

博士論文

論文題目 糸状菌 *Aspergillus nidulans* におけるプロテインキ  
ナーゼ C の機能解析

氏 名 片山 琢也

## 目次

序章 .....	6
0-1. 糸状菌研究の意義 .....	6
0-2. 糸状菌 <i>Aspergillus nidulans</i> .....	6
0-3. プロテインキナーゼ C .....	7
0-3-1. PKC の構造 .....	7
0-3-2. 酵母における PKC .....	9
0-3-3. 糸状菌における PKC .....	10
0-3-4. <i>A. nidulans</i> における <i>pkcA</i> 温度感受性株 .....	12
0-4. 本論文の内容 .....	13
第 1 章 細胞壁合成酵素遺伝子群の転写制御に関わる PkcA の機能 .....	18
1-1. 序 .....	18
1-2. 材料と方法 .....	21
1-2-1. 本章で用いた菌株 .....	21
1-2-2. 本章で用いたオリゴヌクレオチド .....	21
1-2-3. 本章で用いたプラスミド .....	21
1-2-4. プラスミドの構築 .....	22
1-2-5. PCR .....	23
1-2-6. 本章で使用した <i>A. nidulans</i> 菌株の作製 .....	24
1-2-6-1. C 末端に 3xFLAG を付加した MpkA (MpkA-FLAG) を生産する株の作製 ....	24
1-2-6-2. 活性化型 PkcA (PkcA(R429A)) を高生産できる株の作製 .....	24
1-2-6-3. <i>rlmA</i> 欠失株の作製 .....	25
1-2-7. 培地 .....	25
1-2-8. DNA の取扱法 .....	27
1-2-9. 塩基配列の決定法 .....	27
1-2-10. <i>E. coli</i> の形質転換法と <i>E. coli</i> からのプラスミド抽出法 .....	27
1-2-11. <i>A. nidulans</i> の形質転換法 .....	27
1-2-12. <i>A. nidulans</i> からの全 DNA の抽出法 .....	29
1-2-13. サザン解析 .....	30
1-2-14. <i>A. nidulans</i> の細胞抽出液の調製法 .....	30
1-2-15. Coomassie Brilliant Blue (CBB) 染色 .....	30
1-2-16. ウェスタン解析 .....	30

1-2-17. <i>A. nidulans</i> からの全 RNA の抽出法 .....	31
1-2-18. 定量 real-time RT-PCR 法 .....	32
1-2-19. 分生子形成効率の測定法 .....	32
1-3. 結果 .....	32
1-3-1. <i>pkcA-ts</i> 株における表現型解析および PkcA 活性 .....	32
1-3-2. 活性化型 PkcA を高生産する株の表現型及び PkcA 活性 .....	33
1-3-3. <i>pkcA</i> (R429A)発現抑制条件から誘導条件に移した場合の細胞壁合成酵素遺 伝子群の転写解析 .....	34
1-3-4. <i>pkcA</i> (R429A)発現抑制条件から誘導条件に移した場合の <i>rlmA</i> 欠失株にお ける細胞壁合成酵素遺伝子群の転写解析 .....	35
1-3-5. <i>pkcA</i> (R429A)発現誘導条件下で長時間培養した場合の細胞壁合成酵素遺 伝子群の転写解析 .....	36
1-3-6. <i>pkcA</i> (R429A)発現誘導条件下で長時間培養した場合の <i>rlmA</i> 欠失株にお ける細胞壁合成酵素遺伝子群の転写解析 .....	36
1-3-7. <i>pkcA</i> 失活条件における細胞壁合成酵素遺伝子群の転写解析 .....	37
1-3-8. <i>rlmA</i> 欠失株のストレス感受性の検討 .....	37
1-4. 考察 .....	38
1-4-1. RlmA を介して PkcA によって制御される細胞壁合成酵素遺伝子 .....	39
1-4-2. PkcA 活性化条件で短時間培養した場合に RlmA 非依存的にも PkcA によ って制御される細胞壁合成酵素遺伝子 .....	40
1-4-3. PkcA 活性化条件で長時間培養した場合に RlmA 非依存的に PkcA によ って制御される細胞壁合成酵素遺伝子 .....	40
1-4-4. PkcA による高温ストレス時の細胞壁合成酵素遺伝子群の転写制御 .....	41
1-4-5. PkcA による細胞壁合成酵素遺伝子の転写制御の意義 .....	42
第 2 章 高温条件における PkcA の機能解析 .....	62
2-1. 序 .....	62
2-2. 材料と方法 .....	63
2-2-1. 本章で用いた菌株 .....	63
2-2-2. 本章で用いたオリゴヌクレオチド .....	63
2-2-3. 本章で用いたプラスミド .....	64
2-2-4. プラスミドの構築 .....	64
2-2-5. 本章で使用した <i>A. nidulans</i> 菌株の作製 .....	67

2-2-5-1. <i>alcA</i> (p)制御下で <i>lifeact-egfp</i> を発現する <i>A. nidulans</i> 菌株 ( <i>alcA</i> (p)- <i>lifeact-egfp</i> 株) の作製 .....	67
2-2-5-2. <i>bckA</i> 欠失株の作製 .....	67
2-2-5-3. N 末端に EGFP の連結した ModA を生産する株の作製 .....	68
2-2-5-4. C 末端に EGFP の連結した SepA を生産する株の作製 .....	68
2-2-6. PCR .....	69
2-2-7. 培地 .....	69
2-2-8. DNA の取扱法 .....	69
2-2-9. 塩基配列の決定法 .....	69
2-2-10. <i>E. coli</i> の形質転換法と <i>E. coli</i> からのプラスミド抽出法 .....	69
2-2-11. <i>A. nidulans</i> の形質転換法 .....	69
2-2-12. <i>A. nidulans</i> からの全 DNA の抽出法 .....	69
2-2-13. サザン解析 .....	69
2-2-14. <i>S. cerevisiae</i> からの全 DNA の抽出法 .....	69
2-2-15. 蛍光顕微鏡観察 .....	69
2-2-16. FACS 解析 .....	70
2-2-17. 生菌率測定法 .....	71
2-2-18. TUNEL assay .....	71
2-3. 結果 .....	71
2-3-1. 高温条件における <i>pkcA-ts</i> 株の生菌率 .....	71
2-3-2. 高温条件における <i>pkcA-ts</i> 株の分生子の発芽時の形態および核分裂 .....	72
2-3-3. 高温条件における <i>pkcA-ts</i> 株の DNA 複製 .....	72
2-3-4. 高温条件における <i>pkcA-ts</i> 株でのアポトーシス誘導の検討 .....	72
2-3-5. 高温条件における <i>bckA</i> 欠失株、 <i>mpkA</i> 欠失株の表現型 .....	73
2-3-6. 高温条件で培養した <i>bckA</i> 欠失株、 <i>mpkA</i> 欠失株におけるアポトーシスの誘導 .....	74
2-3-7. 高温条件におけるヒドロキシ尿素処理時のアポトーシス誘導の検討 .....	74
2-3-8. 37°Cにおける <i>pkcA-ts</i> 株でのアポトーシス誘導の検討 .....	75
2-3-9. PkcA および CWI 経路の MAP キナーゼカスケードの farnesol 感受性への関与についての検討 .....	75
2-3-10. 高温条件における PkcA のアポトーシス誘導の抑制以外の機能 .....	76
2-3-11. Lifeact をレポーターとして用いた生細胞における F-アクチンの観察 .....	77
2-3-12. 高温条件における <i>pkcA-ts</i> 株での発芽時の Lifeact-EGFP の観察 .....	78

