

平成30年6月4日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07352

研究課題名(和文) 真菌細胞壁グルカン合成機構の総合的解明

研究課題名(英文) Comprehensive study on the mechanism of fungal cell-wall glucan synthesis

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(農学部)・名誉教授

研究者番号：20143406

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：Saccharomyces cerevisiae等の酵母や真菌の細胞壁の必須構成成分である β -1,6-グルカンの合成機構解明を目指した研究を行った。 β -1,6-グルカン合成経路において重要な機能をもつことが予想されるKre5, Kre6およびKre9について主に生化学的手法を用いて解析し、その機能や相互作用に関する新知見を得た。これらは、 β -1,6-グルカンの合成経路を標的として抗真菌作用を示す新たな化合物・薬剤の発見を可能にする重要な成果である。

研究成果の概要(英文)：Beta-1,6-glucan is an essential cell wall component of the budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. However, the details of the beta-1,6-glucan biosynthetic pathway remain largely unknown. We analyzed biochemically the functions of Kre5, Kre6 and Kre9, which have important roles in the beta-1,6-glucan biosynthesis, and obtained findings regarding their functions and protein-protein interactions. These findings will pave the way for the discovery of the new antifungal reagents.

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

真菌を含む微生物はしばしば細胞質膜の外側に細胞壁を持つ。様々な真菌のモデル生物として研究が進んでいる出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の細胞壁は、キチン、マンナン蛋白質、グルコースのポリマーである β -1, 3-グルカンと β -1, 6-グルカンから構成されている。キチン、マンナン蛋白質、 β -1, 3-グルカンに関しては、どのような蛋白質が、細胞内のどこで、どのような機能をもち生合成が進行しているかがほぼ明らかになっているといつてよい。一方、それら細胞壁の成分をお互いにつなぎ合わせる役割を担う β -1, 6-グルカンに関しては、合成に関連する複数の遺伝子が killer toxin 耐性を指標としたスクリーニングにより取得されているもの (*KRE* 遺伝子)、それらがコードする蛋白質が細胞内小胞輸送経路中の様々な場所に散在していることや、個々の蛋白質の精製の困難さなどにより、それらの機能も生合成の経路も全く不明であった。

そのような状況で、我々はゲノム情報をもとに、オルガネラ膜に局在し、必須遺伝子にコードされる酵母蛋白質の網羅的な解析を行った。そのひとつで、Keg1 と我々が命名した蛋白質が、おそらくはシャペロン様の働きをすることで、糖加水分解酵素と相同性をもち β -1, 6-グルカン合成に重要な Kre6 の機能発現を可能にするを見出した。またこの研究において調製した抗 Kre6 抗体により、Kre6 が β -1,6-グルカンが盛んに合成される場所である出芽中の芽に局在することを見出した。

このような知見をもとに、さらに個々の蛋白質の機能をより詳細なレベルで明らかにし、 β -1, 6-グルカンの合成機構を解明、真菌の増殖のメカニズムをより良く理解することを目的とした。またこれらは、 β -1, 6-グルカンの合成経路を標的とすることによ

り抗真菌作用を示す新たな化合物・薬剤の発見を可能にするため、応用面での貢献も大きいことが期待された。

2. 研究の目的

上記のような背景のもと、本研究では、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の β -1,6-グルカン合成経路において重要な機能をもつと予想される Kre5, Kre6, Kre9 の細胞内局在、局在化機構、そして機能を明らかにすることにより、真菌細胞壁 β -1,6-グルカンの生合成経路を解明することを目指す。抗真菌剤の新たな標的の作出も視野に入れた解析も行う。

3. 研究の方法

(1) 昆虫細胞を用いた蛋白質の発現と精製

昆虫細胞は Sf9、発現系は Bac-to-Bac Baculovirus expression system (Thermo Fisher Scientific) を用いた。基本的にシグナル配列を付加して培地に分泌生産させた。融合した His タグを利用して培地からまず Ni-カラムによりアフィニティー精製し、その後、DEAE カラムによる分離を行い、さらに精製度を高めた。

(2) アミノ酸置換の導入

Kre6 のアミノ酸置換は、TAKARA の Prime STR MAX を用いて行った。目的のアミノ酸置換をもつプライマーで、テンプレートとして用いたプラスミド全体を PCR で増幅する方法で行った。*KRE6* 遺伝子と *SKN1* 遺伝子 (*KRE6* の相同遺伝子) の二重破壊株が致死になることを利用して、それぞれの置換体の機能の有無を調べた。また置換体のウエスタンブロッティングによる検出、間接蛍光抗体法による観察は抗 Kre6 抗体を用いて行った。

(3) 共免疫沈降法による蛋白質相互作用

細胞破碎液を Triton X-100 あるいは

digitonin を含む緩衝液で可溶化し、対象とする蛋白質に対する抗体、あるいは HA などのタグを付加した蛋白質の場合はタグに対するモノクローナル抗体と Protein A beads を加えて一晩低温で回転撈拌した。Beads を洗浄した後、免疫沈降物から SDS を含む緩衝液で溶出し、共免疫沈降した蛋白質をウエスタンブロッティングで検出した。

(4) オリゴ糖の解析

精製蛋白質の基質として用いた β -1,6-グルカンのオリゴ糖鎖は以下のように調製した。地衣類の細胞壁から調製された β -1,6-グルカンを豊富に含む pustulan (市販) を酸で部分的に加水分解した後、HPLC で分画、必要な糖鎖長のオリゴ糖を分取し、反応に用いた。

