

麹菌のポストゲノム研究の展開： 糸状菌に特異な機能未知遺伝子を探る

後藤 正利^{1*}・岩下 和裕²

麹菌は酒類、味噌、醤油などの製造、すなわち我が国の食文化を支える発酵食品の生産に必須な微生物である。麹菌 *Aspergillus oryzae*, *A. sojae*, *A. awamori* はこれらの伝統的醸造産業での利用のほか、酵素生産菌としても活躍していることは多くの読者の知るところである。麹菌が強力な菌体外酵素生産能を示すことから、外来遺伝子の発現分泌宿主菌としても注目を浴びている。一方、*Aspergillus* 属糸状菌には麹菌の他にも、食品衛生、医療分野でも関心の高いアフラトキシン毒素生産菌 *A. flavus*, *A. parastictus*, 病原性菌 *A. fumigatus*, そしてモデル菌 *A. nidulans* などが含まれる。これらの *Aspergillus* 属糸状菌と我々は、筆者らの観点からすると互いに善・悪の相互作用を行っていると言える。したがって、*Aspergillus* 属糸状菌をよく理解することで、伝統的醸造産業において製品の多様化や改良、機能性の付与を目的とした菌株の育種、ならびに医療分野では病原性や毒素生産性の抑制、抗真菌剤の開発などが期待できる。これらの代表的な *Aspergillus* 属糸状菌のゲノム解析はすでに終了している。今後は、その情報を活用して、生物資源である *Aspergillus* 属糸状菌を産業界にフィードバックできるか否かが問われている。本稿では、筆者らの *Aspergillus* 属糸状菌を対象としたゲノム情報を活用した、糸状菌の特異な機能未知遺伝子の機能解析について紹介する。

糸状菌の特異な糖鎖合成系

麹菌の特徴の一つは高いタンパク質分泌生産性にある。麹菌で外来遺伝子を高分泌生産させる場合には、発現遺伝子コピー数の増加、強力なプロモーター支配下による発現 mRNA 量の増加¹⁾、mRNA の安定化²⁾、プロテアーゼ低産生株の宿主利用³⁾などの戦略がとられる。また、分泌タンパク質は分泌過程で N-結合型糖鎖修飾あるいは O-結合型糖鎖修飾される。特に N-結合型糖鎖修飾は、小胞体内での分泌タンパク質の品質管理に重要であり、大量な活性タンパク質の分泌生産に不可欠である。一方、タンパク質の Ser/Thr 残基に糖が結合した O-結合型糖鎖修飾については、分泌に及ぼす影響はよくわかっていない。O-結合型糖鎖修飾は N-結合型糖鎖修飾の

ような明確な糖鎖結合アミノ酸モチーフ (Asn-X-Ser/Thr) は認められず、由来生物種によって構成糖やその結合様式がきわめて多様で、*Aspergillus* 属糸状菌には特異な糖鎖が存在する。これらの O-結合型糖鎖は、小胞体にてドリコール-リン酸-マンノースを糖供与体としてマンノースを Ser/Thr に付加する protein O-mannosyltransferase (PMT), さらにゴルジ体にて 2-3 残基目の糖を付加する糖転移酵素群による酵素反応によって合成される⁴⁾。

