

機関番号：12601

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008~2010

課題番号：20380045

研究課題名 (和文) モータータンパク質融合型キチン合成酵素の機能と分子動態に関する総合的研究

研究課題名 (英文) Studies on the functions and the molecular dynamics of chitin synthases with a myosin motor-like domain

研究代表者

堀内 裕之 (HORIUCHI HIROYUKI)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：00209280

研究成果の概要 (和文)：

キチン合成酵素の一部はその N 末端側にモータータンパク質であるミオシンと相同性を有するドメインを持つ。本研究では子囊菌類の糸状菌 *Aspergillus nidulans* と二形性酵母 *Yarrowia lipolytica* を用いて、モータータンパク質融合型キチン合成酵素の機能解析を行った。また *A. nidulans* についてはそれらキチン合成酵素と相互作用するタンパク質の探索も行った。その結果、*Y. lipolytica* のキチン合成酵素は細胞壁の完全性の維持に機能していることが示唆された。*A. nidulans* においてそのタンパク質と細胞内で相互作用する可能性のあるタンパク質の単離と機能解析を行った。

研究成果の概要 (英文)：

Some fungal chitin synthases have a myosin motor-like domain in their N-termini. We analyzed the functions of these chitin synthases using a model filamentous fungus *Aspergillus nidulans* and a dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*.

In *Y. lipolytica*, these chitin synthases were suggested to function in maintaining the cell wall integrity. We also isolated the proteins that may interact with these chitin synthases and analyzed their functions in *A. nidulans*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2009年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2010年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
年度			
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：微生物、バイオテクノロジー、糸状菌、*Yarrowia*、細胞壁

1. 研究開始当初の背景

モータータンパク質融合型キチン合成酵素とはキチン合成酵素ドメイン (CSD) の N 末端側にアクチンフィラメント上を走るモータータンパク質であるミオシンと同一性を有するドメイン (MMD) を持つユニークな構造をしたタンパク質で、我々の研究室においてその存在が初めて発見された (Biochem. Biophys. Res. Commun., **236**: 75-78, 1997)。その後糸状菌のゲノム配列解析が進むにつれ、このタイプの酵素がほぼ全ての糸状菌において普遍的に存在する酵素であることが明らかになった。しかし酵母 *Saccharomyces cerevisiae*、*Schizosaccharomyces pombe*、*Candida albicans* 等にはそのオルソログが存在しないことから、このタイプのキチン合成酵素が糸状菌の菌糸生長において重要な役割を持つことが予想された。さらにこのタイプのキチン合成酵素遺伝子の破壊株は植物病原菌、動物病原菌においてそれぞれ植物、動物への感染力が全くなくなるか、非常に低下することから、その感染に重要な役割を持つことが明らかにされている。我々の研究室では子囊菌類のモデル糸状菌の一つである *Aspergillus nidulans* を対象としてその機能解析を行ってきた。*A. nidulans* にはミオシン様タンパク質融合型キチン合成酵素をコードする遺伝子は *csmA* と *csmB* の 2 つが存在する。*csmA*、*csmB* の遺伝子産物 (それぞれ CsmA、CsmB: その構造を以下に示した)、は菌類のキチン合成酵素の分類でそれぞれ class V と class VI に分類される。菌類のキチン合成酵素はクラス I~VII に分類されており、そのキチン合成酵素活性中心近傍のアミノ酸配列の同一性の高さにより class I~III を division I、class IV~VI を division II、class VII を division III と分類する。このうち class V の全てと一部の class VI に属するキチン合成酵素がその N 末端側に MMD を持つ。

csmA、*csmB* それぞれの単独破壊株は菌糸の途中が膨らむバルーン形成、菌糸の中に新たな菌糸を生じる菌糸内菌糸の形成、分生子形成効率の低下、低浸透圧下における生育の顕著な遅れ等の類似の表現型を示す。またこれら遺伝子の二重破壊は致死となる。これらのことから、CsmA、CsmB は菌糸生長、分生子形成に重要な役割を持つこと、また菌糸内菌糸は隔壁から形成されることから隔壁形成においても重要な役割を持つことが示唆されていた。*csmA* と *csmB* は head to head の形で隣接して *A. nidulans* ゲノム上に存在し、一部プロモーター領域を共有している。このゲノム上での配置は他の子囊菌類に属する糸状菌においても保存されている。これらのことは *csmA* と *csmB* (他の糸状菌に

