

麹菌による有用タンパク質高生産を目指した転写および転写後発現制御機構の解析



東京農工大学大学院農学研究院 田中 瑞己

はじめに

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* (以後、麹菌と表記する) は、アミラーゼなどの加水分解酵素を大量に分泌生産する糸状菌であり、我が国の発酵食品の醸造に用いられている。さらに、アミラーゼ遺伝子のプロモーターを用いて目的遺伝子を高発現させることにより、食品加工に利用される酵素タンパク質や異種タンパク質の生産宿主としても利用されている。我々は、麹菌による有用タンパク質生産の高生産化への応用を目指し、麹菌がタンパク質を高生産する際の転写および転写後発現制御機構を分子生物学的手法によって解析した。以下、その概要について紹介する。

1. アミラーゼ遺伝子の発現誘導機構の解析

1-1. アミラーゼ遺伝子発現の分子機構の解析

麹菌のアミラーゼ遺伝子の発現はマルトースが存在すると誘導され、2つの $Zn(II)_2Cys_6$ 型転写因子 (AmyR, MalR) が発現誘導に関与することが知られていたが、詳細な分子機構は不明であった。これらの転写因子の活性化機構を解析した結果、アミラーゼ遺伝子のプロモーター領域に結合して発現を誘導する AmyR は、活性化条件において細胞質から核内に移行し、マルトースよりもイソマルトースによってより迅速に活性化されることが明らかになった。一方、マルトーストランスポーター遺伝子 (*malP*) と細胞内マルターゼ遺伝子 (*malT*) の発現を制御する MalR は、マルトースの有無に関わらず恒常的に核内に存在し、マルトース存在時には AmyR に先行して活性化することが明らかになった¹⁾。また、イソマルトース存在時には MalR が活性化せず、アミラーゼ遺伝子発現誘導に関与しないことが明らかになった¹⁾。さらに、MalP がマルトースを取り込む主要なトランスポーターであること²⁾、MalT がマルトースをイソマルトースに変換する糖転移活性を有することが明らかになり³⁾、いずれもマルトースによるアミラーゼ発現誘導に必要であることが示された。以上の結果から、MalR が先行して活性化することによってマルトースの取り込みとイソマルトースへの変換が行われ、イソマルトースの生成によって AmyR が核移行することでアミラーゼ遺伝子の発現が誘導されること明らかになった (図1)。

1-2. 固体培養特異的な発現を制御する転写因子の同定

麹菌は液体培養時よりも固体培養時において分泌酵素を大量に生産し、グルコアミラーゼ (*glaB*) をはじめとする一部の酵素遺伝子は、固体培養において特異的に発現が誘導されることが知られている。しかし、固体培養特異的な遺伝子発現を制御する転写因子は不明であった。そこで、*GlaB* の生産を簡便に評価できる方法を構築し、公益財団法人野田産業科学研究所によって作製された麹菌の転写因子破壊株ライブラリーから *glaB* の発現制御に関わる転写因子のスクリーニングを行った。

その結果、分子生形成の制御因子として同定されていた C_2H_2 型転写因子 FlbC が、*glaB* やプロテアーゼ遺伝子の固体培養特異的な遺伝子発現を制御していることが明らかとなった⁴⁾。

2. カーボンカタボライト抑制制御機構の解析と酵素タンパク質生産への応用

糸状菌の加水分解酵素遺伝子の発現は、グルコースが存在するとカーボンカタボライト抑制 (CCR) によって抑制される。CCR の制御に関与する因子として、モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* において 1970 年代に 4 つの主要な因子 (CreA, CreB, CreC, CreD) が同定されているが、詳細な分子機構は明らかとなっていなかった。我々は、CCR を制御する転写因子である CreA の解析を麹菌で行い、アミラーゼ遺伝子発現誘導条件において CreA が核内から細胞質に移行して分解され、この分解

