

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23380048

研究課題名(和文)糸状菌プロテインキナーゼCの包括的機能解析とその機能を利用した有用糸状菌の創製

研究課題名(英文)Comprehensive functional analysis of protein kinase C of filamentous fungi

研究代表者

堀内 裕之(Horiuchi, Hiroyuki)

東京大学・農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：00209280

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では糸状菌*Aspergillus nidulans*のプロテインキナーゼC(PKC)をコードする遺伝子

pkcAについて、その温度感受性変異株、活性化型PkcA高発現株を作製しその機能解析を行った。さらに、pkcAの活性の変化により発現の変化する遺伝子をトランスクリプトーム解析により網羅的に抽出した。その結果、細胞壁合成関連遺伝子群、細胞極性に関わる遺伝子群、カルシウムシグナル伝達に関わる遺伝子群、マイコトキシンであるステリグマトシスチン合成に関わる遺伝子群等の発現に変化が見られた。そこでこれら遺伝子群の発現制御にPkcAがどのように関わっているかを分子レベルで解析し明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The functions of protein kinase C (PKC) in filamentous fungi remain largely unknown. *Aspergillus nidulans* is one of the model filamentous fungus and there is a PKC-encoding gene, *pkcA*, in its genome. In our previous study, we showed that *pkcA* is essential for the growth of *A. nidulans*. In this study, to clarify the function of PkcA, we constructed *pkcA-ts* mutant in which the activity of PkcA was temperature sensitive and R429A mutant that produces an activated form of PkcA under the *alcA* promoter of *A. nidulans*. We performed transcriptome analysis using these mutants and identified genes whose expression changed in response to the changes of the PkcA activity. Genes related to cell wall synthesis, cell polarization, Ca²⁺ signal transduction, and a mycotoxin, sterigmatocystin, synthesis were included in these genes. We analyzed the regulation mechanisms of the gene expression by PkcA and clarified them.

研究分野：細胞遺伝学

キーワード：バイオテクノロジー 糸状菌 PKC 細胞壁

1. 研究開始当初の背景

糸状菌には産業上有用なものが多数存在する一方、人間生活において有害なものも多数存在する。産業上有用な糸状菌をより高度に利用し、有害な糸状菌による損失を減らすためには糸状菌を分子レベルで深く理解することが必要不可欠であるがまだまだ未解明の部分が多い。糸状菌は単細胞生物である *S. cerevisiae* と異なり多細胞で生活し、無性胞子形成器官の分化、無性胞子形成等、様々な形態変化を引き起こす。さらに有性胞子形成においても複雑な構造を持つ有性胞子形成器官を分化させる。このことから糸状菌の遺伝子は酵母にオルソログがあるものでも酵母にはない糸状菌に特有な機能を合わせ持つことが考えられ、実際にそのような例は多数報告されている。

プロテインキナーゼ C (PKC) はセリン・スレオニンキナーゼで菌類などの下等真核生物から哺乳動物などの高等真核生物まで広く保存されて存在している。哺乳動物においては 10 種以上のアイソザイムが存在し、それぞれが様々なシグナル伝達経路において中心的役割を果たしていることが知られている。一方、菌類における PKC については酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において最も研究が進んでおり、PKC をコードする遺伝子は一般に菌類には 1 種 (まれに 2 種) しか存在しないことが知られている。その機能としては、*S. cerevisiae* での解析から細胞壁の完全性の維持に関わる cell wall integrity pathway (CWI 経路) において働いていることが報告されており、その分子レベルでのメカニズムが詳細に解析されているが、それ以外は未解明な部分が多い。*S. cerevisiae* において PKC をコードする唯一の遺伝子 *PKC1* の遺伝子破壊株は通常の培地では生育できないが、培地に浸透圧安定化剤を添加すると生育可能である。