4. 研究成果

(1) Kre6 へのアミノ酸置換導入。

N 糖鎖付加部位、ER からの搬出に関与すると考えられる共通配列、糖加水分解酵素の活性中心に共通する配列にアミノ酸置換を導入して、活性への影響を解析した。Kre6 は推定 5 箇所の糖鎖付加部位をもち、まずそれら一箇所ずつに、またその実験結果を受けて、組み合わせでアミノ酸の置換を導入した。その結果、N 末から 2 番目の糖鎖付加部位のアミノ酸置換は Kre6 の機能を完全に消失させた。また 3 番目と 4 番目に関しては、個々の置換でも Kre6 の SDS-PAGE での挙動に影響が見られたが、同時に置換を導入すると Kre6 の機能が完全に失われた。糖鎖の不全が機能を消失させた理由を知ることを目的に、Kre6 の共免疫沈降実験を行った。2 番目、もしくは 3 番目プラス 4 番目の N 糖鎖付加部位へのアミノ酸置換は、調べた範囲で Kre6 と結合することを明らかにしていた

蛋白質との共免疫沈降には影響を及ぼさなかった。また Kre6 は糖加水分解酵素ファミリー (GH) 16 に相同性を示す領域を持ち、またその活性中心と共通の配列 (ExDxxE) を持つ。Kre6 の同配列にアミノ酸置換を導入したところ、局在などには顕著な影響が見られなかったが、機能は完全に失われた。このことは、Kre6 は糖加水分解や類似の反応を担うことにより、 β -1,6-グルカンの合成経路で機能することを示唆する。

Kre6 は ER からの搬出を促進する共通配列を細胞質側の領域にもつにも関わらず、ER と細胞質膜の両方に存在する。その局在化や細胞質膜への輸送の機構を知りたいと考え以下の実験を行った。COPII コートとの結合により、ER からの搬出を促進すると考えられる DXD 配列が、Kre6 の N 末の細胞質側の領域に 3 箇所存在したので、それらに全ての組み合わせでアミノ酸置換を導入して、挙動や機能を解析した。予想に反して、3 箇所同時に置換した場合でも、Kre6 の量や SDS-PAGE での挙動、間接蛍光抗体法による局在に大きな変化は見られなかった。このことから、配列未知の ER 搬出シグナルが Kre6 では機能していることが示唆された。

(2) 細胞質、膜に存在する β -1,6-グルカンを切断する活性。

酵母の抽出液中に β -1,6-グルカンを切断する活性を見出した。すでに酵母にはそのような活性が存在することが知られていたため、それらと、さらに活性をもつことが疑われる蛋白質をコードする遺伝子を欠損した株を用いて活性を測定したが、 β -1,6-グルカンを切断する活性にはほとんど影響が見られなかった。そのため、この活性をになう本体の精製を行うことにした。まずこの活性が存在する場所を、遠心分画によ

り調べたところ，細胞質画分，膜画分の両方に活性が存在することが示唆された．その後の HPLC による分離に対する挙動から，それらは異なる蛋白質による活性であることが明らかとなった．精製条件を検討し，銀染色で数本の蛋白質にまで精製した．質量分析にかけたが，おそらくは量が不足して同定には至らなかった．系の調整とスケールアップを行い，同定を目指している．

(3) Kre6 と相互作用する蛋白質の解析
免疫沈降実験により Kre6 と他の蛋白質との相互作用を調べた．すでに相互作用を明らかにしていたものに関しても，遺伝子欠損株等において，再度検討した．その結果，輸送系のどこで Kre6 との相互作用が起きるか，またどのような条件（変異株など）でより強く相互作用するようになるかに関する知見を得ることができた．この結果は， β -1,6-グルカンの生合成経路において Kre6 やその結合蛋白質が機能する順番に関する手がかりとなる．

5．主な発表論文等

〔学会発表〕(計 9 件)

難波聖人，足立博之，依田幸司，鎌倉高志，野田陽一： 出芽酵母細胞壁 β -1,6-グルカン合成関連タンパク質の相互作用の解析．日本農芸化学会2018年度大会，2018年

北澤陽一郎，永田晋治，足立 博之，依田幸司，野田陽一： 出芽酵母細胞内の β -1,6-glucan 分解酵素の探索．酵母遺伝学フォーラム第 50 回研究報告会，2017 年

東亮介，足立博之，依田幸司，鎌倉高志，野田陽一： 出芽酵母の細胞壁 β -1,6-glucan の合成に関わる Kre6 の機能に必須なアミノ酸残基の同定．日本農芸化学会大会 2016 年度大会 北海道 札幌コン

ベンションセンター，2016 年

東亮介，足立博之，依田幸司，鎌倉高志，野田陽一： 酵母細胞壁 β -1,6-グルカン合成に関わる Kre6 の機能に必須なアミノ酸残基の同定．酵母遺伝学フォーラム第49回研究報告会，2016年

Yoichiro Kitazawa, Koji Yoda, and Yoichi Noda： Kre5 of *Saccharomyces cerevisiae* displays a cleavage activity to β -1,6-glucan．Fungal Cell Wall 2015，Institut Pasteur (Paris, France)，2015 年

北澤陽一郎，足立博之，依田幸司，野田陽一： 出芽酵母の細胞中の β -1,6-glucan 切断活性の解析．酵母遺伝学フォーラム第 49 回研究報告会，広島大学，2015 年

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・名誉教授
研究者番号：20143406

(2)研究分担者

野田 陽一 (NODA, Yoichi)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教
研究者番号：90282699