

## 論文の内容の要旨

応用生命工学専攻  
平成19年度博士課程 進学  
氏名 木村 信弥  
指導教員名 北本 勝ひこ

## 論文題目

タンパク質分泌生産のための麹菌 *Aspergillus oryzae* の分子細胞生物学的研究

糸状菌はアミラーゼやセルラーゼなどの糖化酵素やプロテアーゼを細胞外に多く分泌することで知られている。麹菌 *Aspergillus oryzae* もその高い分泌能を持つことから、有用タンパク質生産の宿主として利用されている。しかし、異種タンパク質生産においては、宿主由来のプロテアーゼは生産したタンパク質を分解してしまうため、その多量のプロテアーゼが生産過程のボトルネックの1つとして問題となっている。

一方で細胞内においても、異種タンパク質分解の可能性が示唆される。異種タンパク質生産時には、タンパク質品質管理機構に関連する遺伝子の発現応答があり、細胞が異種タンパク質を異常なタンパク質として認識することが考えられる。これまでに糸状菌において、分泌タンパク質品質管理の中心的なオルガネラである小胞体 (endoplasmic reticulum, ER) が可視化されているが、異常なタンパク質を発現している状態での ER の形態や、異常なタンパク質が細胞内でどのように処理されているかについては詳しく調べられていない。

本研究では、異種タンパク質生産量を改善するために、DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析を利用し、プロテアーゼによる異種タンパク質分解の問題の解決を試みた。そして、変異型の  $\alpha$ -アミラーゼの局在を解析するとともに、ER などのタンパク質の分泌に関与するオルガネラの局在解析を行って、糸状菌のタンパク質分泌に関する基礎的知見を得ることとした。

## 1. 麹菌 *A. oryzae* の DNA マイクロアレイ解析と異種タンパク質分泌生産

*A. oryzae* における全遺伝子対応型の DNA マイクロアレイによる解析を行い、異種タンパク質生産におけるプロテアーゼの問題に応用させることとした。異種タンパク質生産量がピークに達する培養 4 日目を培養中期とし、その前後 2 日をそれぞれ前期および後期として、ゲノム情報から抽出された 134 のプロテアーゼ遺伝子について、培養経過に伴う遺伝子発現解析を網羅的に行った。プロテアーゼ遺伝子は培養経過に伴ってその発現量を変化させており、発現パターンによってグループ化することが可能であった。そして、培養経過とともに発現量が増加するプロテアーゼ遺伝子群が同定され、その中にはこれまでにプロテアーゼ遺伝子破壊の効果が認められている *pepA*、*tppA*、そして *alpA* などのプロテアーゼ遺伝子や、それらとクラスタを形成する中性プロテアーゼ遺伝子 *nptB* も含まれていた。培養後期では異種タンパク質生産量が減少することも考慮して、このプロテアーゼ遺伝子群が培養後期での分解に関与すると推測された。そこで、*nptB* 破壊株を用いてヒトリゾチーム生産を行ったところ、その生産量の増加が認められた。<sup>1)</sup> さらに、*nptB* と培養後期で発現上昇が認められたプロテアーゼ遺伝子 *dppV* と *dppIV* を同時に破壊した株でウシキモシン生産を行ったところ、その生産量が約 34%増加した。<sup>2)</sup>

## 2. 麹菌 *A. oryzae* の小胞体 (ER) と変異型分泌タンパク質の局在解析

異種タンパク質は、ミスフォールドした異常なタンパク質として細胞に認識されることが示唆されているが、その細胞内局在についてはほとんどわかっていない。そこで、細胞内における異常なタンパク質の局在を、ER などの分泌に関与するオルガネラの局在とともに調べることにした。始めに、*A. oryzae* のカルネキシン遺伝子 *AoclxA* の遺伝子座に *EGFP* を挿入し、*AoclxA-EGFP* として発現することで ER の可視化を行ったところ、これまでの報告と一致して菌糸の先端側に多く局在する様子が観察された。また、分泌経路の開始点と考えられる ER のサブドメイン transitional ER (tER) について、COPII 被覆小胞構成因子をコードする遺伝子 *Aosec13* に *EGFP* を融合させて、その遺伝子座で *Aosec13-EGFP* として発現したところ、ER と同様に極性のある分布が観察された。ER と tER を同時に可視化してそれらの挙動を調べた結果、tER は ER とは異なる運動性を持つ特徴的なサブドメインであることが示唆された。

