

平成23年 5月 31日現在

機関番号： 82401

研究種目： 研究活動スタート支援

研究期間： 2009～2010

課題番号： 21880055

研究課題名（和文）

麹菌における糖鎖構造からの小胞体関連分解の解析

研究課題名（英文） Analysis of ER associated degradation from structure of sugar chain in *Aspergillus oryzae*

研究代表者

菊間 隆志 (KIKUMA TAKASHI)

独立行政法人理化学研究所・伊藤細胞制御化学研究室・特別研究員

研究者番号： 90553842

研究成果の概要（和文）：

麹菌 *Aspergillus oryzae* における小胞体関連分解（ERAD）因子 AoHtm1 および AoYos9 の機能解析を行った。これらの遺伝子破壊株は Calcofluor white に対して薬剤耐性を示した。また、AoHtm1 高発現株の microsome 画分および組換え AoHtm1 の Man9 アスパラギン結合型糖鎖に対するマンノシダーゼ活性を測定したところ、B アームのマンノシダーゼを1つ切断する新規のマンノシダーゼであることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Yeast Htm1 is a mannosidase-like protein related to ERAD. We obtained strains that overexpress the Htm1 homologue in *A. oryzae*, *Aohtml*. Trimming of the B arm of Man9GlcNac2-PA to Man8Glc2-PA was accelerated in that strain, indicating AoHtm1 was involved in processing of N-linked oligosaccharide. Furthermore, recombinant AoHtm1 expressed in *E. coli* has mannosidase activity. This suggests the possibility that AoHtm1 is a novel  $\alpha$ -1,2 mannosidase.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,080,000	324,000	1,404,000
2010年度	940,000	282,000	1,222,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,020,000	606,000	2,626,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：麹菌、小胞体、糖鎖、小胞体関連分解

## 1. 研究開始当初の背景

麹菌 *Aspergillus oryzae* は我が国において清酒、味噌、醤油などの発酵食品に欠かすこ

とのできない微生物である。

麹菌は米や麦の表面上に菌糸を伸ばしながら酵素を分泌することによって、デンプンやタンパク

質を分解し、栄養源として利用する。これら酵素活性の高い分泌酵素は産業においても非常に有用であり、近年、この麹菌の細胞外分泌能力を利用して、麹菌由来の酵素のみならず、生物種の異なる有用酵素（有用タンパク質）の生産を麹菌によって行おうとする試みがなされている。例えば、ヒトのリゾチーム（細菌の細胞壁の溶解）やウシのキモシン（チーズの凝集）、シロアリのセルラーゼ（植物バイオマスの分解）など、それらの遺伝子を麹菌に導入することによって麹菌に分泌生産させるというものである。しかし、麹菌による異種酵素生産においては、菌体外分泌経路の各段階に様々な生物学的障壁が存在する。しかし、麹菌の分泌経路の詳細は未だ不明な点が多いのが現状である。高分泌能を獲得する分泌経路の詳細が明らかになれば、さらに効率の良い異種タンパク質生産が可能になると期待される。

## 2. 研究の目的

麹菌の菌体外分泌経路は、核から転写された mRNA が小胞体上のリボソームでポリペプチドに翻訳され、小胞体、ゴルジ体を経て菌糸先端部の *Spitzenkörper*（スピッツェンケルパー）に集積され菌体外に分泌されると考えられている。

哺乳動物細胞や酵母など研究から、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、タンパク質同士の結合、糖鎖の付加（グリコシレーション）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ことが明らかとなりつつある。正常に成熟しなかったタンパク質はプロテアソームによって分解される運命をたどる（ERAD）。つまり、新しく合成された分泌タンパク質の品質管理を行いその一生を決定する極めて重要な場所である。この品質管理には分泌タンパク質の糖鎖付加、糖鎖修飾が重要な機能を果たしており、これらの糖鎖を認識するタンパク質、糖鎖を切断するタンパク質、糖鎖に糖を付加するタンパク質などが関与している。つまり、分泌タンパク質に付加された糖鎖の糖の数や、構造によってプロテアソームによる分解を行うか、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と考えられている。