おいてはそれぞれのオルソログ) が密接に関連した機能を持つことを示唆している。我々の研究室では CsmA、CsmB についてその細胞内の局在部位について検討し、これらのタンパク質がともに菌糸の先端、形成中の隔壁に存在することを明らかにした。さらに CsmA について、その MMD はモーター活性を持たないか持つとしてもそのモーター活性が機能には必要ないこと、MMD はフィラメント状のアクチンと結合するがその結合が CsmA の機能に必須であること等も明らかにしている (Mol. Biol. Cell, **16**:1961-1970, 2005, Mol. Microbiol., **59**: 1380-1394, 2006)。しかしその菌糸生長における分子レベルでの機能については不明な部分が多い。また *csmA* と *csmB* のオルソログは一部の二形性酵母にも保存されていることがゲノム配列情報より明らかになっているがその機能の解析はほとんど例がなかった。我々のグループでは炭化水素資化性の二形性酵母である *Yarrowia lipolytica* のゲノム上に *csmA* と *csmB* のオルソログがそれぞれ一つと二つ (それぞれ *CSM1*、*CSM2* と *CSM3* と命名) 存在することを見いだしていた。

これまで *csmA* と *csmB* の両方のオルソログを持つ二形性酵母においては、それら遺伝子の機能解析がなされた例はなくその機能は全く未解明であった。

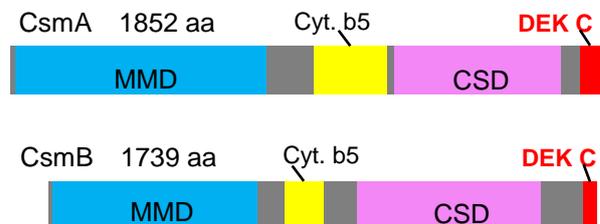


図 CsmA と CsmB の構造

図中 Cyt. b5 は Cytochrome b5-like domain を DEK C は DEK C-terminal domain を表す。

2. 研究の目的

本研究では CsmA、CsmB、またその *Y. lipolytica* におけるオルソログ Csm1、Csm2、Csm3 の機能を解明するとともに細胞内での分子レベルでの動態を明らかにすることを目的とし、さらに糸状菌と二形性酵母における機能の異同を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 用いた菌株並びに培地

本研究で用いた *A. nidulans* の菌株を以下に示す (カッコ内に遺伝子型を示した)。ABPU1 (*biA1 pyrG89 wA3 argB2 pyroA4*)、A1149 (*pyrG89 pyroA4 nkuA::argB*) とそれら由来の遺伝子破壊株

本研究で用いた *Y. lipolytica* の菌株を以下に示した。

CXAU1 (*ura3, ade1*) とそれ由来の遺伝子破壊株

またプラスミドの作製等の実験には以下の大腸菌を用いた。

Escherichia coli DH5 α または HB101

A. nidulans の培養は特に示さない限り 37 度で行い、培地としては MMG 最少培地に必要に応じてビタミン類、アミノ酸類、核酸類を添加したもの (Eukaryot. Cell, **8**: 945-956, 2009)、YG 完全培地にウリジン、ウラシルを添加したものを主に用いた。

Y. lipolytica の培養は 30 度で行い、培地には YPD 完全培地、SD 最少培地、SG 最少培地等 (Biochem. Biophys. Res. Commun., **282**: 832-838, 2001) を用い、必要に応じて核酸類を添加した。

E. coli の培養は 37 度で行い培地には LB 培地を用いた。必要に応じて抗生物質を添加した。

(2) 形質転換法

A. nidulans, *Y. lipolytica* の形質転換はそれぞれ Biosci. Biotechnol. Biochem., **69**: 87-97, 2005、Yeast, **14**: 187-1397, 1998 に記載された方法に従った。