筆者らは、*Saccharomyces cerevisiae* と *Aspergillus* 属糸状菌の比較ゲノム解析により O-結合型糖鎖修飾に関与する糖転移酵素遺伝子群を見いだした。酵母では 3 つの PMT subfamily に分類される計 7 種の PMT 遺伝子が存在するのに対し、*Aspergillus* 属糸状菌には各 PMT subfamily に 1 つずつ計 3 つの *pmt* が存在する。*A. nidulans* での *pmt* 遺伝子破壊株の表現型解析の結果、各 *Pmt* はそれぞれ異なる基質特異性を有していること、O-結合型糖鎖修飾が糸状菌の形態形成や分化に重要な役割を演じることを明らかにした^{5,6)}。黒麹菌 *A. awamori* の *pmtA* 破壊株は、異常な膨潤した菌糸形態となり、低浸透圧条件下では生育が著しく抑制される。黒麹菌が多量に分泌するグルコアミラーゼ (GA) は N-結合型糖鎖および著量の O-結合型糖鎖を有する。黒麹菌 *pmtA* 破壊株では、O-結合型糖鎖量の減少した GA を野生株と同程度分泌する。GA の N-結合型糖鎖はタンパク質の分泌過程において品質管理に関与して、安定なタンパク質分泌に寄与することが知られているが、GA の O-結合型糖鎖は分泌には影響しないことが明らかになった⁷⁾。しかし、糸状菌の各 *pmt* 破壊株は上記のように異常な表現型を示すことから、本来 O-結合型糖鎖を保有している菌体内分泌タンパク質によっては、糖鎖修飾が自身の機能発現に影響を及ぼしているものと推察される。酵母菌での *Pmt* の基質タンパク質の情報から、糸状菌で機能同定されていない推定糖タンパク質をゲノム情報から見いだした。*S. cerevisiae* の WSC タンパク質は細胞膜に局在する N- および O-結合型糖鎖を有する糖タンパク質で、熱や細胞壁へのストレスをセンシングする。酵母では O-結合型糖鎖の欠如により、同タンパク質の安定性が低下し、膜への局在が妨げられる。糸状菌においては *Wsc* は機

* 著者紹介 ¹九州大学大学院農学研究院生命機能科学部門 (准教授) E-mail: mgoto@brs.kyushu-u.ac.jp

²酒類総合研究所

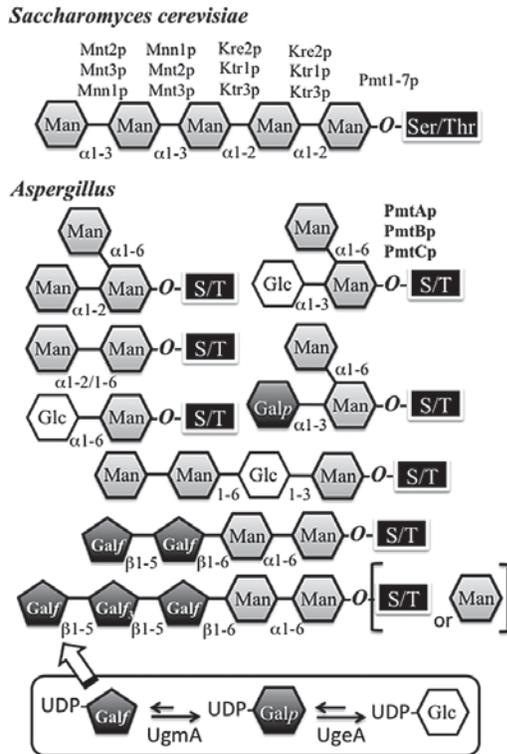


図1. *Aspergillus* 属糸状菌のO-結合型糖鎖

能同定されていない。そこで *A. nidulans* のゲノム情報から *wscA* および *wscB* を見いだした。酵母とは異なり *wscA* は、熱や細胞壁合成阻害剤によるストレスには関与しないが、低浸透圧ストレスに関与していた。 *wscA* 破壊株は低浸透圧条件下で生育が抑制され、菌糸の一部が膨潤した形態を示し、 *pmtA* や *pmtC* 破壊株の表現型の一部と一致した。また、 *WscA* は *pmtA* と *pmtC* 破壊株では分解される。したがって、O-結合型糖鎖修飾は、プロテアーゼに対する分泌タンパク質の安定性に寄与することで、糖タンパク質の正常な機能を維持し、糸状菌に正常な生育を行わせる。

Aspergillus 属糸状菌のO-結合型糖鎖には、Pmtによるマンノースの付加に続き、おもにマンノース、微量のガラクトピラノースやグルコースが付加している(図1)。これら2糖目の糖転移反応については、出芽酵母の *ScKRE2* がコードする α -1,2-mannosyltransferase (Mnt) や、分裂酵母の *gml2* がコードする α -1,2-galactosyltransferase (Gct) がよく知られている^{8,9)}。 *Aspergillus* 属糸状菌のゲノム上には、少なくとも3種の *mnt* 遺伝子、3種の *gct* と推定される遺伝子が存在する。 *A. nidulans* の3種 *gct* 破壊株はいずれも表現型を示さないが、 *mnt* 破壊株のうち *mntA* および *mntC* 破壊株はきわめて生育が遅く、細胞