本研究は、麹菌による効率的な異種有用タンパク質分泌生産のための育種を視野に入れ、麹菌の分泌経路解明の一環として、麹菌の分泌経路において重要な機能を果たす小胞体での分泌タンパク質の品質管理を構成する一要素である小胞体関連分解（ERAD）因子の機能解析を目的とする。

## 3. 研究の方法

### （1）ERAD 関連遺伝子のクローニング

酵母で報告されている ERAD に関与する糖

鎖認識タンパク質 Htm1 および Yos9 をコードするホモログ遺伝子を麹菌ゲノムデータベースより探索する（*Aohtml*, *Aoyos9*）。探索されたホモログ遺伝子を蛍光タンパク質（EGFP）との融合タンパク質として発現する株を作製する。この株を蛍光顕微鏡により観察し、細胞内局在を観察する。

### （2）*Aohtml* および *Aoyos9* 破壊株の解析

*Aohtml* および *Aoyos9* それぞれを、*adeA* 遺伝子をマーカーとして破壊し、両破壊株の表現型、薬剤感受性を評価する。

### （3）*AoHtm1* 高発現株のマノシダーゼ活性評価

*AoHtm1*-EGFP を *AmyB* プロモーター下で高発現させた株より *microsome* 画分を抽出する。この画分を用い、アスパラギン型糖鎖のモデルとして PA-Man9 を基質に *in vitro* アッセイを行う。

### （4）組換え *AoHtm1* の生化学的解析

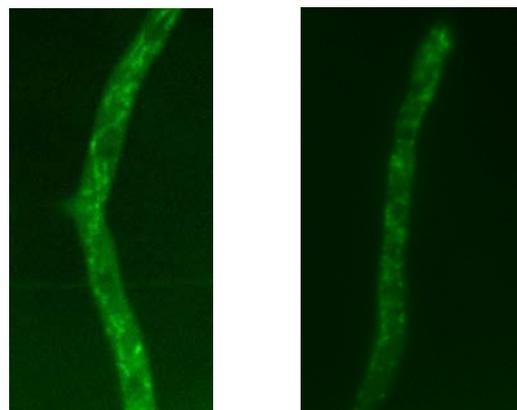
*AoHtm1* の mannosidase homology domain (MHD) の cDNA を作製し、His タグを融合したタンパク質を大腸菌により発現させる。その後、ニッケルアフィニティーカラムにより精製し、PA-Man9などを基質として *in vitro* アッセイを行う。

## 4. 研究成果

### （1）ERAD 関連遺伝子のクローニング

酵母におけるレクチン様 ERAD 関連因子 Htm1p および Yos9p の麹菌ホモログ (*AoHtm1*, *AoYos9*) をコードする遺伝子を麹菌ゲノムデータベースより探索し、クローニングを行った。

それぞれの遺伝子に緑色蛍光タンパク質 (EGFP) をコードする遺伝子を融合させ、麹菌において発現させたところ、*AoHtm1*-EGFP および *AoYos9*-EGFP は小胞体様の構造への局在が観察された (図 1)。このことから、両タンパク質は小胞体内において機能していることが示唆された。



*AoHtm1*-EGFP

*AoYos9*-EGFP

図 1 *AoHtm1*, *AoYos9* の細胞内局在

(2) *Aohtml* および *Aoyos9* 破壊株の解析

*Aohtml* および *Aoyos9* 破壊株を寒天培地に生育させ、ツニカマイシン、DTT、Calcofluor white、Congo Red に対して薬剤感受性試験を行った。その結果、キチン合成阻害剤である Calcofluor white に対して薬剤耐性を示した (図 2)。

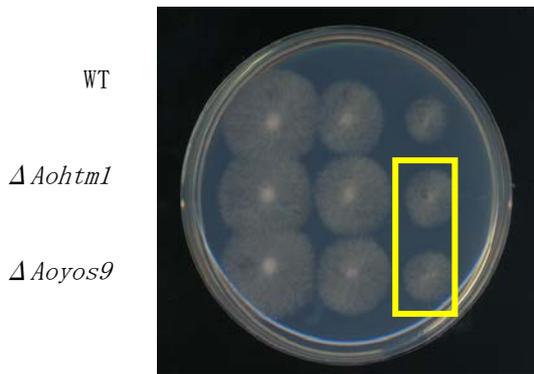


図 2 Calcofluor white に対する耐性

(3) *Aohtml* 高発現株のマンノシダーゼ活性評価

*Aohtml*-EGFP を高発現させた株の microsome 画分を用いて PA-Man9 を基質とした *in vitro* アッセイを行い HPLC で PA の蛍光を検出した。その結果、野生株 (WT) に比べて高発現株 (OE) の Man8 へのトリミング活性が上昇した (図 3)。