(3) 間接蛍光抗体法

間接蛍光抗体法は竹下らの方法 (Mol. Biol. Cell, **16**: 1961-1970, 2005) に従った。

(4) 免疫沈降実験

免疫沈降実験も竹下らの方法 (Mol. Biol. Cell, **16**: 1961-1970, 2005) に従った。

(5) 電子顕微鏡を用いた実験

電子顕微鏡での観察は堀内らの方法 (J. Bacteriol., **181**: 3721-3729, 2009) に従った。

(6) 酵母 two-hybrid assay

酵母 two-hybrid assay は Matchmaker Gold 酵母ツーハイブリッドシステムを用いて行った。方法は付属の説明書に従った。

(7) その他の方法

一般的な分子生物学的手法は成書に従っ

て行った。

4. 研究成果

これまで CsmA はその機能に MMD が必要不可欠であることが示されていたが CsmB についてはその検討が為されていなかった。そこでまず MMD を欠失した CsmB (CS Δ MB) を野生型 CsmB の代わりに生産する株を作製したところ、この株は *csmB* 破壊株と同様の表現型を示した。このことから CsmB の MMD もその機能に必須のものであることが示された。さらに CS Δ MB の細胞内での局在について検討するため CS Δ MB にタグをつけたもの (CS Δ MB-FLAG) を生産する株を作製しその細胞内での局在について検討した。その結果、野生型 CsmB にタグをつけた CsmB-FLAG が菌糸の先端と形成中の隔壁に存在するのに対し CS Δ MB-FLAG ではそのような局在は見られず、MMD が細胞内での局在に重要な役割を持つことが明らかとなった。さらに免疫沈降実験の結果より CsmB-FLAG はアクチンと共沈するのに対し CS Δ MB-FLAG は共沈しないことが示された。これらのことは CsmB においてもその MMD がアクチンと結合することにより菌糸先端、形成中の隔壁に局在することが示唆している (この結果は雑誌論文の①で発表した)。

Y. lipolytica においては *csmA* と *csmB* のオルソログ (それぞれ *CSM1*, *CSM2* と *CSM3*) の単独破壊株、二重破壊株、三重破壊株を作製しその表現型について検討した。その結果これらの破壊株は通常の培地での生育は野生株と比較して生育速度、細胞形態等においてほとんど変化はないが、キチンに結合する色素である Calcofluor white (CFW)、Congo red (CR) に対して *CSM1* 破壊株は強い感受性、*CSM2* 破壊株は弱い感受性を示すことが明らかになった。一方、*CSM3* の破壊株はどちらの薬剤に対しても野生株並みの感受性であった。また *CSM2* と *CSM3* の二重破壊株は *CSM1* 単独破壊株と同程度の感受性を示した。またこれら遺伝子の三重破壊株も *CSM1* 単独の破壊株と同程度の感受性を示した。これらのことから *CSM1*, *CSM2*, *CSM3* 遺伝子とも細胞壁の完全性を保つための機能を持ち *CSM2* と *CSM3* は重複した機能を持つこと、*CSM1*, *CSM2*, *CSM3* の遺伝子産物は同一の経路上で働く可能性が示唆された。

CSM1 破壊株については通常の条件下 (YPD 培地) で培養して透過型電子顕微鏡を用いてその細胞構造の検討を行ったが、野生株と比較して細胞壁の構造に大きな差は見られなかった。

さらに Csm1 についてその N 末端に EGFP

タグをつけたタンパク質を発現できる株を作製し細胞内での存在部位について検討した。その結果、隔壁部分に局在する様子が観察された。このことから Csm1 は *Y. lipolytica* において隔壁形成にも関与することが示唆された (投稿準備中)。

一方、*A. nidulans* においては CsmA と CsmB の細胞表層での存在状態について検討するため CsmA、CsmB にそれぞれ HA と FLAG のタグがついたものを野生型 CsmA、CsmB の代わりに同時に発現する株を用いて Freeze-edging 法によりサンプル調製を行い免疫電子顕微鏡法による観察を試みたが、CsmA-HA、CsmB-FLAG 発現株の細胞壁の溶解が用いた混合酵素系では完全ではないこと、これら遺伝子産物の発現量が少なすぎる等理由ではっきりした結果が得られなかった。

