

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24248016

研究課題名(和文) 酵素反応と細胞内輸送が共役する真菌細胞壁 - 1,6 - グルカン合成機構の解明

研究課題名(英文) Study on the mechanism of fungal cell-wall beta-1,6-glucan synthesis comprised of coupled enzymatic reaction and intracellular traffic

研究代表者

依田 幸司 (YODA, Koji)

東京大学・農学生命科学研究科・教授

研究者番号：20143406

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,400,000円

研究成果の概要(和文)：-1,6-グルカンは酵母の生存に必須な細胞壁の構成成分だが、その生合成機構は未だに明らかでない。-1,6-グルカン合成に最も重要なタンパク質は、小胞体にあるKeg1、Kre5、小胞体から細胞表層まで輸送されるKre6とそのホモログSkn1、Kre9とホモログKnh1である。これらのタンパク質間の正常な相互作用によりKre6が細胞膜へ輸送されることが-1,6-グルカン合成に必須であることを示し、生合成プロセスの新しいモデルを提唱した。

研究成果の概要(英文)：Beta-1,6-glucan is an essential component of yeast cell wall, but the molecular mechanism of its biosynthesis still remains unclear. We found that most important proteins among many participants in beta-1,6-glucan synthesis are Keg1 and Kre6, which are the ER-residents, Kre6 and Kre9 and their homologs Skn1 and Knh1, respectively, which are delivered from the ER to the cell surface. We showed that delivery of Kre6 to the cell membrane with the aid of proper interaction among these proteins is essential for beta-1,6-glucan synthesis and present a new model of the biosynthetic molecular process.

研究分野：農芸化学、応用微生物学

キーワード：微生物機能 酵母細胞壁

## 1. 研究開始当初の背景

カビや酵母のような真菌の細胞は、もっとも外側に細胞壁をもつ。細胞壁は、強固な構造体として物理的に細胞を守るだけでなく、細胞内外の選択的物質透過に関わり、また環境情報を受信するセンサーとしての役割も果たしており、細胞壁に重大な欠陥が起ると真菌は生存できない。病原性真菌は真核生物であるので、私たち人間の細胞と構造や機能に多くの共通性があり、感染すると治療はきわめて困難である。哺乳類の細胞には細胞壁はないから、選択的な抗菌剤の作用標的として、細胞壁の重要性が注目されている。

研究が進んでいるモデル真菌である出芽酵母の細胞壁は、グルカン・キチン・マンナンタンパク質という3種類の高分子化合物が主成分である。グルカンには、グルコース約1500分子が-1,3-結合で重合した-1,3-グルカンと、約450分子が-1,6-結合した-1,6-グルカンがある。-1,3-グルカンが硬く直鎖的であるのに対して、-1,6-グルカンは柔軟でアモルファスといわれている。キチンは、N-アセチルグルコサミンというアミノ糖が-1,4-結合で重合したもので、甲殻類や昆虫の主要な外骨格成分でもあることで分かるように、もっとも硬い成分である。マンナンタンパク質は、多量のマンノース分子によって修飾された糖タンパク質で、構造的役割のみでなく、酵素活性をもっていたりレセプターとして情報伝達に関わるものもある。これらの細胞壁成分の合成についてみると、キチンと-1,3-グルカンは、細胞質膜に埋め込まれた合成酵素が、細胞内の糖ヌクレオチドを材料にして単量体を連結し、細胞外に重合体を放出している。マンナンタンパク質は、分泌タンパク質と同じように、小胞体で膜を透過した後、ゴルジ体経路で細胞表面まで糖鎖修飾を受けながら運ばれてくることが明らかになっている。ところが、-1,6-グルカンは、未だにその正確な合成機構が明らかになっていない。