我々のグループでは糸状菌 *Aspergillus nidulans* より PKC をコードする唯一の遺伝子 *pkcA* を単離しその機能解析を行ってきた。その過程で *pkcA* が *S. cerevisiae* の *PKC1* とは異なり *A. nidulans* の生育に必須の遺伝子であることを初めて示した (Ichinomiya *et al.* Biosci. Biotechnol. Biochem. 71:2787-2799 2007)。このことから、糸状菌である *A. nidulans* の PkcA は、*S. cerevisiae* の Pkc1p が担っている以外の機能をも持つ可能性が考えられた。*A. nidulans* からの *pkcA* の単離については申請者らのグループ以外に、ほぼ時を同じくしてドイツ、米国、イスラエルの

グループから報告されていた (Appl. Environ. Microbiol. 72:2957-2970, 2006, Fungal Genet. Biol. 44:554-562, 2007, Curr. Genet. 51:321-329, 2007)。それ以外ではイスラエルのグループの新規坑真菌剤の発見への利用に関するものと *pkcA* が farnesol により誘導されるシグナル伝達への関与が示されたのみであった。*Aspergillus* 属以外の糸状菌ではアカパンカビ *Neurospora crassa* において PKC が概日リズム、光応答性に関与することが示されている程度であった。

我々のグループでは、*pkcA* の温度感受性株、*pkcA* のプロモーター置換により *pkcA* の発現レベルを培地の炭素源の違いにより調節できる株等を取得し解析することにより、*pkcA* が菌糸生長時における分生子 (無性胞子) 発芽後の極性の確立、菌糸生長時の極性維持、細胞壁にストレスを受けた際の応答反応、分生子形成等に関与することを示唆する結果を得ていた。しかしそれらの分子レベルでのメカニズムについては未解明のままであった。図 1 に PkcA のドメイン構造を示した。

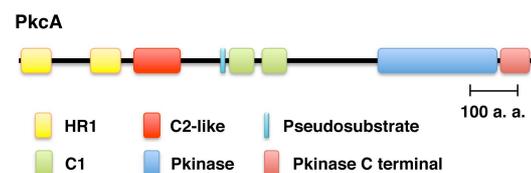


図1 *A. nidulans* PkcAのドメイン構造

ドメイン構造は *S. cerevisiae* の Pkc1p と同様で、*S. cerevisiae* での解析では HR1 は G タンパク質 Rho との相互作用に必要な高等真核生物の PKC には保存されていない。C1 は高等真核生物の PKC ではジアシルグリセロール等との結合に関わる。C2-like 領域は Ca^{2+} との結合に関わる領域 (C2) と相同性を持つが Ca^{2+} との結合に関わるアミノ酸が保存されていない。Pseudosubstrate は PKC が基質として認識しうる配列のリン酸化されるべきセリンまたはスレオニンが別のアミノ酸に置換されており PKC の活性制御に関わる。

2. 研究の目的

以上の背景から、糸状菌において PKC の役割は多岐にわたっていることが推定されていたが、その様々なメカニズムを分子レベルで明らかにすることを目的とした。また得られた知見を糸状菌の分子レベルでの育種

に利用することも目的とした。

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*)、A1145 (*pyrG89 pyroA4 nkuA::argB riboB2*) とそれら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大腸菌 *Escherichia coli* DH5 α を用いた。

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。

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 の形質転換はそれぞれ Biosci. Biotechnol. Biochem., **69**: 87-97, 2005 に記載された方法に従った。

(3) RT-PCR

RT-PCR 法については Biosci. Biotechnol. Biochem. **79**:321-330, 2015 に記載された方法に従った。

(4) RNA-seq 解析

サンプルは TruSeq RNA sample preparation kit (Illumina)を用いて調製し Illumina GA II system を用いて行った。