CsmA と CsmB のホモ複合体、ヘテロ複合体形成の可能性について検討するため、酵母 two-hybrid assay を用いて検討した。まず CsmA、CsmB をそれぞれ N 末領域、中間領域、C 末領域に分割し、これら 6 種の部分を prey または bait として発現できる酵母を作製して検討したが相互作用を示唆する結果は得られなかった。さらに CsmA-HA、CsmA-FLAG を同時に発現する株の細胞抽出液を用いて免疫沈降実験を行ったが CsmA-HA と CsmA-FLAG が共沈する結果は得られなかった (予備的な実験では CsmA-HA と CsmB-FLAG を同時に発現する株を用いて CsmA-HA と CsmB-FLAG は共沈しなかった)。これらのことから CsmA のホモ複合体形成、CsmA と CsmB のヘテロ複合体形成の可能性は低いと考えられた。これは担子菌類に属する二形性酵母 *Ustilago maydis* において CsmA のオルソログである Mcs1 が二量体化して存在することが示唆されている (Plant Cell 22: 2476-2494, 2010) のとは対照的である。

ミオシン融合型キチン合成酵素の C 末端には機能不明の DEK C terminal domain (DEK CTD) がよく保存されており、「研究開始当初の背景」のセクションに示した図にもあるように CsmA と CsmB の C 末端にもこのドメインが保存されている。そこでこの機能について解析するためこの部分のみを欠失させタグをつけた CsmA、CsmB を野生型 CsmA、CsmB の代わりに発現する株 (それぞれ CsmA^{ΔDEK}-HA 株、CsmB^{ΔDEK}-FLAG 株) を作製し解析した。その結果、CsmA^{ΔDEK}-HA 株においては分生子形成効率が大幅に減少した。またどちらの株も菌糸の形態、分生子柄の形態に異常がみられた。さらに CsmA^{ΔDEK}-HA、CsmB^{ΔDEK}-FLAG についてそれらの細胞内での存在部位を間接蛍光抗体法を用いて解析したところ、これらの

変異型タンパク質は菌糸先端のアクチン近傍に局在した。これは野生型 CsmA-HA、CsmB-FLAG の存在部位と類似のものであった。これらのことから DEK CTD は CsmA、CsmB の細胞内での局在には関与しないが、その欠失により CsmA、CsmB の機能に部分的な欠損が起こることが示された。

S. cerevisiae において CsmA、CsmB と同じ division II に属するキチン合成酵素 Chs3 は *SKT5/CHS4* の遺伝子産物と相互作用することがその局在、並びに機能に必要なことが示されている。*SKT5* のオルソログが *A. nidulans* のゲノム中に 3 個存在することからこれらオルソログ遺伝子の産物と CsmA、CsmB のタンパク間相互作用の可能性を考え、まずこれら 3 種のオルソログ遺伝子の破壊株を作製し解析した。その結果、そのうちの 1 種 (*AN3445*) の破壊株については菌糸の多分岐、細胞壁の異常が観察された。しかし、それ以外の 2 種の破壊株については野生型株と同様の表現型を示した。さらに *AN3445* 破壊株における CsmA の局在を検討したところ、野生株と比較して菌糸先端付近の形質膜上における局在の割合が低下し、細胞質中におけるドット状の局在等がより高頻度で観察された。次に *AN3445* の遺伝子産物に EGFP を連結したタンパク質を生産する株を作製し、EGFP-*AN3445* の局在について検討したところ、菌糸先端と隔壁孔の近傍に存在した。さらに CsmA-FLAG 及び EGFP-*AN3445* を同時に生産する株の細胞抽出液を用いて免疫沈降法により CsmA と *AN3445* との相互作用の有無を検討したが、両者間に相互作用は確認されなかった。これらの結果から、*AN3445* の破壊は菌糸先端における CsmA の局在に一部影響を与えるものの、その影響は間接的であることが示唆された (投稿準備中)。