は糸状形態ではなく丸く膨潤した異常形態となる。Mntは糸状菌にとって重要な働きを持つが、Mntの基質特異性については、未だ明らかではない。

いくつかの *Aspergillus* 属糸状菌 (*A. fumigatus*, *A. niger*, *A. saitoi*, *A. nidulans*) の細胞壁の構成糖、あるいは糖タンパク質のN-結合型糖鎖やO-結合型糖鎖の非還元末端には α 1,3-(N-結合型糖鎖)、 β 1,5-, β 1,6-結合によって特異なガラクトフラノース (Gal) が付加していることが報告されている^{4,10)}。 *A. fumigatus* による研究結果から、Galは強力な免疫原性を示すことが知られている。したがって *Aspergillus* 属糸状菌による医薬用組換えタンパク質の分泌生産には、Gal付加されないように宿主を改良するか、あるいは生産後にGal糖鎖を除去する必要がある。Galを除去する β -galactofuranosidase は *A. niger* で酵素の精製まで行われているが、遺伝子の同定までには至っていない¹¹⁾。比較ゲノムの手法を用いても β -galactofuranosidase を見いだすことはできない。糸状菌の場合、Gal糖鎖はUDP-Galを糖供与体として、マンノース糖鎖の非還元末端にGalを転移する反応によって合成されると推定されている。Gal転移酵素は結核菌など一部の細菌において同定されているが、細菌の β -1,5/1,6-Gal転移酵素¹²⁾ と相同性を示すGal転移酵素は、現在のところ多様なゲノム情報が公開されているにもかかわらず、真核生物では見いだせない。しかし、 *A. nidulans*, *A. fumigatus* や *A. niger* では、Gal転移酵素の基質であるUDP-Galの合成に関与するUDP-4-glucose epimerase (*ugeA*) やUDP-galactopyranosyl mutase (*ugmA*) 遺伝子が同定されている(図1)。これらの遺伝子の破壊によって、完全にGal糖鎖が失われ、著しく菌の生育が抑制される¹³⁻¹⁵⁾。したがってGal糖鎖合成を阻害する物質は特異的な抗真菌剤として機能することが期待される。

糸状菌に特異な機能未知全遺伝子破壊株の構築とその利用

世界中で多数の糸状菌のゲノム解析が行われたが、その大半の遺伝子が機能未知であるため、その成果が未だ十分に社会へ還元されるとは言えない。糸状菌遺伝子の大半が機能未知であることは、各遺伝子のアノテーションが、機能が既知の遺伝子とのホモロジー比較によりなされていることに起因する。これまでに機能が解明された遺伝子は、酵母、マウスなどのモデル生物やヒトを中心に研究されたものであり、これら他生物の遺伝子とホモロジーを有する糸状菌遺伝子は全体の半数に満たない。このことは、逆に糸状菌に特異な遺伝子が半数以上

糸状菌の機能未知遺伝子は宝の山

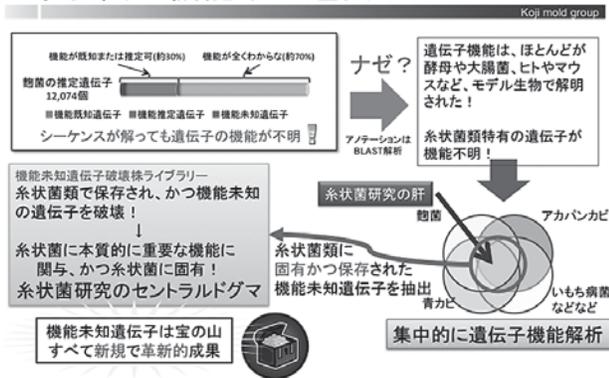


図2. 糸状菌に固有な機能未知遺伝子の機能解明

あり、糸状菌固有の特性にかかわる遺伝子が手付かずのまま残されているということでもある。そこで、酒類総合研究所で糸状菌類に固有かつ高度に保存されたすべての機能未知遺伝子に研究資源を集中して研究を推進している(図2)。

