

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05764

研究課題名(和文) 真菌細胞壁 β -1,6-グルカン合成機構の解明研究課題名(英文) Mechanism of fungal cell wall β -1,6 glucan synthesis

研究代表者

野田 陽一 (NODA, Yoichi)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・特任准教授

研究者番号：90282699

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)： β -1,6-グルカンの合成において特に重要な役割を持つと考えられるKre6の細胞内の挙動を調べた。共免疫沈降実験によりKre6が他の合成に関与する蛋白質と相互作用する可能性を示唆するデータを得た。またKre6がリン酸化を受けることを見出した。このKre6のリン酸化自体は以前に報告されていたが、このリン酸化が他の β -1,6-グルカン合成に関与する蛋白質の機能低下により減弱することを見出した。またKre6の解析を行う過程で、出芽酵母のライセートに β -1,6-グルカンを分解する活性を見出した。この活性は既知のExg1と過去に活性が明らかになっていない蛋白質に起因することを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

真菌の細胞壁の非常に重要な成分である β -1,6-グルカンの合成経路に関して得られた本研究の成果は、真菌の生物学の理解という点において、学術的な意義があると考えられる。また真菌による感染症は、特に他の疾患や薬剤の服用により免疫機能の落ちた状態では未だ大きな脅威である。近年では新たにCandida aurisにより感染拡大も危惧されている。細胞壁 β -1,6-グルカンの合成経路は、抗真菌剤の標的候補として期待されており、本研究の成果は医学的、社会的にも意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：To reveal the mechanism of fungal cell wall β -1,6-glucan synthesis in *S. cerevisiae*, We analyzed the behavior of Kre6, which is thought to play an important role in the β -1,6-glucan synthesis. Co-immunoprecipitation experiments showed that Kre6 may interact with other proteins involved in the β -1,6-glucan synthesis. We also found that the Kre6 protein is phosphorylated and the phosphorylation decreased in the cell in which the function of proteins that have roles in β -1,6-glucan synthesis is impaired. In the course of these studies, we found the β -1,6-glucanase activity in the yeast cell lysate. We revealed that this activity was derived from activities of the two proteins, one of which was Exg1 and the other was protein whose function was previously unknown. This protein was produced as a GST-fusion protein in *E. coli*. The enzymatic parameters of the fusion protein were measured.

研究分野：農芸化学

キーワード：細胞壁 真菌 酵母

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

真菌の細胞の最表面にある細胞壁は単に細胞の形と強度を保持するばかりでなく、物質や情報の外界とのやり取りに関わる必須の構造であり、その破壊は真菌にとって致死的である。出芽酵母の細胞壁は、キチン、マンナンタンパク、グルコース約1500分子が -1,3結合した -1,3-グルカンと、約350分子が -1,6結合した -1,6-グルカンからなる。前三者の生合成機構がほぼ明らかになっているのに対し -1,6-グルカン合成酵素の本体は同定されておらず 変異で合成が低下するKRE (Killer Resistant) 遺伝子の産物は ERから細胞表層にいたる分泌経の各所に局在し合成機構は全く不明である。 -1,6-グルカンは、総グルカンの9-20%と量的には少ないものの、他のポリマーと架橋構造を作り、細胞壁全体の機能的ネットワークを形成するために必須の分子種である。そのため減少すると生育は悪化し、完全に作られなくなると致死になる。 Kre蛋白質のうち、特にKre5, Kre6, Kre9は特に重要な働きを担うと考えられている。それらどの遺伝子の破壊や変異も -1,6-グルカン を顕著に減少させる

2. 研究の目的

上記の様な背景のもと、本研究では真菌に広く保存された蛋白質である Kre5, Kre6, Kre9 の機能解析を主な柱として、真菌の -1,6-グルカンはどの様にして作られるのか、という学術的問いに対する答えを追求し、その生合成メカニズムを可能な限り詳細に明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 酵母ライセートに存在する 1,6-グルカンを切断する活性の検出

