

はじめに

我が国で古くから日本酒、味噌、醤油などに使用されてきた麹菌 (*Aspergillus oryzae*) は、真核微生物のなかでひとときわ高いタンパク質分泌生産能力をもつため、これまで様々な酵素生産に利用されてきた。また、近年、遺伝子組換えによる異種有用タンパク質生産の宿主としても世界的に注目されており、すでに様々な有用タンパク質の生産に利用されている。

このような産業利用の実績と比べ、麹菌細胞内のタンパク質分泌経路の解析は、ほとんどなされていなかった。つい最近まで、麹菌のような糸状菌細胞での分泌経路のモデルとしては、単細胞真核微生物である酵母での知見をもとに推定されたものが主だった。糸状菌は、その名の示すように糸状の細長い構造をもち、また、それらがつながった多細胞からなる複雑な生物であるので、酵母での知見だけでは、その理解に限界がある。最近、麹菌のゲノム情報の利用¹⁻²⁾と細胞生物学的なツールの発達³⁾から、これまでほとんど手のつけられてこなかった麹菌の細胞内の構造が明らかになりつつある。そこで、演者らは、麹菌をセルフアクトリーとして利用することを目的として、細胞内タンパク質分泌経路に関する基礎的な解析を行うとともに、異種タンパク質生産のための宿主の開発を行っている。

1. 麹菌細胞の構造

麹菌は、球状の分生子から菌糸を発芽することで極性生長を開始する。菌糸先端は、生長が起こる唯一の場所であり、加えて菌糸先端は加水分解酵素などのタンパク質分泌のおこる場所でもある。先端生長に伴って隔壁と呼ばれる細胞間の仕切りを形成することで菌糸を多細胞化させる。こうしてできた麹菌の先端細胞は幅 4 mm 程度、長さは 100 mm 以上に及ぶ。隔壁には隔壁孔と呼ばれる連絡口が開いており、これにより隣接する細胞同士は互いに連絡している。

2. 蛍光イメージングによる麹菌細胞でのタンパク質分泌経路の可視化

1) 小胞輸送経路に関わるオルガネラの空間的配置

分泌タンパク質は、小胞体において適切なフォールディングや糖鎖修飾を受けた後、輸送小胞中に集められゴルジ体へと移行される。ゴルジ体において更なる糖鎖修飾を受けた後、分泌タンパク質は細胞膜へと輸送される。また、エンドサイトーシスにより細胞外/細胞膜から取り込まれた物質はエンドソームにおいて選別され、細胞膜へリサイクルされるか、液胞へ運ばれて分解される。輸送小胞が正しい標的オルガネラと融合するための特異性は、SNARE と呼ばれる一群の膜タンパク質により担われている。そこで、糸状菌における小胞輸送の全体像をつかむことを目的として、麹菌の全 21 個の SNARE タンパク質と EGFP (緑色蛍光タンパク) との融合タンパク質を用いて小胞輸送経路のオルガネラを可視化した⁴⁻⁵⁾。

2) 高いタンパク質分泌能には菌糸先端でのエンドサイトーシスが重要である

タンパク質の分泌は、小胞が細胞膜と融合することにより、積み荷の酵素などが細胞外へ生産される。これをエキソサイトーシスと呼ぶのに対し、細胞は細胞膜を貫入させることにより細胞膜タンパク質などを細胞内に取込んでおり、これをエンドサイトーシスと呼ぶ。最近、糸状菌においてもエンドサイトーシスの存在が確認され、タンパク質分泌に重要な働きをしていることが明らかになりつつある⁶⁾。

3) 小胞体は極性依存的に局在している

演者らは、顕著な極性を有する糸状菌細胞での小胞体の分布に興味を持ち、小胞体シャペロンである BipA と EGFP との融合タンパク質を用いて小胞体の局在を観察した。可視化された小胞体は、他の生物と同様の網目状の構造として観察されたが、菌糸先端細胞では小胞体が先端部で特に発達し、基部に向かうにつれてその局在が少なくなる傾向があった。このような極性的な配置は、菌糸の先端生長やタンパク質分泌に重要な役割を果たしていると考えられる⁷⁾。

