

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19580093

研究課題名 (和文) グリコシレーションにより制御される糸状菌の菌糸伸長と分化

研究課題名 (英文) Hyphal development and differentiation of filamentous fungus regulated by protein glycosylation

研究代表者

後藤 正利 (GOTO MASATOSHI)

九州大学・大学院農学研究院・助教

研究者番号：90274521

研究成果の概要：

糸状菌 *Aspergillus nidulans* の正常な形態形成と分化にはタンパク質へマンノースを転移する酵素 Pmt が必須である。本研究では、糸状菌の 3 種の Pmt が互いに異なる基質特異性を有し、分泌タンパク質を糖鎖修飾することで、細胞の正常性を保つ事を明らかにした。*A. nidulans* の菌体外や細胞壁においては野生株と Pmt 欠損株間ではタンパク質の存在プロファイルが異なっていた。これらには Pmt の基質タンパク質だけではなく、細胞状態の変化に伴う局在の変化、あるいは遺伝子発現の変化に起因するタンパク質も含まれていた。従って Pmt 欠損によるタンパク質の構成や機能の変化により Pmt 欠損株が異常形態を示すものと推考した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：*Aspergillus*, glycosylation, 形態形成、分化、糖鎖工学

## 1. 研究開始当初の背景

*Aspergillus* 属糸状菌では、黄麹菌 *A. oryzae*、病原菌 *A. fumigatus*、研究モデル菌 *A. nidulans* のゲノム情報が発表され、その成果を活用した菌の機能解明や産業、医療での高度利用が期待されている。麹菌はその安全性及び高い酵素生産性の観点から我が国で盛んに使用されている重要な微生物である。麹菌のタンパク質分泌能はリッター培養液当たりグラム単位と極めて優れており、外来遺伝子の発現分泌宿主菌として注目を浴びている。タンパク質の分泌過程には小胞体、ゴルジ体への移行が必要であり、この過程でタンパク質はグリコシレーション化される。近年、O-グリコシレーションがタンパク質の安定化、分泌タンパク質の局在性及び分泌効率に関与することが明らかにされてきているが、O-グリ

コシレーションに関する知見は麹菌を含め *Aspergillus* 属糸状菌においてほとんどない。*Aspergillus* 属糸状菌では O-結合型糖鎖は 1-3 残基からなるマンノース鎖が主成分で、分岐したマンノース鎖や少量のグルコース、ガラクトースを構成糖として含む。O-結合型糖鎖合成の初発反応を触媒する protein : O-D-mannosyltransferase (PMT) は最も重要な酵素で、出芽酵母では 7 つの PMT 遺伝子が見出されており、それらのうち 3 重の変異により細胞死に至る。

*Aspergillus* 属糸状菌には 3 種の *pmt* 遺伝子が存在する。*A. nidulans* の *pmtA* を破壊した菌株では、温度感受性、菌糸伸長の抑制、分生子形成能の低下、細胞壁合成阻害剤に対する高い感受性、核数増加などの表現型が多様に変化した。さらに細胞壁成分において、

細胞壁基本骨格を形成する  $\beta$ -1,3-グルカン量が減少しており、*pmtA* は正常な細胞壁構造の維持に関与している。*pmtB* 破壊株では、野生株と同等の菌糸伸長能を示したが、菌糸の分岐が著しく増した。*pmtC* 破壊株では、菌糸伸長が極めて遅く、分生子形成能欠損つまり、分化が行われなくなり、菌糸は短く膨張した異常な構造であった。以上、*pmtA*、*pmtB*、*pmtC* の各遺伝子破壊株の表現型は互いに異なっており、3種の Pmt は各々独自の標的タンパク質に対する特異性を持っていることが示唆された。

酵母菌にはない菌糸伸長、分生子形成などの形態分化を行なう糸状菌において、PMT は標的タンパク質をマンノシル化し、その機能を制御することで、糸状菌の生育を制御していると推定される。

## 2. 研究の目的

本研究では O-結合型糖鎖合成の初発反応を触媒する protein: O-mannosyltransferase (Pmt) をコードする *pmt* 遺伝子破壊、すなわち O-マンノシル化の抑制によって生じる細胞形態変化の要因を探るため、麹菌のモデル糸状菌である *Aspergillus nidulans* の PmtA、PmtB 及び PmtC によって O-マンノシル化される基質タンパク質の探索と同定、Pmt のマンノシル化基質タンパク質自の機能を明らかにすることを目的とする。本研究により O-グリコシル化により制御される糸状菌の菌糸伸長、形態分化機構の解明が期待される。

