

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580108

研究課題名(和文)糸状菌 SUN タンパク質の機能解明とその応用

研究課題名(英文)Functional analysis and application of Sun family proteins in filamentous fungi

研究代表者

小林 哲夫 (Kobayashi, Tetsuo)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：20170334

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：Aspergillus nidulans sunA遺伝子の機能解明のため、破壊株、高発現株の表現型を解析した。破壊株では菌糸形態の異常、分生子形成能の低下、Calucofluor White, Congo Red感受性の上昇が見られ、分泌酵素生産性の向上とともに、細胞内タンパク質の漏出も検出された。また、細胞壁beta-1,3-グルカン合成や修飾に関わる遺伝子の発現量も変化していた。高発現株では有意な表現型はほとんど認められなかった。以上から、SunAは細胞壁のbeta-1,3-グルカンの恒常性に関わる因子であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To clarify the physiological function of the sunA gene in Aspergillus nidulans, phenotypic characteristics of the sunA deletant and overexpressor were analyzed. The deletant displayed morphological abnormality of the mycelia, decreased conidiation, increased sensitivity to Calucofluor White and Cong Red. Furthermore, increased production of the secreted enzymes and leakage of intracellular proteins were evident. Expression profile of the genes related to beta-1,3-glucan synthesis and modification was also different from that of the wild type. The overexpressor did not show significant changes in the above phenotypes. The results suggest that SunA is involved in beta-1,3-glucan homeostasis of the cell wall.

研究分野：応用微生物学

キーワード：糸状菌 細胞壁 恒常性

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の高分泌生産が可能な糸状菌宿主開発を目指し、変異処理により取得した *Aspergillus nidulans* のアミラーゼ高生産変異株 AHP1102 は、SUN タンパク質の一種をコードする *sunA* 遺伝子に変異を有することが示唆されていた。また、本変異株では菌系の形状に異常が見られるため、分泌酵素全般の生産性増加が起こると予測され、実際アミラーゼだけでなく、セルラーゼ、プロテアーゼ分泌量の増加が確認された。

SUN タンパク質は子囊菌類に保存されたタンパク質である。このファミリーのタンパク質は C 末端側に SUN domain と呼ばれる約 250 アミノ酸からなる高度に保存された領域を有し、この領域には鉄-イオウクラスター形成を匂わせる 6 つのシステイン残基が存在する。*Saccharomyces cerevisiae*、*Candida albicans*、*Schizosaccharomyces pombe* などの酵母で研究が行われており、*S. cerevisiae* においては SIM1、UTH1、NCA3、SUN4 の 4 種の SUN タンパク質について、老化 (SIM1、UTH1)、ストレス応答 (UTH1)、ミトコンドリア生合成 (NCA3、UTH1)、分裂の際の隔壁形成 (SUN4) などに関わることが報告されている。他の酵母では、*S. pombe* の PSU1 は細胞壁合成に、*C. albicans* の SUN41 は分裂の際の細胞の分離に関わる。SUN4、PSU1、SUN41 の変異株では細胞壁が野生株と異なることが示されており、 β -1,3-グルカン量の増加も報告されている。従って、分子機能は明らかではないものの、これら 3 種の因子については、細胞壁 β -1,3-グルカンの生合成や分解と関連することが示唆される。実際、*SUN4* 遺伝子の発現プロファイルをマイクロアレイデータベースで見ると、細胞壁のグルカナーゼ遺伝子と挙動を共にしていた。

糸状菌においては SUN ファミリータンパク質の機能は不明であるため、SunA の機能解析は学術的に有意義であるだけでなく、分泌酵素生産性の向上という観点から応用にも役立つと考えられた。

2. 研究の目的

SUN タンパク質は子囊菌類に高度に保存されたタンパク質であり、ミトコンドリア生合成、老化、隔壁形成、細胞分裂など様々な現象に関わるとされる。我々は糸状菌アミラーゼ高生産変異株 AHP1102 の解析から、高生産変異の原因が SUN タンパク質をコードする *sunA* 遺伝子の転写レベルの低下にあることを見出し、さらに、本変異株において多様な分泌酵素が高生産されることを明らかにしている。本遺伝子は糸状菌酵素産業における分子育種の標的遺伝子として期待されるため、本研究では、SunA の分子機能の解明とともに、得られる知見を利用して分泌酵素高生産用宿主の開発を試みた。

