

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* における SM タンパク質の機能解析と異種タンパク質生産への応用研究

樋口 裕次郎
九州大学大学院 農学研究院

研究の目的

真核生物において、分泌タンパク質は小胞輸送により小胞体、ゴルジ体を経て細胞膜から分泌される。この小胞輸送経路において、soluble *N*-ethylmaleimide sensitive factor (NSF) attachment protein receptor (SNARE) 及び Sec1/Munc18 (SM) タンパク質が小胞の膜融合において必要である。SNARE タンパク質は、ターゲット膜と小胞膜上に存在し、複合体を形成して膜融合を行う。SM タンパク質は、SNARE タンパク質複合体に作用し、膜融合を補助する。真核微生物のモデルである出芽酵母においては SM タンパク質に関する研究は進んでおり、ゴルジ体から細胞膜において機能する Sec1p、小胞体からゴルジ体において機能する Sly1p の過剰発現株では、異種タンパク質 (黄麹菌 *Aspergillus oryzae* 由来 α -amylase) の分泌量の増加が報告されている¹。一方、モデル糸状菌である黄麹菌 *A. oryzae* においては SM タンパク質に関する知見が未だに無い。黄麹菌は、2006 年の日本醸造学会大会にて“国菌”に認定されており、日本において古くから発酵・醸造産業に用いられてきた有用微生物であり、高い安全性でアミラーゼなどの有用タンパク質を菌体外に大量に分泌する能力を持つ。本研究では、分泌に関与すると考えられる SM タンパク質に焦点を絞り、機能解析による基礎研究及び異種タンパク質生産を通じた応用研究を行い、黄麹菌における SM タンパク質の理解を目指した。

方法

黄麹菌において SM タンパク質は 4 つ存在すると考えられ、その内、分泌に寄与する出芽酵母の SM タンパク質 Sec1p、Sly1p の黄麹菌におけるオルソログ AoSec1 (AO090010000460)、AoSly1 (AO090701000606) は Sec1 ドメインを有し、機能が保存されていると予想されたため、これらをクローニングした。そして、AoSec1、AoSly1 それぞれと EGFP との融合タンパク質を発現する株を作製し、実際に分泌経路のどの部位で機能しているかを蛍光顕微鏡解析した。

出芽酵母においては、Sec1p、Sly1p をコードする遺伝子は致死性である。そこで、AoSec1、AoSly1 とともに遺伝子の条件発現株を作製した。これまでに、致死性遺伝子の機能解析には *nmtA* プロモーター (*PnmtA*) 置換による条件発現株解析がなされている²。そこで、AoSec1、AoSly1 の機能解析のために、それぞれのプロモーター部位を *PnmtA* に置換し、表現型解析を行った。

SM タンパク質の過剰発現が及ぼすタンパク質分泌量への影響を調べた。SM タン

パク質過剰発現株(*PamyB*)において、まず内在性の分泌タンパク質である α -amylase (*AmyB*) への影響を培養上清をサンプルに SDS-PAGE 及び活性測定 (α -アミラーゼ測定キット、キッコーマンバイオケミファ) により解析した。さらに総タンパク質分泌量についても解析した。次に、黄麹菌の異種タンパク質分泌生産のモデルとして使われるキモシン生産用プラスミド³を SM タンパク質過剰発現株に導入した。

結果

1. 黄麹菌における SM タンパク質の局在解析

AoSec1、AoSly1 をコードする遺伝子をそれぞれクローニングし、C 末端で EGFP と融合するタンパク質を発現する株を作製した。これらの EGFP 融合タンパク質を蛍光顕微鏡解析したところ、AoSec1-EGFP は細胞質に拡散して観察された。一方、AoSly1-EGFP は粒状の構造体と観察され、これらはゴルジ体であると推測された (図 1)。

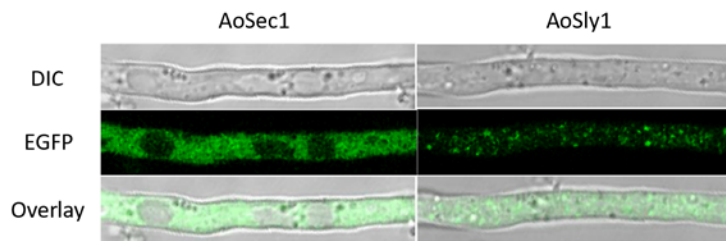


図1 黄麹菌SMタンパク質の細胞内局在

AoSec1-EGFPおよびAoSly1-EGFP発現株を蛍光顕微鏡で観察した。AoSec1-EGFPは細胞質に、AoSly1-EGFPは粒状構造の推定ゴルジ体に局在すると考えられた。

