

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月22日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23780084

研究課題名（和文）糸状菌のもつ O-結合型糖鎖付加タンパク質の同定と機能解明

研究課題名（英文） Identification and functional analysis of O-glycosylated proteins in filamentous fungi

研究代表者

二神 泰基 (FUTAGAMI TAIKI)

九州大学・大学院農学研究院・助教

研究者番号：60512027

研究成果の概要（和文）：

糸状菌において、O-結合型糖鎖付加タンパク質は菌糸伸長や分生子形成といった形態形成や分化に重要な役割をもっている。本研究ではモデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* において、Mid2-like protein (MidB) が O-結合型糖鎖付加タンパク質であることを同定し、細胞壁ストレス耐性に関与することを明らかにした。MidB は細胞表層および隔壁に局在しており、cell wall integrity (CWI) 経路のストレスセンサーとして機能する可能性が示唆された。しかし、MidB は CWI 経路の下流経路の活性化に必須ではなかった。

研究成果の概要（英文）：

O-glycosylated proteins play an important role in the cell morphogenesis of fungal species. We characterized the putative stress sensor protein of cell wall integrity (CWI) signaling, Mid2-like protein (MidB), in the *Aspergillus nidulans*. The disruption of *midB* showed the increased sensitivities to the cell wall inhibitors such as Congo red and calcofluor, indicating that the MidB is involved in the CWI in the *A. nidulans*. However, the MidB was not essential for the downstream MpkA-RlmA signaling that caused a transient transcriptional up-regulation of the *agsB* gene.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：O-結合型糖鎖、細胞壁ストレス、糸状菌、*Aspergillus*

1. 研究開始当初の背景

Aspergillus 属糸状菌は、発酵食品の製造や医薬品などの有用物質の生産に利用されている。その一方で、マイコトキシン生産菌や肺アスペルギスル症を引き起こす病原菌種も存在しており、バイオ産業のみならず医療分野においても重要な真核微生物である。

真核細胞では、細胞表層に局在するタンパク質や菌体外へ放出される分泌タンパク質の多くに、翻訳後修飾機構によって糖鎖が付加されている。*Aspergillus* 属糸状菌におい

ても、糖鎖はタンパク質のプロテアーゼに対する安定性や構造維持、分泌効率などに重要であることが明らかにされてきた (Goto, *Biosci Biotechnol Biochem*, 71:1415-27, 2007)。本研究課題において解析対象とした O-結合型糖鎖は、ペプチド鎖のセリン (Ser) あるいはスレオニン (Thr) のヒドロキシル基にマンノースが結合した構造をもつ。

先の研究において、*Aspergillus* 属のモデル菌である *Aspergillus nidulans* において、3 種類の Protein O-mannosyltransferase

(PmtA, PmtB, および PmtC) が同定され、これらが最初のマンノースを付加することが明らかになった (Oka et al., *Microbiology*, 150:1973-1982. 2004; Goto et al., *Eukaryot Cell*, 8:1465-1474. 2009)。また、各 *pmt* 遺伝子の破壊株は菌糸伸長能の低下、分生子形成能の低下、菌糸が膨らんだ構造などの異常な表現型を示した。したがって、Pmt の基質として *O*-結合型糖鎖が付加されるタンパク質は、*A. nidulans* の正常な形態形成に必要であることが分かった。同様の結果は、焼酎醸造に使用されている黒麹菌 *Aspergillus awamori* でも報告された (Oka et al., *Microbiology*, 151:3657-3667. 2005)。また、アスペルギルス症の原因となる *Aspergillus fumigatus* においても同様の結果が報告された (Zhou et al., *Eukaryot Cell*, 6:2260-2269. 2007; Fang et al., *Glycobiology*, 20:542-552. 2010; Mouyna et al., *Mol Microbiol.*, 76:1205-1221. 2010)。さらに、*pmtA*, *pmtB*, および *pmtC* 遺伝子破壊株間の糖タンパク質プロファイルは異なっており、互いに異なる基質特異性を有していることが明らかになっている。しかし、具体的にどの糖タンパク質に違いがあるのかは、ほとんど解明されていない。

以上の研究背景を踏まえて、Pmt により *O*-結合型糖鎖を付加されるタンパク質の同定と機能解明を進めることで、糸状菌の形態形成や分化メカニズムに関する新規な知見を得ることができると考えた。

2. 研究の目的

本研究は、ゲノム情報と過去の知見から、*Aspergillus* 属糸状菌のもつ *O*-結合型糖鎖付加タンパク質を同定し、それらの生理機能を解析することで糸状菌の形態形成に関わる分子基盤を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) *O*-結合型糖鎖付加タンパク質の予想

