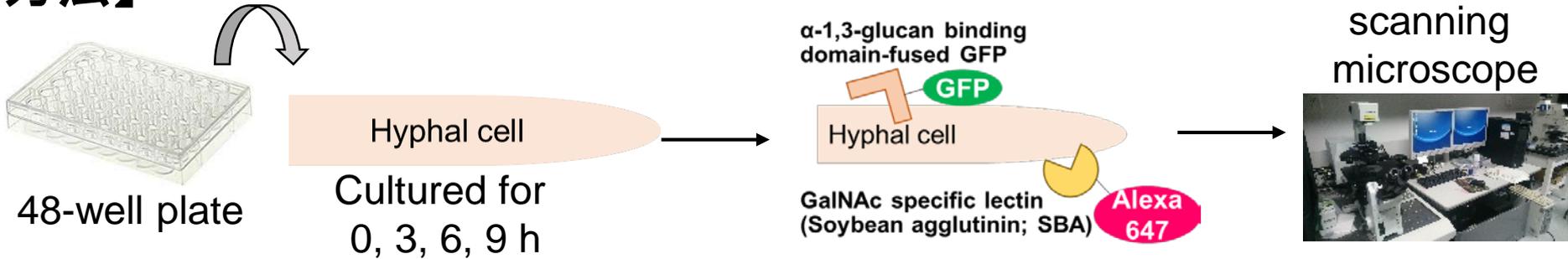


Miyazawa et al. *Front. Microbiol.* (2019) 10:2090

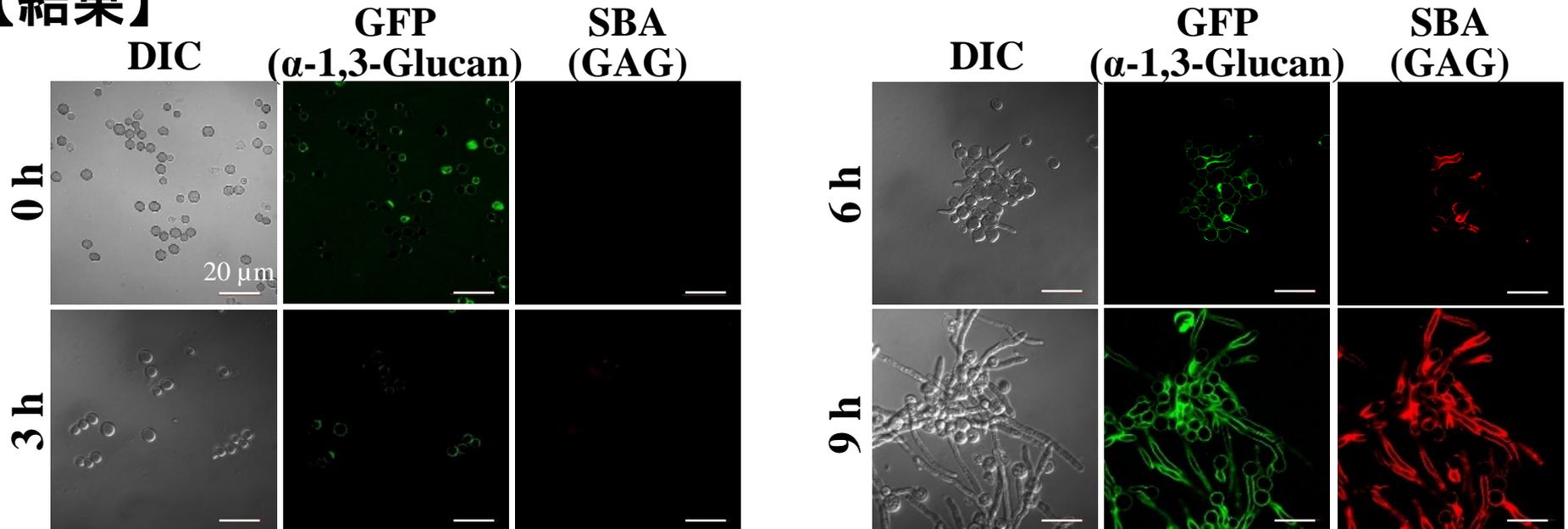
AG-GAG $\Delta$ 株以外で菌糸が凝集; フラスコ培養の結果が再現された。