糸状菌および酵母菌間での比較ゲノム解析、さらにマイクロアレイを用いた高発現遺伝子の同定によって、糸状菌類に固有で高度に保存された高発現機能未知遺伝子の中から、約300種の遺伝子を選抜した。 *A. oryzae* 高効率相同組換え株でこれらの全遺伝子を網羅的に破壊することで、全機能未知遺伝子破壊株ライブラリーの構築を行っている。必須遺伝子の破壊においては、ヘテロカロンのみが単離されることを利用して、必須遺伝子および非必須遺伝子の特定が可能である。特定された必須遺伝子については抗真菌剤の新規のターゲットとするために細胞壁および糖鎖合成、形態形成に絞って分子機構の解明を目指している。現在までの段階で、約20%の割合で必須遺伝子候補株が出現しており、これらは麹菌の生育はもとより糸状菌の生育に共通して重要な役割を果たしていることが示唆されている。これらの遺伝子破壊株ライブラリーを用いることで、穀物上での生育や加水分解、タンパク質生産、物質変換についての特性の理解とともに、発酵産物の品質との関係についても明らかにすることができるものと期待している。

おわりに

我が国を代表する国菌とも称される麹菌のゲノム解明や高効率相同組換え系の開発によって、麹菌を含めた糸状菌類を自在に操られるようになった。糸状菌類は、自然界ではさまざまな動植物と相互作用しており、糸状菌

に保存された遺伝子の多くは、このような他生物との関係の中で機能するものも含まれる。我が国の発酵産業は、まさに糸状菌と動植物の関係を利用したものであり、多様な遺伝子破壊株を穀物類に作用させることで、酒類や醤油などの産業に関わる新たな遺伝子を単離することが期待できる。一方、植物類は豊富なメタボライト資源を有しており、糸状菌は多様なバイオコンバージョン能を有している。そこで、研究の対象を農業廃棄物、食品産業廃棄物などに広げることで、もともと植物が有している多種多様なメタボライトを利用し、糸状菌によりさらに多様に変換することで、さまざまなメタボライトを生み出せる可能性が示唆される。広範なメタボライトの解析により、有用なメタボライトが明らかになれば、遺伝子破壊ライブラリーを利用することで、この現象に関わる遺伝子を抽出し、メタボライト生産性の向上、産業廃棄物の有効利用に資することができる。このように、麹菌の特異な遺伝子機能の解明を行うことで、植物病原菌、医真菌の制御の問題、糸状菌の産業利用の問題、産業廃棄物の有効利用と循環型社会の構築など、非常に広い分野に応用することが期待できる。このような研究を迅速に進行するために、遺伝子破壊ライブラリーを広く国内の研究機関に提供することで、麹菌ゲノム解析の成果が社会に還元される端緒となることに貢献したい。

本稿にて紹介した研究内容の共同研究者の九州大学 竹川薫教授、二神泰基助教、崇城大学 岡拓二准教授、三和酒類大森俊郎博士、ならびに本研究にご協力頂いた九州大学、広島大学の大学院生に感謝いたします。

文献

- 1) Minetoki, T. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **50**, 459 (1998).
- 2) Tokuoka, M. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 6538 (2008).
- 3) Yoon, J. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **89**, 747 (2011).
- 4) Goto, M.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 1415 (2007).
- 5) Oka, T. *et al.*: *Microbiology*, **150**, 1973 (2004).
- 6) Goto, M. *et al.*: *Eukaryotic Cell*, **8**, 1465 (2009).
- 7) Oka, T. *et al.*: *Microbiology*, **151**, 3657 (2005).
- 8) Lussier, M. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **272**, 15527 (1997).
- 9) Yoko-o, T. *et al.*: *Eur. J. Biochem.*, **257**, 630 (1998).
- 10) Latgé, J. P.: *Mol. Microbiol.*, **66**, 279 (2007).
- 11) Wallis, G. L. F. *et al.*: *Biochim. Biophys. Acta*, **1525**, 19 (2001).
- 12) Kremer, L. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **276**, 26430 (2001).
- 13) El-Ganiny, A. M. *et al.*: *Fungal Genet. Biol.*, **47**, 629 (2010).
- 14) El-Ganiny, A. M. *et al.*: *Fungal Genet. Biol.*, **45**, 1533 (2008).
- 15) Damveld, R. A. *et al.*: *Genetics*, **178**, 873 (2008).