解析対象を、*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans* などの他の生物種において、すでに *O*-結合型糖鎖付加タンパク質として同定されている Orf のオルソログと、*Aspergillus* 属などの糸状菌に特有で、かつ機能不明な推定 *O*-結合型糖鎖付加タンパク質の2種に大別して *O*-結合型糖鎖付加タンパク質の予測を行った。前者は、例えば、*S. cerevisiae* の Als1, Bud10, Bar1, Kre9 などのオルソログを BLAST 解析により同定し、過去に *Aspergillus* 糸状菌において機能解析が行われていないオルソログを選定した。一方、後者に関しては、Comparative Fungal Genome Database による比較ゲノム解析と BLAST 解析によるオルソログ同定により、ヒト、酵母などの他生物種には存在せず、糸状菌にのみ存

在する遺伝子を抽出した。次に、これらの遺伝子の中で、*O*-結合型糖鎖付加すると考えられる Ser および Thr 残基に富むものを配列データから選択した。その後、NetOGlyc Server (Julenius et al., *Glycobiology*, 15:153-164, 2005.) により *O*-結合型糖鎖付加の予測を行った。

(2) プロテオーム解析による推定 *O*-結合型糖鎖付加タンパク質の同定

pmtC 遺伝子破壊株は、各 *pmt* 破壊株の中でも最も異常な表現型を示したため、PmtC により糖鎖付加を受ける基質タンパク質は糸状菌の形態形成と分化に特に重要な役割を持つことが推察された (Goto et al., *Eukaryot Cell*, 8:1465-1474. 2009)。また、*pmt* 破壊株において、その基質タンパク質は低分子量化や分解を受けると考えられた。このことから野生株と *pmtC* 遺伝子破壊株の比較プロテオーム解析を行うことで、Pmt 基質タンパク質の同定を行った。まず、野生株と *pmtC* 破壊株から細胞壁、および細胞膜画分を分画し、二次元電気泳動に供して銀染色を行った。次に、野生株において発現量の大きいタンパク質スポットを MALDI-TOF-MS/MS により解析した。

(3) 解析対象遺伝子の破壊株の取得

A. nidulans A89 株の KU80 遺伝子破壊株を宿主として、解析対象遺伝子の破壊株を *argB* 遺伝子マーカー、あるいは *ptrA* 遺伝子マーカーにより取得した。

(4) 表現型の解析

各種ストレス条件下 (浸透圧、温度の変化) におけるコロニー形成能、菌糸伸長速度、分生子形成能を野生株と比較した。また、細胞壁合成阻害剤 (Micafungin, Condo red, Calcofluor など) に対する薬剤感受性を野生株と比較した。表現型に差異が見られたかどうかを指標として、詳細な解析を行うかどうかを判断した。また、各遺伝子破壊株の表現型を *pmtA*, *pmtB*, および *pmtC* 破壊株と比較し、その表現型の一部を満たすかどうか注目した。

(5) 局在性の解析

解析対象の推定 *O*-結合型糖鎖付加タンパク質のうち、MidB の局在を観察するために、C 末端に蛍光タンパク質 (GFP) を融合した MidB を *midB* 遺伝子破壊株において発現する株を構築し、MidB-GFP の局在を共焦点レーザー顕微鏡 (FluoView FV10i, Olympus) により観察した。なお、発現プロモーターとして、*alcA* 遺伝子のプロモーターを用いた。また、GFP を融合した MidB が機能を相補するかどうかを試験した。

(6) 糖鎖の付加の解析

MidB-GFP 発現株のタンパク質粗抽出液に対して抗 GFP 抗体を用いるイムノブロット解析を行った結果、MidB-GFP のアミノ酸は配列

から予測される分子量よりも高分子量側にシグナルが見られたため、その原因として予想された糖鎖付加の有無について調べた。PNGase F 処理、あるいはトリフルオロメタンスルホン酸 (TFMS) 処理による脱糖鎖処理の前後で MidB-GFP の分子量を比較した。

(7) 転写の解析

α -1,3-グルカン合成酵素をコードする *agsB* 遺伝子は、cell wall integrity (CWI) 経路において MpkA-RlmA 経路によって制御されることが報告された (Fujioka et al., *Eukaryot Cell*, 6:1497-1510, 2007)。MidB は CWI 経路の上流のセンサータンパク質であることが予測された。よって、MidB が *agsB* 遺伝子の発現制御に関与するのかどうかを調べるために、野生株と *midB* 破壊株における *agsB* 遺伝子の転写応答をリアルタイム RT-PCR 法により比較した。