3. 研究の方法

(1) アミラーゼ高生産変異株 AHP1102 における変異の同定

特異的プライマーとランダムプライマーのセットを用いて TAIL PCR 法を用いて変異を含む領域を増幅し、その塩基配列を決定することにより変異を同定した。

(2) *sunA* 破壊株・高発現株の作製

sunA 遺伝子上流と下流の間に *pyrG* 遺伝子を挿入した破壊用断片を作製し、相同組み換えにより *sunA* 遺伝子を破壊した。

高発現株の作製では *sunA* 遺伝子のプロモータを構成的高発現プロモータである *Aspergillus oryzae* 由来の *tefl* プロモータに置換し、これを *pyrG* をマーカーとして相同組み換えにより *sunA* 座位に導入した。

(3) 菌糸・分生子形態の観察

最少培地で各株を 16 時間液体培養し、その後、キチン結合性の蛍光色素である Calcofluor White で染色した。これを微分干渉および落射蛍光により顕微鏡観察した。分生子形態は微分干渉顕微鏡により観察した。

(4) 分生子着生数の算出

寒天最少培地で各株を 37、7 日間培養し、ジャイアントコロニーを形成させた。この中心から約 1/2 半径の 2cm × 2cm の領域を切り取り、分生子懸濁液 5 mL を調製、単位面積 (cm²) 当たりの分生子数を算出した。

(5) 細胞外タンパク質の解析

2% グルコースを炭素源とした液体培養で 37、36 時間培養後、培養上清を TCA 沈殿によって濃縮したものを SDS-PAGE に供した。タンパク質の同定は MALDI-TOF/TOF 解析によって行った。

4. 研究成果

(1) アミラーゼ高生産変異株 AHP1102 における変異の同定

サザンブロット解析の結果から、AHP1102 株には、*sunA* 遺伝子のプロモータ領域に染色体の分断や大規模な挿入、欠失などがあると予想されていた。そこで、TAIL PCR によりプロモータ領域を増幅し、塩基配列を決定した。その結果、AHP1102 では *sunA* の -2 と -3 の間で (翻訳開始点を +1 とする) 染色体転座が起こることにより生じたことが明らかとなった。-2 から上流はクロモソーム VIII の AN0430 遺伝子の 2226 base から下流となっていた。なお、*sunA* 遺伝子はクロモソーム I に存在する。AN0430 は *S. cerevisiae* の STB6 のオルソログをコードしており、STB6 は Sin3 結合タンパク質で Sin3 はヒストンデアセチラーゼ複合体を構成する。

(2) *sunA* 破壊株、過剰発現株における分泌酵素生産性

前述の結果より、AHP1102 は *sunA* 遺伝子

プロモータとAN.0430 遺伝子間の染色体転座により生じたことが明らかとなった。そこで *sunA* 遺伝子の機能欠損が分泌酵素生産性向上の原因であることを確認するため、*sunA* 破壊株 ($\Delta sunA$) におけるアミラーゼ、セルラーゼ、プロテアーゼ生産性をプレートアッセイにより確認した(図 1)。その結果、野生型 *sunA* 遺伝子を持つ ABPU1 や ABP 株と比較して、 $\Delta sunA$ 株は AHP1102 と同様の高いアミラーゼ、セルラーゼ、プロテアーゼ生産性を示した。また、デンプンを炭素源として培養した際の上清をザイモグラフィーにより解析した結果、ABP 株、 $\Delta sunA$ 株ともに動度の等しい 3 種のアミラーゼが検出され、いずれのアミラーゼについても $\Delta sunA$ で活性が上昇していた(図 2)。以上から、*sunA* 遺伝子の機能欠損のみで分泌酵素生産性の向上が起こることが確認された。