出芽酵母では遺伝学的解析が進んでいるので、-1,6-グルカンの量が減少した突然変異株が早くから研究された。キラ毒素K1が酵母細胞に吸着するためには-1,6-グルカンが必要なため、これらの変異株はキラ毒素に耐性になり、この性質は-1,6-グルカン量を推定する優れた指標になる。この変異株の原因遺伝子はすべて同定され、産物のアミノ酸配列も明らかになったが、キチンと-1,3-グルカンの合成で働いているような、細胞膜に埋まることができる複数の膜貫通疎水領域をもったタンパク質は見つからなかった。さらに、これらのタンパク質の細胞内局在部位を調べると、小胞体にあるものが多く、ゴルジ体、細胞膜、ペリプラズムなどに存在すると推定されるものもあった。即ち、-1,6-グルカンの合成のためには、小胞体から細胞表面にいたる分泌の小胞輸送経路のいろいろな場所にあるタンパク質が関与

していることになる。

アミノ酸配列の特徴をみると、小胞体にある可溶性の Kre5 タンパク質は、UDP-グルコースから糖タンパク質の N-糖鎖のマンノースにグルコースを転移する酵素と相同的で、遺伝子破壊は致死である。互いに相同な配列領域をもつ Kre6 と Skn1 は、膜を一回貫通する型膜タンパク質で、小胞の内側に入る領域に、グリコシダーゼにみられる配列モチーフをもっている。遺伝子の二重破壊が致死なので、Kre6 と Skn1 は重複して必須な機能を担っている。N 末端に分泌性シグナル配列を持つ Kre9 と Knh1 も相同で、二重破壊株が致死なので、同じように重複した必須機能をもつ。私たちが本研究を始めるきっかけとなった小胞体膜タンパク質 Keg1 も生育に必須なタンパク質で、温度感受性変異株が -1,6-グルカンの減少を示し、野生型 Keg1 は Kre6 と結合する。これらの、糖にかかわる酵素の可能性をもつ Kre5 および Kre6/Skn1、それとは別の働きをしそうな Keg1 および Kre9/Knh1 が、-1,6-グルカン合成に必須なタンパク質で、他はシャペロンとしてフォールディングを援けるなど、必ずしも必須ではないが重要な補助的機能をもつと考えられる。

本研究開始までに私たちが明らかにしたことは、上記の先行研究の確認と整理の上で、Keg1, Kre6/Skn1, Cne1 が小胞体において相互作用していることを可溶性膜タンパク質の免疫沈降で実証し、温度感受性 Keg1-1 では Kre6 との結合が激減していることを発見した。Kre5, Keg1, Cne1 は小胞体に局在する。Kre6/Skn1 は、小胞体にもっとも多く存在することが定量的な細胞分画で再現性良く認められたが、その一部分は生長する出芽部位の細胞膜にも検出された。この Kre6/Skn1 の一部が芽へ移行することは、小胞体において Keg1 や Cne1 と正常に相互作用することに依存し、Kre6 変異体の解析結果とも合わせて、-1,6-グルカン合成に必須であることが明らかになった。

## 2. 研究の目的

上述したように、必須の細胞壁成分である -1,6-グルカンの合成は、UDP-グルコースからのグルコースの重合酵素反応と細胞内小胞輸送とが共役してはじめて進行する、きわめてダイナミックでデリケートなプロセスと思われる。それぞれのタンパク質が、いつ・どこで・どれと一緒に・何をしているのかを明らかにすることが -1,6-グルカン合成の理解には重要であり、本研究の目的はその一部でも確実なことを実証することである。即ち、関与するタンパク質の局在と相互作用を正確に把握し、その中でグルコース単糖がどのように連結されるかという酵素反応の実態を明らかにしたい。さらに、これまでに明らかにされた事柄を総合して、実際に細胞内で起こっていることを推測した最も合理的な作業仮説を構築し、その中から実

