

真菌における膜交通に関する分子細胞生理学研究



九州大学大学院農学研究院 樋口 裕次郎

はじめに

真核生物において、細胞内タンパク質の局在化や分泌タンパク質の輸送には、小胞輸送経路を含む膜交通(メンブレントラフィック)が関与している。真核微生物である真菌、酵母と糸状菌における膜交通の分子機構については、これまで主に酵母において解析が進んできた。酵母は単細胞である一方、糸状菌は多細胞であり、先端生長をする菌糸先端細胞でのタンパク質の輸送には、糸状菌特有な分子機構が関与していると考えられるが、未解明な点も多い。私はこれまでに、黄麹菌、黒穂菌および分裂酵母を用いて、以下に示すような膜交通に関与する分子及び生理機構に関する研究を行ってきた。

1. 黄麹菌におけるエンドサイトーシスの分子機構解析

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* は、2006年の日本醸造学会大会にて“国菌”に認定されており、日本において古くから発酵・醸造産業に用いられてきた微生物であり、高い安全性でアミラーゼなどの有用タンパク質を菌体外に大量に分泌する能力を持つ。エンドサイトーシスは、外界や細胞膜から物質を取り込む膜交通における一部であり、真核生物に広く保存された機構である。しかし、黄麹菌を含む糸状菌においてはエンドサイトーシスの明確な指標が存在しなかったために、その詳細な機構や生理的意義に関する解析は行われていなかった。そこで、細胞膜のプリントランスポーターとEGFPとの融合タンパク質を取り込みの指標とすることでエンドサイトーシスを可視化し、解析する実験系を構築した。

次に、黄麹菌の菌糸先端部では、大規模なタンパク質分泌と相補的なエンドサイトーシスも活発に起こっていると予想し、分泌に関与するv-SNAREのAoSnc1を用いて、エンドサイトーシスによるリサイクリングの可視化を試みた。FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching; 光退色後蛍光

回復)解析により、AoSnc1は主に菌糸先端の分泌小胞の集合体であるスピッツエンケルパーに局在し、菌糸先端部をリサイクリングすることが示唆された。そして、黄麹菌の大規模な分泌を可能にするのが、菌糸先端部のエンドサイトーシスによるリサイクリングであると推測された(図1)。

さらに、エンドサイトーシス関連タンパク質であるAoAbp1をbaitにしたyeast two-hybridスクリーニングにより、新規エンドサイトーシス関連因子の探索を行った。その結果、*aipA~D* (AoAbp1 interacting protein)を見出した。AipAはAAA (ATPases associated with diverse cellular activities) ATPase様タンパク質であり、エンドサイトーシス関連因子をエンドサイトーシス小胞から細胞質へとリサイクリングするのに機能していると推測された。

2. 黒穂菌と黄麹菌における初期エンドソーム動態の解析

エンドサイトーシス経路のオルガネラである初期エンドソームは広く真核生物において、微小管・モータータンパク質系のはたらきにより、2~3 $\mu\text{m}/\text{sec}$ で恒常的な長距離動態を示す。しかしこれまでに、そうした初期エンドソーム動態の分子メカニズムは比較的良く研究されてきたが、動態を示す必然性といった生理的意義に関してはあまり理解が進んでいなかった。そこで、初期エンドソーム動態の生理的意義に関する研究を、その分子メカニズムが良く研究されている植物病原性モデル糸状菌である黒穂菌 *Ustilago maydis* を用いて行った。まず、RNA結合タンパク質Rrm4が初期エンドソーム上に局在し、mRNAとともに動態を示すことに着目し、細胞質リボソームが同様に動態を示すと予想した。リボソームタンパク質であるRps3とRpl25にそれぞれmCherryとGFPをラベルし、FRAPによる生細胞観察により、リボソームが初期エンドソームおよびRrm4と共に動態を示すことを明らかにした。また、リボソームが動態を示す際に、ポリソームを形成しタンパク質翻訳を行っていることを示した。さらに、初期エンドソーム動態を欠損した細胞を用いることで、初期エンドソーム動態がリボソームの細部内分布に重要な役割を果たすことを明らかにした(図2)。