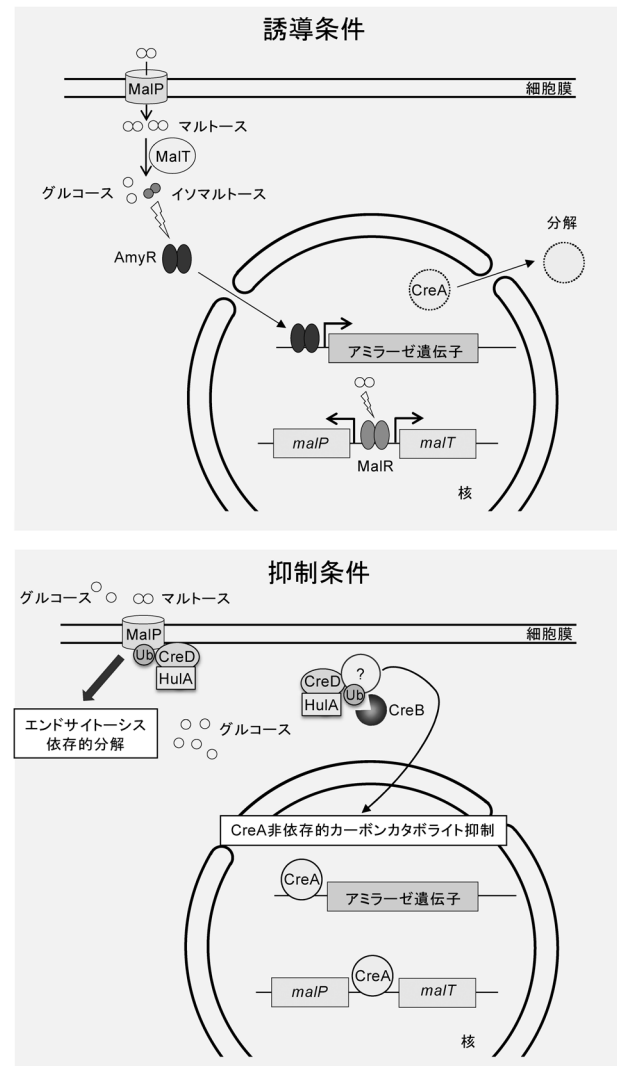


図1. 麹菌におけるアミラーゼ遺伝子の発現制御機構

にCreAのC末端領域が重要であることを明らかとした⁵⁾。また、脱ユビキチン化酵素遺伝子である*creB*と*creA*を二重破壊することにより、アミラーゼの生産量が10倍以上に増加し⁶⁾、キシラナーゼや β -グルコシダーゼの生産量も増加することを明らかとした⁷⁾。さらに、ユビキチンリガーゼアダプターとして働くアレスチン様タンパク質CreDのリン酸化部位を同定し、CreDの非リン酸化変異と*creB*の破壊を組み合わせることでCCRの解除が促進され、アミラーゼ生産量が増加することを明らかとした⁸⁾。

3. 加水分解酵素遺伝子の発現制御に関与するトランスポーターの解析

アミラーゼ遺伝子の発現に必要なMalPの細胞内局在解析を行い、CCR誘導条件においてエンドサイトーシス依存的にMalPが細胞膜から液胞に輸送され、分解されることを明らかとした²⁾。さらに、このエンドサイトーシスにCreDとユビキチンリガーゼHulAが必要であることを明らかとした⁸⁾。

麹菌のプロテアーゼ遺伝子の発現誘導にはペプチド類が関与すると予想されているが、その取り込みに関与するトランスポーターは不明であった。そこで、ジ・トリペプチドの取り込みに関与するトランスポーターを探索し、3つのトランスポーターを同定した⁹⁾。

4. 異種遺伝子由来の転写産物の分解機構の解析

異種遺伝子のコドン宿主生物の使用コドンに合わせて発現させるコドン最適化は、翻訳効率を改善することで異種タンパク質の生産量を向上させると考えられている。一方、糸状菌においては、異種遺伝子の転写産物量がコドン最適化によって増加することが報告されている。麹菌において異種遺伝子の転写産物の解析を行った結果、コドンを最適化していない異種遺伝子を発現させた場合には、転写が遺伝子コード領域内で終結した異常な転写産物が生じ、速やかに分解されることが明らかとなった^{10, 11)}。また、転写終結に関与する配列(3'-end processing signal)の解析を行い、異種遺伝子内に存在するAT-richな配列が3'-end processing signalとして機能し、コドンを最適化することでこれらのAT-richな配列が結果的に除かれることを明らかとした¹²⁾。これらの結果から、糸状菌においてコドン最適化によって転写産物量が増加する機構の一端が初めて明らかとなった(図2)。