験的に検証可能なプロセスを抽出して次の展開を目指すようにすることも、非常に重要である。

### 3. 研究の方法

#### (1) タンパク質の局在解析

本研究で対象にしているタンパク質の正確な細胞内局在を明らかにするための検出法として、便利なために頻繁に一般に使われている蛍光タンパク質やエピトープタグによる蛍光免疫検出法は、きわめて危険である。最初に実験を進めるためにはやむを得ないが、タグの種類とタグをつける位置は複数検討すべきであるし、プラスミドベクターや異種プロモーターの使用は避けて、染色体上の本来の遺伝子を加工すべきである。研究成果でも述べるが、本来のタンパク質に対する特異抗体を使用することで始めて明らかになった事実がある。本研究では、可能な限りタグ標識されていないタンパク質を検出するための抗体の調製を試みた。また、顕微鏡観察のみではなく、細胞分画などの異なる手法による局在解析結果との異同も必ず検討した。

#### (2) 変異タンパク質の解析

タンパク質の機能と相互作用を調べる上で、温度感受性タンパク質のような、条件によって性質を変えられる変異体の利用はきわめて有用である。Kre6/Skn1 のように重複した相同タンパク質で必須機能をもっている場合には、*skn1* の株で *kre6* の温度感受性変異株を error-prone PCR により作製した。Kre5 温度感受性変異は、先行研究で報告されたアミノ酸置換体を作製したが、私たちの酵母株では温度感受性を示さなかったため、独自に複数の変異体をやはり error-prone PCR で作製した。

#### (3) タンパク質相互作用と複合体の解析

膜タンパク質は Triton X-100 ないし digitonin で膜を可溶化した後、特異抗体あるいは抗タグモノクローン抗体で免疫沈降し、沈降してくるタンパク質を抗体で検出した。未知の共沈タンパク質については、SDS-PAGE 後に染色により検出したタンパク質バンドを切り出し、マイクロペプチドマッピングで同定した。

免疫沈降により部分精製した対象タンパク質を含む複合体の酵素活性を調べるには、免疫沈降したビーズをそのまま酵素反応系に投入し反応をおこなった。ネガティブ・コントロールとして、タグ標識タンパク質の場合はタグを持たない株を、特異抗体を用いる場合は当該タンパク質の温度感受性変異株を用いた。

#### (4) オリゴ糖の解析

-1,6-グルカンのオリゴ糖鎖は、市販のプスツランを -1,6-グルカナーゼで部分分

解した後に PA 化し、クロマトグラフィーで均一サイズのを分画して調製した。

### 4. 研究成果

#### (1) *KRE5*, *KRE6* の温度感受性株

Kre5 は、C 末端に HDEL 配列をもち小胞体に常駐する可溶性タンパク質で、タンパク質品質管理にかかわるカルネキシンサイクルのメンバーである UDP-glucose: glycoprotein glucosyltransferase (UGGT) の酵母ホモログである。出芽酵母では UGGT は機能していないと報告されており、私たちはこの酵素が -1,6-グルカン合成のプライマーに最初のグルコースを付加する活性があるのではないかと予想している。Kre5 の特異抗体が取得できていないので、シグナル配列が切断された後の N 末端に 3HA タグをもつ 3HA-KRE5 の 5' 側約半分を変異処理して温度感受性変異をえた。*kre5-1* では、F502L, D616G, T670P の 3 アミノ酸置換がおきていた。温度感受性変異株は許容温度でも K1 キラー毒素に耐性を示し、-1,6-グルカン量が減少していると予想される。ウエスタンブロットで見ると、タンパク質量は野生型よりやや増えていた。*kre5-1* 株では許容温度でも Kre6 の量が減少し、Kre6 の芽への局在量が減少していた。Kre6 のリン酸化状態については、リン酸化されていないバンドの割合が高くなっており、後述する芽への移行とリン酸化の対応がここでも認められた。Kre5 タンパク質の変異が、Kre6 タンパク質に影響することが明らかになった。