また、植物感染時の *U. maydis* における初期エンドソーム動態の寄与に関して解析を行った。植物病原菌は、エフェクターと呼ばれるタンパク質を感染時特異的に発現して分泌することにより、植物の免疫システムを抑制する。 *U. maydis* の植物感染時には、エフェクター遺伝子の発現調節のため、菌糸先端と核との間で動態を示す初期エンドソームが情報伝達を担っていると予想した。そこで、他の細胞内輸送経路に影響を及ぼさずに、初期エンドソームの動態を特異的に阻害すると、エフェクター遺伝子の発現が抑制され、またそれに対応してエフェクタータンパク質の植物細胞への分泌量の低下が確認され

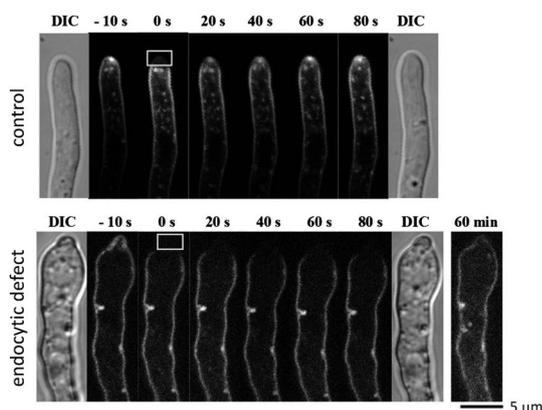


図1. 黄麹菌の菌糸先端部におけるエンドサイトーシスによるリサイクリング

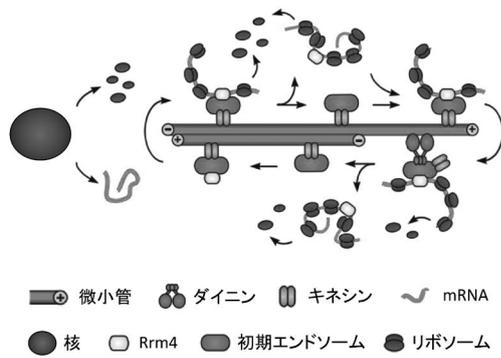


図2. 初期エンドソーム動態によるリボソーム輸送

た。これにより、植物感染する際に、初期エンドソームの動態がエフェクター遺伝子の発現レベルにおいて重要であることを明らかにした。

さらに黄麹菌において、初期エンドソーム動態の生理的意義に関して解析した。初期エンドソームとモータータンパク質のリンカータンパク質をコードする *Aohok1* の破壊株では、初期エンドソーム動態が見られなくなった。菌糸先端の分泌小胞の集合体スピッツェンケルパーを観察すると、*Aohok1* 破壊株では分泌小胞が菌糸先端へ集積されず細胞内分布に異常が見られ、実際に主要な分泌タンパク質である α -アミラーゼの分泌量が有意に減少していた。さらに *Aohok1* 破壊株では、気中菌糸形成が促進するものの無性孢子である分生子形成能が低下することも示され、初期エンドソーム動態が α -アミラーゼの分泌および細胞の分化に関与することを明らかにした。

3. 分裂酵母由来ピルビン酸転移酵素と糖鎖工学解析

膜交通に関連した糖鎖修飾制御は、細胞の様々な生理機能において重要な機構である。分裂酵母の Pvg1 はピルビン酸転移酵素であり、細胞表面の糖鎖末端にピルビン酸を付加することで細胞表面を負電荷にし、細胞間認識に重要な役割を果たす。しかし、糖鎖のピルビン酸化機構の詳細は真核生物において未解明であった。そこで、Pvg1 の立体構造解析を行い、その情報を基に基質特異性を変化させ、新奇ヒト型糖鎖合成に成功した。このピルビン酸含有新奇糖鎖は、ヒトが作るシアル酸含有糖鎖と類似した性質を持ち、ピルビン酸含有糖鎖のバイオ医薬品への応用の可能性が示唆された(図3)。さらに、ピルビン酸化ガラクトース切断酵素を同定し、結晶構造解析によりその基質特異性に関して明らかにした。