2. 黄麹菌 SM タンパク質条件発現株の解析

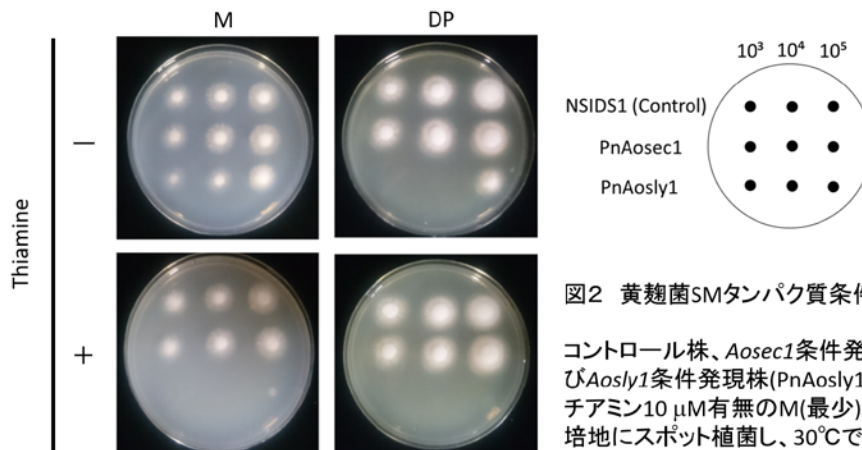


図2 黄麹菌SMタンパク質条件発現株の生育比較

コントロール株、*Aosec1*条件発現株(PnAosec1)および*Aosly1*条件発現株(PnAosly1)の分生子懸濁液をチアミン10 μ M有無のM(最少)培地およびDP(栄養)培地にスポット植菌し、30°Cで2日間培養した。

Aosec1, *Aosly1* をそれぞれ *PnmtA* 制御の下で発現する条件発現株を作製し、M(最少)培地および DP(栄養)培地にて生育比較解析を行った。チアミンを添加した遺伝子発現抑制条件において、*Aosec1* 条件発現株では特に目立った表現型は見られなかった。一方で *Aosly1* 条件発現株では生育に著しい阻害が見られた。出芽酵母オルソログの知見から両遺伝子は生育に必須と予想されていたが、*Aosec1* は本試験条件では生育に必須ではないことが示唆された(図 2)。

3. 黄麹菌 SM タンパク質過剰発現株における分泌解析

Aosec1, *Aosly1* をそれぞれ *PamyB* 制御で発現する過剰発現株を作製した。それらの株を DPY 液体培地にて 2 日間培養し、総分泌タンパク質量について解析した。両過剰発現株において約 1.3 倍程度に総分泌タンパク質量が増加した(図 3)。しかし、 α -アミラーゼの活性量に増加は見られなかった。現在、異種タンパク質(ウシ由来キモシン)生産への影響を解析している。

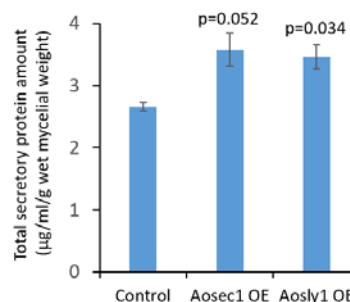


図3 黄麹菌SMタンパク質過剰発現株におけるタンパク質総分泌量

DPY液体培地にて30°C、2日間振とう培養した培養上清の総分泌タンパク質量を測定した(n=3)。

結論

黄麹菌における SM タンパク質の局在解析において、AoSec1 は細胞質に、AoSly1 はゴルジ体に局在することが示唆された。*Aosec1* 発現抑制条件下では生育の阻害は見られなかった一方、*Aosly1* 発現抑制条件下では生育の著しい阻害が見られた。また、*Aosec1* 及び *Aosly1* 過剰発現株ではタンパク質分泌量の増加が見られた。以上から、AoSec1、AoSly1 のタンパク質分泌への関与が示唆された。今後は、SM タンパク質条件発現および過剰発現株を用いて異種タンパク質分泌への影響を解析する。

文献

- 1) Hou, J., Tyo, K., Liu, Z., Petranovic, D., and Nielsen, J. (2012) Engineering of vesicle trafficking improves heterologous protein secretion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab. Eng.* **14**: 120-127.
- 2) Hiramoto, T., Tanaka, M., Ichikawa, T., Matsuura, Y., Hasegawa-Shiro, S., and Gomi, K. (2015) Endocytosis of a maltose permease is induced when amylolytic enzyme production is repressed in *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genet. Biol.* **82**: 136-144.
- 3) Yoon, J., Maruyama, J., and Kitamoto, K. (2010) Disruption of ten protease genes in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae* highly improves production of heterologous proteins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **89**: 747-759.