## 3. 研究の方法

(1) *pmt* 破壊株間における糖タンパク質プロファイルの相違

野生株及び各 *pmt* 遺伝子破壊株の凍結乾燥菌体を破砕し、Triton X-100 抽出溶液 (50 mM Tris-HCl pH7.5、5 mM MgCl<sub>2</sub>、1 % (v/v) Triton X-100) 加え、タンパク質を抽出した。SDS-PAGE で分離後、CBB 染色、あるいはアルカリフォスファターゼ標識 Concanavalin A (ConA) を用いてレクチンブロットを行ないマンノース付加した糖タンパク質を検出した。

(2) *pmt* 破壊株におけるグルコアミラーゼのグリコシル化

黒麹菌由来のグルコアミラーゼ遺伝子 (*glaA*) 発現用ベクターを野生株及び各 *pmt* 遺伝子破壊株に導入し、2% マルトースを含む培地にてグルコアミラーゼ I (GAI) を発現誘導した。培養上清中の GAI を SDS-PAGE によって分離した後、抗-GAI 抗体を用いたイムノブロット法によって検出した。

(3) *pmt* 破壊株における WscA-3XHA のグリコシル化

細胞膜に局在する細胞壁ストレスセンサ

タンパク質をコードする *wscA-3ha* 発現用ベクターを野生株及び各 *pmt* 遺伝子破壊株に導入し、2% マルトースを含む培地にて *wscA-3ha* を発現誘導した。集菌後、抽出バッファー (9 M Urea、1% SDS、25 mM TrisCl、pH6.8、1 mM EDTA、0.7 M 2-mercaptoethanol) にて全タンパク質を抽出した。ついで SDS-PAGE にて分離後、抗-HA 抗体を用いたイムノブロット法によって WscA-3HA を検出した。

(4) 二次元電気泳動による比較プロテオミクス

① 野生株と *pmtA* 破壊株あるいは ② 野生株と *pmtC* 破壊株間で、比較プロテオミクス解析を行なうため、O-結合型糖鎖が付加されたタンパク質が局在すると考えられる菌体外分泌画分、細胞壁画分、細胞膜を含むミクロソーム画分を取得した。各分画タンパク質を二次元電気泳動法によって分離した。1次元目では IPG Phor (GE 社) による等電点電気泳動を行ない、2次元目は Ettan Dalt six (GE 社) による SDS-PAGE を行った。タンパク質を銀染色、あるいは糖タンパク質を Pro-Q Emerald 488 (Invitrogen 社) によって染色して、タンパク質を検出した。野生株と *pmt* 破壊株間で異なるスポットを切り出し、MALDI-TOF-MS に供与した。タンパク質の同定にはペプチドマスフィンガープリント法に従い、データベースとして NCBI を、データベース検索ソフトとして MASCOT を利用した。

## 4. 研究成果

(1) *pmt* 破壊株間における糖タンパク質プロファイルの相違

細胞内で糖鎖修飾されるタンパク質は、小胞体、ゴルジ体といった細胞小器官を移行し、分泌、局在化する。そこで、Triton X-100 によって抽出されるタンパク質を分画して、野生株及び *pmt* 破壊株間での糖タンパク質の全体像を比較した。CBB 染色により検出した。

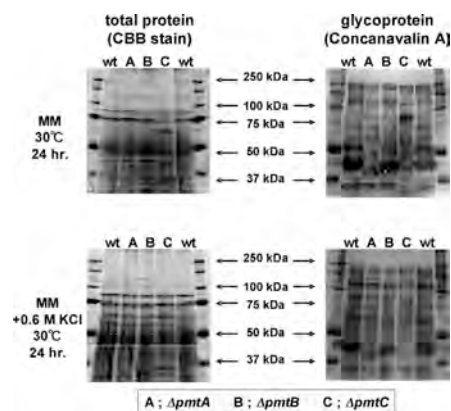


図 1. 野生株及び *pmt* 破壊株の糖タンパク質の比較

タンパク質は、各 *pmt* 遺伝子破壊株間で大きな相違は見られなかった。一方、ConA により検出したマンノース付加した糖タンパク質は、各 *pmt* 遺伝子破壊株間で泳動位置の異なるものが複数確認された(図 1)。