Kre6 の温度感受性変異株は *skn1* の遺伝背景で作製した。はじめに取得した変異体には複数のアミノ酸置換が入っていたが、野生型と組み換えて調べたところ、小胞の内側にある D310G, N689S (*kre6-5*), S300P, N691D (*kre6-6*) の置換だけで温度感受性を示した。Kre6 のタンパク質量は野生型とあまり変わらなかったが、許容温度でも K1 キラー毒素耐性を示し、リン酸化されたバンドの割合が減少していた。

#### (2) Kre5 タンパク質

Kre5 タンパク質の特異抗体を取得するために、大腸菌やピキア酵母で大量発現を各種発現系により試みたが成功しなかった。出芽酵母内で、N 末端 19 アミノ酸のシグナル配列を取り除き、C 末端の小胞体常駐シグナル HDEL を 6His タグに置換した変異体を、多コピーベクター上から GAPDH プロモーターで高生産させた細胞質から、Ni-NTA Agarose アフィニティカラムで 30 mg/ml のタンパク質を回収した。このタンパク質は、特異抗体の調製のための抗原として使用するとともに、UDP-glucose からのグルコース転移活性の検出を試みた。N 糖鎖の PA 化オリゴ糖である  $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$ ,  $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$ ,  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$  を受容体として、いくつかの反応系を試みたが、グルコースの転移を認め

ることはできなかった。また、酵母小胞体膜タンパク質を Triton X-100 で可溶化したものを受容体として反応系を組み、エンドグリコシダーゼ H で切り出したオリゴ糖を分画して調べたが、糖鎖組成の変化は認められなかった。

### (3) Kre9 タンパク質

276 アミノ酸からなる Kre9 は、重複した機能をもつ相同な Knh1 との必須タンパク質のペアのうちで通常は主要な役割を果たしている。Kre9 の局在については、Bussey らの先行研究で、C 末端 15 アミノ酸配列を抗原とした抗体で、野生型では検出できないが、高発現した株では培地に O 糖鎖で高度に修飾された 55-60 kDa のタンパク質が検出されるとされている。彼らが抗原として用いたペプチド配列の上流には、ゴルジ体のプロセシングプロテアーゼ Kex2 による切断のコンセンサス配列である KR があることと、そもそも高発現時ではなく通常の細胞内での局在が知りたいので、独自に検討を行った。

Kre9 の C 末端に 3HA タグをつけたタンパク質は、野生株と同等の K1 キラーに対する感受性を示すので、十分な -1,6-グルカン合成活性を保持していると考えられた。このタンパク質は、免疫蛍光染色法では小胞体と出芽部位にシグナルが認められ、Kre6 と類似の局在をしていた。細胞破碎液を Triton X-100 で可溶化して抗 HA モノクローン抗体で免疫沈降すると、Kre6 が一緒に回収された。共沈したもののリン酸化状態については、リン酸化されていない Kre6 が多かった。Kre9 と Kre6 がタンパク質間で相互作用することが分かったので、*kre9* 変異株で Kre6 タンパク質の局在を調べたところ、間接蛍光染色法で出芽部位への移行が認められなかった。これは -1,6-グルカンが減少する *keg1-1*, *cne1* などの変異株で見られたと同じ現象で、-1,6-グルカン合成に Kre6 の出芽部位への移行が必要で、それにこれら多くのタンパク質が関与していることが確認された。*kre9* 変異株で Kre6 タンパク質のリン酸化状態を調べると、リン酸化されたものの割合が減少していた。

Kre9 の特異抗体を得るために、シグナル配列を除いた 22-276 アミノ酸部分を GST 融合タンパク質として大腸菌で生産し、凝集した不溶性タンパク質を SDS-PAGE で精製した。また、C 末端に 6His を付加した Kre9 を酵母 *kex2* 株で高生産させ培地中に分泌されたものもアフィニティ精製してウサギの免疫に用いた。GST-Kre9 抗原により免疫した抗血清を、酵母で生産した Kre9-6His でアフィニティ精製した抗体は、ウエスタンブロットで糖鎖で修飾された Kre9 タンパク質を特異的に検出することができた。しかし他に泳動位置は異なるが強く反応するタンパク質があるため、免疫蛍光染色に使うことはできなかった。しかし、この抗体を用いて野生型の酵