4. 研究成果

(1) 解析対象遺伝子の選定

A. nidulans における *C. albicans* の Als1 のオルソログを同定するために、Als1 をクエリとして BLASTP 解析を行った。ベストヒットを示した AN4897 は、シグナル配列、*O*-結合型糖鎖が付加すると推定されるセリン・スレオニンリッチ領域、Mid2 ドメイン、および膜貫通ドメインを有しており、Als1 ではなく *S. cerevisiae* の Mid2 の特徴を有していた。系統解析もこの結果を支持した (図 1) Mid2 は、出芽酵母において cell wall integrity (CWI) シグナル伝達経路のストレスセンサータンパク質として機能することが知られている。そこで、実際に細胞壁の合成・維持機構に関与しているかどうかを調べるために、*midB* 遺伝子の破壊株を取得した。

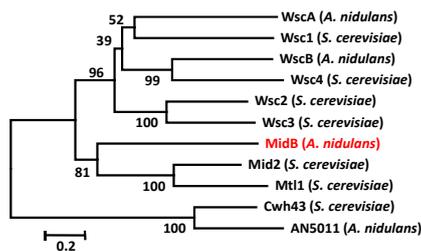


図 1 *A. nidulans* および *S. cerevisiae* における CWI 経路のストレスセンサータンパク質の系統樹 (NJ 法)

(2) *midB* 遺伝子破壊株の表現型

A. nidulans の *midB* 遺伝子破壊株は、30°C における YG 寒天培地での培養において、野生株と同様のコロニー径の伸長を示したが、単位面積当たりの分生子数は野生株と比べて顕著に低下 (約 8%) した。したがって、MidB は分生子形成に関与することが示唆された。また、MM 寒天培地において 30°C、37°C、および 42°C で培養した際のコロニー径の伸長

に野生株と顕著な変化は見られなかったため、温度感受性には関与しないことが示唆された。

一方、*A. nidulans* の *midB* 遺伝子破壊株は、Congo Red および calcofluor に対して高い感受性を示したことから、細胞壁ストレス耐性に関与することが示唆された。本結果は、先の研究で *midB* と同様に CWI 経路の推定センサータンパク質をコードする *wscA* 破壊株、*wscB* 破壊株、および *wscA wscB* 二重破壊株が micafungin や calcofluor などの細胞壁合成阻害剤に対して感受性の増大を示さなかった結果 (Futagami et al. *Eukaryot Cell*, 10:1586-1587, 2011) と異なるものであった。よって、MidB と WscA/B のストレス応答性は異なることが示唆された。

(3) MidB の局在性の解析

液体培地における菌糸における MidB-GFP の局在を観察した結果、細胞表面と隔壁に局在した (図 2)。細胞表面は、細胞が最初にストレスを受ける場として、また、*S. cerevisiae* における Mid2 に関する報告から予想されていた部位であった。一方、隔壁への局在は、単細胞で増殖する *S. cerevisiae* では見られない結果であり、MidB の隔壁における役割や、そのトポロジーに興味を持たれた。

MidB-GFP発現株

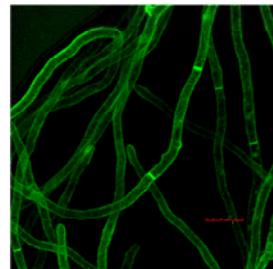


図 2 MidB-GFP の局在性の観察

(4) MidB の糖鎖付加の解析

MidB は *O*-結合型糖鎖の付加が予想される Ser、Thr 残基を多く (42.07%) もつ。そこで、実際に *O*-結合型糖鎖が付加しているかどうかを調べた。抗 GFP 抗体を用いたイムノプロット解析の結果、MidB-GFP のアミノ酸配列から予測される分子量 (54.2kDa) よりも大きい約 96 kDa に主要なバンドが見られた (図 3)。次に、トリフルオロメタンスルホン酸による脱糖鎖処理によって約 60 kDa まで分子量が低下した。一方、PNGase F 処理による分子量の変化は見られなかった。以上より、*O*-結合型糖鎖の付加により分子量が増大していたことが示唆された。

(5) MidB の下流遺伝子の発現応答試験

MidB と cell wall integrity 下流経路との関係を調べるために、 β -1,3-グルカン合成酵素の阻害剤である micafungin によるストレスに対する *agsB* 遺伝子の転写応答を調べ

た(図4)。その結果、*midB*破壊株においても野生株と同様の *agsB* の転写応答が観察された。したがって、*midB*破壊株においては、WscA、WscB、あるいは未同定センサーが機能相補している可能性があると考えた。また、*midB*破壊株が micafungin に対する高感受性を示した結果とあわせて、*agsB*の転写上昇は micafungin 耐性に貢献しない可能性があると考えた。