出芽酵母を500 mlのYPD培地で37、126 rpmでOD=2.0程度にまで培養した。300×g, 5 minで細胞を集菌して、5 mlの水で洗浄した。さらに300×g, 5 minで集菌し、pH 5.0 10 mM 酢酸バッファー2.5 mlで懸濁して50 mlチューブに移し、5 gのビーズを加えた。4で1 minボルテックスし、1 min氷上で静置。これを五回繰り返し破碎した。破碎後上清を回収し、ガラスビーズにLysis バッファー 3 mlを加えsuspendして上清を回収し、先に回収した上清と合わせた。300×g, 5 min遠心して未破碎菌体を落として上清を回収、出芽酵母粗抽出液(TCL)とした。このライセート 10 µgとPA化したbeta-1,6-oligomerを20 µlの系で実験に応じて30 sec~o/n反応させた。反応は基本的には37で行った。

(2) 活性をコードする遺伝子の同定

出芽酵母にはGH5ファミリー蛋白質が5つ存在する。そのうちの2つは、分裂酵母*Schizosaccharomyces pombe*で-1,6-glucanase活性を持つことが示されたExg1とExg3に相同性を示す蛋白質であり、分裂酵母と出芽酵母のGH5ファミリーのアミノ酸配列を比較すると活性中心がよく保存されていることが分かる。またこの解析結果から系統樹及び模式図を作成すると、出芽酵母のExg1及びSpr1と分裂酵母のExg1に近く、出芽酵母のYbr056wが分裂酵母のExg3に近いことが分かった。出芽酵母のExg1は-1,3-glucanaseと-1,6-glucanase活性を示すことが報告されていることから、Ybr056wが-1,6-glucanaseである可能性が想像された。これらをコードする遺伝子の多重破壊株を作製し(1)の方法で活性を測定した。

(3) リコンビナント蛋白質の活性測定

遺伝子をpGEX4T-3にクローニングして、BL21株に導入した。IPTG(30, 二時間)により発現を誘導した後にライセートを調製してglutathione Sepharose beadsを用いてGST融合蛋白質を精製した。Bradford法により蛋白質濃度を測定して、反応の種類に応じて適切な量のGST融合蛋白質を反応系に加えた。

(4) 活性中心に存在すると予測されるアミノ酸残基への変異導入

GH5ファミリーに属する他のグルカナーゼの過去の実験結果より予想された活性中心に存在するアミノ酸残基に、Prime STR MAX (TAKARA)による変異導入を行った。方法はほぼTAKARAのプロトコールをもとにして、さらに条件検討を行い最適な条件を設定した。得られた変異導入遺伝子の候補は、シークエンスにより狙った変異のみが導入されていることを確認の後にその後の実験に供した。

(5) Kre6の予想リン酸化アミノ酸の置換

UniProt上のKre6のリン酸化部位に関する情報と、出芽酵母の網羅的リン酸化断片に関する過去の知見から、19個のSer残基と1個のThr残基、2個のTyr残基をKre6のリン酸化部位の候補とした。それらのアミノ酸を置換した遺伝子を得るために、Prime STR MAX (TAKARA)による変異導入を行った。方法はほぼTAKARAのプロトコールをもとにして、さらに条件検討を行い最適な条件を設定した。得られた変異導入遺伝子の候補は、シークエンスにより狙った変異のみが

