

# 麹菌における細胞表層工学システムの構築

中島 春紫

(東京大学大学院農学生命科学研究科 応用生命工学専攻)

## 研究の目的

細胞表層工学は微生物の表層に外来のタンパク質を発現させることにより、機能的なタンパク質にコートされた細胞を生物触媒として提供する技術である。細菌や酵母細胞において *in vivo* で GFP、グルコアミラーゼ、抗原ペプチド、重金属吸着ペプチドの表層発現が報告されているが、糸状菌は細胞表層へのアンカーとなるタンパク質が開発されていないため細胞表層工学の宿主となっていない。本研究では麹菌 *Aspergillus oryzae* において有用な細胞表層アンカーを開発することを目的としている。

## 方法

麹菌のゲノムデータベース情報を利用して、細胞表層に局在すると考えられる分泌タンパク質 $\beta$ -アセチルグルコサミニダーゼおよびヒドロフォービンをコードする遺伝子 *nagA* および *hypA-E* を単離した。それぞれについて eGFP を結合した融合タンパク質を構築し、蛍光顕微鏡により融合タンパク質の局在を観察するとともに、ウエスタン解析により融合タンパク質の挙動を検討した。

## 結果および結論

麹菌より $\beta$ -アセチルグルコサミニダーゼをコードする *nagA* 遺伝子を単離した。*NagA* は 600 アミノ酸よりなり、他生物の $\beta$ -アセチルグルコサミニダーゼと強い相同性を有していた。*NagA-eGFP* 融合タンパク質をコードする遺伝子を構築して麹菌に導入したところ、固体培養時に細胞表層への強い蛍光が観察された。しかし、*NagA-eGFP* の細胞表層への結合の安定性は低く、細胞表層アンカーとしての適応性は低かった。

ヒドロフォービンは特徴的なヒドロパシーパターンと保存された 8 個の Cys 残基を持つ低分子量タンパク質であり、糸状菌及びキノコの気中菌糸、孢子、子実体の表面を覆っている。ヒドロフォービンは分泌された後、細胞表層に自己集合して疎水性の層を作ることにより、細胞表層に撥水性を与えている。我々は麹菌よりヒドロフォービンをコードする可能性のある遺伝子を 5 つ(*hypA-E*)単離した(図 1)。このうち *hypA* および *hypB* 遺伝子は固体培養特異的な mRNA の転写が観察されている。*HypA* の局在について解析するため、*hypA* 遺伝子自身のプロモーターにより *hypA-egfp* 融合遺伝子を