母細胞破碎液を蔗糖密度勾配遠心により分画して Kre9 の局在をウエスタンブロットで調べたところ、膜小胞中ではなくペリプラズムに分泌していることが明らかになった。酵母で生産した Kre9-6His を抗原とした血清は、糖鎖全般と強く反応する抗体が多く含まれているため Kre9 の特異的な検出に使うことはできなかった。

Kre9 の C 末端の Kex2 認識サイトと推定された KR のアルギニンをアラニンに置換した Kre9(R263A)-3HA を作製して Kre9-3HA と比較したが、形質にはっきりした違いは認められなかった。しかしいずれも、野生株より *kex2* 株で電気泳動度の遅れが見られることから、ここは異なる位置で Kex2 による切断を受けていることが予想された。ちなみに、R263 以降を欠失させた変異体は *kre9* 株と同程度にきわめて生育が遅く、この C 末端領域の存在は Kre9 の機能に必須であると考えられた。

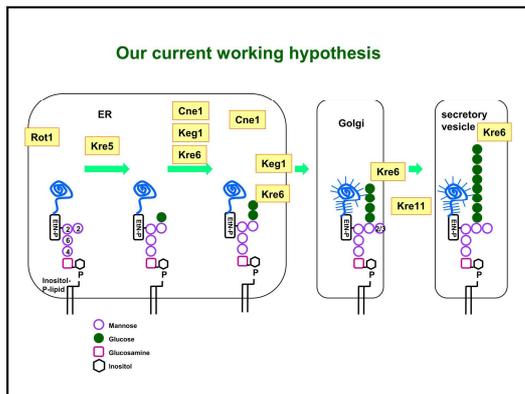
### (4) Kre6 のリン酸化

すでに何度か記述したように、Kre6 タンパク質にはリン酸化されたものが存在し、-1,6-グルカン合成が正常な状態ではリン酸化されたものが多く認められ、*keg1-1*, *kre5-1*, *cne1*, *kre9* など -1,6-グルカン合成が低下したときにはリン酸化されたものが減少する。このリン酸化と Kre6 の出芽部位への移行も相関している。Kre6 の細胞質ドメインはアクチン関連タンパク質との相互作用が報告されており、この領域のリン酸化状態が、Kre6 タンパク質の細胞内輸送を介して -1,6-グルカン合成を制御していると予想される。リン酸化された Kre6 タンパク質とされていない Kre6 タンパク質を SDS-PAGE ゲルから切り出し、プロテアーゼ消化した断片の MALDI-TOF MS 解析でリン酸化アミノ酸を絞り込む解析を行ったが、明確な結論は得られなかった。アミノ酸配列解析からリン酸化が予想されるモチーフ内のセリン・スレオニンをアラニン置換した変異体の解析も試みたが、残基の決定には至らなかった。さらに、関与するタンパク質リン酸化酵素について、酵母の遺伝子破壊株ライブラリを探索したが、単独の遺伝子破壊株の中にはリン酸化されなくなるものは見出されなかった。

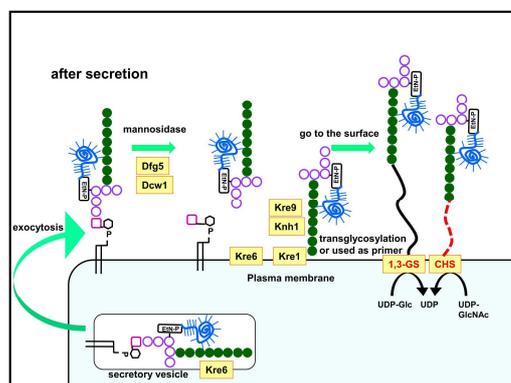
### (4) -1,6-グルカン合成のモデル

これまでの研究成果から、-1,6-グルカン合成に関わる、ER から細胞膜まで細胞内各所に存在するタンパク質の中で、グルコースの転移反応に直接関わる候補は Kre5 と Kre6/Skn1 に絞られ、他のタンパク質は、これらと複合体を形成して、そのフォールディング・働く場所への細胞内輸送・活性制御等に働いていると考えられる。これに基づいて、私たちの現在の作業仮説を示すと、以下のようになるだろう。 -1,6-グルカン合成のプ