導入されていることを確認の後にその後の実験に供した。

4. 研究成果

本研究課題において、我々は Kre6 の 1,6-グルカンに対する活性を解析していた。その過程において出芽酵母の細胞質、膜画分に短い 1,6-グルカンを切断する強い活性を見出した。前年度までに、この本体を同定すべく、まず関係が予想される Exg1 を含めた既知のグルカナーゼをコードする複数遺伝子の破壊株を作製して、活性を測定したところ、1,6-グルカンに対する切断活性に影響が見られなかった。そこでその破壊株の細胞破碎液から両活性の精製を試みた。しかし、最終的に活性の本体であると推測するに至ったバンドを質量分析で解析したところ、グルカナーゼ活性との関連が低いと考えられる蛋白質であった。精製はこの段階で一度諦めたが、その後の文献や過去の知見の再調査、関連の研究者のアドバイスによりおそらく本体をコードする可能性のある遺伝子を見出した。その遺伝子の破壊を上記の複数遺伝子の破壊株に導入したところ、1,6-グルカン分解活性の顕著な低下が見られた。その遺伝子がコードする蛋白質を GST 融合蛋白質として発現、グルタチオンカラムを用いて精製した。精製した蛋白質を試験管内で 1,6-グルカンとインキュベートしたところ、強い分解活性が観察された。また同じファミリーに属する他の酵素の解析結果や、配列の相同性から推測される活性中心に位置するアミノ酸に置換を導入したところ、分解活性は消失した。基質特異性を調べるために、1,6-グルカンと同様に出芽酵母細胞壁の重要な構成成分である 1,3-グルカンに対する分解活性を、laminariotriose を基質として調べた。laminariotriose は GST 融合蛋白質により全く分解を受けず活性の特異性が示された。これらの実験結果から、出芽酵母 *S. cerevisiae* のライセート中に検出される 1,6-グルカン分解活性は、Exg1 と本酵素に由来することが強く示唆された。この酵素を GST 融合蛋白質として大腸菌で発現、精製し、酵素活性の pH、温度依存性を解析、さらに酵素学的パラメーターの測定を行った。この酵素はミトコンドリアに存在する蛋白質であることが、網羅的な解析によりいくつかの論文に報告があり、またデータベースにも登録されている。ミトコンドリアに存在することの生理学的な意義が不明であったこともあり、この点についても再検討を行った。GFP 融合蛋白質として発現した細胞で顕微鏡観察を行ったところ、細胞質の局在と思われる細胞全体に均一のシグナルが得られた。また細胞分画実験でも細胞質画分に多くの蛋白質が回収された。そのことからミトコンドリアに存在するとしてもその割合は低いであろうことが示唆された。

Kre6 はリン酸化を受けることが RI ラベルされた ATP を用いた実験により、以前に報告されていた。我々はそのリン酸化状態が、サンプルの調製法など実験法の工夫により SDS-PAGE において二段階のリン酸化状態として検出できることを見出した。そこで Kre6 のリン酸化部位の同定と各部位の生理機能の解明を試みた。UniProt 上の Kre6 のリン酸化部位に関する情報と出芽酵母の網羅的リン酸化断片に関する過去の知見から、19 個の Ser 残基と 1 個の Thr 残基、2 個の Tyr 残基を Kre6 のリン酸化部位の候補とした。そのうち、可能な限り広範囲にアミノ酸置換を導入して Kre6 の挙動をまずウエスタンブロッティングで調べた。多くには顕著な変化は見られなかったが、一部にはリン酸化を示す移動度の遅いバンドの減少、消失が見られた。ウエスタンの結果からリン酸化を受ける可能性の高い部位のアラニン置換体の細胞内の局在を間接蛍光抗体法により調べたところ、一部の置換体において局在の変化が見られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Yoichi Noda, Seisuke Arai, Ikuo Wada, and Koji Yoda | 4. 巻 65 |
| 2. 論文標題 Both Svp26 and Mnn6 are required for efficient ER exit of Mnn4 in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 J. Gen. Appl. Microbiol. | 6. 最初と最後の頁 215-224 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2323/jgam.2018.10.002 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Yuuki Tanabe, Seisuke Arai, Ikuo Wada, Hiroyuki Adachi, Takashi Kamakura, Koji Yoda and Yoichi Noda | 4. 巻 65 |
| 2. 論文標題 Svp26 facilitates ER exit of mannosyltransferases Mnt2 and Mnt3 in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 J. Gen. Appl. Microbiol. | 6. 最初と最後の頁 180-187 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2323/jgam.2018.09.001 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Hiroyuki Hirayama, Tsugiyo Matsuda, Yae Tsuchiya, Ritsuko Oka, Junichi Seino, Chengcheng Huang, Kazuki Nakajima, Yoichi Noda, Yuichi Shichino, Shintaro Iwasaki, and Tadashi Suzuki | 4. 巻 294 |
| 2. 論文標題 Free glycans derived from O-mannosylated glycoproteins suggest the presence of an O-glycoprotein degradation pathway in yeast | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 J. Biol. Chem. | 6. 最初と最後の頁 15900-15911 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.009491 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Goyu Kurosaka, Satoshi Uemura, takahiro Mochizuki, Yuri Kozaki, Akiko Hozumi, Sayuri Suwa, Ryoga ishii, Yusuke Kato, Saki imura, Natsuho ishida, Yoichi noda and Fumiyoshi Abe | 4. 巻 9 |
| 2. 論文標題 A novel ER membrane protein Ehg1/May24 plays a critical role in maintaining multiple nutrient permeases in yeast under high-pressure perturbation | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Sci. Rep. | 6. 最初と最後の頁 18341 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-54925-1 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|--------------------|
| 1. 著者名 Kubo K, Itto-Nakama K, Ohnuki S, Yashiroda Y, Li SC, Kimura H, Kawamura Y, Shimamoto Y, Tominaga KI, Yamanaka D, Adachi Y, Takashima S, Noda Y, Boone C, Ohya Y | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Jerveratrum-Type Steroidal Alkaloids Inhibit -1,6-Glucan Biosynthesis in Fungal Cell Walls | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Microbiol Spectrum | 6. 最初と最後の頁 1-19 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/spectrum.00873-21 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 該当する |