図 1

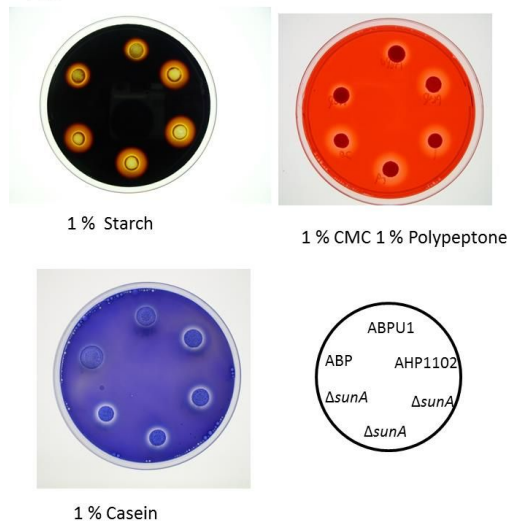
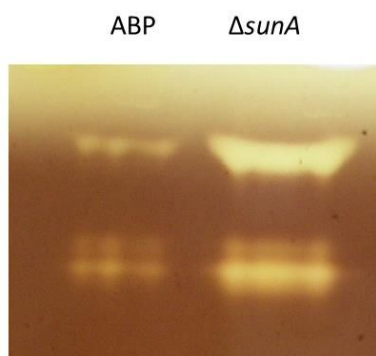


図 2



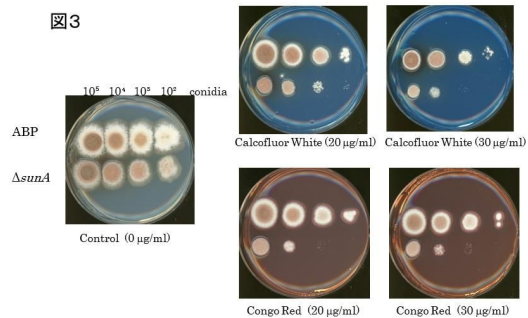
一方、*sunA* 過剰発現株 (OEsunA) では分泌酵素生産は野生型 *sunA* 遺伝子を持つ ABPU1 や ABP 株と同等であった(data not shown)。

(3) Calcofluor White 及び Congo Red 感受性に与える *sunA* 破壊及び過剰発現の影響

SunA のオルソログ SUN4, UTH1 は細胞壁に存在し、SUN4 の破壊株では娘細胞が分離

されない。これらは *SunA* が細胞壁と関連する因子であることを示唆している。そこで、細胞壁合成の攪乱物質である Calcofluor White および Congo Red に対する感受性を検討した。攪乱剤含有培地で 37 °C、3 日間培養した結果、*sunA* 破壊株 ($\Delta sunA$) ではいずれの薬剤に対しても感受性が上昇していることが明らかとなった(図 3)。一方 *sunA* 過剰発現株 (OEsunA) では影響が見られなかった。

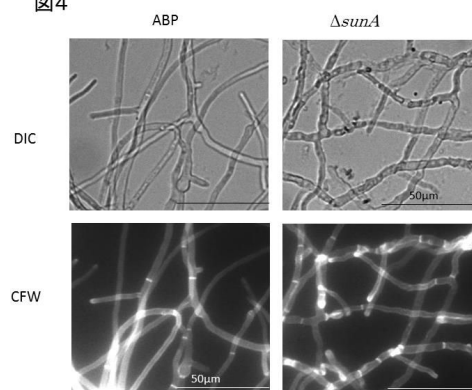
図 3



(4) 菌糸形態に与える *sunA* 破壊・過剰発現の影響

微分干渉観察では、破壊株 ($\Delta sunA$) の菌糸は著しくいびつであり、頻りに湾曲していた。また、細胞内に液胞と考えられる構造体が数珠状に存在していた(図 4)。一方、落射蛍光観察では、頻りに湾曲は観察されるもののいびつさは見られなかった。この違いは、液胞様構造体が可視できるかどうかの差によると考えられる。なお *sunA* 破壊株では隔壁の間隔が狭い傾向が見られた。*sunA* 破壊株における菌糸形態異常は、本因子が正常な細胞壁維持に必要な因子であることを示唆している。一方、*sunA* 過剰発現株 (OEsunA) では野生株と同様の菌糸形態が観察された。