# $\alpha$ -1,3-グルカンとGAGの蛍光標識と顕微鏡観察

## 【方法】



## 【結果】

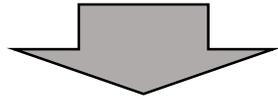


$\alpha$ -1,3-Glucan: labeled from 0 h  $\leftrightarrow$  GAG: labeled from 6 h

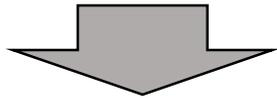
$\alpha$ -1,3-グルカンは接種後すぐから、GAGは分生子発芽後から、菌糸塊形成に寄与することが示唆された。

# GAGは直接的に菌糸塊形成に寄与するのか？

AG欠損株に対してGAG生合成遺伝子を破壊することにより、菌糸の塊形成が全く見られなくなった。  
(遺伝学的な解析)



多糖としてのGAGが直接的に菌糸の塊形成に寄与しているか否かは不明。

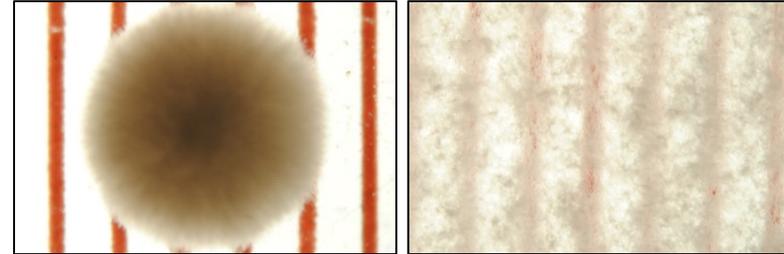


GAGを精製し、GAGと菌糸を混合することにより、菌糸の塊形成が再現されるか否かを評価した。  
(生化学的な解析)

フラスコ写真

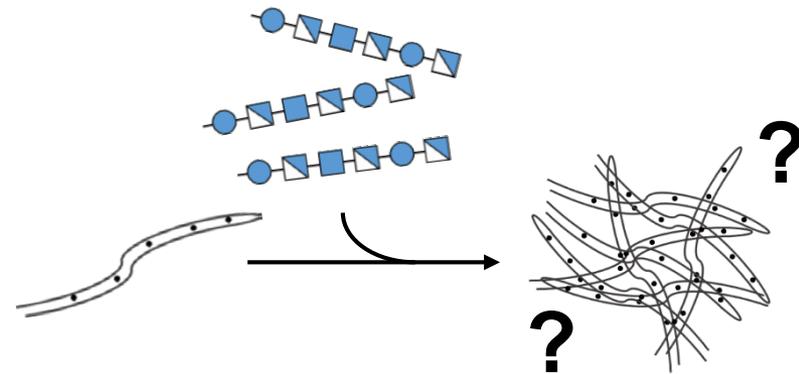


実体顕微鏡  
(目盛 = 1 mm)