2-3-13. <i>pkcA-ts</i> 株における高温ストレス時の菌糸先端での Lifeact-EGFP の観察	78
2-4. 考察	79
2-4-1. PkcA のアポトーシス誘導の抑制に関わる機能	80
2-4-2. PkcA の極性形成に関わる機能	81
第 3 章 PkcA の sterigmatocystin 合成制御に関わる機能解析	107
3-1. 序	107
3-2. 材料と方法	108
3-2-1. 本章で用いた菌株	108
3-2-2. 本章で用いたオリゴヌクレオチド	108
3-2-3. 本章で用いたプラスミド	108
3-2-4. プラスミドの構築	109
3-2-5. 本章で使用した <i>A. nidulans</i> 菌株の作製	109
3-2-5-1. <i>thiF</i> プロモーター制御下で <i>anbH1</i> を発現する株の作製	109
3-2-5-2. ピリドキシン要求性の回復した活性化型 PkcA (PkcA(R429A)) を高生産できる株の作製	110
3-2-6. PCR	111
3-2-7. 培地	111
3-2-8. DNA の取扱法	111
3-2-9. 塩基配列の決定法	111
3-2-10. <i>E. coli</i> の形質転換法と <i>E. coli</i> からのプラスミド抽出法	111
3-2-11. <i>A. nidulans</i> の形質転換法	111
3-2-12. <i>A. nidulans</i> からの全 DNA の抽出法	111
3-2-13. サザン解析	111
3-2-14. <i>A. nidulans</i> の細胞抽出液の調製法	111
3-2-15. RNA-seq 解析	111
3-2-16. sterigmatocystin 測定	111
3-2-17. 菌体からのヌクレオソーム DNA の回収	111
3-2-18. ヌクレオソームのマッピング	112
3-3. 結果	112
3-3-1. PkcA 活性化条件、PkcA 失活条件における網羅的転写解析	112
3-3-2. PkcA 部分的失活条件及び活性化条件における sterigmatocystin 生産量の測	

定 .....	113
3-3-3. <i>rlmA</i> 欠失株における ST 生産量の測定 .....	114
3-3-4. PkcA 活性化条件における <i>aflR</i> 、 <i>stcU</i> の転写解析 .....	114
3-3-5. PkcA の ST 合成を制御する機能に対する AnBH1 の関与についての検討 .....	114
3-3-6. <i>pkcA</i> 条件変異株におけるヌクレオソームの位置の変化 .....	115
3-4. 考察 .....	115
3-4-1. PkcA 活性化条件、失活条件における網羅的転写解析 .....	116
3-4-1-1. 細胞壁関連遺伝子 .....	116
3-4-1-2. 脂質代謝関連遺伝子 .....	117
3-4-1-3. 二次代謝産物生産関連遺伝子 .....	118
3-4-2. PkcA 活性化、不活性化による細胞内シグナル伝達経路への影響 .....	118
3-4-3. PkcA の ST 合成制御に関わる機能 .....	120
終章 .....	152
参考文献 .....	156
謝辞 .....	170

## 序章

### 0-1. 糸状菌研究の意義

糸状菌はその高いタンパク質分泌能から食品製造や醗酵生産などの産業分野で広く利用されてきた。*Aspergillus oryzae* や *Aspergillus sojae* などはそのタンパク質高分泌能から清酒や醤油の製造においてデンプンの糖化、タンパク質の分解の促進に利用されている。さらにその際に生成する副産物は清酒、醤油を特徴づける上で重要な役割を果たしている。一方、*Aspergillus fumigatus*、*Fusarium oxysporum* などのように人間を含む動植物に感染することで人間生活に害をなすものも多数存在し、より効果的な抗真菌薬、農薬の開発が望まれている。これらのタンパク質高分泌能や動植物への感染能は菌糸状の形態と密接に関連することが示唆されている。また、糸状菌は豊富な二次代謝産物生産能を有することから新規生理活性物質を探索するための有望な対象である一方で、*Aspergillus flavus* や *Aspergillus parasiticus* などのようにマイコトキシンを生産し人間生活に害をもたらすものも存在する。このように、糸状菌の形態形成や二次代謝産物生産のメカニズムを明らかにすることは、有益な糸状菌の有用性を高め、有害な糸状菌による損失を低減させるために非常に重要である。また糸状菌は多様な形態を示すことから、細胞の形態形成や分化のメカニズムを解明するという基礎生物学的観点からも糸状菌研究は非常に興味深い。

近年、多くの糸状菌において全ゲノムが公開され、マイクロアレイ解析や RNA-seq 解析、プロテオーム解析といった網羅的解析が精力的に行われており、膨大な知見が蓄積されつつある。今後これらの情報を利用した解析により糸状菌研究の飛躍的な進展、産業分野への応用の更なる活発化が期待されている。

### 0-2. 糸状菌 *Aspergillus nidulans*

糸状菌 *Aspergillus nidulans* (テレオモルフ名は *Emericella nidulans*) は一倍体で安定に増殖し有性生殖を行うことから古典遺伝学的手法の利用が可能であり、分子生物学的手法の整備やゲノム情報の公開により、糸状菌の中では研究を行う環境が最も整っている菌の一つである。最近ではキナーゼをコードする遺伝子すべてについての破壊株がホモカリオン、またはヘテロカリオン（必須遺伝子の場合）として取得されており、それ以外の遺伝子についても 95%近く

の遺伝子についてすでに破壊株が取得されている (De Souza *et al.*, 2013)。

*A. nidulans* は有性生活環、無性生活環、擬似有性生活環といった多様な生活環を有するが、通常無性生殖を行って増殖する (Fig. 0-1) (Todd *et al.*, 2007)。無性孢子 (分生子) は発芽過程において、まず無極性生長により無方向性に膨張後、ある時点で極性が確立されて発芽管を形成する。その後菌糸は先端生長と分岐を繰り返して伸長を続け、固体培地ではコロニーを形成する。気中に伸長した菌糸では栄養分の飢餓や空気にさらされることにより、分生子形成器官の分化が誘導され、分生子形成器官が形成される。一方、酸素の欠乏や光が遮断されている場合には有性生殖が誘導され、有性生殖器官が形成される。無性生殖により形成された分生子や有性生殖により形成された子嚢胞子は発芽、菌糸生長を行い、再び無性生殖、有性生殖を繰り返す。

### 0-3. プロテインキナーゼ C

プロテインキナーゼ C (PKC) は、真核生物に高度に保存されたセリン/スレオニンキナーゼである。高等真核生物では一種の生物が複数のアイソザイムを持ち、それらが様々なシグナル伝達系において複雑に制御されて、細胞の増殖や分化、アポトーシスといった根源的な細胞機能の調節から、発生、免疫、記憶などの多細胞生物特有の生理現象まで幅広い現象に関与する (Ohno and Nishizuka, 2002)。

#### 0-3-1. PKC の構造

PKC は哺乳類では 12 種のアイソザイムが存在し、どの分子種においても C 末端側にキナーゼドメイン、V5 ドメイン、N 末端側に活性の制御や細胞内局在に関わる複数のドメインを持つことは共通しているが、N 末端側のドメインの相同性は低く、その構造から哺乳類の PKC は 3 つのサブクラス、cPKC (conventional PKC)、nPKC (novel PKC)、aPKC (atypical PKC) に分けられる (Fig. 0-2) (堀内, 2009)。これら 3 つのサブクラスでは、構造の違いを反映し、その活性を制御する因子が異なる。cPKC は 2 つの C1 ドメイン (C1A、C1B) においてジアシルグリセロール (DAG) やホルボールエステルであるホルボール-12-ミリステート-13-アセテート (PMA) と結合し、さらに C2 ドメインにおいてカルシウム依存的に陰イオン性のリン脂質と結合する。cPKC の活性化は、まずカルシウムの結合した C2 ドメインが細胞膜と相互作用し、その後 C1 ドメ