従って、各 Pmt タンパク質によってマンノシル化されるタンパク質が異なっていること、またはそれぞれの遺伝子破壊株の形質に違いが生じているために発現している糖タンパク質が異なっていることが示唆された。

(2) *pmt* 破壊株におけるグルコアミラーゼのグリコシル化

*A. nidulans* の各 *pmt* 遺伝子破壊株の表現型は互いに異なっており、各 Pmt は異なる基質認識能を有していると推察される。そこで、O-マンノース型糖鎖結合領域を持つ黒麹菌の菌体外分泌酵素グルコアミラーゼ I (*glaA*) 遺伝子を *pmt* 遺伝子破壊株で発現させることにより、Pmt の *in vivo* 活性および基質特異性についての解析を行った。

グルコアミラーゼ I (GAI) は N 末端側の触媒ドメインと C 末端側の生澱粉吸着ドメイン、そして両ドメインをつなぐ Gp-I ドメインからなる。Gp-I ドメインは 45 アミノ酸残基中 30 アミノ酸が Ser/Thr 残基で Pmt にとって良好な基質となると推定される。先に *A. nidulans* 野生株及び *pmtA* 破壊株にて *glaA* 遺伝子の発現を行なっており、*pmtA* 破壊株で分泌された GAI は野生株のものとは低分子量化していた (Oka *et al. Microbiol.*, 2004)。本研究では、新たに *pmtB* 破壊株、*pmtC* 破壊株で *glaA* 遺伝子を発現させた。その結果、両遺伝子破壊株ともに GAI を菌体外へ分泌した。GAI の分子量は、野生株由来のものが約 92 kDa、*pmtB* 破壊株、*pmtC* 破壊株由来のものがともに約 90 kDa であった (図 2)。従って菌体外分泌酵素 GAI に対しては *A. nidulans* の Pmt による基質特異性の相違は認められなかった。

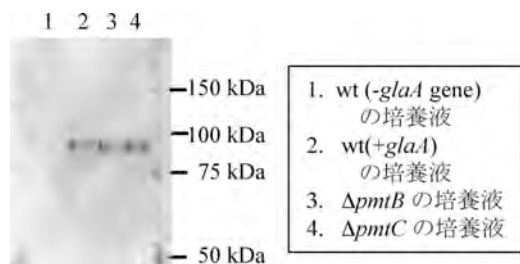


図 2. *pmt* 破壊株由来 GAI の SDS-PAGE

野生株由来の GAI と *pmtB* 破壊株、*pmtC* 破壊株由来の GAI には約 2 kDa の分子量の差があった。この違いは、GAI の O-マンノース型糖鎖結合領域に結合しているマンノース量の違いによるものであり、先の研究で明らかになった PmtA 同様、PmtB および

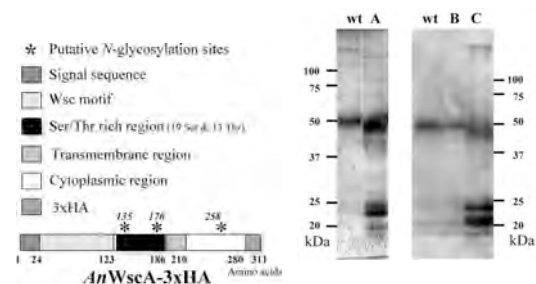
PmtC が外来の分泌タンパク質に対して Pmt 活性を有しているものと考察した。

(3) *pmt* 破壊株における WscA-3XHA のグリコシル化

*A. nidulans* の *pmtA* 破壊株及び *pmtC* 破壊株は低浸透圧感受性や抗真菌薬剤感受性を示す。*pmtA* 破壊株では、野生株に比べ細胞壁成分のうち  $\beta$ -glucan の減少と  $\alpha$ -glucan の増大が認められ、細胞壁が弱化的なことが既に明らかにされている (Oka *et al. Microbiol.*, 2004)。このような細胞壁の弱化的原因の 1 つとして出芽酵母では *pmt2/pmt4* 遺伝子変異株における Wsc1p の機能の欠損が報告されている。Pmt2、Pmt4 はそれぞれ PmtA、PmtC のホモログである。Wsc1p は出芽酵母の細胞壁の生合成修復機構 (CWI cell wall integrity signaling pathway) の主要なストレスセンサータンパク質であり、膜貫通型タンパク質で細胞表層に存在する。その構造には N 末端に WSC ドメイン、C 末端に細胞質ドメイン、そしてその間に O-結合型糖鎖が付加した Ser/Thr に富んだ領域が存在する。WSC ドメインで細胞壁ストレスの感知の役割を担い、細胞質ドメインで CWI signaling pathway 下流の Rom2 と相互作用する。その後、リン酸の転移という形でシグナルを伝え、細胞壁の生合成に関与するタンパク質群の転写を制御するに至る。*pmt2/pmt4* 遺伝子破壊株では Wsc1 に対する糖鎖付加が十分に行われず、その結果 Wsc1 は CWI signaling pathway の細胞表層ストレスセンサーとしての役割を果たさない。