(5) 細胞抽出液の調製

細胞抽出液の調製は Mol. Microbiol. **89**: 532-551, 2013 に記載された方法に従った。

(6) その他の方法

一般的な分子生物学的手法、細胞生物学的手法、生化学的手法は成書に従って行った。

4. 研究成果

我々のグループが作製した *pkcA* の温度感受性株 (*pkcA-ts-2* 株) を用いたこれまでの研究で *A. nidulans* の PKC が高温条件下でアポトーシスの誘導を抑えることが示唆さ

れていた。この機構について、*PkcA* の下流で機能する因子を明らかにするため CWI 経路で *PkcA* の下流で機能することが知られている mitogen activated protein kinase (MAPK) と MAPK kinase kinase をコードする *mpkA*、*bckA* 遺伝子の破壊株を作製し検討した。その結果、これらの遺伝子破壊株においても高温条件下でアポトーシス (apoptosis) が誘導されることが明らかになり、CWI 経路と同様にこの場合も *PkcA* の下流で *BckA*、*MpkA* が働いていることが明らかになった。一方、菌糸を高温条件下にシフトすると菌糸先端の脱極性化 (depolarization) が引き起こされるが、30 分程度で再極性化 (repolarization) が誘導される。この再極性化においても *PkcA* が重要な働きをしていることを示したが、この機能にも *bckA* が関与しているかを検討した。その結果、この再極性化に *bckA* は関与していないことが明らかになり *PkcA* の菌糸先端における極性形成の働きには CWI 経路の下流で働く MAPK カスケードは関与しないことが示唆された。そこで図 2 に示したモデルを提唱した。(これらの結果は、雑誌論文の①と学会発表の①で公表した)。

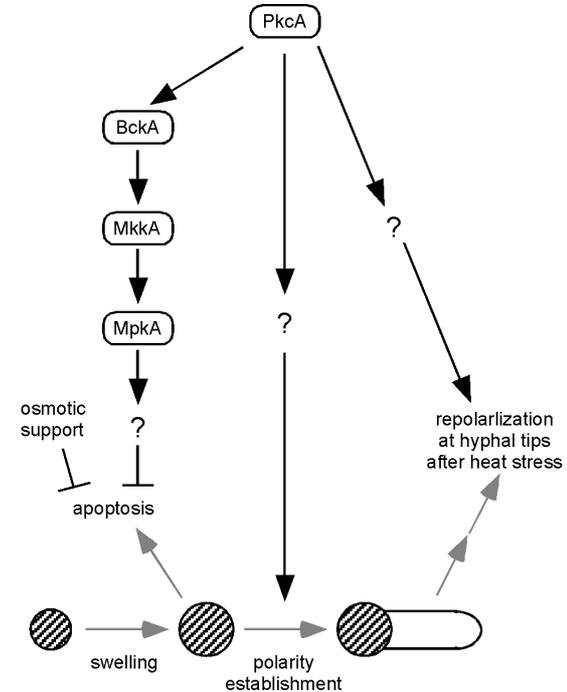


図2 *PkcA* のアポトーシス抑制、菌糸再極性化における機能のモデル (雑誌論文①より転載)

図中、分子子を斜線の円で示した。分子子は初め無方向的に生長 (swelling) するが、ある時期がくると一方向への極性生長を開始 (polarity establishment) し菌糸状の生育をする。

