

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450096

研究課題名(和文) 麹菌のプロセッシングプロテアーゼの基質となる菌系分岐制御タンパク質の探索と同定

研究課題名(英文) Screening and identification of substrates of processing peptidases from *Aspergillus oryzae*

研究代表者

山形 洋平 (Youhei, Yamagata)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：40230338

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：我が国の代表的産業微生物である麹菌のプロセッシングプロテアーゼの基質タンパク質を酵素反応中間体をpull-downすることによって補足する方法を開発し、候補の一つとしてポリリン酸キナーゼを見出した。同酵素は酵母においては、酸化ストレスや飢餓ストレスへの対応、リン酸の恒常性維持等に関与している。kexin欠損株では、細胞壁合成に関わるタンパク質のプロセッシング不全が細胞壁の異常を引き起こし、生育が大きく抑制されると考えてきた。しかし、今回の結果から、kexinが細胞の恒常性に関与するような生育に重要な働きを持つタンパク質の活性化を行っていることが示唆され、新たなkexinの重要性が示された。

研究成果の概要(英文)：We developed a new pull-down method to detect substrates for the processing protease of Japanese representative industry microbe, *Aspergillus oryzae*. According to the method, we detected a candidate protein. The protein was an orthologue of yeast polyphosphate kinase. The enzyme is reported concerning with responses to the oxidative stress and starvation stress and maintenance of the intracellular phosphate concentration in yeast. It had been thought deletion of *A. oryzae* kexin gene caused defective processing of the proteins related to the cell wall synthesis, and it gave rise to growth suppression. However, our results seemed to indicate kexin activated the important proteins involved in the homeostatic system in *A. oryzae* different from previously what we thought.

研究分野：応用酵素学

キーワード：麹菌 kexin プロセッシングプロテアーゼ ポリリン酸キナーゼ

1. 研究開始当初の背景

我が国の代表的産業微生物である麹菌は、各種アミラーゼ、プロテアーゼなどを細胞外に大量に生産することが知られている。このタンパク質生産に優れる性質は、酵素工業における異種タンパク質生産宿主として注目されている。

タンパク質の細胞外への分泌に関しては、麹菌も酵母と同様に小胞体、ゴルジ体を経由して小胞輸送、エキソサイトーシスによって輸送されていると考えられている。幾つかのタンパク質やペプチドは、前駆体として生産されていると考えられ、これらの大部分は、ゴルジ体でプロセッシングを受け成熟型となっていると推定される。酵母 *S. cerevisiae* においては、この過程が詳しく研究されている。例えば、性フェロモンである α -ファクターの場合、 α -ファクター配列が四回反復する前駆体として生合成される。反復配列間に挿入されたスペーサー配列に存在する Lys-Arg は、kexin (Kex2p)によって認識され、その C-末端側で切断が生じる。 α -ファクターの C 末端に残った Lys-Arg は、セリンカルボキシペプチダーゼである Kex1p によって Arg, Lys の順に遊離され α -ファクターが完成する。

我々は、麹菌のゴルジ体に存在するプロセッシング酵素として kexin ファミリーに属する KexB の存在を明らかにした。また、最近、酵母 kex1p のオルソログである KexA について報告を行った。しかし、麹菌においては、未だに α -ファクターの様な性フェロモンが関与する有性世代は見出されていない。また、ペプチド性のシグナル伝達物質も見出されていない。

プロセッシングプロテアーゼとしての KexB については、外来タンパク質を [A. *oryzae* グルコアミラーゼ~KexB 認識配列 (Lys-Arg)~外来タンパク質] とした融合タンパク質として発現させると、グルコアミラーゼ領域と外来タンパク質領域の間に挟まれた KexB の認識配列で切断が生じていることを明らかにしており、KexB は、細胞外に分泌されるタンパク質のプロセッシングに関与していると考えられた。しかし、麹菌細胞内で KexB がどのような前駆体タンパク質を基質としているのかは、明らかではなかった。

