

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：34315

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05422

研究課題名（和文）麹菌における小胞体に関連したタンパク質分解機構の解明

研究課題名（英文）Endoplasmic reticulum associated protein degradation in *Aspergillus oryzae*

研究代表者

菊間 隆志 (Takashi, Kikuma)

立命館大学・生命科学部・助教

研究者番号：90553842

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：麹菌 *Aspergillus oryzae* は我が国の醗酵・醸造産業に欠かすことのできない微生物であり、またそのタンパク質分泌能力の高さから、異種タンパク質生産の宿主として期待されている。分泌には小胞体でのタンパク質品質管理機構（ERQC）が大きく関わっていると考えられる。本研究は、ERQCの分解経路である小胞体関連分解（ERAD）およびERQCオートファジーに関連するタンパク質の探索および機能解析を行い、新規オートファジー関連タンパク質候補を抽出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

麹菌における小胞体におけるタンパク質品質管理（ERQC）は、分泌タンパク質の高生産において重要な役割を担っていると考えられる。そのため、麹菌による抗体などの異種有用タンパク質の高生産を目指す上で、その分子機構の解明は極めて重要である。本研究において、異種タンパク質生産に関連するERQCにおける分解機構の一端が明らかになったと考えられ、麹菌による異種有用タンパク質高生産株の育種につながると期待される。

研究成果の概要（英文）：*Aspergillus oryzae* is a very important microorganism for Japanese fermentative industries and is expected as a host for heterologous protein productions due to its high-level protein secretory ability. It is considered that the protein secretion is largely related to the endoplasmic reticulum protein quality control mechanism (ERQC). In this study, we screened putative ERAD and ERQC autophagy-related proteins, and analysed functions of these proteins.

研究分野：分子細胞微生物学

キーワード：麹菌 オートファジー ヌクレオファジー 小胞体タンパク質品質管理 小胞体関連分解 N型糖鎖 マンノシダーゼ

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

(1) 麹菌 *Aspergillus oryzae* は非常に高いタンパク質菌体外分泌能力を有しており、自身の持つ有用な分泌酵素を工業的に生産し、医薬品や食品加工など様々な用途に用いられてきた。近年では、高分泌能力を活用し異種タンパク質の生産に利用されており、今後様々な有用タンパク質の生産宿主としての活用が期待されている。しかし、高等生物由来の異種タンパク質を発現させると、糸状菌のタンパク質に比べ、期待されるような分泌量が得られない場合が多い。申請者は近年、S-S 結合を欠損させたミスフォールディングタンパク質を発現させると、小胞体に蓄積し、細胞内の分解経路であるオートファジーにより分解されることを見出した。またその分解を抑制することにより麹菌での異種タンパク質生産性の向上に成功した。このことは、タンパク質の分泌経路を考えると、小胞体でのタンパク質の品質管理が高分泌に重要であることを示唆している。

(2) 哺乳動物細胞や酵母などの研究から、分泌経路の中で小胞体は、新生ポリペプチドのフォールディング(折り畳み)糖鎖の付加などによって機能的なタンパク質に成熟させる場であると考えられている。正常に成熟したタンパク質はゴルジ体に輸送され、分泌経路の次のステップに進むが、異常なタンパク質(ミスフォールディングタンパク質)は小胞体関連分解(ER associated protein degradation: ERAD)により分解される運命をたどる(図1)。また、分泌タンパク質のほとんどが糖鎖修飾を受けると考えられており、分泌タンパク質に付加された糖鎖の糖の数や、構造によって分解を行うか、次の分泌経路であるゴルジ体に輸送するかを決定している(図1)。この一連の機構は、小胞体におけるタンパク質の品質管理(ER quality control: ERQC)と呼ばれており、とくにアスパラギン結合型糖鎖(N型糖鎖)の構造が重要な目印となっている。つまり、N型糖鎖をプロセスし、その構造を認識する因子が存在し、分解するか分泌するかを決定している。