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 北澤陽一郎、永田晋治、平山弘人、鈴木 匡、足立博之、野田陽一 |
| 2. 発表標題 出芽酵母YBR056wがコードする蛋白質は -1,6- グルカナーゼ活性を持つ |
| 3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第53回研究報告会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Yoichi Noda, Seisuke Arai, Ikuo Wada, Koji Yoda |
| 2. 発表標題 Efficient ER Exit of Mnn4 Is Dependent on Both Svp26 and Mnn6 in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
| 3. 学会等名 ICYGMB2019 (Sweden, Gothenburg) (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 難波 聖人, 足立 博之, 野田 陽一 |
| 2. 発表標題 出芽酵母において Kre5 は ER で Kre6 のフォールディングを補助する |
| 3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第52回研究報告会 (静岡県) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 加藤祐介, 黒坂豪祐, 上村聡志, 望月貴博, 伊村咲希, 石田夏穂, 石井凌賀, 野田陽一, 阿部文快 |
| 2. 発表標題 新規小胞体膜タンパク質 Ehg1 による酵母栄養源輸送体の制御 |
| 3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第52回研究報告会(静岡県) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 久保佳蓮, 野田陽一, 嶋本康広, 富永健一, 大矢禎一 |
| 2. 発表標題 真菌の細胞壁に作用する新しい抗真菌薬 Jervine の研究 |
| 3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第52回研究報告会(静岡県) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 久保佳蓮, 野田陽一, 嶋本康広, 富永健一, 大矢禎一 |
| 2. 発表標題 真菌の細胞壁「-1,6-グルカン合成」を阻害する抗真菌薬Jervineの研究 |
| 3. 学会等名 日本農薬学会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 野田陽一 |
| 2. 発表標題 ビール酵母Saccharomyces pastorianusのストレス応答 |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会(九州大学)シンポジウム(招待講演) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 北澤陽一郎, 永田晋治, 平山弘人, 鈴木匡, 足立博之, 野田陽一 |
| 2. 発表標題 出芽酵母YBR056wにコードされる -1,6-グルカナーゼ活性を持つ蛋白質の解析 |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会(九州大学) |
| 4. 発表年 2020年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

| |
|--|
| 酵母発酵学社会連携研究部門 https://koubohakkou.net/ |
|--|

| 6. 研究組織 | | |
|---------------------------|-----------------------|----|
| 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
| | | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
| | |