

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月18日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21380058

研究課題名（和文） 真菌細胞壁 β -1,6-グルカン生合成機構の解明研究課題名（英文） Study on the molecular mechanisms of
the fungal cell-wall β -1,6-glucan biosynthesis

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

研究成果の概要（和文）： 酵母の生存に必須な細胞壁構成成分のうち、 β -1,6-グルカンの生合成機構は未だ明らかでない。 β -1,6-グルカン合成に必須な、多糖加水分解酵素と配列類似なKre6とSkn1が、小胞体にあるタンパク質Keg1と相互作用すること、これらが機能するには正しくフォールディングし、一部が生長する芽の細胞質膜に移行する必要があること、芽への移行には機能未知だったKeg1やCne1などが結合して介助する必要があることを、本研究で明らかにした。

研究成果の概要（英文）： The molecular mechanism of biosynthesis of β -1,6-glucan, an essential component of the yeast cell wall, is still unclear. Kre6 and its homologue Skn1, which have sequence homology with glycoside hydrolases, are required for this process. In this study, we discovered that Kre6 and Skn1 interact with the ER-resident proteins Keg1, a part of Kre6/Skn1 must localize to the plasma membrane of growing buds for β -1,6-glucan synthesis, and their proper folding and localization to the growing buds require support of Keg1 and Cne1 in the ER.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,200,000	2,160,000	9,360,000
2010年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2011年度	3,200,000	960,000	4,160,000
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

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：微生物機能、酵母細胞壁

1. 研究開始当初の背景

真菌であるカビや酵母の細胞壁は、細胞の形を定める構造的役割を担うと同時に、細胞内外の物質透過に関与し、環境情報を受信するセンサーでもあるので、細胞壁の欠損は致命的である。出芽酵母の細胞壁は、主にグルカン・キチン・マンナンタンパク質から成っ

ている。グルカンには、グルコース約1500個が β -1,3-結合した β -1,3-グルカンと、約450個が β -1,6-結合した β -1,6-グルカンがある。キチンはN-アセチルグルコサミンが β -1,4-結合でつながった多糖である。マンナンタンパク質は一般の分泌タンパク質と同じように、タンパク質がマンノースによる糖鎖修飾を受

けながら小胞体(ER)-ゴルジ体経由の輸送で細胞表層に送られる。単純な多糖であるキチンと β -1,3-グルカンは、細胞内の糖ヌクレオチドを基質として、細胞質膜(PM)を貫通して存在する合成酵素(それぞれChs1, Chs2, Chs3とFks1, Fks2)が細胞外に重合する。これらの細胞壁成分の基本的な生成機構は既に理解できたと言ってよい。ところが β -1,6-グルカンは、その合成酵素本体が未同定で、合成機構が明らかでない。 β -1,6-グルカンの存在量は総グルカンの9-20%で、 β -1,3-グルカンと比較すると量的にはマイナーな分子種であるものの、細胞壁マンナンタンパク質は β -1,6-グルカンを介して β -1,3-グルカンに結合し、またキチンも β -1,6-グルカンと結合することで強固な細胞壁ネットワークを形成している。即ち、 β -1,6-グルカンは細胞壁を構成する分子種を互いにつなぎ合わせる機能を担っており、真菌の強固な細胞壁の構築にまさに必須な構成成分である。

β -1,6-グルカン量が減少する変異は複数単離されており、遺伝子産物の解析も進められてきたが、その中には β -1,3-グルカンやキチンの合成酵素に特徴的な多数の膜貫通配列を持つPM局在のタンパク質はなく、ERからPMへの分泌経路に広く分かれて存在している。Kre6とそのホモログのSkn1は、二重破壊が致死的で、多糖分解酵素と相同性がある。単独破壊でも致死的なKre5はUDP-グルコースからタンパク質N糖鎖にグルコースを転移する酵素と相同性がある。他に遺伝子破壊が致死的になる関連タンパク質としては、我々がERに局在してKre6と結合することを見出したKeg1があり、これらが β -1,6-グルカン合成で必須の役割を果たしていることは間違いないが、各タンパク質の分子レベルの機能や細胞における振舞いはまったく不明であった。