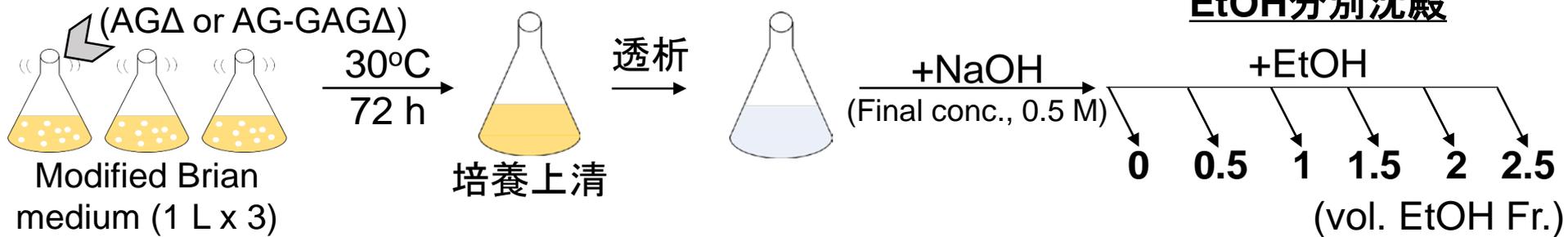
WT

AG-GAG  
二重欠損株

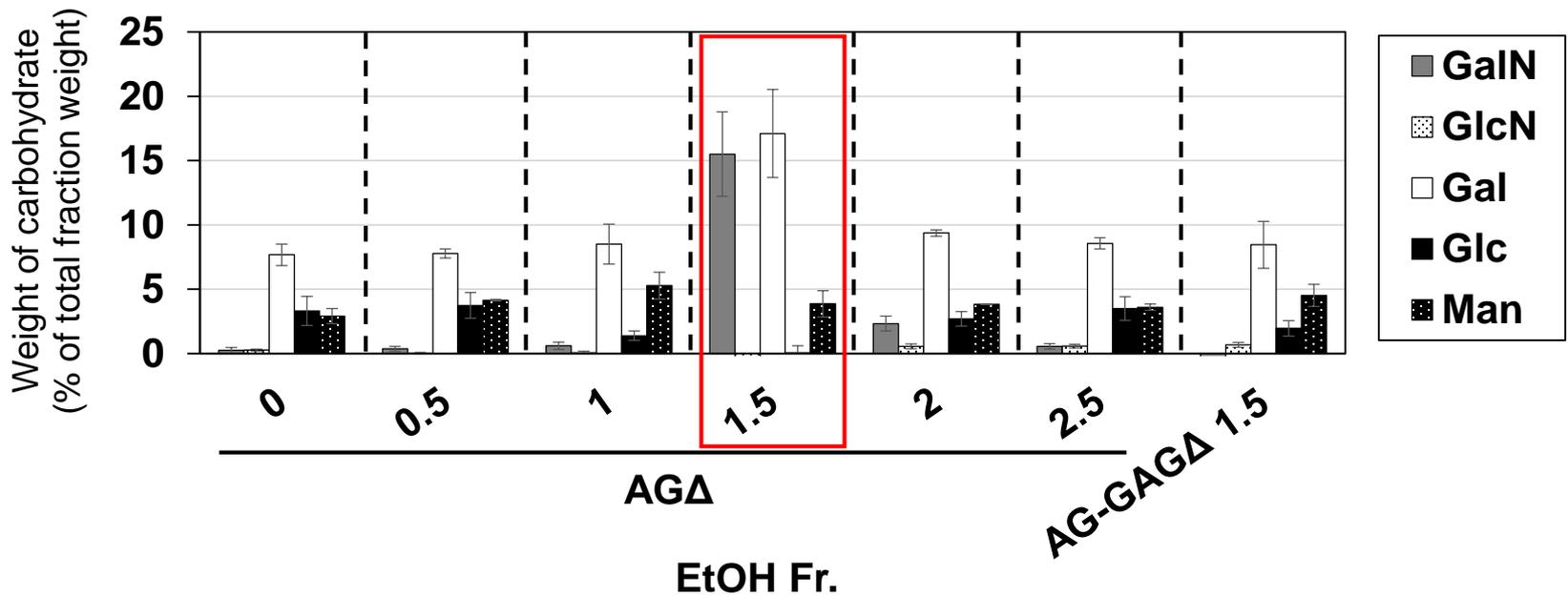


# 培養上清からのGAGの精製

## 【方法】



## 【結果】



Miyazawa et al. *Front. Microbiol.* (2019) 10:2090

**1.5 vol. EtOH画分**にGalNとGalが最も多かった。

# In vitro 凝集評価系の構築

## 【方法】

- (1) AG-GAG $\Delta$  hyphae (9 h)
- (2) 50  $\mu$ L 1 M Na Pi buffer (pH 7.0)
- (3) 50  $\mu$ L EtOH fraction (2 mg/mL)  
(total 500  $\mu$ L)



