

《農芸化学奨励賞》



麴菌酵素の O-結合型糖鎖機能と糖鎖合成機構

九州大学大学院農学研究院生物機能科学部門 助手 後藤 正利

麴菌はその安全性および高い酵素生産性の観点から我が国で盛んに利用されている重要な微生物である。麴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、外来遺伝子の発現宿主菌としても期待されている。タンパク質の分泌過程では小胞体、ゴルジへの移行が必要であり、この移行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、局在性および分泌効率に関与することが明らかになってきた。筆者らは先に黒麴菌 *A. awamori* の産生するグルコアミラーゼの糖鎖機能の解明を行ってきたが、糸状菌においては O-結合型糖鎖合成機構に関する知見がなく、新たに麴菌における O-結合型糖鎖合成機構の解明を目指し研究を開始した。本講では、麴菌グルコアミラーゼ (GAI) の O-結合型糖鎖の機能と麴菌における O-結合型糖鎖の合成機構について紹介したい。

1. 麴菌グルコアミラーゼの O-結合型糖鎖機能

黒麴菌が培地中へ分泌する GAI は、N 末端の可溶性デンブロン基質を加水分解する触媒ドメイン (A¹-V⁴⁶⁹)、構成 45 アミノ酸残基のうち 30 アミノ酸残基が Ser および Thr からなる糖鎖結合ドメイン (Gp-I: A⁴⁷⁰-V⁵¹⁴)、そして C 末端の生デンブロン吸着ドメイン (A⁵¹⁵-R⁶¹⁵) からなる。Gp-I の Ser/Thr 配列には O-型で主にマンノース 1~3 残基からなる糖鎖が高度に結合している。筆者らは Gp-I 配列に変異をもつ種々の変異型 GA を構築し、酵母菌や黒麴菌で発現させ変異型 GA の分泌を調べた。その結果、Gp-I を 36 アミノ酸残基以上欠失した GA は分泌不能となり、細胞内にて速やかに分解されることを見いだした。分泌不能な変異型 GA を発現させた際に、分泌タンパク質の品質管理にかかわる小胞体シャペロン Bip の転写誘導が特異的に起こることから、Gp-I 欠失により GA の分泌過程での折りたたみが正しく行われていないことが示された。したがって、Gp-I は複数のドメインからなる GAI の両末端ドメインをそれぞれ正確に折りたたませ、活性な GAI として分泌をもたらす役割がある。また、Gp-I を一部欠失した変異型 GA は生デンブロン分解活性と酵素安定性が低下し、Gp-I を二つタンデムにもつ変異型 GA においては同分解活性と同安定性が強化された。また酵母や黒麴菌の O-結合型糖鎖合成変異株において GAI 遺伝子を発現させ、糖鎖量の減少した GA を分泌させた。N-結合型糖鎖とは異なり O-結合型糖鎖は GAI の分泌には関係なく、酵素の安定性と生デンブロン分解性に関与することが明らかになった。

2. 麴菌の O-結合型糖鎖合成反応

O-結合型糖鎖は N-結合型糖鎖とは異なり、起源生物により付加される糖の組成や構造が大きく異なる。真菌類の O-結合型糖鎖は出芽酵母では直鎖状で 1~5 残基からなるマンノース鎖、*Aspergillus* 属糸状菌では 1~3 残基からなる直鎖状および分岐したマンノース鎖や、量比は低いがグルコース、ガラクト

ースも構成糖として含むことが知られている。麴菌の糖タンパク質糖鎖の合成機構とその機能を明らかにするため、麴菌類緑菌である *A. nidulans* の O-結合型糖鎖合成機構の解明を試みた。まず、*A. nidulans* の O-結合型糖鎖合成の初発反応 (Ser/Thr + Dol-P-Mannose → Ser/Thr-Mannose + Dol-P) を触媒する protein: O-D-mannosyltransferase (Pmt) をクローン化し、3 種の *pmt* 遺伝子 (*pmtA*, *pmtB*, *pmtC*) の構造を明らかにした。*pmtA*, *pmtB*, *pmtC* 遺伝子は構造予測から、小胞体局在の膜タンパク質であると推定された。*A. nidulans* において *pmtA*, *pmtB*, *pmtC* は菌の生育に伴って、いずれも一定量発現していることから、菌糸の伸長に重要であることが示唆された。

さらに、PMT による糖鎖合成反応に続く糖転移反応を触媒する α -マンノシルトランスフェラーゼおよび α -ガラクトシルトランスフェラーゼをコードすると推定される各々 3 種の *mnt* 遺伝子 (*mntA*, *mntB*, *mntC*)、2 種の *gct* 遺伝子 (*gctA*, *gctB*) をクローン化し、その構造を明らかにした。*mnt* および *gct* 遺伝子群はいずれも II 型の膜タンパク質構造を形成し、ゴルジ体に局在するものと推定された。*mntA*, *mntC* は培養前期から一定量発現するのに対し、*mntB* は培養後期およびストレス条件下で発現しており、生理的な役割の違いが示唆された。*gctA* および *gctB* は発現量が低いが、構成的に発現していた。