2. 研究の目的

上述したように、関与するタンパク質の局在情報から、必須の細胞壁成分である β -1,6-グルカンは、細胞内小胞輸送系を利用する形で合成が進むと予想され、私たちがそれまで解析してきたKeg1とKre6/Skn1の関係を糸口に深く研究することで、新たな重要な知見が得られると期待された。Keg1は、出芽酵母全ゲノム配列が決定されて存在が予想されたタンパク質で、網羅的ポストゲノム解析により、遺伝子破壊が致死的なので生育に必須であり、また、網羅的Yeast Two-Hybrid解析からKre6と結合することが予想されていた。我々は、GFPで標識した機能未知必須膜タンパク質の網羅的解析の中で、Keg1がER膜に局在すること、確かに生育に必須で、Kre6と強く結合することを確認し、さらに温度感受性*keg1-1*変異株を分離して β -1,6-グルカン合成に欠損を示すことを明らかにしていた。

本研究は、我々が見出した必須タンパク質Keg1を中心として、 β -1,6-グルカン合成に関与する各タンパク質の正確な局在とタンパク質間相互作用を明らかにし、各タンパク質の細胞生物学的挙動や分子レベルで果たす役割を、最終的には無細胞系において素反応を測定できる系の確立を目指して、解析することである。言い換えれば、分子レベルの遺伝学的・生化学的なあらゆる方法を駆使して、 β -1,6-グルカン合成酵素本体の同定と合成系の全容を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) β -1,6-グルカン合成に関するタンパク質の細胞内局在と機能

タンパク質の細胞内における局在性を調べるには、構造遺伝子を加工して抗原タグを付け、間接免疫蛍光染色法で観察するのが一般的である。しかし、タンパク質配列上のタ

グを結合する位置、タグの種類、タンパク質の発現量により、本来と異なる局在性が観察されることがある。できるかぎり、野生型タンパク質に対する特異的抗体を調製して使用し、それがかなわない場合はプラスミドではなく染色体上の遺伝子にいろいろな位置に異なるタグを挿入して、他の観察結果との整合性を確認する。細胞内局在と機能の関係を調べるためには、タンパク質の局在に関する配列を欠失させるなどの変異体により機能を調べる。

(2) β -1,6-グルカン合成に関するタンパク質のフォールディングと相互作用

ERに局在する、 β -1,6-グルカン合成関連タンパク質には、汎用的シャペロンタンパク質Rot1や、品質管理機構であるカルネキシンサイクル構成員のホモログ (Cwh41, Rot2, Kre5, Cne1) がある。これらの関わりを調べるため、各遺伝子の変異体を組み合わせて、遺伝的な相互作用やタンパク質の実際の安定性を調べる。

(3) β -1,6-グルカン合成の無細胞系

変異株による研究から、 β -1,6-グルカン合成の基質は、ドリコール-P-グルコースではなく、糖ヌクレオチドUDP-グルコースであることが確定している。いろいろな方法で調製した無細胞成分と、 ^{14}C で標識されたUDP-グルコースを含む反応液を、様々な条件でインキュベートして、グルコースの多量体化あるいは何らかの中間体への転移を調べる。

4. 研究成果

(1) β -1,6-グルカン合成に関するタンパク質の細胞内局在と機能

最初の報告では、検出感度の低さを理由として、多コピープラスミドから発現させた

GFP-Kre6が初期ゴルジ体に局在するとされていたが、我々はセントロメアベクターで6mycを連結したKre6-6mycが典型的なER膜局在として観察されることを見出し、ER局在タンパク質Keg1と強く結合することからも、Kre6はERに存在するタンパク質であると報告した (Nakamata et al., 2007, J. Biol. Chem. 282: 34315-34324)。しかし、このKre6-6myc標識タンパク質は野生型Kre6と同等の活性があるのではなく、染色体上の *KRE6* 遺伝子の C 末端に 3HA エピトープを連結した Kre6-3HA が最も野生型 Kre6 に近い活性を示した。この細胞を観察したところ、これまでとまったく異なり、細胞の生長する領域、娘細胞を出芽している細胞ではその芽の部分に、強いシグナルが認められた。そこで、野生型細胞でタグなどを連結しない本来の Kre6 タンパク質を観察することが絶対に必要と考え、抗 Kre6 抗体を調製することにした。ホモログである Skn1 と最も類似性が低い N 末端 84 アミノ酸のペプチドを GST-融合タンパク質として大腸菌から精製し、2羽のウサギを免疫した。

