

変異または異種分泌タンパク質の過剰発現に対する麹菌の細胞応答

新谷 尚弘

(東北大学大学院農学研究科)

研究の目的

糸状菌はタンパク質分泌能力の高さから異種タンパク質の分泌発現宿主としての利用が期待されている。麹菌 *Aspergillus oryzae* においても宿主-ベクター系の開発が行われその有用性が示されているが、宿主由来の分泌タンパク質に比べ、異種タンパク質の分泌発現効率は一般的に低いことが知られている。異種または変異分泌タンパク質の過剰発現は細胞にとって異常な状況だと考えられ、このストレスに対する宿主細胞の応答を解析することは、異種タンパク質高分泌株の分子育種の基盤になるものと期待される。本研究では近年開発された麹菌 DNA マイクロアレイ技術を用い、他に先駆け異種または変異タンパク質の分泌ストレスに対する宿主細胞の応答を網羅的に解析する。

方法

本研究で使用されたプラスミドをTable 1 に示す。各々のプラスミドは野生型あるいは変異型の 1,2- α -mannosidase 発現株を作製するために *A. oryzae* NS4 株の *niaD* 遺伝子座に挿入された。 *A. oryzae* は YPM 液体培地 (1% yeast extract, 1% peptone, 2% maltose) 中、30℃、24 時間培養された。ノーザン解析と cDNA マイクロアレイ解析は前田らに従って行った¹⁾。

結果

多田羅らにより、*Aspergillus saitoi* の 1,2- α -mannosidase の Cys-443 残基はコンフォメーションを保つのに重要であり、この残基の Phe への置換は *A. oryzae* による分泌生産量の著しい低下をもたらすことが見出されている²⁾。恐らく、宿主細胞において変異型酵素がタンパク質品質管理を受けていると考えられる。そこで、*A. oryzae* における異常分泌タンパク質発現に対する細胞応答を解析するために、この変異型酵素を発現させることとした。発現レベルは細胞応答を解析する上で重要な考慮点であると考えられたので、2 種類の転写活性の異なる転写プロモータを用いた。一つは No.8142 プロモータであり、強力なプロモータとしてすでに確立されている。もう一つの *enoA* プロモータは、生理的なレベルでの蛋白質発現に用いた。ノーザン解析により No.8142 プロモータを用いた場合、転写量は *enoA* プロモータを用いた場合より遥かに高いことが確認された。

これらの発現系を用い、野生型及び変異型酵素タンパク質を発現させ、SDS-PAGE とウェスタン解析によって解析した。どちらのプロモータを使用した場合でも、野生型酵素は効率よく分泌された。プロモータ活性を反映し、No.8142 を用いた方が 10 倍以上の分泌発現量を示した。一方、変異型酵素は *enoA* プロモータを用いた場合は分泌が検出されなかったが、No.8142 プロモータを用いた場合はスミアなシグナルとして変異型酵素が培地中に検出された。Endo H により N 型糖鎖を除去すると一本のバンドに収束することから、変異型酵素は強

力なプロモータを用いて過剰発現されると分泌されるが、高分子量の N 型糖鎖修飾（ハイパーグリコシレーション）を受けることが明らかとなった。この修飾は野生型酵素には見られず、変異型酵素に特徴的であることから、異常分泌タンパク質に対する応答の一つであると考えられる。変異型酵素が細胞内に蓄積している可能性を調べるために、細胞抽出液に対するウェスタン解析を行ったところ、*enoA* プロモータを用いた場合は、野生型酵素に比べて変異型酵素の細胞内量は非常に少ないことが示された。このことは変異型酵素が細胞内で分解されている可能性を示している。No.8142 プロモータを用いて過剰発現した場合は、野生型と変異型酵素の細胞内蓄積量は同等であった。また、細胞内に検出された変異型酵素はハイパーグリコシレーションを受けていなかった。出芽酵母とのアナロジーから、ハイパーグリコシレーションはゴルジ体で起こると推定される。ゴルジ体でハイパーグリコシレーションを受けた変異型酵素は速やかに分泌されていると考えられる。従って、変異型酵素はゴルジ体より前のステップ、つまり小胞体に蓄積していると考えるのが妥当である。

そこで、次に変異型酵素の過剰発現に対する細胞応答を転写レベルで解析した。解析には約 5,000 の重複しない EST クローンを搭載した cDNA マイクロアレイを用いた。野生型酵素、変異型酵素をそれぞれ過剰発現する *A. oryzae* の転写産物量を解析した結果、*bipA*, *pdiA* などの小胞体分子シャペロンの転写量が変異型酵素発現株において特異的に増加していることが明らかとなり、unfolded protein response (UPR) が誘導されていると考えられた。

結論

立体構造に異常がある分泌タンパク質を麹菌にて発現させた時の細胞応答を解析した。生理的な発現レベルでは、変異型 1,2- α -mannosidase は分泌経路で品質管理を受け、分解されていると推測された。過剰発現すると分解は回避されたが、ハイパーグリコシレーションを受けることが明らかとなった。糸状菌においてタンパク質のハイパーグリコシレーションに関する報告は無く、異常分泌タンパク質発現に対する新しい細胞応答の可能性が考えられる。酵母においては、正常な生育条件でもハイパーグリコシレーションは起こり、それによって生じたマンノプロテインは細胞壁の重要な構成成分である。*A. oryzae* 細胞内に検出された変異型酵素はハイパーグリコシレーションを受けていないことから小胞体に蓄積しており、小胞体に多量に蓄積すると UPR を誘導すると考えられた。

文献

- 1) Maeda H, Sano M, Maruyama Y, Tanno T, Akao T, Totsuka Y, Endo M, Sakarada R, Yamagata Y, Machida M, Akita O, Hasegawa F, Abe K, Gomi K, Nakajima T, and Iguchi Y. (2004) Transcriptional analysis of genes for energy catabolism and hydrolytic enzymes in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae* using cDNA microarrays and expressed sequence tags. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65, 74-83.
- 2) Tatara Y, Yoshida T, and Ichishima E. (2005) A single free cysteine residue and disulfide bond contribute to the thermostability of *Aspergillus saitoi* 1,2- α -mannosidase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69, 2101-2108.

Table 1. The plasmids used in this study.

Name	Promoter	Target cDNA for expression
pNE	<i>enoA</i>	none
pNE-AM1	<i>enoA</i>	wild-type <i>f-msdS</i>
pNE-AM1-C443F	<i>enoA</i>	C443F <i>f-msdS</i>
pNAN8142	No.8142	none
pNAN-AM1	No.8142	wild-type <i>f-msdS</i>
pNAN-AM1-C443F	No.8142	C443F <i>f-msdS</i>