*A. nidulans* における Wsc1p のホモログ WscA は Wsc1 との相同性がアミノ酸レベルで 31.2% で、WSC ドメイン、Ser/Thr に富んだ領域、膜貫通領域、細胞質ドメインを有している (図 3)。*wscA* 遺伝子破壊株は低浸透圧感受性、薬剤感受性などを示した。この表現型は *pmtA* 破壊株の表現型の一部と一致する。

そこで、WscA が Pmt の基質タンパク質であるか否かを確認するために、野生株と各 *pmt* 破壊株に HA タグを付与した *wscA* を発現させ、*pmt* 遺伝子破壊による WscA へのグリコシル化能及び WscA の安定性について調べた。



(A:  $\Delta pmtA$ , B:  $\Delta pmtB$ , C:  $\Delta pmtC$ )

図 3. WscA の構造と *pmt* 破壊株での安定性

野生株 (wt) では、WscA-3HA は約 50 kDa 付近のバンドとして検出された。*pmtB* 破壊株では野生株と同様のバンドパターンを示したことから、PmtB は WscA のグリコシレーションには関与していない事が明らかになった。一方、*pmtA* 破壊株 及び *pmtC* 破壊株においては、野生株の約 50 kDa に相当するバンドはいずれも少し低分子側へシフトしていた。さらに 20~25 kDa 付近に分解産物と思われるバンドも検出された。これらの分解産物を生じるには WscA-3HA の 123-186 残基間の Ser/Thr に富んだ領域でプロテアーゼによって分解される必要がある。本来野生株で WscA は、この領域に糖鎖付加されており、プロテアーゼによる分解から免れるが、糖鎖付加が行なわれなくなると分解され、WscA の機能が失われる可能性が示唆された。先の研究結果で *A. nidulans wscA* 破壊株が低浸透圧感受性や細胞壁合成阻害剤高感受性を示すことを明らかにしている。従って *pmtA* 及び *pmtC* 破壊株が低浸透圧感受性を示す表現型が生起する要因のひとつが、WscA の機能不全にあると考察した。

(4) 二次元電気泳動による比較プロテオミクス

*pmt* 遺伝子破壊による表現型への影響の原因を明らかにするために、野生株 と *pmt* 破壊株間の比較プロテオーム解析を行い、*pmt* 遺伝子破壊が及ぼすタンパク質プロファイルの変化、並びに Pmt の基質タンパク質の同定を試みた。

#### ① 野生株 vs *pmtA* 破壊株

細胞壁画分では図 4 の紫色の丸で囲った糖タンパク質が野生株に特異的な spot として検出された。MALDI-TOF-MS 解析により複数のスポットが同定されたが、多くのミトコンドリア由来のタンパク質が存在していることが明らかとなった。分画を行った際に細胞壁成分にミトコンドリアが付着していた可能性が推察される。また、野生株と *pmtA* 破壊株の間で見られた差異は PmtA による糖鎖付加の有無という直接的な原因によるものではなく、糖鎖付加がなされなかったタンパク質が十分に機能しなかったことよって起こる二次的な現象であると考察した。

細胞壁への局在が考えられるものの中で、野生株 と *pmtA* 破壊株の間で差異が検出されたものとしては spot No. 11、12、13 で同定された glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) が挙げられる。GAPDH は O-結合型糖鎖が付加されるセリン・スレオニン残基を全体の 14.6% 有している。また、推定の N-結合型糖鎖が付加できるサイトを 3 つ有する。GAPDH のスポットは銀染色では GAPDH は野生株 と *pmtA* 破壊株間で差がないにも関わらず、糖タンパク質染色では野生株 でのみ検出された。本来