一方、*Aspergillus* 属の KexA については、我々が初めて報告しているが、同様に細胞内でのターゲットについては、明らかにできていない。

酵母での 2 つの酵素の関係から、これら 2 つの酵素がゴルジ体において協同して働くと考えられている。しかし、KexA の欠損麹菌を作製したところ、直線的な菌糸成長 (菌糸の分岐抑制) が観察された。これに対して、KexB の欠損株においては、多分岐な菌糸成長が観察された。この結果は、これら 2 つの酵素の欠損が菌糸の伸長に関して相反する

結果を示しており、菌糸伸長に関しては、それぞれ別々の基質のプロセッシングに関与していることを示唆している。

DNA マイクロアレイを用いてそれぞれの欠損株の遺伝子発現の差を解析している。多くの遺伝子の発現量の変化が観察されているものの、これらの遺伝子発現の変化が菌糸伸長異常の原因なのか、結果なのかを明らかにすることができず、菌糸の分岐をコントロールしているタンパク質の同定には至っていない。

2. 研究の目的

麹菌 *A. oryzae* の KexA 並びに KexB の細胞内での基質となるタンパク質、ペプチドの前駆体の捕捉方法を確立する。またこの中に存在する菌糸成長時の分岐に関わるタンパク質、ペプチド前駆体を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) tag 精製が可能な KexB タンパク質の調製

KexB 麹菌を宿主として、KexB の pull down 用高発現株を作製し、これを用いて基質となるタンパク質の探索を行うこととした。初めに、KexB の C 末端領域の存在する膜貫通ドメインを削除し、更にその C 末端に FLAG-tag、His-tag 配列を結合した KexB-TM+FH をコードする遺伝子を作製し、麹菌高発現用プラスミド pNGA142 に挿入し、pNGA142-KexB-TM+FH を作製した。A. *oryzae* niaD300 株を pNGA142-KexB-TM+FH で形質転換し、高発現株を作製した。KexB-TM+FH 高発現株では、細胞外並びに細胞内可溶性画分に KexB-TM+FH の活性を確認することができたが、FLAG-tag、His-tag がそれぞれ検出できず、カルボキシル末端側の tag 配列が麹菌がもつプロテアーゼによって分解されたものと考えられた。また、tag を利用した精製法だけでなく、様々な精製法を試みたが、その精製は困難であった。そこで、細胞内外のプロテアーゼに分解されないように tag が結合する前に存在していたタンパク質分解酵素によって分解される可能性のある配列を分析し、KexB-TM+FH かつその配列を除いた KexB-TM+FH2 を新たに造成し、A. *oryzae* niaD300 株を宿主として高発現株を作製した。この高発現株においては、His-tag を用いた検出や精製はできず、KexB-TM+FH と同様に His-tag 配列は、除去されてしまっていることが考えられたが、FLAG-tag での検出が可能であったため、これを利用して基質の補足を行うこととした。

(2) 麹菌細胞内から KexB 反応中間体調製法の確立

(1) で作製した KexB-TM+FH2 高発現株を用い、細胞内から KexB-TM+FH2 を pull-down できる条件の検討を行った。特に細胞内から KexB-TM+FH2 を調整する際の pH と KexB 以

外のタンパク質分解酵素を阻害する阻害剤の使用条件の検討を行った。

(3) KexB 基質の探索と同定

(2) で決定した、高い緩衝能を持つ pH 3-4 の緩衝液を用い、pepstain、および antipain を添加した条件で KexB 高発現株の破碎を行い、細胞内可溶性画分から抗 FLAG-tag 抗体を用いて pull-down を行った。得られた沈降画分を SDS-PAGE に供し、*A. oryzae* niaD300 を pNGA142 で形質転換したものをネガティブコントロールとして、電気泳動像に差があるかどうかを指標として、その差が見られた領域を電気泳動後のゲルから切り出し、MS 解析を行い、得られた解析結果を麹菌ゲノムデータベースと照合して目的タンパク質であるかどうかを検討した。