次に、*A. oryzae* の代表的な分泌タンパク質である  $\alpha$  - アミラーゼ AmyB の局在について調べたところ、菌糸最先端において Spitzenkörper 様の構造体を形成しており、ER および tER は最先端を除く先端側に局在していた。また、ゴルジ体の局在も調べたところ、菌糸の先端側に多く存在し、極性を持つ tER と近接な関係にあった。以上のことから、分泌に関与するオルガネラは、菌糸先端付近に配置されていることが示唆された。

続いて、AmyB のジスルフィド結合欠損型の変異体を作製し、その細胞内局在を ER および tER の局在とともに調べた。変異型 AmyB は転写レベルでの発現抑制が示唆されたが、低い発現量でも効率的にタンパク質変性応答 (Unfolded Protein Response, UPR) を誘導しており、強力な ER ストレス誘導タンパク質であることが示唆された。変異型 AmyB を発現すると、ER の極性は失われ、基部側にも発達して変異型 AmyB を多く蓄積し、基部側から先端側にかけて変異型 AmyB の勾配を形成していた。しかし、tER の極性は変異型 AmyB を発現しても維持されていた。そして、tER と変異型 AmyB は、それぞれ逆方向の勾配を形成していた。これらの結果は、菌糸の先端側の ER では分泌が積極的に行われているのに対して、基部側の ER では異常なタンパク質を蓄積する可能性を示唆し、部位によって ER の役割が異なるという可能性が考えられた。

### 3. 麹菌 *A. oryzae* の変異型分泌タンパク質分解機構の解析

変異型 AmyB の局在解析から、異常なタンパク質は菌糸の基部側に蓄積することが示された。この蓄積した異常なタンパク質の運命を調べるために、長時間培養を行って蓄積した変異型 AmyB の様子を観察した。その結果、48 時間培養後においては、変異型 AmyB は ER マーカーとともに液胞に取り込まれていた。この ER の取り込みが ER ストレス誘導型のオートファジーによるものかを調べるため、変異型 AmyB を発現していない株を ER ストレス誘導剤である DTT で処理したところ、AoAtg8 が液胞への取り込まれたことからオートファジーの誘導が認められた。しかし、ER マーカーの取り込みは限定的であった。一方で、長時間培養をすると、AoAtg8 と ER マーカーがともに液胞に取り込まれる様子が観察された。このことから、培養フェーズ依存的なオートファジーによる ER の液胞への取り込みが示唆された。そして、変異型 AmyB は、長時間培養後に AoAtg8 とともに液胞に取り込まれることが確認された。そこで、オートファジー欠損株 ( $\Delta$ Aoatg8) を用いて変異型 AmyB の液胞への取り込みを観察した結果、オートファジー欠損株においては変異型 AmyB の液胞への取り込みが起こらなかった。さらに、ER の液胞への取り込みについても調べたところ、同様にオー

トファジー依存的であることが示された。以上のことから、長時間培養で誘導されるオートファジーによって ER および変異型 AmyB が分解されることが示唆され、オートファジーによる蓄積したミスフォールドタンパク質の除去を糸状菌で初めて示した。

## 総括

培養後期で発現量が上昇するプロテアーゼ遺伝子を破壊することにより、異種タンパク質の分泌生産量が増加することが示され、それらプロテアーゼ遺伝子の多重破壊はさらなる効果があることが認められた。一方で、細胞内において、フォールディングに異常のあるタンパク質は、菌糸の基部側の ER に蓄積し、最終的にオートファジーで分解されることが示唆された。タンパク質の分泌に関与するオルガネラは、菌糸の先端付近に配置されていることから、異常なタンパク質を基部側に蓄積させることによって、正常なタンパク質の分泌を維持しているのかもしれない。そして、長時間培養によって起こるオートファジーを利用し、蓄積した異常なタンパク質をオルガネラごと分解していることが示唆された。

## 発表論文

1) Kimura S, Maruyama J, Takeuchi M, and Kitamoto K.

Monitoring global gene expression of proteases and improvement of human lysozyme production in the *nptB* gene disruptant of *Aspergillus oryzae*.

Biosci. Biotechnol. Biochem. 72(2):499-505. (2008)

2) Yoon J, Kimura S, Maruyama J, and Kitamoto K.

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

Appl. Microbiol. Biotechnol. 82(4):691-701. (2009)