3. 異種タンパク質生産のための宿主開発

1) プロテアーゼ多重破壊株の育種

麹菌により生産された異種タンパク質は麹菌のもつプロテアーゼにより分解されるため、これに関与するプロテアーゼ活性を低下させることは重要である。そこで、マイクロアレイ解析により明らかになった培養後期に発現する分泌型プロテアーゼを中心として遺伝子の多重破壊を行っている⁸⁾。現在までに、7重破壊株の取得に成功し、生産性が向上していることを確認している。

2) 異種タンパク質高生産変異株の取得

プロテアーゼ遺伝子二重破壊株 (NStApE 株) を親株として、リゾチーム活性を指標としたハロアッセイにより、高生産変異株をスクリーニングした。ポジティブセレクション培地を用いてヒトリゾチーム発現プラスミドを脱落させた株を取得し、AUT (*A. oryzae* hyper-producing strain developed in University of Tokyo) 株と命名した。AUT 株はリゾチームのほかウシキモシンの生産性も向上していることが確認され、様々なタンパク質生産の宿主として期待される⁹⁾。

3) RNAi を用いた α -アミラーゼ発現抑制による異種タンパク質生産量の改善

麹菌の α -アミラーゼは、培地中に最も大量に分泌されるタンパク質であり、細胞内分泌経路で発現させた異種タンパク質と競合している可能性が考えられる。そこで、RNAi (RNA 干渉) により、 α -アミラーゼ発現を抑制した株を作成し、ウシキモシン生産性を検討したところ、生産性が有意に向上することが確認された。

4) 麹菌による有用タンパク質生産

これまでに、ヒトリゾチーム^{8, 9)}、キモシン⁸⁾、味覚修飾タンパク質¹⁰⁾ (ミラクリン、ネオクリン) の麹菌による生産に成功した。また、セルロース系バイオマスからのバイオエタノール生産を目指して、シロアリ由来セルラーゼを生産する麹菌の育種にも取り組んでいる。

おわりに

麹菌のもつタンパク質高分泌能に関して、ゲノム解析終了後、分子レベルでの解析が急速に進んでいる。しかし、どうして麹菌が優れているかという答えはゲノム情報からだけでは得られていない。モデル生物である酵母での知見をもとにした解析は効率的な研究方法ではあるが、そこには限界がある。やはり、「麹菌のことは麹菌に聞かなくてはならない」というのが実感である。タンパク質生産能力が高い真核微生物である麹菌をタンパク質工場として利用することは、21世紀の食糧、環境、エネルギーの諸問題の解決にとって重要なことであり、我が国の代表的微生物 (国菌) である麹菌を用いた研究を通じて、世界に「日本の文化の香りのするサイエンス」を発信していきたいと考えている。

参考文献

- 1) Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*, M. Machida *et al.*: *Nature*, **438**, 1157-1161 (2005)
- 2) ポストゲノム時代を迎えた麹菌、北本、生物工学会誌、84、361-363 (2006)
- 3) 麹菌の分子育種のための新規宿主・ベクター系、北本・丸山、シーエムシー出版、95-103、(2006)
- 4) Systematic analysis of SNARE localization in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*, M. Kuratsu *et al.*, *Fungal Genet Biol.*, **44**, 1310-1323 (2007)
- 5) 糸状菌オルガネラの形態とその極性依存的な配置 - 麹菌の小胞輸送経路の解析からみえてきたもの -、正路、樋口、丸山、北本、蛋白質核酸酵素、53、753-759 (2008)
- 6) Endocytosis is crucial for cell polarity and apical membrane recycling in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*, Y. Higuchi *et al.*, *Eukaryot. Cell*, **8**, 37-46 (2009)
- 7) Differential distribution of the endoplasmic reticulum network in filamentous fungi, J. Maruyama, K. Kitamoto, *FEMS Microbiology Letters*, **272**, 1-7 (2007)
- 8) Construction of quintuple protease gene disruptant for heterologous protein production in *Aspergillus oryzae*, J. Yoon *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **82**, 691-701 (2009)
- 9) Isolation of *Aspergillus oryzae* mutants for heterologous protein production from a double proteinase gene disruptant, T. Nemoto *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* in press (2009)
- 10) 麹菌による味覚修飾タンパク質ネオクリンの発現生産、中島、阿部、北本、醸造協会誌、103、586-593 (2008)