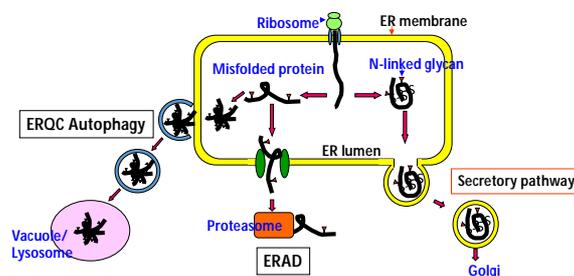


図1 小胞体におけるタンパク質の選別

(3) 哺乳動物細胞や酵母では、これらに関連する因子(糖分解酵素や糖鎖認識タンパク質)が同定されつつあり、機能解析が進んでいる。また、ミスフォールドしたタンパク質はERAD以外にもオートファジーによる分解(ERQC オートファジー)が知られている。これはERADで分解しきれず凝集したタンパク質が小胞体ごと液胞/リソソームに運ばれ分解されるプロセスである(図1)。近年、タンパク質の変異の場所によりERADかオートファジーか異なる方法で分解されるという報告があり、単純にミスフォールディングタンパク質の量の問題ではないことが示唆されている。また代表研究者は、麹菌において核をオートファジーにより分解するヌクレオファジーにより丸ごと分解するというユニークな現象を見出している。核膜は小胞体と連続した構造であることから、本研究のERQC オートファジーとヌクレオファジーは密接に関連している可能性がある。

しかし麹菌をはじめとする糸状菌においては、その分泌能力の高さにも関わらず、小胞体でのタンパク質品質管理機構についてはほとんどわかっていない。

2. 研究の目的

Aspergillus oryzae の小胞体におけるタンパク質品質管理機構(ERQC)の理解を目指し、その分解経路である小胞体関連分解(ERAD)およびERQC オートファジーの分子メカニズム解明を目的としている。

3. 研究の方法

- (1) Tandem affinity purification (TAP)法によりAoAtg8と相互作用するタンパク質を精製した。
- (2) 得られたタンパク質をLC/MSMSで同定した。
- (3) スクリーニングを行い、候補タンパク質の同定解析、遺伝子破壊による機能解析をおこなった。

4. 研究成果

(1) AoAtg8は機能的な構造になるためにC末端がAoAtg4によりプロセッシングを受ける。そのため、*Aoatg4* 遺伝子の破壊株において、AoAtg8のC末端側にTandem affinity purification(TAP)タグを融合したタンパク質(AoAtg8-TAP)を発現する株およびコントロールとしてTAPタグのみを発現する株を作製した。ウエスタンブロッティングによりAoAtg8-TAPおよびTAPの発現を確認した。

(2) AoAtg8-TAP 発現株を炭素源もしくは窒素源枯渇条件下で培養し、AoAtg8および結合タンパク質をTAPタグにより精製した。精製されたタンパク質をLC/MSで解析することにより、各条件において、約130個のタンパク質の同定に成功した。その中より機能未知の推定 ERQC オートファジー関連タンパク質を選別し、コードする遺伝子を同定した。

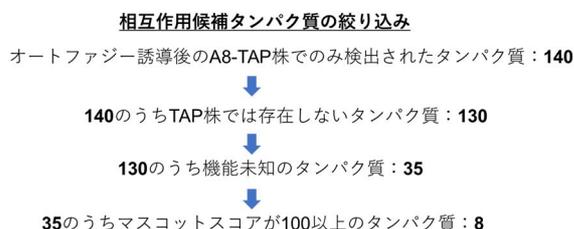


図2 AoAtg8 相互作用タンパク質の絞り込み

(3) 推定 ERQC オートファジー関連タンパク質と緑色蛍光タンパク質 EGFP との融合タンパク質を発現する株を作製し、局在解析を行った。その結果、小胞体や核に局在するものに加え、ドット上構造に局在するものが観察された。また、オートファジーにおける分解基質を取り囲む膜であるオートファゴソーム上に局在するものが観察された。様々な局在を示しており、小胞体や核などのオルガネラの分解レセプターである可能性が示唆された。さらに、新規のオートファジー関連タンパク質である可能性も示唆された。

(4) 推定 ERQC オートファジー関連タンパク質をコードする遺伝子の破壊株を作製し、解析したところ、オートファジー欠損株に特徴的な気中菌糸および分生子形成阻害が見られるものは存在しなかった。これはこれらのタンパク質がオートファジーに必須なコアタンパク質ではないことを示しており、また、麹菌オートファジーのコアタンパク質である AoAtg8 に相互作用することから、ERQC オートファジーをはじめとする選択的オートファジーに機能するタンパク質であることが強く示唆された。