インに DAG や PMA が結合することで起こる。nPKC は cPKC と同様に 2 つの C1 ドメインにおいて DAG や PMA と結合するが、nPKC の C2 様 (C2-like) ドメインにはカルシウムとの結合に関わるアミノ酸残基が保存されておらず、このドメインにはカルシウムは結合しない。そのため、nPKC の活性化はカルシウムに依存しない。aPKC は cPKC や nPKC とは異なり、C1 ドメインにおいて DAG や PMA とは結合しないが、ホスファチジルイノシトール-3-リン酸やセラミドと結合する。また、aPKC はタンパク質間相互作用に寄与する PB1 ドメインを持つ。この PB1 ドメインに結合するタンパク質が複数同定されており、これらによって aPKC の活性が制御される。いずれの分子種においても偽基質配列 (PS) が保存されている。偽基質配列は、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残基がアラニンなどのリン酸化されないアミノ酸残基に置換されている配列で、この配列が PKC の活性中心に結合することで活性を制御していると考えられている。一方、3-ホスホイノシタイド依存性キナーゼである PDK-1 は PKC の最も C 末端側に存在する V5 ドメインに結合して PKC のキナーゼドメイン中の活性化ループのスレオニン残基をリン酸化するが、このリン酸化は触媒ポケットへのネガティブチャージの導入や活性化型立体構造の安定化に寄与する (Steinberg, 2008、Steinberg, 2012)。

高等真核生物とは対照的に下等真核生物では 1 種の生物が持つ PKC の種類は少なく、*S. cerevisiae* には Pkc1p のみ、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* には Pck1p および Pck2p の 2 種のみ存在する (Perez and Calonge, 2002)。真菌類の PKC は N 末端側のドメインの配置から、nPKC に最も近い構造を持つが、*S. cerevisiae* や *A. nidulans* の PKC はジアシルグリセロール、リン脂質、カルシウムでは活性化されないのに対し (Antonsson *et al.*, 1994、一宮, 2004)、*Trichoderma reesei* の Pkc1p はホスファチジルエタノールアミンやホスファチジルセリンなどのリン脂質の存在下で活性化することが示されており (Khatun and Lakin-Thomas, 2010、Lendenfeld and Kubicek, 1998)、真菌類の中でも生物種によって PKC の制御機構は異なると考えられる。真菌類の PKC の最 N 末端側には 2 つの HR1 ドメイン (HR1A、HR1B) が保存されている。HR1 ドメインは低分子量 G タンパク質の Rho と結合することが知られているドメインで、*S. cerevisiae* における Pkc1p の HR1 ドメインについても、低分子量 G タンパク質である Rho1p と結合することが示されている (Schmitz *et al.*, 2002)。哺乳類の PDK-1 の場合と同様に *S. cerevisiae* における PDK-1 のオルソログである

Pkh1p/2pもPkc1pの活性化ループ中のスレオニン残基をリン酸化することが示されており、このリン酸化は高温ストレス時のPkc1pの完全な活性に必要であることが示唆されている(Levin, 2005)。Fig. 0-3に糸状菌、酵母および哺乳類のPKCとPKCアイソザイムであるProtein kinase N (PKNまたはPKC-related kinase: PRK)のアミノ酸配列に基づく系統樹を示した(堀内, 2009)。子囊菌類に属する糸状菌のPKCは相互に近縁の関係にあるのに対し、*S. cerevisiae*のPKC (Pkc1p)はこれら子囊菌類の糸状菌のPKCとは比較的保存度が低く、*S. cerevisiae*のPkc1pと糸状菌のPKCとでは一部機能が異なる可能性が考えられる。

### 0-3-2. 酵母におけるPKC

*S. cerevisiae*は真核微生物の中で最もPKC研究が進んでいる生物である。Pkc1pをコードする*PKC1*の欠失は通常の条件では致死性であり、欠失株は最終的な表現型 (terminal phenotype) として、小さなbudを形成した状態で細胞周期が停止し、出芽部位において溶菌が見られるが(Levin *et al.*, 1990)、この致死性は培地への浸透圧安定化剤の添加により抑圧される。これまでの解析によりPkc1pの中心的役割は細胞壁の完全性の維持に機能するシグナル伝達経路 (Cell Wall Integrity (CWI) 経路) に関わるものと考えられている。CWI経路では細胞壁の異常を感知するセンサーであるWsc1~3p、Mid2p、Mtl1pから、Rho1pのグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) であるRom2pを介してRho1pに伝えられたシグナルを、Pkc1pが受け取り、下流のMAPキナーゼのカスケードに伝える役割を担う。この場合MAPキナーゼのカスケードにはMAPKKKとしてBck1p、MAPKKとしてMkk1p/2p、MAPKとしてSlit2p(Mpk1p)が含まれ、Slit2pが転写因子であるRlm1p、SBF複合体 (Swi4pとSwi6pの複合体) を活性化して遺伝子発現が制御される (Fig. 0-4) (Levin, 2011)。Pkc1pはCWI経路に関わる機能以外にも様々な機能を持つことが示唆されている。高温ストレス時や酸化ストレス時にbudに局在するアクチンが一時的に脱局在化して細胞質中に拡散し、一定時間後に再びbudへの局在化が見られるが、Pkc1pがアクチンの脱局在化とその後の再局在化に関与することが示唆されている (Delley and Hall, 1999、Dong *et al.*, 2003、Pujol *et al.*, 2009、Guo *et al.*, 2009)。また、Pkc1pがoligosaccharyltransferase (OT) の複数のサブユニットと結合すること、*pkc1*欠失株ではOT活性が低下することが示されており、Pkc1pがタンパ

ク質の N 型糖鎖付加の制御に関与することが示唆されている (Park and Lennarz, 2000)。Pkc1p はリン脂質合成に関わる遺伝子の転写を抑制する因子である Opi1p のリン酸化を介してこれらの遺伝子の転写を正に制御することが示唆されている (Sreenivas *et al.*, 2001)。これに加え、Pkc1p がコリンからホスファチジルコリンを合成する経路で機能する Cki1p をリン酸化すること、Pkc1p 依存的に Cki1p の活性が亢進することが示されており (Choi, *et al.*, 2005)、これらのことから Pkc1p がリン脂質合成制御にも関与することが示唆されている。さらに、野生型株では高温ストレス時に形質膜画分のキチン合成酵素 Chs3p が増加するのに対し、*pkc1* 温度感受性株ではこの増加が見られないことが示されており、Pkc1p が Chs3p の細胞内輸送に関与することが示唆されている (Valdivia and schekman, 2003)。最近の解析では、形質膜や細胞壁に損傷が生じた場合、Bud に局在していた formin である Bni1p が Pkc1p 依存的に分解されて細胞が脱極性化すること、細胞の脱極性化によって formin である Bnr1p や Rom2p、Rho1p、Pkc1p が損傷部位に局在するようになり、損傷部位にキチン合成酵素 Chs3p がリクルートされて損傷部位におけるキチン合成が誘導されることが示されており、Pkc1p が極性を制御することで細胞の損傷の修復に関与することが示唆されている (Kono *et al.*, 2012)。*S. cerevisiae* の Pkc1p は HR1 ドメインの他に、C1 ドメインにも Rho1p が結合することが示されており、Pkc1p が上流からのシグナルの違いにより、下流に選択的なシグナル伝達を行うことが推測されている (Nonaka *et al.*, 1995)。一方 *Pichia pastoris* においては、PKC をコードする遺伝子の不活化によりタンパク質分泌が亢進することが報告されている (Larsen *et al.*, 2013)。

### 0-3-3. 糸状菌における PKC

これまでに少なくとも 9 種類の糸状菌 (*A. nidulans*、*A. oryzae*、*Aspergillus niger*、*T. reesei*、*Neurospora crassa*、*Tuber borchii*、*Tuber magnatum*、*Cochliobolus heterostrophus*、*Ashbya gossypii*) において PKC をコードする遺伝子が単離されており (Ichinomiya *et al.*, 2007、Juvvadi *et al.*, 2007、Morawetz *et al.*, 1996、Lendenfeld and Kubicek, 1998、Arpaia *et al.*, 1999、Ambra and Macino, 2000、Oeser, 1998、Lengeler *et al.*, 2013)。*A. nidulans* において PKC をコードする遺伝子 *pkcA* は当研究室の一宮により初めて単離され、真菌類の PKC において保存されている複数の領域が PkcA においてもよく保存されてい