発現するプラスミドを構築し、*A. oryzae* niaD300 株に導入した。液体培養の時、蛍光はほとんど観察できなかったが、固体培養では分生子頭および分生子表層に顕著な蛍光が観察された（図 2）。HypA（16 kDa）に対して eGFP（27 kDa）は大きなタグであるが、抗 GFP 抗体を用いたウエスタン解析を HypA-eGFP 発現菌体に対して行ったところ、27 kDa, 100 kDa, >300 kDa の 3 本のバンドが検出された（図 3）。一番小さな 27 kDa のバンドは HypA-eGFP の分解産物であり、100 kDa のバンドは HypA-eGFP が 2 ~ 3 分子結合したオリゴマーと考えられる。最も強いシグナルを示したのが >200 kDa のバンドであったことから、大部分の HypA-eGFP は麹菌の表層で自己集合していたと考えられる。重合したヒドロフォービンは SDS 存在下の煮沸によっても解離しないことが報告されている。自身の 2 倍の分子量を持つ eGFP タグを結合したヒドロフォービン HypA は、固体培養時の気中菌糸および分生子の表層に発現し、SDS 存在下の煮沸によっても解離しない強固な自己集合によって層を形成していることが示された。以上の観察結果は、麹菌のヒドロフォービン HypA が麹菌における細胞表層システムを構築するのに適した性質を有することを示していると考えている。

```

RodA  MKFSIAAAVVAFAASVAALPPAHDSQFAGNGVGNKGNNSNVKFPVPENVTVKQASDKC--GDQAQLS-CC
HypA  MQFS-VAAVLALATAVAALP-PASGTGAGQQVGHSKN---DFPLPKELTTKQAADKC--GDQAQLT-CC
HypB  MKFFAVAALFATAAMAAPGS--APVPGAAAAAGNGNA-----PVINQTTQQAFTDACSAGNHPV--CC
HypC  MKVTLLTTLTTLCVLGVASSADP-----TAQ-----C---DNGPVQ-CC
HypD  MHSTNIFNFFMLAVAAASAAT---ISKAGDSKALQKVAEGK-----C---DIGNTA-CC
HypE  MKFLHTIALIATFTVASATP-----AGSTPSQ-----C---TAAQANKCC

RodA  NKATYAGDTTTVDEGLLSGALSGLIGAGSGAEGGLGLFDQCSKLDVAVLIG---IQDLVNQK--CKQNIA
HypA  NKTVKTGDFQTQVEEGLLAGLLSNLLGAGQGSQGLGLLDEC----TNIPIPIIISIASPQEK--CKQPIS
HypB  -DQIDTSTKTTTVNEGLLGGLLGEGLGVLNLLVGGEPEGAC-----SGLVSALNKQ--CQTSIG
HypC  ----ATGLPTDSVVSPLLGLLGVVVPDMSTPVGLT----C-----NPIVQGGG-CPGHPV
HypD  ----NNVHEEKDERLFNLVKQGLIDILAGNEDYA----CAKSGVIDEWNLFSLVKQTNDGPVCKNVTA
HypE  -----TGLTNGILNLNVLPAL-----C-----LPLVGS---CNNQAA

RodA  CC-QNSPSD--ASGSLIG-IGLP-C-----VALGSIL-- 157
HypA  CC-QNTKSS--ADGDLVG-IGLP-C-----IALGSLL-- 151
HypB  CCQNAKGDNYQSGLLNLNLQAP-C-----LLSNGL-- 146
HypC  CC-----TGNNFNGLLALG-C----TPVLST---- 99
HypD  CC-----SSGK-----C-----VAIDG---- 119
HypE  CC-----ETNGIVAPVELPHCGLMTRRLDMIYPI 96

```

図1. 麹菌 (*A. oryzae*) から単離した5つのヒドロフォービン (HypA - E) および *A. nidulans* の RodA のアミノ酸配列。保存された Cys 残基を下線で示す。

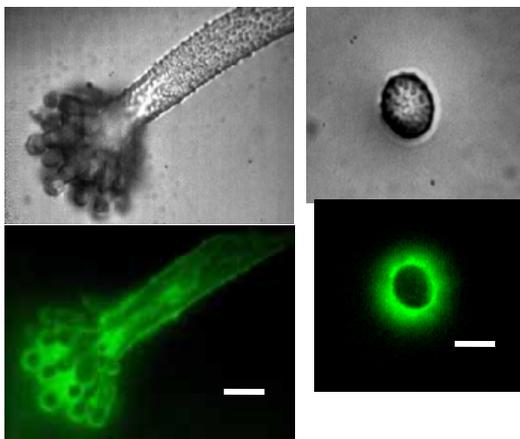


図2 HypA-eGFP 融合タンパク質は *A. oryzae* の分生子頭 (左図) および分生子 (右図) の表層に特異的に局在する。  
Bar: 20 $\mu$ m (左図) 5  $\mu$ m (右図)

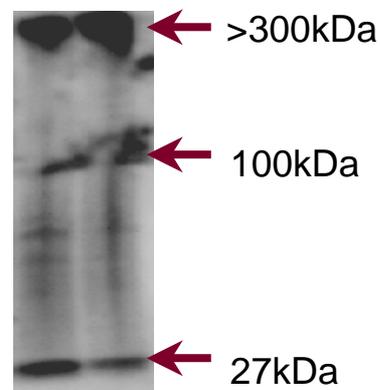


図3 HypA-eGFP 融合タンパク質は *A. oryzae* の細胞表層に自己集合する。  
*hypA-egfp* 融合遺伝子を発現する *A. oryzae* を固体培地で培養し、抗 GFP 抗体により Western 解析を行った。