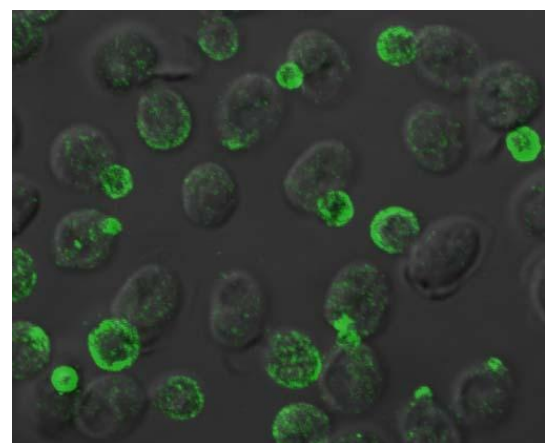


図1. 抗Kre6血清により野生型酵母を免疫蛍光染色した像。Kre6のシグナルは強く芽のような生長領域に集中している。

このN末端部分ペプチドを抗原として得

たウサギ抗Kre6血清は、ウエスタンブロットでは非特異的なシグナルもあるが、Skn1とは反応せず、Kre6特異的なバンドを与え、免疫蛍光染色に使うとゴルジ体やERとみられる構造体ではなく、活性を保持するHAタグ標識タンパク質と同様に、細胞壁合成が盛んな芽が強く染まる蛍光染色像を示した(図1)。これが細胞質膜にあるか、その近傍の膜構造体にあるか明らかにするため、細胞周期を同調させ大きさの揃った芽をもつ細胞を温和に破碎し、条件を様々に変え、蔗糖密度勾配遠心で分画したところ、Kre6タンパク質は、小胞体膜マーカーと常に同じ画分に検出された。更に詳細な構造を見るため、免疫電子顕微鏡観察を行った。抗Kre6ウサギ血清は非特異シグナルが出てしまうため、ここでは使えず、抗HAモノクローン抗体のみでKre6-3HAの観察を行った。HA抗原の存在を示す金コロイド粒子は、細胞質膜より内側に多くが認められ、芽の細胞質膜近傍の小胞体への局在が支持された。おそらく芽よりもはるかに大量に存在するERにおいて、間接免疫蛍光染色でKre6のシグナルが検出されない理由は不明であるが、なんらかの細胞成分が覆いかぶさるなどにより、抗原部分に抗体が結合できない状況にある可能性が考えられる。

Kre6が芽に局在することと、 β -1,6-グルカン合成への関与との関係を調べるため、Kre6のN末端細胞質ドメインを逐次欠失させた変異体を作製して検討した。230アミノ酸以上を失ったKre6-3HAは、活性におそらく重要なC末端の多糖加水分解酵素と相同な部分は保持しているが、細胞が生長する芽への集積が見られなくなった。それと同時に、K1キラー毒素耐性やカルコフラワーホワイト感受性から、 β -1,6-グルカンが減少していることが示唆された。即ち、多くのKre6はERにあるが、一部は出芽部のPMに移行し、このPMへの局在

がその活性発現に必須と考えられる。

Kre6のホモログであるSkn1については、Kre6でC末端3HA標識体が野生型タンパク質と同じ像を与えるので、Skn1-3HAについて検討した。ウエスタンブロットでは、Kre6の有無に関らず同等のシグナルが検出されるが、免疫蛍光染色では、Kre6があるときはシグナルが見られず、 $\Delta kre6$ 破壊株でのみ、Kre6と同様の生長する芽に集積した像が観察された。蔗糖密度勾配遠心分画でも、Kre6と同様の分布挙動を示し、まさしくKre6の予備タンパク質として機能することが支持された。

他のグルカン合成関連タンパク質の抗体作製は、各タンパク質の不安定性などのために難航し、断片の位置を変えるなどさまざまな試みを行ったにもかかわらず成功しなかった。また、合成ペプチドを抗原とした抗体調製にも挑戦したが、ウエスタンブロットでも十分な特異的シグナルを検出できるものは得られなかった。

(2) β -1,6-グルカン合成に関するタンパク質のフォールディングと相互作用

Kre6と結合する必須遺伝子産物Keg1の温度感受性 $keg1-1$ 株では、準許容温度においてKre6の安定性が低下することと、芽の細胞質膜に集まる蛍光染色像が見られなくなることを発見した。この原因のひとつは、Kre6タンパク質のERにおけるフォールディングが正常に行われなかったためであることが、小胞体異常タンパク質分解機構(ERAD)の欠損変異株による実験で明らかになった。即ちERADに関与する遺伝子を欠損させることにより、 $keg1-1$ でもKre6ポリペプチドの分解が抑制され、ウエスタンブロットで検出できるようになった。しかし、この分解抑制状態でも、Kre6は芽に移行できず、 β -1,6-グルカン合成も正常化されなかった。Kre6の正常なフォールディング