ることが明らかとなった(一宮, 2004)。その後のゲノム情報の公開により、*pkcA* は *A. nidulans* において PKC をコードする唯一の遺伝子であることが示されている (Galagan *et al.*, 2005)。これまでに当研究室では 2 種の遺伝的背景の異なる株において *pkcA* 欠失株の取得が試みられており、*pkcA* を欠失した核と野生型の核からなるヘテロカリオン (遺伝的背景の違いによりそれぞれ *///pPSP-16* 株、 $\Delta$ *pkcA-1h* 株と命名) と、ヘテロカリオンから生じたと考えられるヘテロ二倍体のみが取得されている (Ichinomiya *et al.*, 2007、内田, 2008)。*///pPSP-16* 株、 $\Delta$ *pkcA-1h* 株の分生子を選択培地で培養した場合、*pkcA* を欠失した核のみを持つホモカリオン化したと考えられる細胞では発芽管は形成されるが、頻繁に溶菌が見られ、長時間培養してもコロニーは形成されなかった (Fig. 0-5) (Ichinomiya *et al.*, 2007、内田, 2008)。また、両株の分生子を、浸透圧安定化剤として 1.0 M のソルビトールを添加した選択培地で培養した場合にもコロニーは形成されず、*pkcA* は *A. nidulans* の生育に必須の遺伝子であることが強く示唆されている (Ichinomiya *et al.*, 2007、内田, 2008)。これまでに *N. crassa*、*C. heterostrophus* において PKC をコードする遺伝子の欠失株の取得が試みられたが、これらを欠失した一倍体ホモカリオンは取得されなかったことから、*N. crassa*、*C. heterostrophus* においても PKC は生育に必須であることが示唆されている (Colot *et al.*, 2006、Oeser, 1998)。一方、*S. cerevisiae* と非常に近縁な糸状菌 *A. gossypii* では PKC をコードする *pkc1* の欠失株が取得されている (Lengeler *et al.*, 2013)。

*A. nidulans* において *pkcA* の発現を抑制または誘導した株や C1B ドメイン近傍のグリシンがアルギニンに置換された PkcA を生産する株 (*calC2* 変異株) は細胞壁にストレスを与える薬剤に高感受性を示すことから、PkcA は細胞壁の完全性維持に必要であることが示唆されている (Ronen *et al.*, 2007、Ichinomiya *et al.*, 2007、Teepe *et al.*, 2007)。また、C 末端に GFP を付加した PkcA が菌糸先端や隔壁形成部位、フィアライド先端に局在すること、*calC2* 変異株では分生子形成効率が低下することから、PkcA が極性生長や隔壁形成、分生子形成に関与することが示唆されている (Teepe *et al.*, 2007)。さらに *pkcA* の発現を抑制した場合に、ペニシリン合成に関わる遺伝子の転写が誘導されること、これらの遺伝子の転写を抑制する因子 AnBH1 が核外に局在することから、PkcA が AnBH1 を介してペニシリン合成に関わる遺伝子を抑制する機能を持つことが示唆されている (Herrmann *et al.*, 2006)。farnesol で処理した場合に野

生型株で見られる Unfolded Protein Response (UPR) の指標となる *hacA* mRNA のプロセシングの誘導が *calC2* 変異株ではほとんど見られないことから、PkcA が UPR にも関与することも示唆されている (Colabardini *et al.*, 2010)。

*N. crassa* の PKC である NPKC は転写因子である WC-1 のリン酸化を介して光応答に関わる遺伝子の転写を制御することが示されている (Franchi *et al.*, 2005)。また、NPKC が菌糸先端や分岐の先端、菌糸先端からやや後方の部位、形成中の隔壁に局在し、細胞質中にも存在すること、PMA や DAG アナログである 1,2-ダイオクタノイル-sn-グリセロール (DOG) を処理した場合に細胞質中に存在していた NPKC が一時的に形質膜に局在を変化させることが示されている (Khatun *et al.*, 2011)。*A. oryzae* の PKC は Woronin body タンパク質である AoHex1 をリン酸化することで AoHex1 のマルチマー化を促進することが示されている (Juvvadi *et al.*, 2007)。*A. gossypii* の *pkc1* 欠失株は著しい生育の悪化、高頻度の菌糸先端での溶菌が見られること、この株では高温条件下や  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、0.8 M のマンニトールの存在下でも生育にほとんど影響が見られないことが示されている (Lengeler *et al.*, 2013)。

#### 0-3-4. *A. nidulans* における *pkcA* 温度感受性株

*S. cerevisiae* では UV を変異原とした *PKC1* の温度感受性株が複数取得されている (Levin and Bartlette-Heubusch, 1992)。これらの株では *PKC1* ORF の 3' 側に変異が入っており、Pkc1p のキナーゼドメインの配列中にアミノ酸置換が起きている。これらの株は制限温度下で生育不能であり、非制限温度から制限温度へのシフトにより、細胞周期の G<sub>2</sub> 期での停止、タンパク質合成の低下、生存率の低下、溶菌の増加などの表現型が見られる。一方で培地にカルシウムを添加することでこれらの株の高温での生育は支持される。当研究室の内田は、*S. cerevisiae* において野生型 Pkc1p の代わりに 1023 番目のプロリンがロイシンに置換された Pkc1p を生産する *pkc1* 温度感受性株 (*pkc1-2* 変異株) (Levin and Bartlett-Heubusch, 1992) の知見を基に、PkcA において相当するアミノ酸である 959 番目のプロリンをロイシンに置換したタンパク質を野生型 PkcA の代わりに生産する株を作製し解析した結果、この株は高温感受性株 (*pkcA-ts* 株) となることが示された。この *pkcA* 温度感受性株は 30°C では野生型株と同等の生育を示すのに対し、37°C では生育の遅延、分生子形成効率の著しい低下がみられ、42°C では生育することができない (内田, 2008)。このことから、PkcA が

生育に必須な機能と分生子形成に関わる機能を持つことが示唆されている。

以上、示したように糸状菌において PKC は非常に幅広い現象に関与する機能を持つことが示唆されている。*A. nidulans* の PkcA は細胞壁完全性維持に関わる機能を持つことから、PkcA の機能解析により得られる知見は選択性の高い抗真菌薬の探索に利用できると考えられる。また、糸状菌のタンパク質分泌は主に菌糸先端から起こることが知られており、菌糸型での生長はその高分泌性と密接に関連することが明らかにされている。PkcA は極性生長に関与することから、菌糸状の形態形成に重要であることが示唆され、PKC の極性生長における機能を解明することは高分泌能を持つ菌の育種に繋がると考えられる。実際、*P. pastoris* では PKC がタンパク質の分泌に関与することが示唆されており、糸状菌でも PKC がタンパク質の分泌に関与する機能を持つ可能性が十分考えられるため、PKC の機能解析は糸状菌におけるタンパク質の生産などの産業分野への貢献に繋がることが期待される。PkcA はペニシリン合成制御にも関わる機能を持つことから、他の二次代謝産物の合成制御にも関与する可能性が考えられる。PKC の二次代謝産物生産に関わる機能解析は糸状菌による有害な二次代謝産物生産の抑制や新規な二次代謝産物の同定に繋がると考えられる。しかし、これまでに糸状菌の PKC の機能について詳細な解析がなされた例は少なく、PKC の働く分子機構はほとんど未解明である。そこで本研究では糸状菌における PKC の機能を明らかにするため、*A. nidulans* の PkcA についてその機能解析を行った。

#### 0-4. 本論文の内容

第 1 章では活性化型 PkcA を高生産できる株を作製し、この株を用い PkcA の細胞壁合成酵素遺伝子群の転写制御への関与について検討した。さらに *A. nidulans* における *S. cerevisiae* の *RLM1* のオルソログである *rlmA* の欠失株を作製し、RlmA の細胞壁合成酵素遺伝子群の転写制御への関与について検討した。

第 2 章では *pkcA-ts* 株の 42°C における表現型を解析し、この株が 42°C で致死となる原因について検討した。また、培地に浸透圧安定化剤を添加した条件でもこの株が 42°C で致死となる原因について検討した。

第 3 章では PkcA 活性化条件および失活条件における網羅的転写解析を行った。そして、PkcA の sterigmatocystin 合成への関与について検討した。