48-well plate

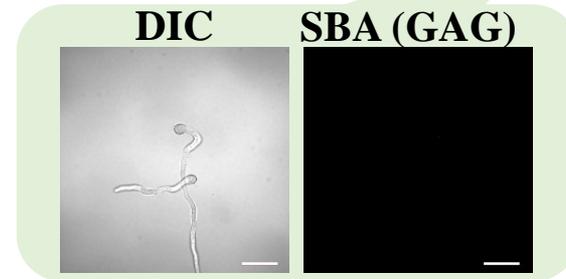
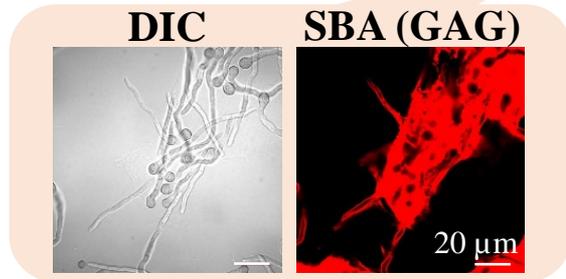
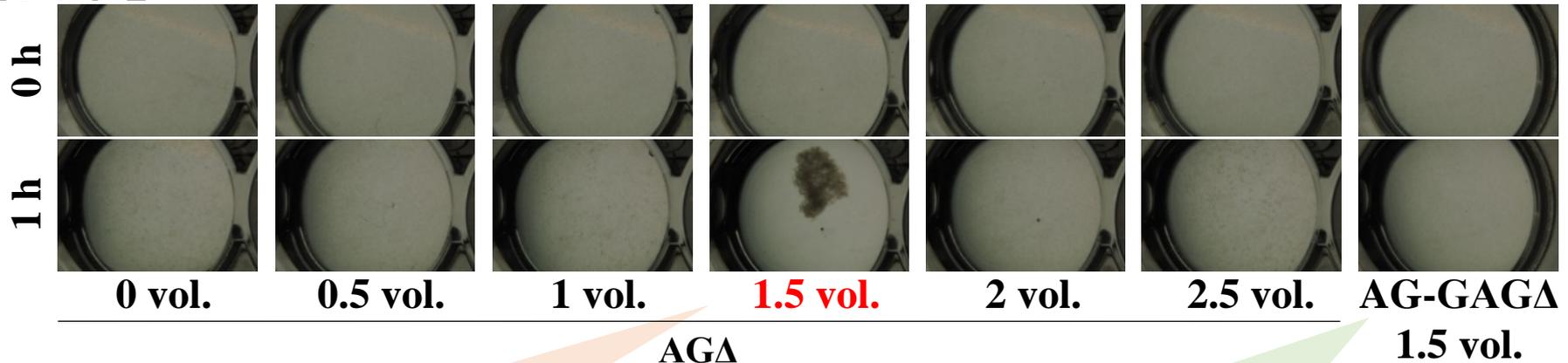
30°C

Agitation (1,200 rpm)

0 1 (h)

実体顕微鏡観察

## 【結果】



Miyazawa et al. *Front. Microbiol.* (2019) 10:2090

1.5 vol. EtOH画分を加えたときのみ菌糸凝集が見られた。

GAGが直接的に凝集に寄与することが強く示唆された。

# AG-GAG欠損株の酵素生産性

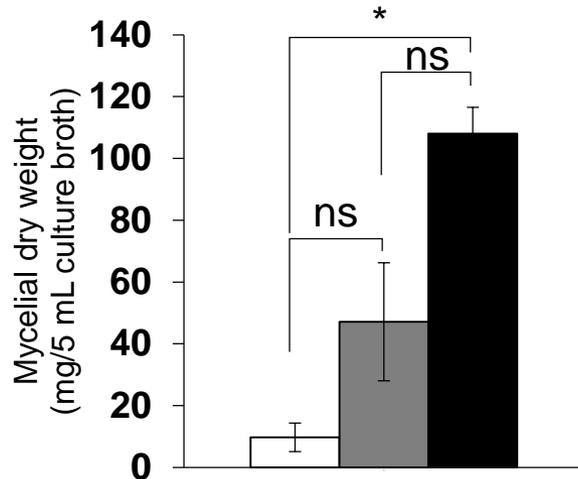
## モデルタンパク質の高発現系の構築



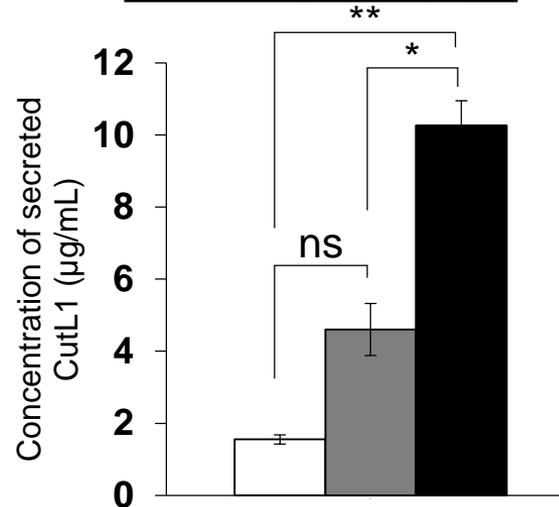
**定量**

生育菌体量  
培養上清中の  
CutL1量  
(SDS-PAGE)