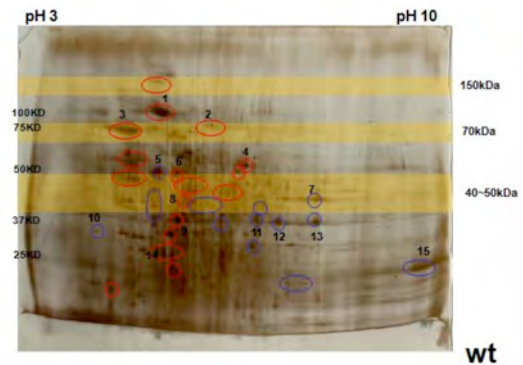


図 4. 野生株の細胞壁タンパク質のタンパク質プロファイル。丸で示した spot は糖タンパク質染色により、染色されたもの。黄色の帯で示した分子量は、SDS-PAGE による実験結果で、野生株と *pmtA* 破壊株で差異があったバンド領域を示す。番号は同定された spot を示す。

解糖系の属する酵素であるが、出芽酵母や *Candida albicans* では細胞壁への局在が確認されており、本菌でも細胞壁に局在している可能性が示唆された。また本菌では浸透圧ストレスを与えることで、GAPDH の発現が増大することが既に報告されている。また、GAPDH に対して代謝経路の下流にある glycerol 3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) の遺伝子破壊株では、*pmtA* 破壊株と同様に菌糸が異常膨らんだバルーン構造が見られる。GAPDH、G3PDH とともにグリセロールの生合成に関与していることから、これらの酵素が本来の機能を発揮しないことでグリセロールの合成が十分に行われず、浸透圧ストレスに感受性を示すものと推察した。出芽酵母でも同様に GAPDH と浸透圧ストレスの関係性が報告されている。

ミクロソーム画分に関しては、明確な差異は検出できなかった。

#### ② 野生株 vs *pmtC* 破壊株

菌体外分泌画分、細胞壁画分、ミクロソーム画分の二次元電気泳動を行った。中でも分泌画分では野生株に特異的な 15 の spot と *pmtC* 破壊株に特異的な 6 の spot に差が認められた。これらの spot すべての MS 解析を行なったが、野生株に特異的なスポットのうち、Inorganic pyrophosphatase (IPP、AN2968.3) と *pmtC* 破壊株に特異的なスポット 1,4-β-D-xylan xylanohydrolase C (XlnC、AN1818) XlnC が同定可能であった。他の spot は糖鎖付加の影響のためと推定されるが同定できなかった。IPP 及び XlnC には糖鎖が付加されているという報告はなく、その分子量からも糖鎖が付いておらず、*pmtC* の破壊によって二次的な影響によって差が出たことが予想された。



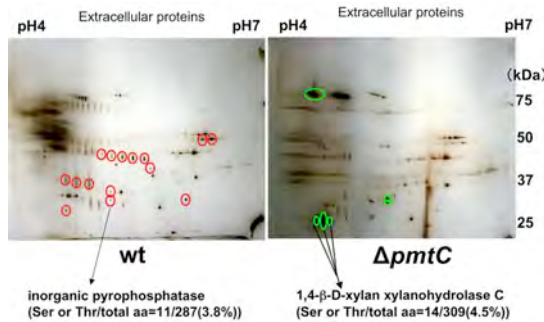


図 5. 野生株と *pmtC* 破壊株の細胞壁タンパク質のタンパク質プロファイル比較

一方、細胞壁画分、ミクロソーム画分ともに、野生株あるいは *pmtC* 破壊株に特異的なスポットが存在することを確認した。

以上の結果より、*A. nidulans* の菌体外分泌酵素、細胞壁タンパク質において野生株と *pmtA* 破壊株、*pmtC* 破壊株ではタンパク質の存在プロファイルが異なっていることを明らかにした。これらには *PmtA* や *PmtC* の基質タンパク質だけではなく、細胞状態の変化に伴う、局在の変化あるいは遺伝子発現に起因するタンパク質も含まれており、両タンパク質の構成、機能の変化により *pmt* 破壊株が異常形態を生起することが示唆された。

#### 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 3 件)

- ① Goto, M., Takegawa, K., and Furukawa, K. Protein O-glycosylation affects morphology and differentiation of *Aspergillus nidulans*. *J. Biotechnol.*, 査読無, 136, Suppl.1, page S339 (2008).
- ② Goto, M. Protein O-glycosylation in fungi; diverse structures and multiple functions. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 査読有, 71, 1415-1427 (2007).
- ③ 後藤正利. 糸状菌における O-グリコシレーションの役割. *バイオサイエンスとインダストリー*, 査読無, 65, 30-31 (2007).