なお、第 2 章で示す内容は報文 (Katayama *et al.*, 2012) として既に報告した内容である。

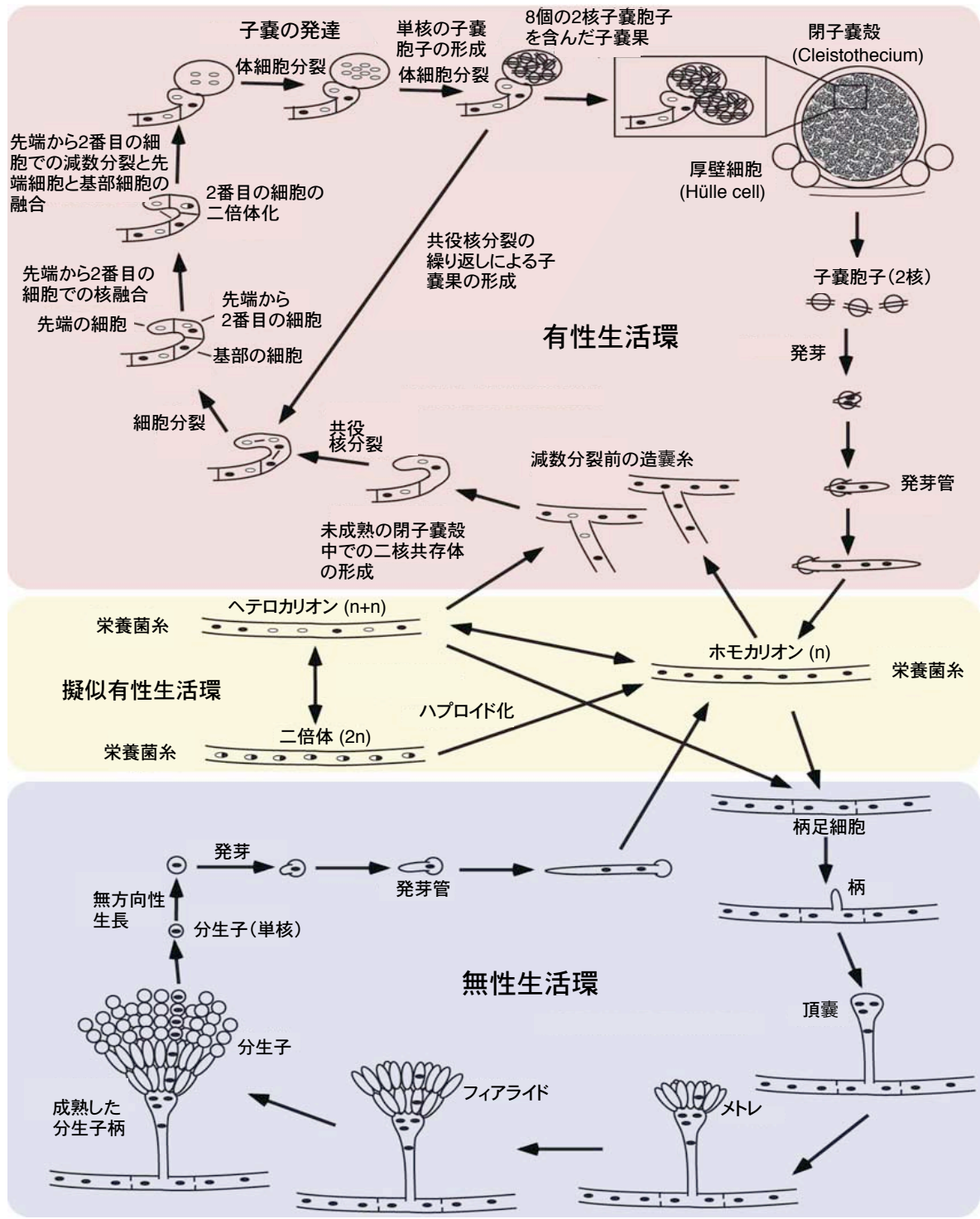


Fig. 0-1 *A. nidulans*の生活環  
 (Todd et al., 2007 より改変して転載)



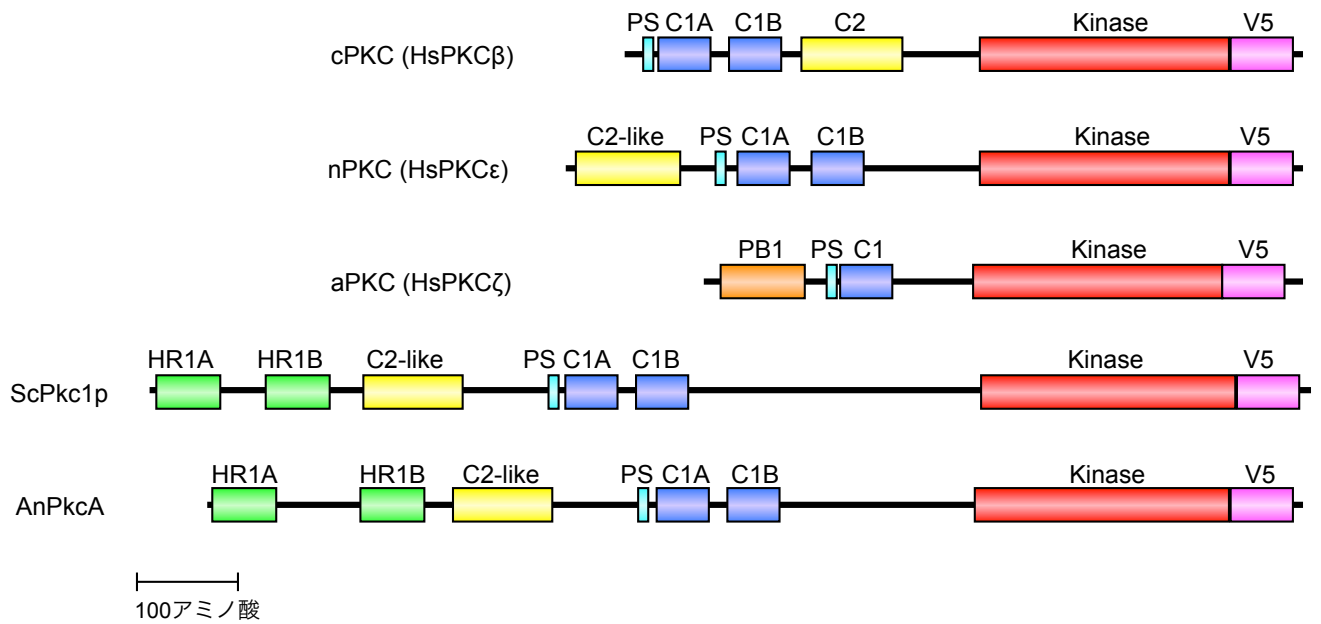


Fig. 0-2 哺乳類、真菌類のPKCの構造

(堀内, 2009より改変して転載)

ヒトの3種のPKCアイソザイム (HsPKCβ、HsPKCε、HsPKCζ)、*S. cerevisiae*のPkc1p、*A. nidulans*のPkcAの構造を示した。PSは偽基質配列 (pseudosubstrate sequence)、Kinaseはキナーゼドメインを表す。

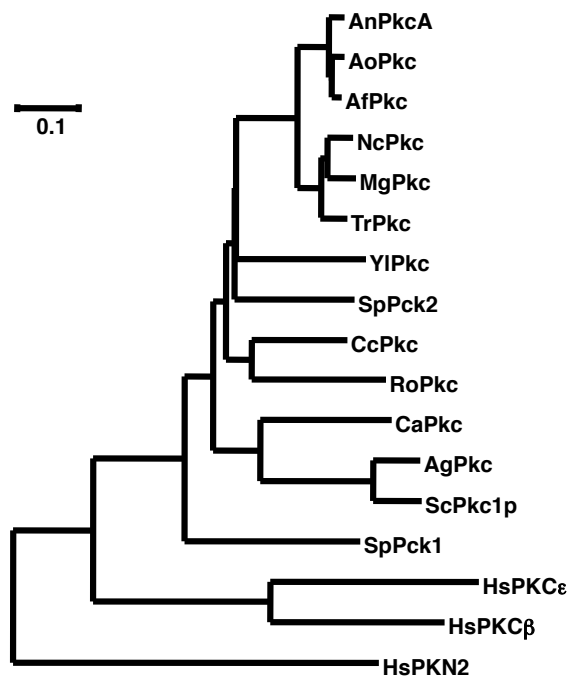


Fig. 0-3 PKCの系統樹

(堀内, 2009より改変して転載)

