

糸状菌 *Aspergillus oryzae* をモデルとした温度による分泌タンパク質変化への膜脂質不飽和度の寄与の解析

岩間 亮

東京大学大学院 農学生命科学研究科

研究の目的

真核微生物の 1 つである糸状菌は長い糸状の細胞形態を特徴としており、細胞外への各種分解酵素の分泌能の高さから、発酵産業と密接に結びついている。生長に必要な生体膜成分、細胞壁合成酵素などが小胞輸送により持続的に菌糸先端へと輸送されることにより、糸状菌の正常な菌糸生長が可能となっているが、糸状菌の各種分解酵素の細胞外分泌能の高さはこの活発な小胞輸送に由来している。輸送小胞を形作る生体膜の主要構成成分であるリン脂質は親水性頭部や疎水性尾部の違いにより様々な種類が存在するが、特に、疎水性尾部は生体膜流動性などの物性に大きな影響を与える。産業利用時に糸状菌は様々なストレスに曝されるが、その主要なものに糸状菌自身が生育することにより発生する熱がある。環境温度は生体膜物性に大きな影響を与えるが、糸状菌におけるリン脂質アシル鎖の変化がタンパク質分泌に与える影響は理解されていない。本研究は、産業上重要な糸状菌である *Aspergillus oryzae* を主な究対象とし、培養温度-リン脂質組成-タンパク質分泌能の関係性を明らかにすることを目的とする。

方法

解析に用いる遺伝子破壊株の作製 糸状菌における生体膜リン脂質のアシル鎖の多様性やその制御に関わる基本的な理解は立ち遅れていた。本研究では、麹菌 *A. oryzae* とともに、古くから糸状菌のモデル生物として使用されてきた *Aspergillus nidulans* も対象とし、これら株で候補遺伝子の破壊株を作製した。

リピドーム解析 培養した菌体からリン脂質を BUMC 法により抽出し、液体クロマトグラフタンデム質量分析装置 (liquid chromatograph-tandem mass spectrometer, LC-MS/MS) を用いて、網羅的リン脂質定量解析を行った。

細胞外タンパク質分泌能の検討 *A. oryzae* を親株に作製した破壊株の各温度における細胞外タンパク質分泌能を網羅的に解析するため、デンプンを含む平板培地を用いたヨウ素デンプン反応のハローの大きさを ImageJ を用いて定量した。

結果

モデル糸状菌 *A. nidulans* におけるリン脂質不飽和度の制御

液体最少培地で培養した *A. nidulans* から抽出したリン脂質を用いてリピドーム解析を行うと、リン脂質の 2 本のアシル鎖の合計炭素数が 34、36 となるリン脂質が

主に検出される。アシル鎖の炭素数 36 のリン脂質に着目すると、アシル鎖に含まれる二重結合数として 0~6 までの多様性が見られる。さらに、リン脂質アシル鎖を構成する脂肪酸に着目したところ、脂肪酸に含まれる二重結合の数は 3 つまでであり、糸状菌では複数の二重結合を持つ脂肪酸が 2 つ持つリン脂質が普遍的に存在することがわかった。また、糸状菌は、分生子が無極性的に膨潤した後、分生子が発芽して菌糸生長を行うパターンを示す。これまでに、私は分生子の発芽前後に一過的に不飽和度の高いリン脂質が顕著に増加することを示していたが、さらに、平板培地での菌糸を用いたリポドーム解析から、菌糸形態を示す細胞が多い箇所では不飽和度の高いリン脂質が多いこともわかった。

これまで、*A. nidulans* において、脂肪酸に 1 つ目の二重結合を導入する $\Delta 9$ デサチュラーゼをコードする *sdeA*、*sdeB*、2 つ目の二重結合を導入する $\Delta 12$ デサチュラーゼをコードする *odeA*、3 つ目の二重結合を導入する $\Delta 15$ デサチュラーゼをコードする *odeB* が知られていたが、実際に生体膜リン脂質への影響は解析されていなかった。今回、これらの単独破壊株を作製し、それぞれのリン脂質アシル鎖組成を解析したところ、*odeA* 破壊株では二重結合を 3 つ以上もつリン脂質が産生されなくなり、*odeB* 破壊株では二重結合を 5 つ以上もつリン脂質の量が著しく減少することを、いずれも *in vivo* 解析で明らかにした。また、これまでに *odeB* 破壊株の表現型は解析されていなかったが、野生型株と比較して高温では生育の差は見られないが、低温では生育が遅延することがわかった。低温で *odeB* の発現量が増加した結果も得られ、*odeB* が低温での生育に重要であることがわかった。