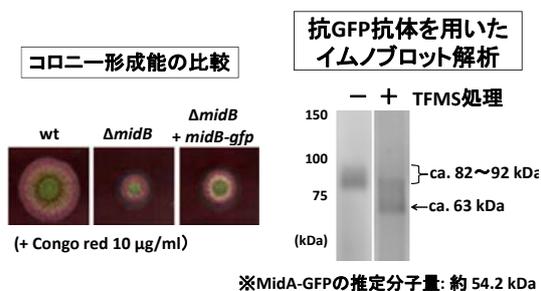


図3 MidB-GFP 発現株の表現型、および MidB-GFP への糖鎖付加の解析

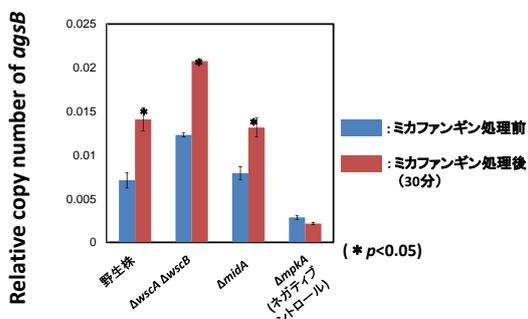


図4 Micafungin に対する *agsB* 遺伝子の転写応答の比較

(6)比較プロテオーム解析による *O*-結合型付加タンパク質の同定

野生株と *pmtC* 破壊株間の比較プロテオーム解析を行った。その結果、細胞壁画分では 30 のタンパク質、膜画分では 18 のタンパク質が同定された。これらのほとんどは *O*-結合型糖鎖付加に必要とされる分泌シグナル配列を保持しておらず、PmtC の基質タンパク質ではないことが推定された。一方、シグナル配列を持つタンパク質として、AN9339 (CatB)、および AN3057 (推定 prenylcysteinyase) を PmtC の基質タンパク質候補として同定した。CatB (推定分子量 79.2 kDa) は、すでに *A. nidulans* における解析が報告されており、菌糸表面に局在するカタラーゼであることが明らかにされている (Kawasaki et al., *J Bacteriol*, 179:3284-3292, 1997)。また、*N*-結合型糖鎖の付加が確認されており、一方、*O*-結合型糖鎖に関しては調べられていない。Calera らは、Endoglycosydase H により脱 *N*-結合型糖鎖処理を行った後の分子量が 80.1 kDa であったことを報告した (Calera et al., *FEBS Lett.*, 475:117-120, 2000)。NetOGlyc

により CatB は *O*-結合型糖鎖修飾部位が予測されなかったことも考慮すると、CatB は PmtC 基質タンパク質ではなく、別の要因により *pmtC* 破壊株において発現量が低下していた可能性があると考えた。

近年、*in silico*解析により、*A. nidulans* の全タンパク質 10560 のうち、1453 (13.8%) がシグナル配列を持ち、932 (シグナル配列を持つタンパク質の 64.1%) に *O*-結合型糖鎖が付加すると予測された (González et al., *BMC Microbiology*, 12:213, 2012)。*Aspergillus* 属糸状菌には機能未知 *O*-結合型付加タンパク質が未だに多数存在すると考えられ、今後の機能解明が期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

1) Futagami T, Goto M. Putative cell wall integrity sensor proteins in *Aspergillus nidulans*. *Commun Integr Biol*. 査読有. 5: 206-208 (2012). doi: 10.4161/cib.18993.

[学会発表] (計4件)

1) 上原拓磨、二神泰基、豊浦利枝子、岩下和裕、梶原康博、高下秀春、大森俊郎、竹川薫、後藤正利. *Aspergillus nidulans* における糖転移酵素 PmtC 基質タンパク質の同定. 第19回日本生物工学会九州支部大会. 2012年12月1日. 別府大学.

2) 二神泰基、瀬戸和史、梶原康博、高下秀春、大森俊郎、竹川薫、後藤正利. *Aspergillus nidulans* における Mid2 様タンパク質の機能解析. 第64回日本生物工学会大会. 2012年10月23-26日. 神戸国際会議場.

3) 二神泰基. 糸状菌に特異的なストレス応答機構に関する研究. 第15回真核微生物交流会. 2012年06月29日. 酒類総合研究所.

4) 上原拓磨、瀬戸和史、二神泰基、大森俊郎、竹川薫、後藤正利. *Aspergillus nidulans* における *kre9* ホモログ遺伝子の機能解析. 日本農芸化学会西日本支部・中四国支部合同大会. 2011年9月16-18日. 宮崎大学.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

二神 泰基 (FUTAGAMI TAIKI)
九州大学・大学院農学研究院・助教
研究者番号：60512027

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし