

研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2007～2009
課題番号：19580100
研究課題名（和文） 酵母キラー蛋白質の感受性細胞侵入機構の解析
研究課題名（英文） Requirement of PKC pathway of target yeast for toxicity of killer protein
研究代表者 北本 宏子 (KITAMOTO HIROKO) 独立行政法人農業環境技術研究所・生物生態機能研究領域・主任研究員 研究者番号：10370652

研究成果の概要（和文）：酵母 *Kluyveromyces lactis* が生産するキラータンパク質(zymocin)は酵母 *Saccharomyces cerevisiae*(SC)細胞内に毒素サブユニット( $\gamma$ )を侵入させて、細胞を殺す。本研究では、zymocin によって SC が細胞表層の破壊を察知し、修復する「PKC 経路」が活性化した結果、 $\gamma$  が細胞内へ侵入し、同時に細胞壁合成酵素が細胞表層へ輸送されることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Toxic subunit of *Kluyveromyces lactis* killer protein (zymocin), is transported into cell of sensitive yeast, *Saccharomyces cerevisiae* (SC). In this study we found that the activation of cell integrity pathway (PKC pathway) of SC is needed for the transportation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：応用微生物学

キーワード：微生物機能、細胞内・細胞間情報伝達、膜輸送と輸送蛋白質

#### 1. 研究開始当初の背景

zymocin のサブユニットが各々「標的細胞の細胞壁へ結合」「標的細胞内へ侵入する毒素」の役割を担うことが明らかにされていた。特定の細胞内へ物質を輸送する仕組みは、DDS 等へ応用可能であり、毒素侵入の仕組みの解明に興味を持った。本課題担当者は、網羅的解析から PKC 経路の遺伝子欠損株が zymocin 耐性を示すという実験結果を得てい

た。PKC 経路は、細胞壁合成酵素の合成と細胞表層への輸送を制御する。

#### 2. 研究の目的

zymocin の毒素サブユニットが標的細胞内へ侵入する時に、標的細胞自体の細胞壁合成酵素の循環系（細胞内→細胞表層→細胞内）を利用していると予想した。またこれには、zymocin の作用による PKC 経路が必要だと考

え、PKC 経路の変異株を用いて毒素侵入の仕組みを明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) zymocinによって標的細胞のPKC経路は活性化されるか？

PKC経路は、表層のセンサーが細胞表層の破壊を察知し、下流のRho1p→Pkc1→Mpk1pへリン酸化によって情報を伝える。活性化されたRho1とPkc1は、細胞表層へ細胞壁合成酵素を輸送する一方、Mpk1pは細胞壁合成酵素の転写を活性化する。課題担当者は既に *mpk1* 遺伝子破壊株 (*mpk1*<sup>-</sup>) が zymocin 耐性を示すことを明らかにしていた。そこで、PKC経路の変異株の zymocin 感受性の違いを解析した。また、zymocin が持つキチナーゼ活性で細胞表層が破壊された結果 Mpk1p が活性化されるのかを生化学的に解析した。

(2) zymocin により、細胞壁合成酵素の表層への輸送が誘導されるか？

Zymocin はキチナーゼ相同性が高く、キチナーゼ活性も確認されていた。また、キチン合成酵素遺伝子破壊株は zymocin 耐性を示すことも報告されていた。そこで、zymocin で細胞表層のキチンが破壊された結果、キチナーゼが細胞表層へ輸送されると考えた。キチナーゼを GFP で標識した酵母株を使い、zymocin により、細胞内・表層のキチナーゼの分布の変化を解析した。Zymocin を処理した細胞の細胞破砕物を密度勾配遠心法で分画し、分画物を SDS ゲル電気泳動法で分離後、抗 GFP 抗体を用いたウエスタンブロッティング法でキチン合成酵素の分布を解析した。

(3) zymocin 各サブユニットの標的細胞での局在の解析

zymocin の毒素サブユニットは標的細胞内で検出されるが、他のサブユニットについては局在が明らかにされていない。Zymocin 作用後、各サブユニットの局在を明らかにする。課題担当者は既に、純度が高い zymocin の精製法を確立し、zymocin 各サブユニットの抗体も調製した。Zymocin を作用した標的細胞を、密度勾配遠心で分離した膜画分のウエスタン解析と、細胞の免疫染色により、zymocin 各サブユニットの局在を解析する。

### 4. 研究成果

(1) PKC 経路遺伝子破壊株の zymocin 感受性  
酵母全遺伝子の 2/3 が個々に遺伝子破壊された約 5 千株のセットを用いて、zymocin に対する感受性を網羅的に調べた結果、PKC 経路上流のセンサー *wsc1*~*4* 株、Pkc1p 下流の *bck1* 株、*mpk1* 株は zymocin 耐性を示した。また、ソルビトールで浸透圧を調整すると、野生株の zymocin 感受性が押さえら

れたことから、zymocin が細胞表層の破壊によって PKC 経路を活性化している可能性が示された(図 1)。Zymocin 処理で Mpk1p がリン酸化することから、PKC 経路の活性化が確認された(図 2)。

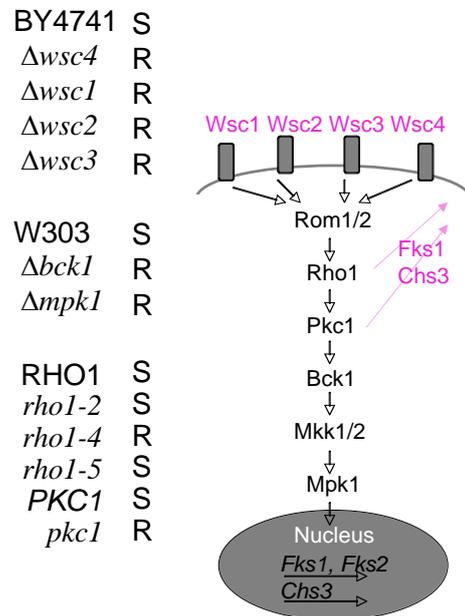


図 1. PKC 経路の遺伝子破壊株・遺伝子変異株の zymocin 感受性 (S:感受性、R:耐性)

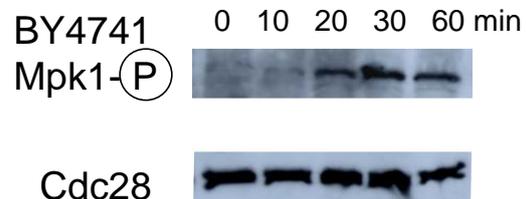


図 2. Zymocin 処理により Mpk1p はリン酸化される

次に、PKC 経路上流の生存に必須な遺伝子 *rho1*, *pkc1* の変異株の zymocin 感受性を解析した結果、*rho* 変異のうち、細胞壁合成酵素を細胞表層へ輸送できない変異株 (*rho1-4*) と *pkc1* 変異株は、上記の zymocin 耐性を示した。Pkc1p, Mpk1p をリン酸化できない *rho* 変異株 (*rho1-2*, *rho1-5*) は、*mpk1*<sup>-</sup> 株と同様に zymocin 耐性になることを予想していたが、予想に反して zymocin 感受性を示した(図 1)。従って、*rho1-2*, *rho1-5* 変異による表現系は、Mpk1p リン酸化能欠損以外の変異形質も存在する可能性が示唆された。

(2) 酵母細胞破砕物をショ糖密度勾配遠心後、酵母の膜画分各抗体の分布を調べた(図 3)。

小胞体マーカーSec12 のバックグラウンドが高く、局在している画分がわかりにくかった。小胞体に局在する他の蛋白質の抗体を用いた場合も、同様であった。しかし、A. Reyesら (J. Cell Science 2007) によると、細胞内の Chs3-GFP は、Pep12p とともに細胞内小胞と共存する画分と、細胞表層の Pma1p と共存する画分があることから、小胞体は、今回実施した実験では、3-4番の画分に含まれると推測した。

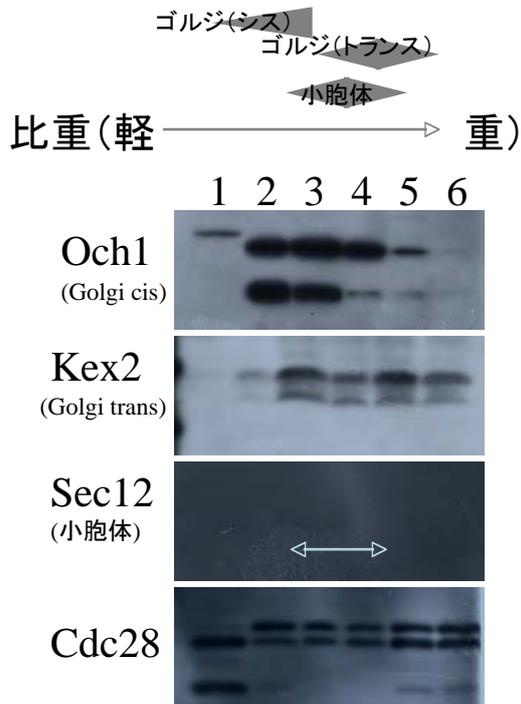


図3. 密度勾配遠心による酵母蛋白質の分布

GFP 結合型キチン合成酵素 GFP-Chs3p を生産する細胞に zymocin を処理して、細胞成分中の GFP-Chs3p の局在変化を解析した。その結果、野生株では、Chs3p が最も比重が重い細胞内画分 (図中の6番: 図4で示すように6番の画分には Pma1p が蓄積するため、細胞膜画分と思われる) から減少していた (図4)。mpk1<sup>-</sup>株も、zymocin 処理により、野生株ほど顕著ではないが、細胞膜画分で減少しているように観察された (図5)。図1に示したように、mpk1<sup>-</sup>株は、PKC 経路活性化による Chs3p 合成は誘導されない。従って、既に細胞内にプールされている Chs3p のみが、zymocin による刺激で局在変化したと推測している。mpk1<sup>-</sup>株の結果から、zymocin 処理によって PKC 経路の Rho1p や Pkc1p が活性化された結果、Chs3p が小胞体から輸送されたと考えられる。mpk1<sup>-</sup>株では新たな Chs3p が合成されず、ゴルジ(シス)側の Chs3p も減少していることから、zymocin の作用で、

Chs3p は、ゴルジ (トランス) に蓄積していると考えられる。各種輸送系に関わる遺伝子破壊株に GFP-Chs3p を導入した株を作成した。しかし、顕微鏡下で観察したところ、GFP-Chs3p の大部分が細胞質中の粒子として局在し、本来局在すると言われる bud neck に局在しているものは、今回の報告書で示した物だけであり、それ以外は局在変化の解析は困難であった。(同様の表現形が最近報告されているため、プラスミドでの導入や、染色体へ導入したもの、染色体中の *CHS3* を遺伝子破壊して入れ換えた物、*CHS3* を制御する *CHS7* を共発現させたものなどを試した)。

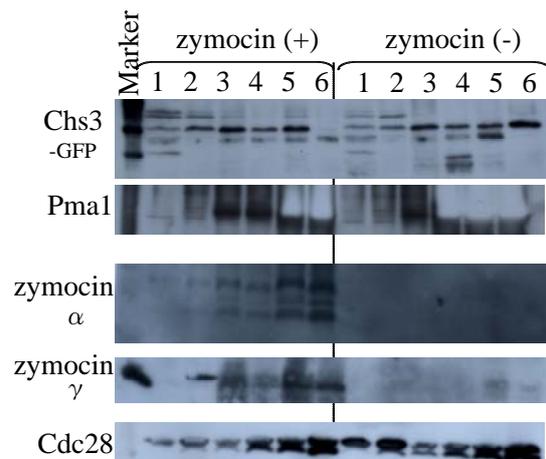


図4. 野生株に zymocin を作用させたときの細胞内蛋白質の局在変化

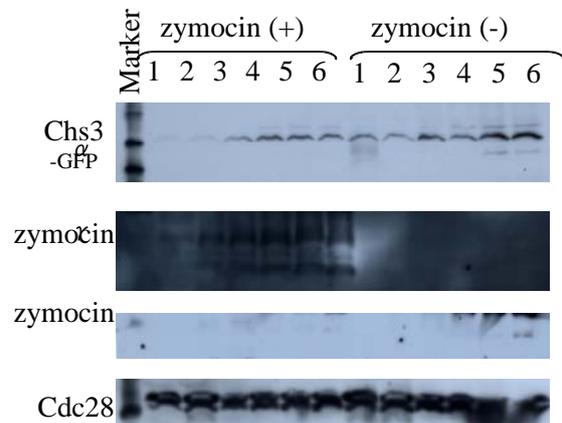


図5. mpk1Δ株に zymocin を作用させたときの細胞内蛋白質の局在変化

(3) zymocin を作用した細胞を、zymocin 各サブユニットの抗体を用いて免疫染色した。その結果、zymocin のサブユニットのうち、キチナーゼ活性を示す α サブユニットと、毒素サブユニット (γ) に対する抗体を用いた染色では、各々の標的蛋白質は、感受性細胞のキチンリングに局在が確認された (図6)。

一方、機能不明のβサブユニットは細胞表層での局在が確認されなかった。

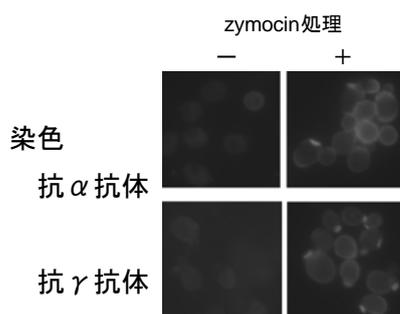


図6. Zymocin 処理細胞の各サブユニットの細胞表層局在

次に、zymocin を処理した細胞の膜画分を各サブユニットの抗体でウエスタン解析した。その結果、小胞体やゴルジ体が局在する膜画分に、αとγが検出され(図4)、細胞質画分では検出されなかった。また、βサブユニットはどちらにも検出されなかった。従って、zymocin は、はじめに標的細胞細胞表層のキチンリングに結合し、その時にβサブユニットが遊離することが初めて明らかになった。

次に、zymocin が標的細胞の細胞内への侵入に必要な経路を明らかにするために、zymocin 処理をした *mpk1*・・株での zymocin 局在を解析した。その結果、γサブユニットが細胞内へ侵入できなくなっており(図5)、侵入には Mpk1p の機能が必要な可能性がある。γサブユニットは膜と結合しているためか、電気泳動での検出が不安定であったため、この結果についてはさらに詳細な検討が必要である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

1. Megumi S., O. Tetsuhiro, K. Atsuhiko, H. K. Kitamoto, H. Makoto, H. Masaki (2009) Cellular and transcriptional responses of yeast to the cleavage of cytosolic tRNAs induced by colicin D., *Yeast*, 26(12), 663-673 (査読有)

2. Nakase M., M. Tani, T. Morita, H. K. Kitamoto, J. Kashiwazaki, T. Nakamura, A. Hosomi, N. Tanaka, K. Takegawa (2010) Mannosylinositol phosphorylceramide is a major sphingolipid component and is required for proper localization of plasma membrane proteins in *Schizosaccharomyces pombe*, *Journal of Cell Science* 123: 1578-1587 (査読有)

3. 北本宏子 (2009) 真菌界の殺し屋-酵母の

キラ一因子生物の科学遺伝 63, 2, 48-53 (査読無) .

ほか

〔学会発表〕(計8件)

1. 柴山祥枝, 多胡香奈子, 中村幸治, 北本宏子 (2009) 自然環境下で抗菌タンパク質耐性株は定着するのか?, 酵母遺伝学フォーラム(42), 14 茨城県

2. 茂松恵, 大本哲也, 小川哲弘, 北本宏子, 日高真誠, 正木春彦 (2009) tRNA の切断が接合シグナル伝達系を活性化させる, 酵母遺伝学フォーラム, 39 茨城県

3. M. Shigematsu, T. Omoto, T. Ogawa, H. K. Kitamoto, M. Hidaka, H. Masaki (2009) Cellular and transcriptional responses to tRNA cleavage induced by tRNA-targeting ribonuclease, colicin D., Yeast cell biology meeting 米国

4. 前田美紀, 北本宏子, 梶原英之 (2008) *Kluyveromyces lactis* アルコール脱水素酵素 I におけるニッケル結合部位の推定 第8回日本蛋白質科学会年会 日本蛋白質科学会 1P-076. 東京

5. 多胡香奈子, 高久洋暁, 高木正道, 北本宏子 (2007): 出芽酵母におけるカラシナ由来ディフェンシンの抗菌作用に関する遺伝子の特定, 酵母遺伝学フォーラム, 40, 82. 大阪

6. 柴山祥枝, 中村幸治, 北本宏子 (2008): 出芽酵母の偽菌糸形成における新しい形態変化, 日本農芸化学会大会講演要旨集 2008年度(平成20年度)大会, (社)日本農芸化学会, 84. 東京

ほか

〔産業財産権〕

○取得状況(計2件)

名称: カルシニューリン活性化剤

発明者: 北本宏子、宮川都吉

権利者: 農業生物資源研究所

種類: 特許

番号: 第4500991号

取得年月日: 2010年4月30日

国内外の別: 国内

名称: キラー蛋白質の精製方法

発明者: 北本宏子

権利者: 農業生物資源研究所

種類: 特許

番号：第 4491588 号  
取得年月日：2010 年 4 月 16 日  
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北本 宏子 (KITAMOTO HIROKO)  
独立行政法人農業環境技術研究所・生物生態機能研究領域・主任研究員  
研究者番号：10370652