(5) 上記(1)~(4)より、Atg8 に相互作用するタンパク質が糸状菌で初めて精製された。糸状菌においては、選択的オートファジー関連タンパク質の同定が極めて遅れており、本研究により麹菌の ERQC オートファジーのみならず、様々な分解基質の選択的オートファジーレセプターの発見につながると期待される。今後は(4)における遺伝子破壊株の様々な選択的オートファジー活性の評価を行い、新規オートファジー関連タンパク質を麹菌から発見する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 菊間 隆志	4. 巻 97
2. 論文標題 禁断の美食? :ヌクレオファジー	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 生物工学会誌	6. 最初と最後の頁 29
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 西尾謙一郎, 尾崎愛奈, 島田侑希, 武田陽一, 菊間隆志
2. 発表標題 麹菌Aspergillus oryzaeにおける選択的オートファジーレセプターの探索
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西尾謙一郎, 尾崎愛奈, 島田侑希, 武田陽一, 菊間隆志
2. 発表標題 麹菌Aspergillus oryzaeにおけるヌクレオファジーレセプター候補遺伝子破壊株の解析
3. 学会等名 第8回糸状菌若手の会ワークショップ
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hashiguchi, Yuji ; Tada, Sato ; Ito, Yukishige ; Takeda, Yoichi ; Kikuma, Takashi
2. 発表標題 Analysis of 1,2-mannosidase in Saccharomyces cerevisiae by gene disruption
3. 学会等名 The 2021 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 荒木璃子、菊間隆志、武田陽一
2. 発表標題 糸状菌中性スフィンゴ糖脂質生合成解析に向けた2'-ヒドロキシセラミドアナログの合成
3. 学会等名 第38回日本糖質学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋慶晃、武田陽一、菊間隆志
2. 発表標題 麹菌 <i>Aspergillus oryzae</i> におけるヌクレオファジーレセプター探索を目指したAoAtg8相互作用タンパク質の単離
3. 学会等名 第19回糸状菌分子生物学コンファレンス
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 米良優希、菊間隆志、武田陽一
2. 発表標題 Synthesis of CMP-KDO and its derivatives
3. 学会等名 日本化学会第100回春季年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋慶晃、武田陽一、菊間隆志
2. 発表標題 麹菌 <i>Aspergillus oryzae</i> におけるヌクレオファジーレセプターの探索
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 折田 紗弥、菊間 隆志、瀬古 玲、伊藤 幸成、武田 陽一
2. 発表標題 小胞体グルコース転移酵素における基質認識の定量的評価
3. 学会等名 第37回日本糖質学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 湯浅 晶、三谷 隆宏、菊間 隆志、吉田 稔、有岡 学
2. 発表標題 麹菌 <i>A. oryzae</i> におけるオートファジーによる核の分解（ヌクレオファジー）の解析
3. 学会等名 第18回糸状菌分子生物学コンファレンス
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中川原 千咲、菊間 隆志、吉田 稔、有岡 学
2. 発表標題 麹菌 <i>Aspergillus oryzae</i> の持つ2つの分泌型ホスホリパーゼA1の機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 湯浅 晶、菊間 隆志、吉田 稔、有岡 学
2. 発表標題 麹菌 <i>Aspergillus oryzae</i> におけるヌクレオファジーの分子機構の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口 実愛、菊間 隆志、瀬古 玲、伊藤 幸成、武田 陽一
2. 発表標題 EDEMタンパク質の人工糖鎖基質に対する活性評価
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上嶋 里菜、戸田 菜穂子、Greimel Peter、菊間 隆志、武田 陽一
2. 発表標題 ホスファチジン酸に対するグルコシド化を検出するための分子プローブの合成
3. 学会等名 日本化学会第99回春季年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 東 爽佳、菊間 隆志、武田 陽一
2. 発表標題 タンパク質中のシステイン残基を特異的に架橋する多機能性プローブの開発
3. 学会等名 日本化学会第99回春季年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------