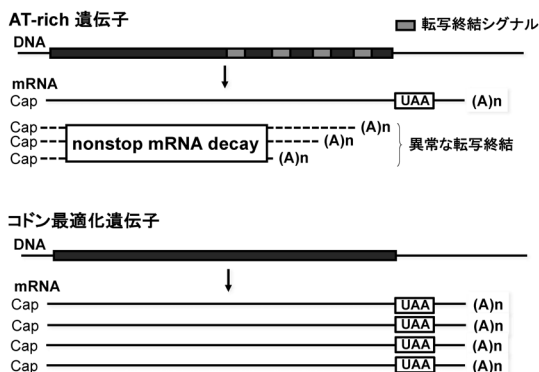


図2. 麹菌において異種遺伝子由来の転写産物量がコドン最適化によって増加する機構

5. タンパク質高生産により誘導される小胞体ストレス応答の解析

真核生物は、折り畳みに失敗したタンパク質が小胞体内に蓄積するのを防ぐため、Unfolded protein response (UPR) と呼ばれる小胞体ストレス応答機構を備えている。我々は、麹菌においてアミラーゼ生産によって生理的条件下でUPRが誘導され、アミラーゼ生産条件において麹菌が生育するためにUPRが必須であることを明らかにした¹³⁾。また、アミラーゼの生産だけでなく、構造が不安定なタンパク質を高発現させることによってもUPRが誘導されることが明らかとなった¹⁴⁾。これらの結果から、麹菌におけるタンパク質の高生産において小胞体ストレス応答機構が重要な役割を担っていることが明らかとなった。

おわりに

本研究により、麹菌がアミラーゼをはじめとするタンパク質を高生産する際の遺伝子発現制御機構と細胞応答機構の一端が明らかとなってきた。一方で、研究を進めるにつれて、麹菌が我々の想像を遥かに超える巧妙な制御機構を有していることも明らかになり、未解明な部分が数多く残されている。本研究をさらに発展させ、「麹菌はなぜタンパク質を高生産できるのか?」という問いの答えを見つけることで、麹菌が持つタンパク質生産能力を最大限に引き出したいと考えている。

(引用文献)

- 1) Suzuki K et al, *Appl Microbiol Biotechnol*, 99: 1805-1815, 2015.
- 2) Hiramoto T et al, *Fungal Genet Biol*, 82: 136-144, 2015.
- 3) Ichikawa T et al, *Biosci Biotechnol Biochem*, 85: 2076-2083, 2021.
- 4) Tanaka M et al, *Appl Microbiol Biotechnol*, 100: 5859-5868, 2016.
- 5) Tanaka M et al, *Mol Microbiol*, 110: 176-190, 2018.
- 6) Ichinose S et al, *Appl Microbiol Biotechnol*, 98: 335-243, 2014.
- 7) Ichinose S et al, *J Biosci Bioeng*, 125: 141-147, 2018.
- 8) Tanaka M et al, *Appl Environ Microbiol*, 83: e00592-17, 2017.
- 9) Tanaka M et al, *Biosci Biotechnol Biochem*, 85: 452-463, 2021.
- 10) Tokuoka M et al, *Appl Environ Microbiol*, 74: 6538-6546, 2008.
- 11) Tanaka M et al, *Appl Microbiol Biotechnol*, 96: 1275-1282, 2012.
- 12) Tanaka M et al, *DNA Res*, 18: 189-200, 2011.
- 13) Tanaka M et al, *Fungal Genet Biol*, 85: 1-6, 2015.
- 14) Yokota JI et al, *Appl Microbiol Biotechnol*, 101: 2437-2446, 2017.

謝辞 本研究は、東北大学大学院農学研究科・遺伝子情報システム学分野と静岡県立大学食品栄養科学部・生物分子工学研究室で行われたものです。学生時代から今日に至るまでご指導ご鞭撻を賜った東北大学教授・五味勝也先生に心から感謝申し上げます。また、多大なご助言を賜った東北大学教授・新谷尚弘先生、自由に研究をする環境をいただきました静岡県立大学准教授・河原崎泰昌先生に心から感謝申し上げます。さらに、共同研究において多大なサポートをいただきました多くの先生方に心から感謝申し上げます。遺伝子情報システム学分野の先輩であり、数多くの助言を賜った東京農業大学准教授・徳岡昌文先生に心から感謝申し上げます。また、本研究の遂行に尽力いただいた学生の皆さんに深く感謝いたします。