さらに CsmA と相互作用するタンパク質を探索するため CsmA の 2 種の部分配列を bait とし、*A. nidulans* の cDNA ライブラリーを prey として酵母 two-hybrid 法によりスクリーニングを行った。その結果、数種のポジティブクローンを得た。

以上、本研究はモータータンパク質融合型キチン合成酵素について糸状菌と二形性酵母を用いてその機能と細胞内での動態の解析を行った。その結果、二形性酵母では主に細胞壁の完全性を保つための機能を持つが、菌糸生長、形態形成における役割は糸状菌と比較すると小さいことが明らかとなった。また糸状菌においては、これまで機能不明であった DEK CTD がその機能に必要なこと、CsmA、CsmB は細胞内でホモまたはヘテロ二量体を作る可能性は低いことを明らかにした。さらに細胞内で相互作用する可能性のあるクローンを数種得ており、今後それらの

遺伝子に対し機能解析を行うことにより、まだ未解明な部分の多いモータータンパク質融合型キチン合成酵素の細胞内での動態の分子レベルでの全貌解明につながると考えられる。

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1件)

- ① Tsuizaki, M., Takeshita, N., Ohta, A., and Horiuchi, H. 2009. Myosin motor-like domain of the class VI chitin synthase, CsmB, is essential for its functions in *Aspergillus nidulans*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **73**:1163-1167. 査読有

[学会発表] (計9件)

- ① 盛 威、堀内裕之、太田明徳
二形性酵母 *Yarrowia lipolytica* におけるミオシン様ドメインを有するキチン合成酵素をコードする遺伝子 *CSM1*、*CSM2* の機能の関連性についての解析 日本農芸化学会関東支部大会 2008年10月山梨大学
- ② 盛 威、堀内裕之、太田明徳
二形性酵母 *Yarrowia lipolytica* におけるクラスIV、クラスVIキチン合成酵素をコードする *CHS4*、*CHS6* の機能解析 日本農芸化学会 2009年度大会 2009年3月マリンメッセ福岡
- ③ 對崎真楠、堀内裕之、太田明徳
Aspergillus nidulans のキチン合成酵素 CsmA の菌糸内局在化における微小管の役割 第9回糸状菌分子生物学コンファレンス 2009年11月 東京大学
- ④ 西出品、對崎真楠、堀内裕之、太田明徳
糸状菌 *Aspergillus nidulans* における *Saccharomyces cerevisiae* *CHS4* オルソログの機能解析(1) 第9回糸状菌分子生物学コンファレンス 2009年11月 東京大学
- ⑤ 西出品、對崎真楠、堀内裕之、太田明徳
糸状菌 *Aspergillus nidulans* における *Saccharomyces cerevisiae* *CHS4* オルソログの機能解析(2) 日本農芸化学会 2010年度大会 2010年3月 東京大学
- ⑥ 前田隼見、堀内裕之、太田明徳
Aspergillus nidulans のキチン合成酵素 CsmA、CsmB における DEK C terminal domain の機能解析 第10回糸状菌分子生物学コンファレンス 2010年11月 広島大学
- ⑦ 對崎真楠、堀内裕之、太田明徳
Aspergillus nidulans のキチン合成酵素

CsmB 及び CsmA の菌糸内局在化部位の比較 第10回糸状菌分子生物学コンファレンス 2010年11月 広島大学

- ⑧ 盛 威、山下修一、堀内裕之、太田明徳
二形性酵母 *Yarrowia lipolytica* におけるキチン合成酵素をコードする遺伝子の機能解析 日本農芸化学会 2011年度大会 2011年3月 京都女子大学
- ⑨ 星 浩臣、對崎真楠、堀内裕之、太田明徳
糸状菌 *Aspergillus nidulans* における出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* *SKT5* オルソログ *AN3445* の機能解析 第11回糸状菌分子生物学コンファレンス 2011年11月 東京大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀内 裕之 (HORIUCHI HIROYUKI)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：00209280

(2) 研究分担者

なし ()

(3) 連携研究者

なし ()