近年製造されるバイオ医薬品の多くは糖タンパク質であるが、細胞から作られる糖タンパク質糖鎖構造は不均一であることが多く、薬効の不安定性につながる。そこで、糖タンパク質から不均一な糖鎖を切り出し、均一な構造の糖鎖に置換する効率的な方法を開発した。まず、糖タンパク質から *N*-型糖鎖を末端の *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) 1分子を残して切り出す *Endo- β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ (ENGase)* を *Coprinosia cinerea* から見出し、Endo-CC と名付けた。そして Endo-CC により、一度 GlcNAc-タンパク質を調製した後、Endo-CC^{N180H} 変異体とオキサゾリン糖を用いた糖転移反応により、高効率に均一糖鎖含有糖タンパク質を調製することに成功した。さらに、黄麹菌のゴルジ体において ENGase である EndoT を発現させることにより、GlcNAc-タンパク質を分泌生産することにも成功した。

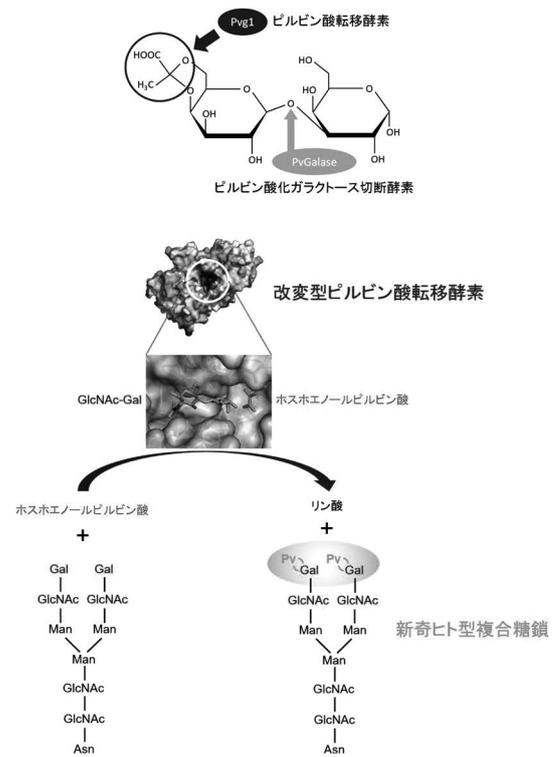


図3. ピルビン酸糖鎖関連酵素と糖鎖改変

おわりに

本研究では、真菌の膜交通に関連した解析により、初期エンドソーム動態の意義といった、真核生物ならではの分子生理機構を明らかにしてきた。また、真菌における糖鎖関連酵素や糖タンパク質糖鎖に着目し、糖鎖構造の改変技術を構築した。今後も基礎と応用の両面からのアプローチによって、農芸化学における本研究領域を推進していきたい。

謝辞 本奨励賞に御推薦賜りました、日本農芸化学会西日本支部長で九州大学大学院農学研究院教授の酒井謙二先生に御礼申し上げます。本研究は、東京大学大学院農学生命科学研究科微生物学研究室、英国エクセター大学バイオサイエンス学科、そして現所属である九州大学大学院農学研究院発酵化学研究室において行われたものです。学生時代から現在に至るまで御指導を賜りました、東京大学大学院農学生命科学研究科名誉教授(現日本薬科大学特任教授)北本勝ひこ先生に篤く御礼申し上げます。また、御指導いただきました東京大学大学院農学生命科学研究科准教授の有岡学先生、同特任准教授の丸山潤一先生、同教授の伏信進矢先生に御礼申し上げます。博士研究員時代にお世話になりましたエクセター大学 Gero Steinberg 教授に感謝致します。着任以来、酵母・糖鎖研究において御指導いただきました九州大学大学院農学研究院教授の竹川薫先生、麹菌研究において御指導いただきました佐賀大学農学部教授の後藤正利先生に御礼申し上げます。また、共同研究で大変お世話になりました九州大学大学院農学研究院教授の片倉喜範先生、同教授の角田佳充先生、そして研究員や学生の皆さんに御礼申し上げます。さらに、西日本支部におきましては庶務幹事を務めさせていただき、多くの先生方に御指導いただきましたことに深く御礼申し上げます。最後に、これまでの研究生生活を理解し支えてくれた家族、親族に心より感謝致します。