糸状菌においても *S. cerevisiae* と類似の CWI 経路が存在し、細胞壁の完全性維持に関わっていることが示唆されていたが、実際に PkcA が種々の細胞壁関連遺伝子の発現を制御しているか否かについては検討されていなかった。そこで活性化型 PkcA を培地の炭素源を変更することにより高発現できる株 (R429A-1 株) を作製し、8 種のキチン合成酵素遺伝子 (*chsA~chsD*, *chsF*, *chsG*, *csmA*, *csmB*)、2 種の α グルカン合成酵素遺伝子 (*agsA*, *agsB*)、1 種の β グルカン合成酵素遺伝子 (*fksA*) について RT-PCR 法を用いて発現解析を行った。その結果、*chsB*, *chsC*, *chsD*, *csmA*, *csmB*, *agsB* は活性化型 PkcA の高発現により転写産物量が増加することが明らかとなった。一方、*chsG* の転写産物量は逆に減少することも明らかとなった。さらにこれらの遺伝子の転写産物量の変動に *S. cerevisiae* の CWI 経路で働いていることが知られている転写因子 Rlm1 の *A. nidulans* でのオルソログ RlmA が関与しているかどうかを検討した。R429A-1 株において *rlmA* 遺伝子を欠失させた R429 Δ rlmA-1 株を作製し RT-PCR 法により上記遺伝子の発現を解析したところ *chsB*, *chsD*, *csmA*, *csmB* の転写産物量の増加が全く見られなくなったのに対し *chsC*, *agsB* は R429 Δ rlmA-1 株においてもある程度の転写産物量の増加がみられた。これらのことから細胞壁合成関連遺伝子の中には、PkcA による発現誘導が RlmA に完全に依存するものと、部分的に依存するものが存在することが示された。これらの結果をまとめたものが図 3 である (これらの結果は雑誌論文②と学会発表②③で公表した)。

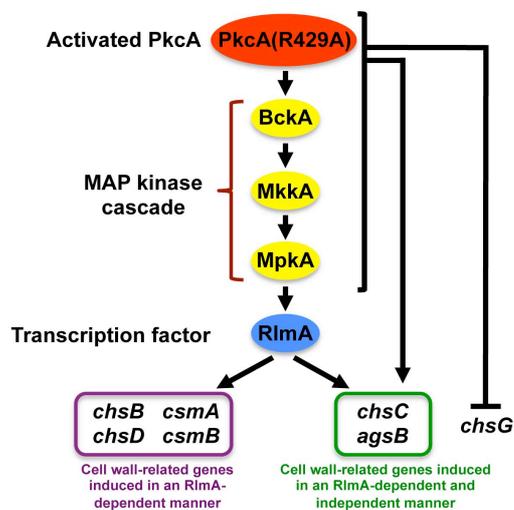


図 3 PkcA による細胞壁合成関連遺伝子の発現制御機構 (雑誌論文②の graphic abstract より転載)

さらに PkcA が発現に影響を与える遺伝子を網羅的に同定するため RNA-seq 解析を行った。RNA-seq 解析は *pkcA-ts-2* 株を制限温度である 42 度で 1.5 時間処理した場合と R429-1 株を活性化型 PkcA を発現誘導する条件で 20 時間培養した菌体から RNA を抽出して行った。その結果、上記細胞壁合成関連遺伝子の転写産物が R429-1 株において上昇していたことが確認できた。さらにそれ以外では *A. nidulans* が生産するマイコトキシンであるステリグマトシスチン (ST) 合成に関与する遺伝子の発現が *pkcA-ts-2* 株で上昇していること、 Ca^{2+} のシグナル伝達系が活性化すると発現が上昇することが知られている遺伝子群の発現が *pkcA-ts-2* 株で上昇していることなどが明らかとなった。そこで *pkcA* の ST 合成への関与について検討を行った。その結果、PkcA が ST 合成を正に制御する転写因子をコードする *aflR* 遺伝子の発現を負に制御すること、その抑制は *A. nidulans* においてペニシリン合成の抑制に関わることが知られている転写制御因子 AnBH1 依存的と非依存的の両方で ST 合成を負に制御することが示唆された (これらの結果については学会発表④⑤で公表しており雑誌論文として投稿準備中である)。

pkcA の失活条件下において実際に Ca^{2+} シグナル伝達系が活性化しているかどうかについても検討を行った。その結果、*pkcA* 失活条件下では、 Ca^{2+} シグナル伝達系の下流で働く転写因子 CrzA が脱リン酸化されて核に移行していることが示唆された。この現象は Ca^{2+} シグナル伝達系が活性化した際にみられる現象と同様である。CWI 経路で PkcA の下流で働く MAPK をコードする *mpkA* の欠失株においても同様の現象がみられることも明らかとなった。さらにこの *pkcA* 失活条件、*mpkA* 欠失株でみられる CrzA の核への移行は、培地に浸透圧安定化剤を加えることにより抑制できることが明らかになった。これらのことから CWI 経路が働かない条件では細胞質の Ca^{2+} 濃度が上昇し Ca^{2+} シグナル伝達系が活性化されることが示唆された (これらの結果は学会発表⑥⑦で部分的に公表しており、現在雑誌論文として投稿後 revise 中である)。