3. *pmtA* 遺伝子の機能

A. nidulans の *pmtA* 遺伝子を相同組換え法により破壊した *pmtA* 破壊株を構築し、同遺伝子の機能解析を行った。*pmtA* 破壊株では、*in vitro* での Pmt 活性が親株と比べ約 6% にまで低下した。また、*pmtA* 破壊株のコロニーサイズは親株に比べ約 40% へ低下し、分生子数も親株に比べ約 20% 程度まで減少した。また、破壊株では菌糸の途中が膨らむ異常な菌糸構造が観察され、菌糸の隔壁間に存在する核の倍化が起こっていた。さらに破壊株では細胞壁結合性色素に対する感受性の増加などの多様な表現形の変化が認められた。細胞壁の成分を調べた結果、*pmtA* 破壊株では、細胞壁の基本骨格をなす β -1,3/1,6-グルカンの量が親株に比べ減少しており、対照的に骨格間を埋める役目をなす α -グルカンの量が増加していた。すなわち、破壊株の細胞壁は弱体化しており、*pmtA* が正常な細胞壁構造形成に必須であることが明らかになった。さらに、二次元電気泳動解析による野生株と *pmtA* 破壊株のタンパク質プロファイルと比較した。両菌株間において、特に細胞膜、細胞壁に存在するタンパク質プロファイルに相違が見られた。PmtA は分泌タンパク質のみならず、マンノシル化反応の基質である細胞膜・細胞壁タンパク質の活性、安定性、あるいは局在性に重要な役割を演じていることが示唆される (図 1)。*pmtA* 遺伝子破壊による異常な表現型は高浸透圧培地の使用により回避できることや、破壊株では細胞壁中のキチン含量が増加することから、PmtA

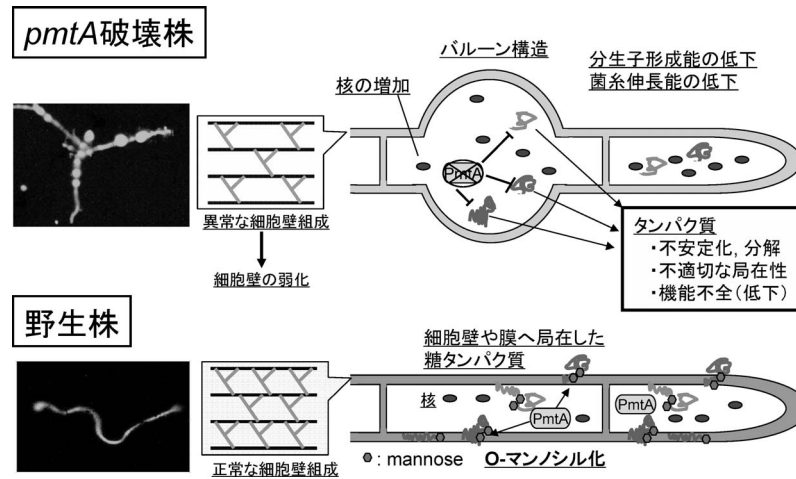


図1 PmtAによるO-マンノシル化によって制御される麹菌の生育

がマンノース化する標的タンパク質の一つとして cell wall integrity mechanism に関与するタンパク質の存在が推察される。

一方、実用菌株である黒麹菌 *A. awamori* においても *pmtA* 遺伝子を単離し、その遺伝子破壊株を構築した。*A. awamori pmtA* 遺伝子は *A. nidulans pmtA* 遺伝子破壊株同様、多様な表現型の変化が認められたが、その菌糸伸長能や分生子形成能はより劇的に低下した。*A. awamori pmtA* 破壊株で分泌される GAI の O-結合型糖鎖量は著しく減少し（33 マンノース相当分の減少）、PmtA が GAI の O-結合型糖鎖付加に関与していることを実証した。また、GAI 生産用液体培地での *pmtA* 破壊株の GAI 分泌量は野生株のものと大差なく、GAI については PmtA が関与する O-型結合糖鎖は分泌には重要ではないことを明らかにした。

おわりに

糖鎖はタンパク質の親水化による高次構造維持、安定化、シャペロン機能、分泌・局在化シグナル、細胞認識などの役割を果たすことが知られており、その重要性が指摘されている。しかし、麹菌での糖鎖の機能解明やリモデリングはいまだ発展の途にある。本研究では、麹菌の O-結合型糖鎖合成機構に関する知見と、O-結合型糖鎖付加が、形態変化を行う糸状菌細胞の成長をいかに制御しているのかを解明してきた。黒麹菌 *pmtA* 破壊株は、液体培地でのタンパク質分泌能は維持されており、低

糖鎖タンパク質の発現宿主や O-結合型糖鎖リモデリング用の宿主としての利用が期待される。

本研究は九州大学大学院農学研究院生物機能科学部門応用微生物学講座発酵化学分野で行われたものであります。麹菌を対象とした本研究を遂行する機会を与えていただき、終始ご指導ご激励を賜りました九州大学大学院農学研究院発酵化学分野教授 古川謙介先生に深甚なる感謝の意を表します。また、つねにご助言とご激励を賜りました九州大学大学院農学研究院発酵化学分野の吉野貞蔵博士、南里信也博士に深く感謝いたします。本研究成果は発酵化学分野で学んだ大学院生や学生の多大なる努力の賜物であり、卒業生、在校生に心から感謝申し上げます。特に、産業技術総合研究所の岡 拓二博士、大阪大学の鮫島結香博士、崇城大学の浴野圭輔博士、Il Kwon 博士には多大なる貢献をいただき、深く感謝申し上げます。本研究を開始するきっかけと多大なご指導を賜りました九州大学名誉教授の恩師 林田晋策先生に深甚なる感謝の意を表します。本研究進行上、ご助言ご激励を賜りました九州大学名誉教授・崇城大学教授の緒方靖哉先生に心から感謝申し上げます。また、貴重な研究経験を賜りましたイリノイ大学 Ananda M. Chakrabarty 先生に深く感謝申し上げます。最後に本奨励賞にご推薦くださいました九州大学大学院農学研究院微生物工学分野教授の園元謙二先生に厚く御礼申し上げます。