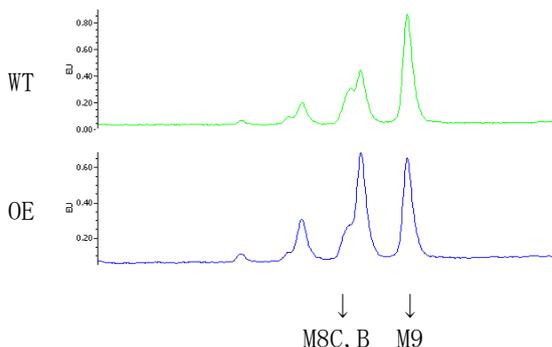


図 3 PA-Man9 のトリミング活性

とくに、高発現株においては B アームのマンノースが切断された Man8B へのトリミングが活性化された。酵母 *Htm1p* は C アームのマンノースを切断することが報告されているため、麹菌における小胞体でのアスパラギン結合型糖鎖のプロセッシング機構は、酵母と異なる可能性が示唆された。

(4) 組換え *Aohtml* の生化学的解析

*Aohtml* の mannosidase homology domain (MHD) を大腸菌により発現させ、His タグを用いて粗精製した画分を用いて、マンノシダーゼ活性を測定したところ、Man9 から

Man8B への切断が観察された (図 4 M9)。また、Man8B を基質にした場合、マンノシダーゼ活性は検出できなかったが、Man8C を基質にした場合、Man7a への切断が観察された (図 4 M8B, M8C)。

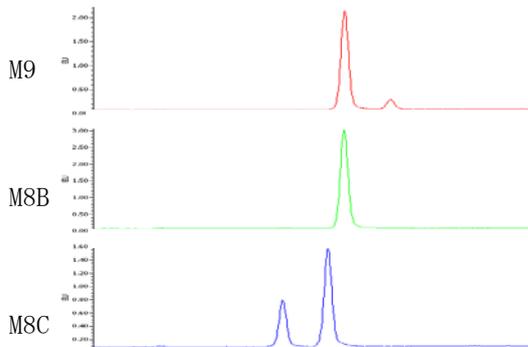


図 4 組換え *Aohtml* のマンノシダーゼ活性

この結果は、アスパラギン結合型糖鎖の B アームのマンノースを 1 つだけ切断することを示している。他の生物における小胞体マンノシダーゼが Man5 程度までトリミングすることから、新規のマンノシダーゼである可能性が示唆された。

また、クラス I マンノシダーゼの阻害剤であるキフネンシンにより顕著に活性が阻害された。

(5) まとめ

本研究により、麹菌において小胞体内で機能する新規のマンノシダーゼが発見された可能性が示唆された。今後、より詳細な基質特異性や結合様式などの解析を行う必要があると考えられる。

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)

[学会発表] (計 4 件)

- ① 菊間隆志、麹菌 *A. oryzae* における小胞体関連分解 (ERAD) 関連遺伝子 *Aohtml*, *Aoyos9* の機能解析、第 9 回糸状菌分子生物学コンファレンス、2009 年 11 月 18 日、東京
- ② 菊間隆志、麹菌 *A. oryzae* の小胞体関連分解 (ERAD) 因子 *Aohtml*, *AoYos9* の機能解析、日本農芸化学会 2010 年度大会、2010 年 3 月 29 日、東京
- ③ 菊間隆志、麹菌 *A. oryzae* における小胞体品質管理関連タンパク質の生化学的解析、第 10 回糸状菌分子生物学コンファレンス、2010 年 11 月 19 日、広島
- ④ 菊間隆志、麹菌 *A. oryzae* における小胞体品質

質管理関連タンパク質の解析、日本農芸  
化学会 2011 年度大会、2011 年 3 月 26 日、  
京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菊間 隆志 (KIKUMA TAKASHI)

独立行政法人理化学研究所・伊藤細胞制御化  
学研究室・特別研究員

90553842