[学会発表] (計 14 件)

- ① 松島享生、岡拓二、川森真菜、小町裕司、竹川薫、後藤正利、野村善幸. *Aspergillus nidulans* の UDP-ガラクトピラノースムターゼの機能解析. 日本農芸化学会大会. 2009 年 3 月. 福岡市.
- ② 藤原絵美、古田吉史、大森俊郎、伊本亮、軸屋博之、竹川薫、後藤正利. *Aspergillus nidulans* O-結合型糖鎖合成酵素の基質タンパク質の探索. 日本農芸化学会大会. 2009 年 3 月. 福岡市.

- ③ 大久保有祐、大橋貴生、竹川薫、後藤正利. *Aspergillus nidulans* の糖鎖構造の解析と糖転移酵素の探索. 第 8 回糸状菌分子生物学コンファレンス. 2008 年 11 月 18 日. 金沢市.
- ④ 伊本亮、松本翔、宮崎絵美、軸屋博之、大森俊郎、竹川薫、後藤正利. *Aspergillus nidulans* の糖転移酵素 *Pmt* の基質タンパク質の探索. 第 8 回糸状菌分子生物学コンファレンス. 2008 年 11 月 18 日. 金沢市.
- ⑤ Goto, M. Takegawa, K., and Furukawa, K. Protein O-glycosylation affects morphology and differentiation of *Aspergillus nidulans*. 13th International Biotechnology Symposium & Exhibition-Biotechnology for Sustainability of Human Society-. 2008 年 10 月. Dalian, China.
- ⑥ Goto, M. Protein O-glycosylation affects morphology and differentiation of *Aspergillus nidulans*. The 4th Japan-Netherlands Joint Seminar on New Aspects in Enzyme Science and Biotechnology. 2008 年 9 月. Fukuoka.
- ⑦ 大久保有祐、大橋貴生、竹川薫、後藤正利. *Aspergillus nidulans* の糖鎖構造解析と糖転移酵素の探索. 日本農芸化学会西日本支部大会. 2008.9 月. 長崎大学.
- ⑧ 伊本亮、松本翔、軸屋博之、竹川薫、後藤正利. *Aspergillus nidulans* の糖鎖転移酵素 *Pmt* の基質タンパク質の探索. 日本農芸化学会西日本支部大会. 2008.9 月. 長崎大学.
- ⑨ 後藤正利. 糸状菌の O-glycosylation と形態形成. 第 11 回真核微生物交流会. 2008 年 7 月. 酒類総合研究所.
- ⑩ 後藤正利、原田祐佳、松本翔、古川謙介. *Aspergillus nidulans* の protein O-mannosyltransferase 遺伝子群の基質特異性解析. 日本農芸化学会大会. 2008 年 3 月. 名古屋市.
- ⑪ 原田祐佳、松本翔、後藤正利. *Aspergillus nidulans* における protein O-mannosyltransferase 遺伝子群の機能解析. 第 7 回糸状菌分子生物学コンファレンス, 2007 年 11 月. 東京大学.
- ⑫ 後藤正利. O-グリコシレーションによって制御される糸状菌の正常な形態形成. 第 7 回糸状菌分子生物学コンファレンスシンポジウム. 2007 年 11 月. 東京大学.
- ⑬ 松本翔、城戸弥生、原田祐佳、後藤正利、古川謙介. *Aspergillus nidulans* の O-マンノシレーションに制御される糖タンパク質の同定. 日本生物工学会大会. 2007 年 9 月. 広島大学.
- ⑭ Goto, M. Miyazaki, E., Harada, Y., and Furukawa, K.. Functional analysis of mannosyltransferase involved in protein glycosylation in *Aspergillus nidulans*. 107th General Meeting of American Society for

Microbiology. 2007 年 5 月. Toronto.

6. 研究組織

(1)研究代表者

後藤 正利 (GOTO MASATOSHI)

九州大学・大学院農学研究院・助教

研究者番号：90274521