### 生育菌体量



### CutL1 分泌生産量



【培養条件】

YPM培地 50 mL  
30°C, 100 rpm, 24 h  
胞子数  $1.0 \times 10^4$ /mL

□ WT

■ AGΔ

■ AG-GAGΔ

\*  $p < 0.05$

\*\*  $p < 0.01$

ns not significant

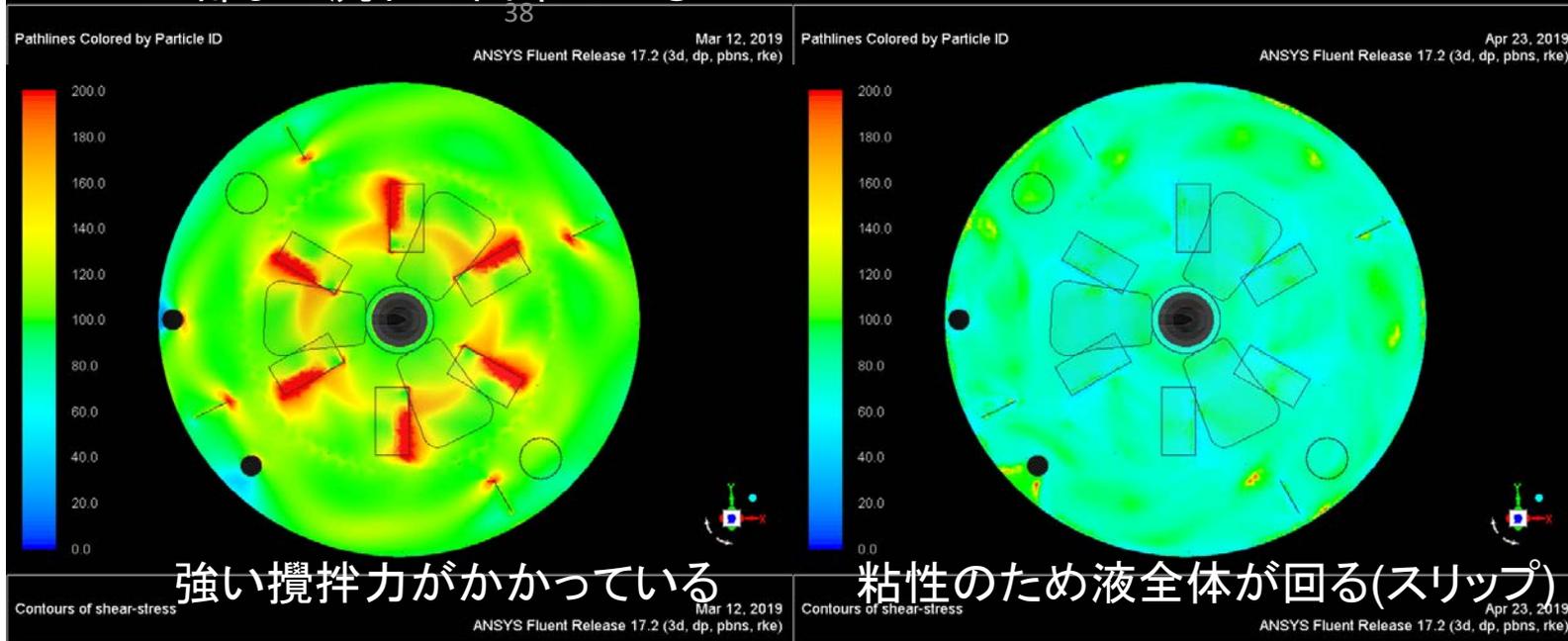
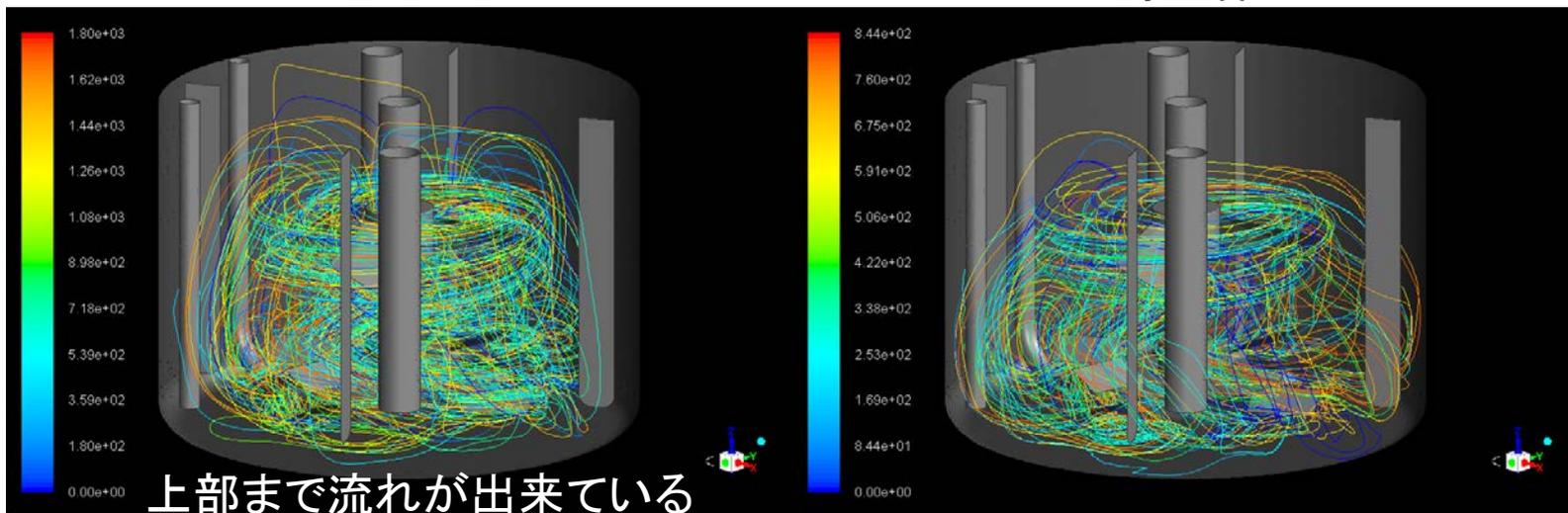
**AG-GAGΔ株は、野生株やAGΔ株に比べて酵素生産性が高い。**