ライマーとなるのは、おそらく細胞壁マンナンタンパク質のうち GPI-アンカー型の前駆体で、哺乳類では構造不良糖タンパク質 N 糖鎖のマンノースにグルコースを付加する UGGT のホモログである Kre5 が、酵母では GPI-アンカー中のマンノースにグルコースを転移すると考えられる。Kre6 はその糖鎖の伸長に寄与すると考えられる。



完成した細胞壁では、最初に示した 4 種類のポリマーが共有結合して巨大な構造体を作っている。これまで、これは糖鎖間の組換え反応を触媒する転移酵素が働いてできると予想されてきたが、 $\beta$ -1,3-グルカン同士について Bgl2 や Gas1 が働くことが分かったのみで、それ以上の探索は成功していない。上に示したモデルではマンナンタンパク質と  $\beta$ -1,6-グルカン間の結合は、プライマーからの糖鎖の伸長という形で、最初から作られている。これを拡張すると、他の「ネットワーク」形成も、実はポリマー完成後に起るのではなく、架橋の要にある  $\beta$ -1,6-グルカンが、下図のように、 $\beta$ -1,3-グルカン合成のプライマーとしても働き、最初から共有結合されている可能性を提起することができよう。



## 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4件)

- 野田陽一, 依田幸司. 出芽酵母細胞壁 1,6-グルカン合成の謎を解く. 化学と生物, 51 (6) 383-388 (2013), [https://katosei.jsbba.or.jp/download\\_pdf.php?aid=81](https://katosei.jsbba.or.jp/download_pdf.php?aid=81), 査読有.
- Yoichi Noda and Koji Yoda. Molecular mechanisms of the localization of membrane proteins in the yeast Golgi compartments. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 77 (3), 435-445 (2013), DOI 10.1271/bbb.120982, 査読有.
- Tomokazu Kurita, Yoichi Noda, and Koji Yoda. Action of multiple endoplasmic reticulum chaperon-like proteins is required for proper folding and polarized localization of Kre6 protein essential in the yeast cell wall  $\beta$ -1,6-glucan synthesis. Journal of Biological Chemistry, 287 (21) 17415-17424 (2012), DOI 10.1074/jbc.M109.086272, 査読有.

[学会発表](計17件)

- 林田光弘, 野田陽一, 依田幸司. 出芽酵母細胞壁  $\beta$ -1,6-グルカンの合成に関与する Kre9 と Kre6 の機能解析. 日本農芸化学会 2015 年大会. 2015.3.28. 岡山大学(岡山).
- Koji Yoda and Yoichi Noda. ER membrane protein Keg1 is essential for yeast cell-wall  $\beta$ -1,6-glucan synthesis through folding and functional localization of Kre6 and Skn1. The 30th International Specialized Symposium on Yeast (ISSY2013) "Cell Surface and Organelles in Yeasts: from Basics to Applications." 2013.6.22. Hotel Kontakt (Stara Lesna, Slovakia)
- Koji Yoda. Novel ER membrane protein Keg1 is essential for yeast cell wall  $\beta$ -1,6-glucan synthesis through folding of Kre6/Skn1 and their localization to the growing plasma membrane. The 5th International Conference on Molecular Mechanisms for Fungal Cell Wall Biogenesis. 2012.6.7. Hotel Zora (Primosten, Croatia).

[その他]

ホームページ等

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/molbiotech/>

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

依田 幸司 (YODA, Koji)  
東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授  
研究者番号：20143406