

糸状菌に特有の小胞体ストレス下における分泌タンパク質 mRNA の減少 ：その機構の解明およびタンパク質分泌生産への応用に向けて

新谷 尚弘
東北大学大学院 農学研究科

研究の目的

真核細胞をジチオトレイトール (DTT) やツニカマイシンで処理すると、立体構造が異常なタンパク質が小胞体に蓄積し、小胞体シャペロン遺伝子などの転写活性化が起こる。この現象は **unfolded protein response (UPR)** と呼ばれる。糸状菌では、UPRに加えて主要分泌タンパク質遺伝子の転写量が特異的に減少する **repression under secretion stress (RESS)** という現象が観察される。RESS の原因は分泌タンパク質遺伝子プロモーターに依存した転写抑制だと推測されているが¹⁾、詳細は不明である。

一方、私たちは麴菌 *Aspergillus oryzae* がその主要な分泌酵素である α -アミラーゼを生産する培養条件下で UPR を引き起こすことを明らかにしている²⁾。また、麴菌で折り畳みが異常な分泌タンパク質を発現させると、UPR を誘導することも示している³⁾。つまり、タンパク質の生産現場で麴菌は小胞体ストレスを受けており、そのストレスにより RESS を介した分泌タンパク質生産の負のフィードバック制御が働いている可能性が危惧された。そこで、私たちは麴菌における RESS の機構を明らかにすることを目的とした。

方法

RESS の検出法

麴菌株を 1%フルクトース、0.1%ペプトンを含む Czapek-Dox (CD)液体培地で 24 時間培養した後、炭素源を 1%マルトースに変えた同培地で 2 時間培養し、 α -アミラーゼ遺伝子の発現を誘導した。その後、培養液に DTT (終濃度 20 mM) を添加し、経時的に回収した菌体から mRNA を調製し、ノーザンブロット解析に供した。チアミン抑制性 *nmtA* プロモーター制御下で *ireA* を発現する場合は、上記培養にチアミン (終濃度 10 μ M) を加えた。

結果

1) DTT 処理による α -アミラーゼ遺伝子 mRNA の減少におけるプロモーター依存的な転写抑制の関与

DTT 処理区で麴菌野生株において *amyA/B/C* mRNA 量の急激な減少がみられた。同条件で *amyA/B/C* の転写活性化因子である *amyR* の mRNA 量も緩やかであるが減少したため、*AmyR* の減少に伴う *amyA/B/C* の転写不活性化が RESS の原因であることが示唆された。そこで、*amyB* をエノラーゼ遺伝子 *enoA* のプロモーター制御下で発

現させたところ、依然として DTT 処理に伴う mRNA の減少が観察された。これらの結果から、プロモーターに依存した *amyA/B/C* の転写抑制は mRNA 減少の主原因ではないことが示された。

2) 小胞体ストレス条件下で α -アミラーゼ mRNA は IreA 依存的に分解される

細胞質で合成された分泌タンパク質の新生鎖はリボソーム、mRNA との三者複合体として小胞体膜上にターゲティングされる。従って、合成中の分泌タンパク質の mRNA はストレスを受けた小胞体によって除去されることが考えられた。そこで、小胞体ターゲティングシグナルのみにフレームシフト変異を持つ AmyB (AmyB-FS) を発現する麹菌株を作製し、DTT 処理に伴ってその mRNA が減少するか解析した。その結果、*amyB-FS* の mRNA の急激な減少は回避されることが明らかとなった。このことから、*amyB* mRNA の減少は *amyB* mRNA の小胞体へのターゲティングと深く関わっていることが示唆された。

次にこの現象が UPR 制御下にあるか調査した。小胞体ストレス条件下では、bZIP 型転写因子 HacA の mRNA が小胞体膜貫通型キナーゼ/エンドリボヌクレアーゼである IreA によって特殊なスプライシングを受け、UPR が起こることが知られている⁴⁾。そこで、*ireA* 発現抑制株で RESS を解析したところ、*amyA/B/C* mRNA の減少は回避された。また、活性化型 HacA (HacA-i) を発現する *ireA* 破壊株においても *amyA/B/C* mRNA の減少が回避されたことから、RESS は UPR の下流ではなく IreA によって直接的または間接的に制御されていることが示唆された。

私たちは、*amyA/B/C* mRNA が DTT 処理下で IreA 依存的に分解されていると仮定した。そこで、*amyA/B/C* mRNA の分解産物の検出を試みた。RNA がエンドリボヌクレアーゼで切断されると、生じた mRNA 断片はエクソリボヌクレアーゼで消化されることが知られている。mRNA の 3'側からの分解に関わっているエクソソームのサブユニット Ski2 の遺伝子破壊株では DTT 処理によって、低分子の *amyA/B/C* mRNA が検出された。つまり、断片化された *amyA/B/C* mRNA がエクソソームの欠損で検出されるようになった。このことは mRNA の分解が *amyA/B/C* mRNA の減少に関わっていることを示している。

結論

DTT による小胞体ストレス条件下で起こる麹菌分泌タンパク質の mRNA の減少には、mRNA 分解に関わっていることが示された。分泌タンパク質新生鎖、リボソームとの複合体として小胞体膜上にターゲティングされた mRNA が小胞体ストレス条件下で活性化された IreA によって切断を受け、生じた mRNA 断片をエクソソームが分解するというモデルを想定している。DTT 処理下における分泌タンパク質 mRNA の分解は Regulated Ire1-dependent decay (RIDD) として、ショウジョウバエで初めて報告され⁵⁾、哺乳類や植物でも報告されており、糸状菌でも RIDD が分泌タンパク質

mRNA の分解に関わっていることが示唆された。

異種タンパク質の分泌発現で惹起される小胞体ストレスが RIDD を活性化するのであれば、タンパク質生産の障害となり得る。今後は異種分泌タンパク質の過剰生産が RIDD を引き起こすか解析する必要がある。