(4) KexA 高発現株の作製

(1) で KexB の高発現株の造製が困難であると考えられたため、KexA は大腸菌を宿主として KexB と同様に C 末端側に存在する膜貫通領域を削除し、更にその C 末端に FLAG-tag、His-tag 配列を結合した KexA-TM+FH を発現することとした。大腸菌発現用ベクター pColdIII の N 末端に結合する His-tag をコードする領域を削除し、KexA-TM+FH をコードする遺伝子を挿入した pColdIII-KexA-TM+FH を作製した。同プラスミドで大腸菌を形質転換し、誘導発現を試みた。細胞内可溶性画分に KexA-TM+FH の発現が確認できたため、KexA-TM+FH を His-tag を用いて精製した。

(5) KexA 基質の探索と同定

(2) で決定した条件で 麹菌 KexA 破壊株を破碎し、KexA-TM+FH と混合し、FLAG-tag を利用して、pull-down を行った。しかし、KexA は酸性側領域でも活性を持つことが明らかとなり、中間体で反応が停止しないことが示唆された。

(6) KexA 活性中心変異体の作製

(5) から KexA が酸性側で活性を維持し、反応中間体の状態で反応を停止することが困難である可能性が示されたため、KexA の活性中心であると推定されている Ser152 を Ala に変換した KexAS152A-TM+FH を作製し、親和性のみで pull-down するのではなく、リンカーを用いて KexA と結合しているタンパク質を補足することを考えた。(4) と同様に大腸菌で発現系を構築し、蛋白質の調製を行った。

4. 研究成果

(1) KexB 高発現系の構築

これまで麹菌 KexB は、高発現すると活性を見ることはできていたが、タンパク質として確認することはできなかった。これは、KexB が非常に高い比活性を持っていることが原因であると考えられていた。今回も活性は確認できるがタンパク質そのものの検出は困難であった。高発現してもそれほど多量には発現していないことが考えられた。しかし、

KexB-TM+FH2 を作製することで初めて C 末端側にある FLAG-tag を用いて KexB の発現を確認することができた。これまで His-tag 付きの KexB を高発現しても His-tag を用いて KexB の高発現が確認できなかった。今回 KexB-TM+FH を用いた結果から、細胞内の可溶性画分、細胞外いずれにも KexB の活性が確認できながら His-Tag、FLAG-tag での確認ができなかったことから、タンパク質が細胞内で合成され分泌される過程でカルボキシル末端付近での分解が生じていることが推定され、これまで考えられているより、ER→Golgi→細胞外のタンパク質分泌過程では、細やかなタンパク質分解酵素によるプロセッシングが生じている可能性が示唆された。

(2) KexB 中間体の補足方法

今回の研究の結果、KexB の中間体の補足が可能であることが示された。しかし、すべての基質となるタンパク質がこの方法で回収できるわけではないことも示され、酸性化と同時にリンカーによる架橋を行い、確実にタンパク質を補足する必要があると考えられ、今後もこの研究を継続する。

(3) KexB の基質の探索と同定

今回の研究の結果、3つのタンパク質が同定できた。そのうちの2つのタンパク質は、現在のところ局在が細胞内であると考えられているため Golgi に存在するとされている KexB の基質である可能性がないと考えられた。最も可能性が高いと考えられたのは、酵母ポリリン酸キナーゼのオルソログと考えられているタンパク質であった。麹菌においてはこのタンパク質の機能は道であるが、酵母のポリリン酸キナーゼは、液胞膜に9回膜貫通型タンパク質として存在し、他の3つのタンパク質と複合体を形成し、ポリリン酸を合成すると報告されている①。酵母において酸化ストレスに対する応答や飢餓に対する応答としてポリリン酸の蓄積が重要であるとともに、リン酸欠乏の際の生体内リン酸濃度を一定に保つ役割を果たしている②、③。さらにバクテリアでは、DNA の合成に関与するなど重要な働きが示唆されている。