Hs:*Homo sapiens*, An:*A. nidulans*, Sc:*S. cerevisiae*, Sp:*Shizosaccharomyces pombe*, Ag:*Ashbya gossypii*, Ca:*Candida albicans*, Ro:*Rhizopus oryzae*, Cc:*Coprinus cinereus*, Yl:*Yellowia lipolytica*, Nc:*Neurospora crassa*, Mg:*Magnaporthe grisea*, Tr:*Trichoderma reesei*, Af:*Aspergillus fumigatus*, Ao:*Aspergillus oryzae*。このうち*R. oryzae*は接合菌類、*C. cinereus*は担子菌類に属するが、それ以外の菌は子囊菌類に属するスケールはサイトあたりの置換数を表す。

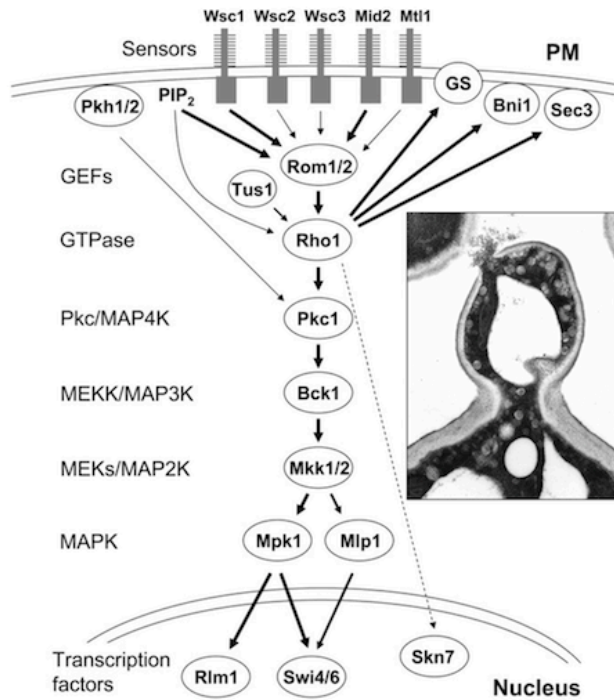


Fig. 0-4 *S. cerevisiae*のCWI経路  
(Levin, 2011)

形質膜においてセンサータンパク質であるWsc1、2、3、Mid2、Mtl1からシグナルが伝達される。これらのタンパク質は、GEFであるRom1/2を形質膜にリクルートするホスファチジルイノシトール-2-リン酸 (PIP<sub>2</sub>) と共にヌクレオチド交換因子であるRho1を刺激する。それぞれのセンサータンパク質からのシグナルの強さを矢印の太さで示す。GEFであるTus1やPkh1/2による制御機構も示す。Rho1のエフェクターにはβ-1,3-グルカン合成酵素 (GS)、formin (Bni1)、Sec3、Pkc1-activated MAPK cascadeが含まれる。Mlp1はキナーゼ活性をもたないMpk1のパラログで転写制御に寄与する。この経路では転写因子であるRlm1とSBF (Swi4/6) が活性化される。破線で示したようにSkn7も細胞壁完全性維持に関わる転写制御機構に寄与する可能性が考えられる。右の図はBudの先端で溶菌が見られる*pkc1*を欠失した細胞の電子顕微鏡写真を示す。

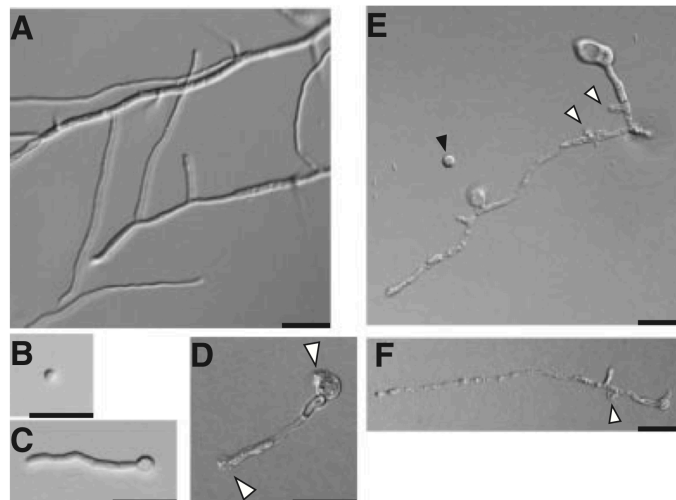


Fig. 0-5 *pkcA*欠失株の形態  
(Ichinomiya *et al.*, 2007)

それぞれの株の分生子をアルギニンを含まない選択培地で培養した場合の形態。Aはアルギニン非要求性の野生型株、B、C、アルギニン要求性の野生型株、D-Fは///pPSP-16株 (ヘテロカリオン) を示す。白矢頭は細胞の溶菌した部位を示し、黒矢頭は*pkcA*を欠失していない核をもつアルギニン要求性の分生子だと思われるものを示す。

## 第 1 章 細胞壁合成酵素遺伝子群の転写制御に関わる PkcA の機能

### 1-1. 序

糸状菌の細胞表層は細胞壁によって覆われており、菌糸の形態形成、維持において細胞壁が重要な役割を果たしていると考えられている。糸状菌の細胞壁は主にグルカンとキチンから構成される (Fig. 1-1) (Latge, 2007)。 *Aspergillus fumigatus* の細胞壁中のアルカリ不溶層はキチンを核として  $\beta$ -1,3/1,4-グルカン、分岐した  $\beta$ -1,3/1,6-グルカン、ガラクトマンナンが結合して構成される。一方、アルカリ可溶層は  $\alpha$ -1,3/1,4-グルカンとそれに結合したガラクトマンナンから構成される。*A. fumigatus* の細胞壁には  $\beta$ -1,6-グルカンが存在しない点、 $\beta$ -1,3/1,4-グルカンやガラクトマンナン、 $\alpha$ -1,3/1,4-グルカンが存在する点で *Saccharomyces cerevisiae* の細胞壁とは大きく異なる。また、糸状菌においてキチンは細胞壁構成成分の 10~30% を占めるのに対し、*S. cerevisiae* や *Candida albicans* においては約 1~2% であり、糸状菌では細胞壁キチンの役割は酵母よりも複雑であることが予想される。キチンは N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) が  $\beta$ -1,4 結合で繋がった直鎖状のポリマーであり、このポリマーが整列し結晶化することで細胞壁に強度を付与する構造となることが知られている。以下に *Aspergillus nidulans* における細胞壁合成酵素についてまとめた。

#### ・グルカン合成酵素

*A. nidulans* は 2 つの  $\alpha$ -1,3-グルカン合成酵素をコードする遺伝子 ( $\alpha$ -1,3-グルカン合成酵素遺伝子: *agsA*、*agsB*) を持つが、*agsB* が主要な  $\alpha$ -1,3-グルカン合成酵素遺伝子であることが示唆されている (Yoshimi *et al.*, 2013)。*agsA*、*agsB* の二重欠失株の解析からこれらの遺伝子は通常の培養条件における生育には重要でないことが示唆されているが (Yoshimi *et al.*, 2013)、calcofluor white (CFW) や  $\beta$ -1,3-グルカン合成酵素の阻害剤である micafungin を処理した場合に *agsB* の発現量が上昇することから、AgsB がストレス応答に関与することが示唆されている (Fujioka *et al.*, 2007、Damveld *et al.*, 2005)。一方、*A. nidulans* は  $\beta$ -1,3-グルカン合成酵素をコードする遺伝子 ( $\beta$ -1,3-グルカン合成酵素遺伝子) を *fksA* の一つしかもたない (de Groot *et al.*, 2009)。*S. cerevisiae* は 3 つの  $\beta$ -1,3-グルカン合成酵素遺伝子をもつが、そのうち *FKS1* と *FKS2* の欠失は合成致死性を示す (Mazur *et al.*, 1995)。また、*A. fumigatus* や *Cryptococcus neoformans* は