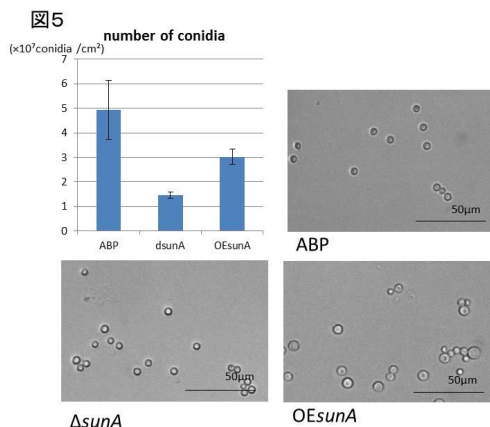
図 4



(5) 分生子着生・形態に与える *sunA* 破壊・過剰発現の影響

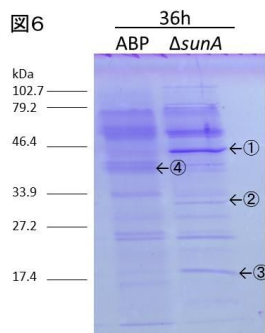
Aspergillus 属糸状菌では気中菌糸の先端で vesicle が形成され、さらに metulae を介して、phialide の先端で、分生子が出芽のように形成される。*S. cerevisiae* の *SunA* オルソログ SUN4 は娘細胞の分離に必要なため、分生子形成にも *SunA* が関わる可能性がある。*sunA* 破壊株の分生子形成能を ABP 株

(*sunA*⁺)と比較したところ、分生子数が約4分の1に減少していた。また、過剰発現株(OE*sunA*)でも破壊株ほどではないものの減少が見られた(図5)。分生子形態を観察したところ、*sunA*破壊株はABP株と同等であったが、過剰発現株では径が均一ではなく、大小様々な分生子が観察された(図5)。おそらく、正常な分生子形成には適正な量のSunAが必要であると考えられる。



(6) *sunA*破壊株における細胞外タンパク質組成

*sunA*破壊株は細胞壁に異常を持つと考えられるため、部分的な溶菌により細胞内タンパク質の漏出が起こる可能性がある。培養上清に含まれる細胞外タンパク質をSDS-PAGEによって解析したところ、ABP株(*sunA*⁺)と*sunA*破壊株(*sunA*)とではプロファイルに違いがあり、後者では前者には存在しない複数のタンパク質が認められた(図6)。



特徴的なタンパク質を、MALDI-TOF/TOF解析で同定した結果、破壊株に特徴的なからそれぞれNADP依存型グルタミン酸デヒドロゲナーゼ(GdhA)、キシラナーゼ(XlnC)スーパーオキシドディスムターゼ(SodA)であり、ABP株(*sunA*⁺)に特徴的はAN4575によってコードされる未知タンパク質であった。GdhAとSodAは細胞内タンパク質であり、*S. cerevisiae*のオルソログはそれぞれ77,500分子/cell、519,000分子/cellと大量に存在する。GdhA、SodAが同様に細胞内に大量に存在すると仮定すると、部分的

な溶菌により一部が細胞外に放出された可能性が考えられる。

XlnCは菌体外分泌酵素である。*sunA*破壊により細胞壁構造に異常が生じ、部分的な溶菌により細胞内タンパク質が漏出するとともに、細胞壁にトラップされていた分泌酵素が培養液中に放出されたことが示唆された。

(7) *sunA*破壊・過剰発現が細胞壁関連遺伝子の発現に与える影響

*sunA*破壊は細胞壁の異常を引き起こすため、これがシグナルとなって恒常性維持のために細胞壁合成・分解に関わるの遺伝子群の発現が変化する可能性があり、その情報からSunAの機能に迫れる可能性がある。そこで、破壊、過剰発現が細胞壁合成・分解関連遺伝子の発現に与える影響を半定量RT-PCRにより解析した。その結果、chitin、 α -1,3-glucanの合成に関わる遺伝子の発現は影響が認められなかったのに対して、 β -1,3-glucanの合成に関わる遺伝子や β -1,3-glucanの修飾に関わる遺伝子の発現に変化が見られた。以上から、SunAは細胞壁 β -1,3-glucanの恒常性に関わるタンパク質であると考えられる。

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 件)

〔学会発表〕(計 1件)

船山あずみ、金丸京子、木村真、小林哲夫、分泌酵素生産に関与する *Aspergillus nidulans* SunAの機能解析、第14回糸状菌分子生物学コンファレンス、2014年11月15日、東北大学川内北キャンパス(宮城県仙台市青葉区川内)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 哲夫 (KOBAYASHI, Tetsuo)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授

研究者番号：20170334

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：