謝辞

本研究は横田淳一、杉山優子、佐藤駿、田中瑞己博士、張斯来博士、五味勝也教授らの協力の下、行われました。御礼申し上げます。

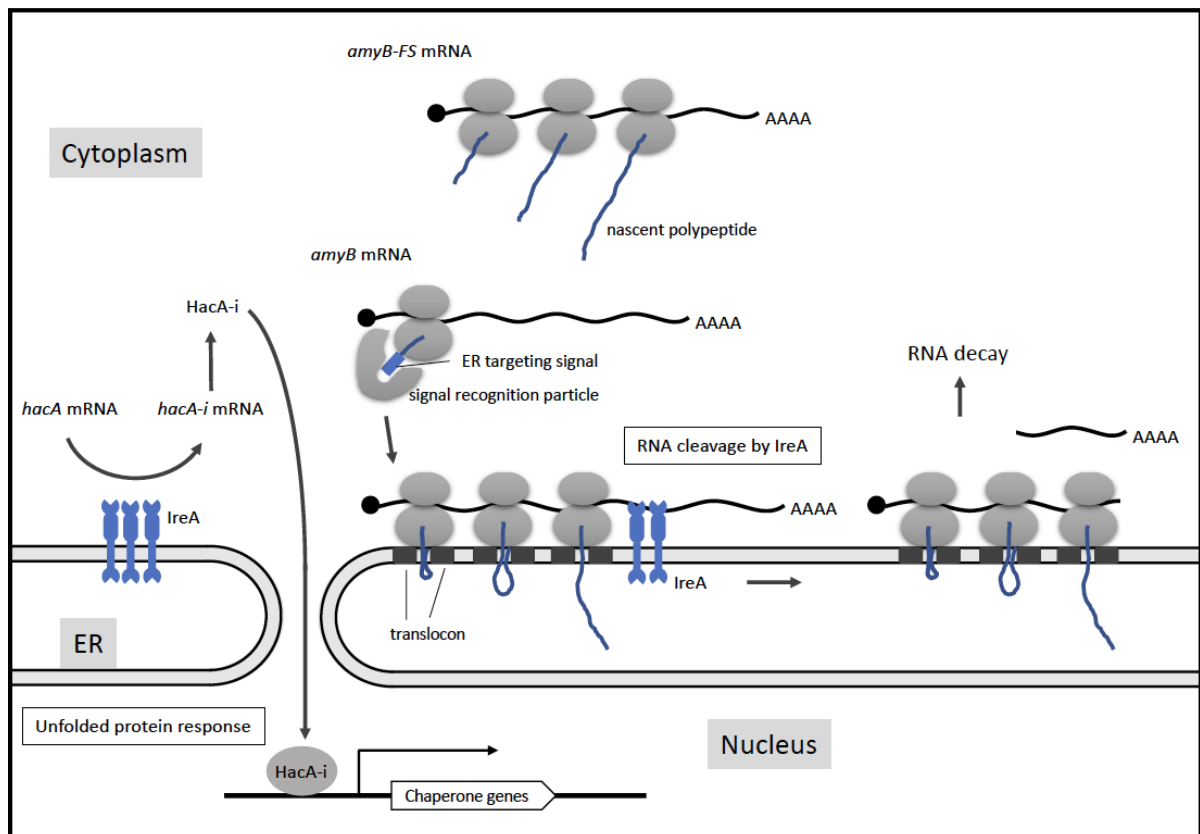


図 ジチオトレイトール処理下における *amyB* mRNA の分解モデル

野生型 *amyB* mRNA は新生鎖の小胞体ターゲティング・シグナルに依存して小胞体膜上にリクルートされ、分解を受ける。小胞体ターゲティング・シグナル領域にフレームシフト変異を持つ *amyB-FS* mRNA は小胞体にターゲティングされず、分解から回避される。

文献

- 1) Pakula, T. M., Laxell, M., Huuskonen, A., Uusitalo, J., Saloheimo, M. and Penttilä, M. (2003) The effects of drugs inhibiting protein secretion in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. Evidence for down-regulation of genes that encode secreted proteins in the stressed cells, *J. Biol. Chem.*, **278**: 45011-45020.

- 2) Tanaka, M., Shintani, T. and Gomi, K. (2015) Unfolded protein response is required for *Aspergillus oryzae* growth under conditions inducing secretory hydrolytic enzyme production, *Fungal Genet. Biol.*, **85**: 1-6.
- 3) Yokota, J.-I. *et al.* (2017) Cellular responses to the expression of unstable secretory proteins in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **101**: 2437-2446.
- 4) Saloheimo, M., Valkonen, M. and Penttilä, M. (2003) Activation mechanisms of the HAC1-mediated unfolded protein response in filamentous fungi, *Mol. Microbiol.*, **47**: 1149-1161.
- 5) Hollien, J. and Weissman, J. S. (2006) Decay of endoplasmic reticulum-localized mRNAs during the unfolded protein response, *Science*, **313**: 104-107.