これ以外にも PkcA が直接リン酸化するタンパク質の同定を野生型株、*pkcA-ts-2* 株、R429A-1 株等を用いて試みたが再現性のある結果を得られておらず、また上記で得られた知見の有用菌株の作製への利用もまだ達成できていないが今後ぜひ試みたい。

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 2 件)

- ① Katayama, T., H. Uchida, A. Ohta, and H. Horiuchi, 2012. Involvement of protein kinase C in the suppression of apoptosis and in polarity establishment in *Aspergillus nidulans* under conditions of heat stress. PLoS ONE **7**:e50503. 査読有
- ② Katayama, T., A. Ohta, and H. Horiuchi. 2015. Protein kinase C regulates the expression of cell wall-related genes in an RlmA-dependent and independent manner in *Aspergillus nidulans*. Biosci. Biotechnol. Biochem. **79**:321-330. 査読有

[学会発表] (計 7 件)

- ① 片山琢也、堀内裕之、太田明德
*Aspergillus nidulans*における高温条件下でのプロテインキナーゼ C によるアポトーシス誘導抑制機構の解析 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
- ② 片山琢也、太田明德、堀内裕之
*Aspergillus nidulans*におけるプロテインキナーゼ C による細胞壁合成酵素遺伝子群の転写制御についての解析 第 12 回糸状菌分子生物学コンファレンス 2012 年 11 月 ウィンクあいち (名古屋)
- ③ 片山琢也、志波優、吉川博文、太田明德、堀内裕之
*Aspergillus nidulans*におけるプロテインキナーゼ C による細胞壁合成酵素遺伝子の転写制御 日本農芸化学会 2013 年度大会 2013 年 3 月 東北大学
- ④ 片山琢也、堀内裕之
*Aspergillus nidulans*におけるプロテインキナーゼ C の sterigmatocystin 合成にかかわる機能の解析 第 13 回糸状菌分子生物学コンファレンス 2013 年 11 月 つくば国際会議場
- ⑤ 片山琢也、堀内裕之
糸状菌 *Aspergillus nidulans* におけるプロテインキナーゼ C の sterigmatocystin 合成制御に関わる機能の解析 日本農芸化学会 2014 年度大会 2014 年 3 月 明治大学
- ⑥ 片山琢也、志波優、吉川博文、堀内裕之
糸状菌 *Aspergillus nidulans* におけるプロテインキナーゼ C 失活条件における網羅的

転写解析 第 8 回日本ゲノム微生物学会年会 2014 年 3 月 東京農業大学

- ⑦ 片山琢也、志波優、吉川博文、堀内裕之
Aspergillus nidulans におけるプロテインキナーゼ C によるカルシウム応答シグナル伝達経路制御機構の解析 第 14 回糸状菌分子生物学コンファレンス 2014 年 11 月 東北大学

[図書] (計 2 件)

- ① Horiuchi, H. and T. Katayama. 2015. Protein kinase C of filamentous fungi and its roles in the stresses affecting hyphal morphogenesis and conidiation, p. 185-198. In H. Takagi and H. Kitagaki (ed.), Stress Biology of Yeasts and Fungi: Applications for Industrial Brewing and Fermentation. Springer.
- ② 片山琢也、堀内裕之. 2014. 糸状菌の形態形成過程におけるプロテインキナーゼ C の機能. 化学と生物 **52**:490-491.

[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

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 ()