これまで、麹菌の kexin は細胞外に分泌されるタンパク質やペプチドの活性化に関与しているものと考えられていた。Kexin 遺伝子の欠損株では、大幅な生育抑制が見られる。我々は、この原因が細胞壁合成に関連するタンパク質のプロセッシング不全によって細胞壁の合成が正常にできず、その情報がフィードバックされて細胞壁合成関連遺伝子の転写活性化が生じ、更に kexin によって活性化されないタンパク質が蓄積し、その結果、生育の抑制が生じているものと考えていた。しかし、本研究の結果、細胞の恒常性に関与するようなタンパク質の活性化に関与している可能性が示された。この様な恒常性維持に関わる重要なタンパク質のプロセッシングを kexin が行っている可能性が示され、

これまで考えられていたより麹菌 kexin の働きが生体にとって重要である可能性が示唆された。このようなタンパク質の活性化不全が生じているのであれば、その複合的な要因で最終的に麹菌の形態変化が観察されている可能性が示唆された。

(4) KexA の高発現と基質の捕捉

KexA の基質の捕捉は、KexB よりも難しい事が考えられた。KexA が酸性でも活性を持ってしまい、酸性化した条件でもタンパク質の切断を行ってしまう可能性が示された。そのため、活性を持たない用に、活性中心の Ser 残基を Ala に置換した KexA(S152A) を作製した。タンパク質の発現、精製が可能であることが示され、今後このタンパク質を用いてリンカーを用いて基質となるタンパク質、ペプチドの捕捉に務める。

以上のように本研究では、これまで高発現ができていなかった KexB 並びに KexA の高発現系の構築に成功した。また、KexB については、反応中間体を補足する方法を考案し、これを用いて、初めて、ポリリン酸キナーゼが KexB の基質であることを示すデータを得た。この結果からこれまで考えていたより、KexB の生体内における重要性が高いことが示唆された。一方、KexA については、基質の捕捉には至らなかったが、酸性側での活性があることがわかり、今後この酵素自身が Golgi だけでなく液胞での働きが存在するのではないかなど新しい展開が考えられた。

参考文献

- ①N. Ogawa, J. DeRisi, P. O. Brown, 2000, New components of a system for phosphate accumulation and polyphosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* revealed by genomic expression analysis, *Mol Biol Cell*, 11:4309-21
- ②M. Hothorn, H. Neumann, E. D. Lenherr, M. Wehner, V. Rybin, P. O. Hassa, A. Uttenweiler, M. Reinhardt, A. Schmidt, J. Seiler, A. G. Ladurner, C. Herrmann, K. Scheffzek, A. Mayer, 2009, Catalytic core of a membrane-associated eukaryotic polyphosphate polymerase, *Science* 324: 513-516
- ③ A. R. Reddi, L. T. Jensen, A. Naranuntarat, L. Rosenfeld, E. Leung, R. Shah, V. C. Culotta, 2009, The overlapping roles of manganese and Cu/Zn SOD in oxidative stress protection, *Free Radic Biol Med* 46: 154-162.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2件)

- ① H. maeda, T. Katase, D. Sakai, M.

Takeuchi, K. Kusumoto, H. Amano, H. Ishida, K. Abe, Y. Yamagata, A novel non thermostable deuterolysin from *Aspergillus oryzae*. *Biosci Biotechnol Biochem*, *in press* (査読あり)

② H. maeda, D. Sakai, T. Kobayashi, H. Morita, A. Okamoto, M. Takeuchi, K. Kusumoto, H. Amano, H. Ishida, K. Abe, Y. Yamagata, Three extracellular dipeptidyl peptidase found in *Aspergillus oryzae* showing varying substrate specificity. *Appl Microbiol Biotech*, *in press* (査読あり)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山形 洋平 (YAMAGATA Youhei)

東京農工大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：40230338

(2) 研究分担者

竹内 道雄 (TAKEUCHI Michio)

東京農工大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：50092490