

平成 30 年 9 月 11 日現在

機関番号：63801

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26292046

研究課題名(和文) 菌糸制御の分子機構

研究課題名(英文) Molecular mechanism of hyphal development

研究代表者

仁木 宏典 (NIKI, Hironori)

国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・教授

研究者番号：70208122

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：二形性酵母は環境ストレスに応じて酵母から糸状菌へと増殖様式を変換する。*Candida albicans*ではRas1-MAPKシグナル伝達経路が菌糸転換に関与していることが報告されている。*S. japonicus*でのRas1-MAPK経路の役割を明らかにするため、Ras1-MAPK経路の遺伝子破壊株を作成し、菌糸転換への影響を調べた。その結果、いずれのRas1-MAPK経路も菌糸転換には必要ではなかった。しかし、これら経路の上流にあるRas1は菌糸転換に必須であった。細胞極性の制御経路として知られるRas1-Cdc42経路が菌糸転換に必要であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Dimorphic yeasts transform into filamentous cells or hyphae in response to environmental cues. The Ras1-MAPK pathway is a major signal transduction pathway for hyphal transition in *C. albicans*. To examine how hyphal transition is induced by environmental stress-triggered signal transduction, we studied the hyphal transition of deletion mutants of MAPK pathways in *Sz. japonicus*. We found that the MAPK pathways are not involved in hyphal induction, although the mating response is dependent on these pathways. However, only Ras1 deletion caused a severe defect in hyphal development via both DNA damage and environmental stressors. In fact, genes on the Cdc42 branch of the Ras1 (Ras1-Cdc42) pathway, *efc25Sj*, *scd1Sj* and *scd2Sj*, are required for hyphal development. Cell morphology analysis indicated that the apical growth of hyphal cells was inhibited in Ras1-Cdc42-pathway deletion mutants. Thus, the control of cell polarity by the Ras1-Cdc42 pathway is crucial for hyphal development.

研究分野：分子生物学

キーワード：分裂酵母 糸状菌 菌糸 二形性 光応答 温度応答 シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

真菌は産業上有用である一方、動植物の病原性因子としての一面をも持つ。真菌の菌糸は、免疫細胞による防御システムから逃れ組織内部に入り込み増殖する。そのため、治療や除去を困難にする。菌糸という特異な細胞増殖機構、特に組織への浸入メカニズムを分子レベルで理解することが、真菌感染症の治療には必要不可欠である。実際これまでもカンジダ菌や出芽酵母を用いて菌糸の研究が行われて来ている。カンジダ菌は病原性の二形性酵母で菌糸形でのみ病原性を示す。そのため、菌糸誘導に関わる変異体の研究が行なわれている。が、カンジダ菌の遺伝様式は複雑で遺伝解析が容易ではない。他方、出芽酵母は遺伝解析に優れているものの偽菌糸しか形成しない。これらの短所を補うモデル真菌が *Schizosaccharomyces japonicus* である。当研究室では、菌糸形の生活環を持った二形性分裂酵母 *S.japonicus* をモデル生物として利用すべく、これまでにゲノム配列の決定と遺伝解析用リソースの開発を行ってきた。

S.japonicus は非病原性でありながら、環境ストレスにตอบสนองして酵母から菌糸へ転換し、よく発達した菌糸を生ずる。またカンブトテシンの添加により可逆的な菌糸誘導が可能であることから、遺伝学的に菌糸誘導の研究が可能となった (Furuya & Niki, 2010)。この時、どのシグナル系経路から菌糸の誘導されるのか明らかになっていない。さらに、菌糸が光や温度の刺激にตอบสนองして同調的な細胞分裂の活性化を起すことを見出した (Okamoto et al., 2013)。この光応答にはアカパンカビで見つかった青色光受容体 WCC のオルソログ (Wcs1 と Wcs2) が関与していた。WCC のオルソログは真菌に広く保存されているが、酵母としては 2 例目

である。光応答は真菌において、概日リズムの獲得の前に既に存在していたより原始的な環境応答反応である。今回、遺伝的に解析が容易な分裂酵母でこの現象が発見されたことから、光応答反応の制御機構の研究が進むと期待できる。さらに、興味ある点は同じく日周期的な変動環境刺激である気温によっても、同様な現象がおこることである。温度の刺激に対する応答は WCC のオルソログに依存しないことから、別に温度受容体があると示唆された。真菌類の温度受容体に関しては、まだよく判っていないというのが現状である。生物一般でも温度のセンサーについての研究は、未開の領域である。この光や温度による同調的な細胞分裂の活性化では、細胞周期の制御が深く関与しているであろう。その制御の仕組みについても解明を試みる。