A. oryzae におけるリン脂質不飽和度を制御する遺伝子のタンパク質分泌への影響

A. oryzae には、推定 $\Delta 9$ デサチュラーゼ遺伝子として *AO090005000456*、*AO090102000339*、*AO090026000799*、*AO090103000283*、推定 $\Delta 12$ デサチュラーゼ遺伝子として *AO090001000224*、推定 $\Delta 15$ デサチュラーゼ遺伝子として *AO090010000714* があり、それぞれを *A. oryzae* において *sdeA*、*sdeB*、*sdeC*、*sdeD*、*odeA*、*odeB* と命名した。これら遺伝子の単独破壊株を作製し、20°C、25°C、30°C、35°C における Czapek-Dox (CD) 培地での生育を解析した (図 A)。*sdeA* 破壊株、*odeA* 破壊株は 20°C でほとんど生育しなかったことに加え、25°C、30°C においても顕著な生育遅延を示した。*sdeA* 破壊株、*odeA* 破壊株は 35°C でもわずかに生育が悪化した。その他の遺伝子破壊株でも同様の生育遅延を示すものが多かった。*A. nidulans* では、*sdeA* 破壊株は高温の方がより生育が悪いこと、*odeA* 破壊株が低温で生育が悪いものの、一定程度の生育を示すなど、*A. oryzae* と *A. nidulans* で遺伝子破壊の影響が異なることが確認された。また、*A. nidulans* で見られた *odeB* 破壊株の低温での生育遅延も *A. oryzae* では見られなかった。一方で、*A. oryzae* と *A. nidulans* を 20°C、30°C、37°C で培養して、生体膜リン脂質組成を解析したところ、これらの 2 菌種において、低温でリン脂質内の二重結合数が増えるなど、温度変化

に対して同様なアシル鎖組成変化を示した。

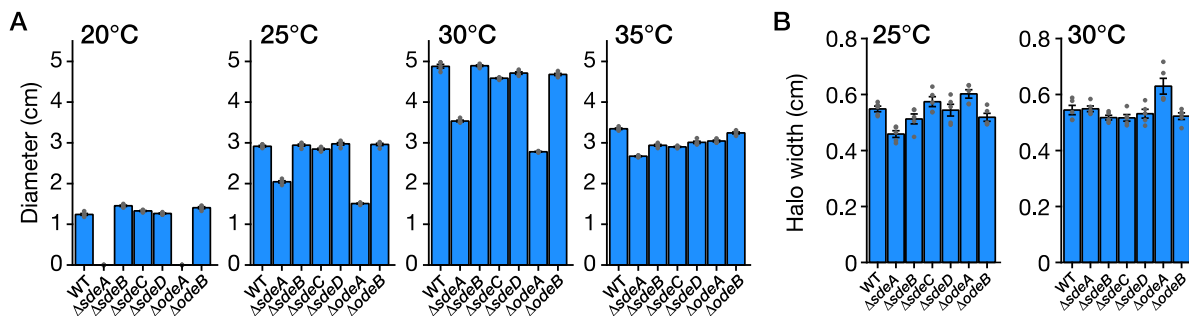


図. *A. oryzae* における脂肪酸不飽和化酵素欠損株の表現型 (A) 野生型株と各遺伝子破壊株の分生子 10^3 個を CD 最少培地に植菌した後、各温度で 3.5 日間培養し、それぞれのコロニーの大きさを測定した。(B) 野生型株と各遺伝子破壊株の分生子 10^3 個をデンプンを含む CD 最少培地に植菌した後、各温度で 3.5 日間培養し、ヨウ素-デンプン反応で検出されるハローの大きさを計測した。それぞれ 5 回測定し、平均値とエラーバー (S.E.)を示す。

これらの破壊株をデンプンを含む平板培地で培養し、ヨウ素デンプン反応によるハローの大きさから細胞外へのタンパク質分泌能への影響を評価した(図 B, 一部の温度のみを示す)。20°C では *sdeA* 破壊株でハローの大きさが有意に減少し、30°C では *odeA* 破壊株でハローの大きさが有意に大きくなっていることが示された。*odeA* 破壊株は液体 CD 培地において、30°C でも野生型株と比較して生育が著しく悪く、現在までに *odeA* 破壊株の脂質組成は解析できていない。*A. nidulans* において *odeA* 破壊株では、オレイン酸 (1 つの不飽和結合を持つ炭素鎖長 18 の脂肪酸) を 2 つ持つリン脂質が顕著に増加していたため、デンプン平板培地にオレイン酸を培地に添加した条件で、野生型株の *A. oryzae* のハローを測定した。僅かにハローが大きくなることが確認されたが、その他の脂肪酸を与えた場合にも同様の効果が確認され、*odeA* 破壊株でハローが大きくなる原因は現時点で明らかになっていない。

結論

A. oryzae において、脂肪酸に 2 つ目の不飽和結合を導入すると推定される *OdeA* の欠損株で、30°C のハローの大きさが有意に大きくなる。*odeA* 破壊株は生育が悪くなるが、同様に生育が悪くなる *sdeA* 破壊株ではハローの大きさに変化が見られないため、*odeA* 破壊株におけるハローの大きさには生育の影響ではないと予想される。その他のタンパク質の分泌がどのように変化しているか、また、どのようなメカニズムでこの変化が生じているのかを今後明らかにする必要がある。