と芽への移行による機能発現には、ERにおける正常なKeg1の働きが必要と考えられる。

また真核生物ERで広くタンパク質の高次構造形成に働く、カルネキシンサイクルを構成する4タンパク質の酵母相同体(Cwh41, Rot2, Kre5, Cne1)の変異株でも、 β -1,6-グルカン量の低下が知られていたが、Keg1がKre5及びCne1と結合し、Kre6はKeg1及びCne1に結合した。 Δ *cne1*破壊株でもKre6が芽PMに集積できなくなることから、ERのKre6が正しい高次構造を形成して芽のPMに移行し機能を発揮するために、複数のERのシャペロン様タンパク質が正常に働く必要があると考えられる(図2)。Kre6とSkn1を両方失った細胞は致命的で、両者はタンパク質間相互作用や局在もほぼ同等だった。Keg1には更に別の膜タンパク質が結合していた。

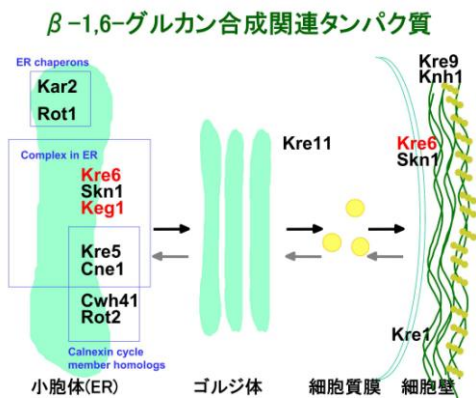


図2. Keg1を含め、ERに存在する複数のタンパク質が、Kre6(そしておそらくホモログSkn1)のフォールディングとPMへの移行を介助している。

(3) β -1,6-グルカン合成の無細胞系

浸透圧ショック法で透過性にした酵母細胞で、無細胞グルカン合成系構築を検討した。 ^{14}C でグルコースが標識されたUDP-グルコースを基質とし、 30°C で反応後、煮沸により反応停止し、基質から転移された ^{14}C グルコース

について、様々な検討を行った。熱水不溶・クロロホルム不溶の放射性カウントは、温度依存的に孵置時間とともに増加した。その一部は β -1,3-グルカナーゼ処理で水溶化されたことから、細胞壁合成の一部はこの系で進行したことが確認され、 β -1,6-結合をもつ産物について次の研究で検討する基礎ができた。ERを多く含む膜小胞画分を用いても同様の膜に結合した低分子量の産物が作られた。

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)

- ① Tomokazu Kurita, Yoichi Noda, Tomoko Takagi, Masako Osumi, and Koji Yoda. Kre6 protein essential for yeast cell-wall β -1,6-glucan synthesis accumulates at sites of polarized growth. *Journal of Biological Chemistry*, 286 (9) 7429-7438 (2011), DOI 10.1074/jbc.M110.174060, 査読有
- ② 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 yeast cell wall β -1,6-glucan synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 287 (21) 17415-17424 (2012), DOI 10.1074/jbc.M111.321018, 査読有

[学会発表] (計10件)

- ① 栗田朋和、野田陽一、高木智子、大隅正子、依田幸司、出芽酵母の β -1,6-グルカン合成関連遺伝子KRE6産物の解析、酵母遺伝学フォーラム第43回研究会、奈良、9月(2010)
- ② 栗田朋和、野田陽一、依田幸司、 β -1,6-

グルカン合成に必須のKre6の折り畳みと
搬出にはERのシャペロン様タンパク質が必要
である、酵母遺伝学フォーラム第44回研
究会、福岡、9月(2011)

- ③ 栗田朋和、野田陽一、依田幸司、出芽酵母
の細胞壁多糖、 β -1,6-グルカンの合成に必
須のKre6が機能を発揮するにはERの複数の
シャペロン様タンパク質の働きが必要であ
る、日本農芸化学会2012年度大会、京
都、3月(2012)

[その他]

ホームページ等

[http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/molbiotec
h/](http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/molbiotec
h/)

[http://www.a.u-tokyo.ac.jp/topics/2011/
20110302-2.html](http://www.a.u-tokyo.ac.jp/topics/2011/
20110302-2.html)

[http://www.a.u-tokyo.ac.jp/topics/2012/
20120518-6.html](http://www.a.u-tokyo.ac.jp/topics/2012/
20120518-6.html)

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