# ジャー培養のCFD解析~AG-GAGΔ株の優れた攪拌性

AG-GAGΔ

野生株

フローパターン



攪拌翼底面  
剪断力

強い攪拌力がかかっている

粘性のため液全体が回る(スリップ)

# まとめ

1. モデル糸状菌 *A. nidulans* においては、 $\alpha$ -1,3-グルカンの量に加えてその分子量と細胞壁中の局在も菌糸の塊形成に寄与することを明らかにした。(Part-1)
2. 産業用糸状菌 *A. oryzae* においては、 $\alpha$ -1,3-グルカンに加えて細胞外分泌多糖ガラクトサミノガラクトン (GAG) も菌糸の塊形成に寄与することを明らかにした。(Part-2)
3. GAGを介した菌糸凝集メカニズムを解析し、GAG分子中のGalN残基のアミノ基を介した水素結合がGAG依存的菌糸塊形成の本質であることを示した。(Part-2)
4. 菌糸分散性のAG-GAG $\Delta$ 株は、野生株に比較して培養液の粘度が低く、攪拌性の向上により野生株よりも優れた酵素生産性を示した。(Part-2)

# 謝辞

- AG欠損株、AG-GAG欠損株、シグナル伝達の解析、菌糸接着解析  
東北大学未来科学技術共同研究センター (現 京都大学)  
東北大学大学院農学研究科 応用微生物学分野 (現 国立感染研)  
同  
同  
金沢工業大学  
山形大学工学部  
(現)琉球大学  
(現)クミアイ化学
- *A. oryzae*  $\alpha$ -1,3-glucan 合成酵素遺伝子3重破壊株の作製  
東北大学大学院農学研究科
- AG, GAG の定量に関する助言  
宮城大学食産業学部
- 培養のCFDシミュレーション  
佐竹化学機械工業(株)

吉見 啓 准教授  
D3 宮澤 拳  
M2 古明地 敬介  
M1 市川 暉  
佐野元昭 教授  
矢野成和 博士  
水谷 治 准教授  
藤岡 智則 博士

五味勝也 教授

笠原紳 教授

加藤好一 研究所長



グラント:  
(公財) 発酵研究所 大型研究助成

ご支援に御礼申し上げます。

阿部研究室-糸状菌チーム