単一の  $\beta$ -1,3-グルカン合成酵素遺伝子しか持たず、これらの遺伝子は生育に必須であることが示唆されている (Firon *et al.*, 2002、Thompson *et al.*, 1999)。 *A. nidulans* の *fkxA* も同様に生育に必須な遺伝子であると考えられている。

#### ・キチン合成酵素

これまでに様々な酵母や糸状菌からキチン合成酵素をコードする遺伝子 (キチン合成酵素遺伝子) が多数単離され、現在菌類のキチン合成酵素はその構造から少なくとも 7 つのクラスに分類されている (Fig. 1-2) (Horiuchi, 2009)。 *A. nidulans* にはそのゲノム配列から 8 種のキチン合成酵素をコードすると考えられる遺伝子 (*chsA*、*chsB*、*chsC*、*chsD*、*chsF*、*chsG*、*csmA*、*csmB*) が存在するが、当研究室ではこれまでに *chsG* 以外の 7 種のキチン合成酵素遺伝子の機能解析を行ってきた (Horiuchi, 2009、鄭ら, 未発表)。これらの遺伝子産物である ChsA、ChsB、ChsC、ChsD、ChsF、ChsG、CsmA、CsmB はそれぞれクラス II、III、I、IV、III、VII、V、VI に属する (Fig. 1-3)。 *chsA*、*chsC* それぞれの欠失株は野生型株と同様の表現型を示すが、*chsA*、*chsC* の二重欠失株は細胞壁にストレスを与える薬剤に高感受性を示すこと、この株では隔壁の形態、隔壁形成部位に異常が生じること、ChsA、ChsC は共に形成中の隔壁に局在することから、ChsA、ChsC が正常な細胞壁の形成や隔壁形成に関わる機能を持つことが示唆されている (Fujiwara *et al.*, 2000、Ichinomiya *et al.*, 2005)。 *chsB* 欠失株は非常に小さなコロニーしか形成せず、菌糸の多分岐化、菌糸中に新たに伸長する菌糸である菌糸内菌糸の形成などの表現型を示す (Yanai *et al.*, 1994、Fukuda *et al.*, 2009)。加えて、ChsB が発芽管先端や菌糸先端などに局在することから、ChsB は菌糸の正常な細胞壁の形成に非常に重要な働きを持ち、菌糸の極性生長に深く関与することが示唆されている (Fukuda *et al.*, 2009)。 *chsD* 欠失株は野生型株と同等の生育を示すが (Motoyama *et al.*, 1997)、*chsB* の発現を抑制した条件では、*chsD* の欠失により菌糸がより多分岐になり、*chsB* 発現抑制による生育がさらに悪化することから、ChsD の機能は細胞壁に異常を生じた場合に重要性が増すことが示唆されている (Ichinomiya *et al.*, 2002)。 CsmA、CsmB はともに N 末端側にミオシン様ドメインを持つキチン合成酵素であり、この点で他のキチン合成酵素とは構造が大きく異なる (Fig. 1-3)。 *csmA*、*csmB* はプロモーター領域を一部共有するように染色体上に head-to-head で位置することから (Takeshita *et al.*, 2006)、これらが類似の転写制御を受ける可能性が

考えられている。また、*csmA* 欠失株は菌糸の途中が膨らむバルーン構造や菌糸内菌糸などの形態異常を示すが、*csmB* 欠失株でも同様の表現型が見られることが明らかにされている (Horiuchi *et al.*, 1999、Takeshita *et al.*, 2006)。さらに、*csmA* と *csmB* の欠失は合成致死性を示すことが示されており (Takeshita *et al.*, 2006)、これらのことから CsmA と CsmB が類似した機能を有することが示唆されている。細胞壁に異常が生じていると考えられる *chsA*、*chsC* の二重欠失株では *csmA* の発現量が上昇することから、CsmA が異常の生じた細胞壁の修復に機能することが示唆されており (Yamada *et al.*, 2005)、発現パターン、機能の類似性から CsmB も同様に細胞壁の修復に機能する可能性が考えられている。*chsF* 欠失株は野生型株と同様の表現型を示すことは明らかにされているが、それ以上の解析はなされていない (鄭ら, 未発表)。これまでに *A. nidulans* では *chsG* の解析はなされていない。*A. nidulans* と近縁な *A. fumigatus* では *chsG* のオルソログである *AfchsD* の欠失株が作製されており、この株では細胞壁のキチン含量が減少するものの、野生型株と同様の表現型を示すことが示されている (Mellado *et al.*, 1996)。

序章でも述べたように *S. cerevisiae* の PKC である Pkc1p は CWI 経路において中心的な役割を担っており、この経路を介して細胞壁合成に関わる遺伝子の転写を制御する (Jung and Levin, 1999)。Pkc1p は CWI 経路において下流の MAP キナーゼカスケードを活性化することで、さらにその下流の転写因子 Rlm1p または SBF 複合体 (Swi4p と Swi6p の複合体) を活性化する (Rodriguez-Pena *et al.*, 2010)。CWI 経路の活性化時の網羅的転写解析の結果、glycosyl-phosphatidylinositol (GPI) アンカー型タンパク質や PIR ファミリータンパク質、細胞壁合成酵素など細胞壁の合成に関わるタンパク質をコードする遺伝子が誘導されること、これらの遺伝子のプロモーターには Rlm1p が結合すると考えられるコンセンサス配列が存在することが示されている (Jung and Levin, 1999)。また、SBF 複合体も  $\beta$ -1,3-グルカン合成酵素遺伝子 *FKS1*、2 の転写誘導に関わることが示唆されている (Levin, 2005)。*pkcA* の条件変異株や CWI 経路の MAP キナーゼカスケードの構成因子のオルソログの欠失株の解析により *A. nidulans* においても PkcA やこのカスケードが細胞壁の完全性維持に重要な機能を担っていることが示唆されている (内田, 2008、Fujioka *et al.*, 2007、Teepe *et al.*, 2007)。

これまでに  $\beta$ -1,3 グルカン合成酵素の阻害剤である micafungin 処理時における細胞壁合成酵素遺伝子群の転写解析により、このカスケードの MAP キナーゼである MpkA と Rlm1p のオルソログである RlmA 依存的に *agsA*、*agsB* の転写は制御されるが、*fksA*、*chsA*、*chsB*、*chsC*、*chsD*、*chsF*、*chsG*、*csmA*、*csmB* はこれらの制御を受けないことが示唆されている (Fujioka *et al.*, 2007)。しかし、PkcA が MpkA や RlmA を介さずに  $\beta$ -1,3-グルカン合成酵素遺伝子やキチン合成酵素遺伝子の転写を制御する可能性、また異なる細胞壁ストレス条件では MpkA、RlmA を介してシグナル伝達が起こる可能性も考えられる。そこで本章ではまず活性化型 PkcA を高生産できる株を作製し、この株とこれまでに内田によって作製されている *pkcA* 温度感受性株 (内田, 2008) を用いた細胞壁合成酵素遺伝子群の転写解析を行うことで、PkcA が細胞壁合成酵素遺伝子群の転写制御に関与するかどうかについて検討した。

## 1-2. 材料と方法

### 1-2-1. 本章で用いた菌株

*Escherichia coli*

DH5 $\alpha$  : F<sup>-</sup>,  $\Phi$ 80d*lacZ* $\Delta$ M15,  $\Delta$ (*lacZYA-argF*)U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*(*r<sub>K</sub>*<sup>-</sup>, *m<sub>K</sub>*<sup>+</sup>), *phoA*, *supE44*,  $\lambda$ <sup>-</sup>, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*