二形性酵母は外的ストレスにより、菌糸へと増殖の転換を起す酵母である。二形性のジャポニカス分裂酵母の菌糸が光応答することを発見した。真菌では青色にตอบสนองする WC 受容体が広く保存されている。そのホモログがこの現象にも関与していた。光照射後に、菌糸は同調的に細胞分裂を活性化させる。この同調的な細胞分裂の活性化は温度の変化によっても生じ、未知の温度センサーの存在を示唆する。ジャポニカス分裂酵母を使い、日周期的な環境要因の変化、すなわち、光や温度の刺激に対する細胞の適応現象とその制御機構、さらにその生理的な意義の解明をめざす。本酵母は菌糸誘導の制御と共に光や温度の刺激に対する応答の研究のための新たなモデルであり、その研究は植物等の他の生物の光や熱の応答の分子機構理解にも繋がると期待できる。

2. 研究の目的

二形性酵母は外的ストレスにより、菌糸へと

増殖の転換を起こす酵母である。外的ストレスを感知しそのシグナルを伝達する経路について明らかにする。

二形性のジャポニカス分裂酵母の菌糸が光応答することを発見した。真菌では青色に応答する WC 受容体が広く保存されている。そのホモログがこの現象にも関与していた。光照射後に、菌糸は同調的に細胞分裂を活性化させる。この同調的な細胞分裂の活性化は温度の変化によっても生じ、未知の温度センサーの存在を示唆する。ジャポニカス分裂酵母を使い、日周期的な環境要因の変化、すなわち、光や温度の刺激に対する細胞の適応現象とその制御機構、さらにその生理的な意義の解明をめざす。本酵母は菌糸誘導の制御と共に光や温度の刺激に対する応答の研究のための新たなモデルであり、その研究は植物等の他の生物の光や熱の応答の分子機構理解にも繋がると期待できる。

3 . 研究の方法

真菌類の中でも分裂酵母は Schizosaccharomyces 属の 4 種だけである。この国際共同プロジェクトにより、ジャポニカス分裂酵母のゲノムが解読され、4 種のゲノムの比較よりそれぞれの種に固有の遺伝子が報告されている (Rhind et al., 2011) 。4 種の中で菌糸を形成できるのはジャポニカス分裂酵母だけである。このことから、ジャポニカス分裂酵母に固有の 401 遺伝子の中に、菌糸形成に関与する遺伝子も存在すると予想された。そこで、固有の 401 遺伝子の全てを欠損させた変異株コレクションの作製を計画した。401 遺伝子の破壊株を作成に際してまずゲノム情報を精査し、アミノ酸配列レベルで他の分裂酵母には確かに相同性が保存されていない事を確認した。その結果、ジャポニカス分裂酵母に固有の遺伝子は約 252 株に絞られ

た。これら遺伝子らについて破壊株作製に使用する遺伝子領域の配列を決め、また破壊株の効率的な作成方法について検討を行い順次作製に取り組んだ。そして、作遺伝子破壊株について菌糸の形成能力などを調べた。

4 . 研究成果

252 個の固有遺伝子をそれぞれ破壊したライブラリーを作成した。分裂酵母の中でジャポニカスに固有の性質としては、トポイソメラーゼ I の阻害剤であるカンプトテシンの添加もしくは栄養枯渇に依存した菌糸型成長と、分裂期後期に起こる半開放型核分裂の 2 つが挙げられる。我々は、これらの菌糸と分裂期の特徴的な性質が、分裂酵母の中でジャポニカス分裂酵母にのみ存在する遺伝子に依存する可能性を考え、ライブラリーをカンプトテシン存在下で培養した。その結果、野生型に比べ菌糸成長が阻害される破壊株 (菌糸形成因子) と菌糸成長が促進される破壊株 (菌糸阻害因子) を得た。また、ライブラリーを微小管重合阻害剤であるチアベンダゾール存在下で培養したところ、感受性を示す破壊株 (分裂期因子) を得た。これらの結果から、分裂酵母の中でジャポニカスにのみ存在する遺伝子の中に、菌糸形成または分裂期制御に関わる遺伝子があることがわかった。

次にジャポニカス分裂酵母固有遺伝子ライブラリーから、温度変化に応答しない株をスクリーニングし、そのような変異体一株の分離に成功した。破壊されていた遺伝子は、557 アミノ酸、推定分子量 63kDa のタンパク質をコードしており、*trj1* と命名した。Trj1 の BLAST 検索から 200 種以上の真菌類にその相同タンパク質が保存されていた。細胞内での局在を特定するために Trj1 の GFP 融合株の蛍光を観察したところ、ミトコンドリアと細胞質の顆粒状の構造体への局在が観察された。また *trj1* の転写量は培養温度の上昇後、18 時間かけて転写量が直線的に増

加し、その後やはり 18 時間かけて元のレベルまで減少手いった。trj1 の転写が温度により周期的に変化することが明らかとなった。

外部ストレスのシグナル経路に関しては、Ras1-MAPK 経路の機能について調べた。まず分裂酵母のゲノムの比較から、Ras1-MAPK 経路の遺伝子を特定した。そしてそれら遺伝子破壊株を作製した。ras1^{Si}, byr2^{Si}, byr1^{Si}, spk1^{Si}, ste11^{Si} の遺伝子破壊株は生育には影響はなかったが、*S. pombe* と同様に不稔となっていた。しかし、これらの遺伝子破壊株では菌糸が誘導された。次に、Wis4/Win1-Wis1-Sty1 経路と Mkh1-Pek1-Pmk1 経路の遺伝子破壊株を作製し菌糸形成能を調べたが、いずれの遺伝子も菌糸誘導には必須ではなかった。しかし、これら遺伝子の上位に位置する Ras1 の欠損変異株では菌糸の誘導能が失われていた。また、菌糸は酵母と異なり細胞の一端で先端成長する極性を持った細胞である。Ras1 ではその極性に乱れが生じていた。このことから、Ras1-Cdc42 経路が活性化され菌糸の成長が起きていることがわかった。

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 6 件)「全て査読有り」

- (1) Nozaki, S., Furuya, K., and Niki, H. (2018). The Ras1-Cdc42 pathway is involved in hyphal development of *Schizosaccharomyces japonicus*. FEMS Yeast Res. 18, doi:10.1093/femsyr/foy031.
- (2) Seike, T., and Niki, H. (2017). Mating response and construction of heterothallic strains of the fission yeast *Schizosaccharomyces octosporus*. FEMS Yeast Res. 17. doi: 10.1093/femsyr/fox045.
- (3) Niki, H. (2017). Induction of Hyphal Growth in *Schizosaccharomyces japonicus*. Cold Spring Harbor Protocols 2017, pdb.prot091868, pdb.prot091868.
- (4) Aoki, K., and Niki, H. (2017). Transformation of *Schizosaccharomyces japonicus*. Cold Spring Harbor Protocols

2017, pdb.prot091850. doi: 10.1101/pdb.prot091850.

- (5) Aoki, K., Furuya, K., and Niki, H. (2017). *Schizosaccharomyces japonicus*: A Distinct Dimorphic Yeast Among the Fission Yeasts. Cold Spring Harbor Protocols 2017, pdb.top082651, doi: 10.1101/pdb.top082651.
- (6) Furuya, K., and Niki, H. (2017). Mating, Spore Dissection, and Selection of Diploid Cells in *Schizosaccharomyces japonicus*. Cold Spring Harbor Protocols 2017, pdb.prot091843, pdb.prot091843..

〔学会発表〕(計 5 件)

- (1) 日本遺伝学会第 89 回大会 村田稔大会委員長 岡山大学(2017 年)分裂酵母の中でジャポニカスにのみ存在する遺伝子群の解析。仁木 宏典、青木 敬太、岡本 尚、野崎 晋五
- (2) 酵母遺伝フォーラム第 50 回研究報告会 白髭克彦、前田達哉世話人 東京大学(2017 年)真菌類に保存される温度応答関連因子 Trj1 の機能。岡本 尚、仁木 宏典
- (3) 酵母遺伝フォーラム第 50 回研究報告会 白髭克彦、前田達哉世話人 東京大学(2017 年)分裂酵母の中でジャポニカスにのみ存在する遺伝子群の解析。青木敬太、野崎晋五、岡本 尚、仁木 宏典
- (4) 第 10 回日本ゲノム微生物学会年会 黒川 顕年会長 東京工業大学(2016 年)真菌の温度応答関連因子 Trj ファミリータンパク質の構造と機能。岡本 尚、仁木 宏典
- (5) 第 9 回日本ゲノム微生物学会年会 吉田健一年会長、神戸大学(2015 年) 真菌類ゲノムに保存される光応答因子の系統樹分析とジャポニカス分裂酵母を用いた機能解析。岡本尚、古谷 寛治、野崎 晋五、青木 敬太、仁木 宏典

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.nig.ac.jp/labs/MicroGen/>

6．研究組織

(1)研究代表者

仁木宏典 (NIKI,Hironori)

国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・
教授

研究者番号：70208122