本章で用いた *A. nidulans* 菌株を Table 1-1 に示した。

### 1-2-2. 本章で用いたオリゴヌクレオチド

本章で用いたオリゴヌクレオチドを Table 1-2 に示した。

### 1-2-3. 本章で用いたプラスミド

本章で用いたプラスミドを以下に示す。

pUC18 (TaKaRa)

pBluescript II SK<sup>+</sup> (Stratagene)

p3xFLAG-*myc*-CMV-26 (Sigma)

pUCpyroA2 (小野, 2008)

*pyroA* の ORF 及びその上流、下流を含むプラスミド。

pSXII (金子, 2005)

*pyroA* の ORF 及びその上流、下流と *A. nidulans* の複製開始点 *AMA1* を含むプラスミド。

pMPKA (越, 2006)

*mpkA* の ORF 及びその上流、下流を含むプラスミド。

pMPKAsh (本論文)

pMPKA-pyroA (本論文)

pBSriboB (本論文)

palcA(p)-R429A (本論文)

pΔrlmA (本論文)

#### 1-2-4. プラスミドの構築

- ・ pMPKAsh

pMPKA を *Pst* I 消化して得られる *mpkA* ORF 全長を含む約 3.9 kbp の DNA 断片と pUC18 を *Pst* I 消化して得られる約 2.7 kbp の DNA 断片を連結し、pMPKAsh を作製した。

- ・ pMPKA-pyroA

pMPKAsh を *Afl* II 消化して得られる約 6.6 kbp の DNA 断片と pSXII を *Afl* II 消化して得られる *pyroA* ORF 全長を含む約 1.9 kbp の DNA 断片を連結し、pMPKA-pyroA を作製した。

- ・ pBSriboB

FGSC A26 株の全 DNA を鋳型とし、5riboBn、3riboBn をプライマーとして使用して PCR により増幅した *riboB* の ORF と下流を含む約 3.0 kbp の DNA 断片を *Not* I - *Xho* I 消化して得られる約 3.0 kbp の断片と、pBluescript II SK<sup>+</sup>を *Not* I - *Xho* I 消化して得られる約 3.0 kbp の断片とを連結し、pBSriboB を作製した。

#### ・ palcA(p)-R429A

alcA(p)-pkcA-3 株の全 DNA を鋳型とし、riboBF、PkcAR429AR をプライマーとして使用して *riboB* の下流に *alcA* プロモーター (*alcA(p)*) と *pkcA* の ORF の 5'側が連結した約 4.0 kbp の DNA 断片を PCR により増幅した。次に FGSC A1149 株の全 DNA を鋳型とし、PkcAR429AF、3pkcARnew をプライマーとして使用して、*pkcA* の ORF の 3'側と下流を含む約 5.2 kbp の DNA 断片を PCR により増幅した。これら 2 断片を鋳型とし、riboBF、3pkcARnest をプライマーとして使用して *riboB* の下流に *alcA(p)* と PkcA の 429 番目のアルギニンがアラニンに置換される変異を含む *pkcA(R429A)* が連結した約 8.9 kbp の DNA 断片を PCR により増幅した。この DNA 断片を *Nde* I 消化して得られる約 5.9 kbp の DNA 断片と pBSriboB を *Nde* I 消化して得られる約 6.0 kbp の DNA 断片とを連結し、palcA(p)-R429A を作製した。

#### ・ pΔrlmA

FGSC A1149 株の全 DNA を鋳型とし、5rlmAF、5pA-rlmAR をプライマーとして使用して *rlmA* の ORF の上流約 1.0 kbp の DNA 断片を PCR により増幅した。次に FGSC A1149 株の全 DNA を鋳型とし、3pA-rlmAF、3rlmAR をプライマーとして使用して *rlmA* の ORF の下流約 1.4 kbp の DNA 断片を PCR により増幅した。さらに pUCpyroA2 を鋳型とし、pyroA5n、pyroA3n をプライマーとして使用して *pyroA* の ORF を含む約 2.4 kbp の DNA 断片を PCR により増幅した。これら 3 断片を鋳型とし、5rlmAF、3rlmAR をプライマーとして使用して PCR により増幅した *rlmA* の ORF を *pyroA* に置換するための約 4.8 kbp の DNA 断片を *EcoR* I 消化して得られる約 3.9 kbp の DNA 断片と pUC18 を *EcoR* I 消化して得られる約 2.7 kbp の DNA 断片とを連結し、pΔrlmA を作製した。

#### 1-2-5. PCR

PCR による DNA 断片の増幅には *EX Taq* (TaKaRa)、iProof (BIO-RAD)、KOD-Plus neo (TOYOBO)、KOD-FX neo (TOYOBO) を用い、使用法はそれぞれの説明書に従った。また、Fusion PCR 法は Szewczyk らの方法に従って行った (Fig. 1-4) (Szewczyk *et al.*, 2006)。



## 1-2-6. 本章で使用した *A. nidulans* 菌株の作製

### 1-2-6-1. C 末端に 3xFLAG を付加した MpkA (MpkA-FLAG) を生産する株の作製

pMPKA-pyroA (1-2-4 参照) を鋳型とし、mpkA5、5mpkA-FLAG をプライマーとして使用して *mpkA* ORF を含む約 1.5 kbp の DNA 断片、mpkA3、3FLAG-*mpkA* をプライマーとして使用して *pyroA* ORF と *mpkA* の下流を含む約 4.5 kbp の DNA 断片、p3xFLAG-*myc*-CMV-26 を鋳型とし、3xFLAGF、3xFLAGR をプライマーとして使用して 3xflag 全長の 69 bp の DNA 断片を PCR によって増幅した。これら 3 断片を鋳型とし、mpkA5、mpkA3 をプライマーとして使用して PCR により増幅した *mpkA* に 3xflag を付加するための約 6.0 kbp の DNA 断片を用い、A1149 株、pkcA-ts-2 株を親株として形質転換を行った。それぞれピリドキシン要求性の回復した 2 株以上の形質転換体を取得し、これらの株の全 DNA を *Pst*I 消化後、pMPKAsh (1-2-4 参照) を *Pst*I - *Eco*T22I 消化して得られる約 1.5 kbp の DNA 断片をプローブとしてサザン解析を行った。A1149 株では 4.0 kbp のバンドが検出されたのに対し、それぞれの形質転換体では 6.0 kbp のバンドが検出され、その他のバンドは検出されなかった (Fig. 1-5)。よってこれらの形質転換体では形質転換に用いた断片が目的の領域のみに単コピーで組換えられたことが確認された。A1149 株由来の株については A1149/MF-1、-2、pkcA-ts-2 株由来の株については pkcA-ts/MF-1、-2 と命名した。A1149/MF-1、-2、または pkcA-ts/MF-1、-2 はそれぞれ生育速度、コロニーの形態が同様であったため、以後の実験では A1149/MF-1 株、pkcA-ts/MF-1 株を用いて解析を行った。

### 1-2-6-2. 活性化型 PkcA (PkcA(R429A)) を高生産できる株の作製

palcA(p)-R429A (1-2-4 参照) を *Spe*I - *Xho*I 消化して得られる約 7.9 kbp の DNA 断片を用い、A1145 株を親株として形質転換を行った。リボフラビン要求性の回復した 2 株以上の形質転換体を取得し、これらの株の全 DNA を *Eco*R V 消化後、A1149 株の全 DNA を鋳型とし、5riboBn、3riboBn をプライマーとして使用して PCR により増幅した DNA 断片を *Nde*I 消化して得られる約 0.5 kbp の DNA 断片をプローブとしてサザン解析を行った。A1145 株では 3.3 kbp のバンドが検出されたのに対し、それぞれの形質転換体では 8.5 kbp のバンドが検出され、その他のバンドは検出されなかった (Fig. 1-6)。よってこれらの形質転換

体では形質転換に用いた断片が目的の領域のみに単コピーで組換えられたことが確認された。これらの形質転換体を R429A-1、-2 と命名した。これらの株はそれぞれ生育速度、コロニーの形態が同様であったため、以後の実験では R429A-1 株を用いて解析を行った。

### 1-2-6-3. *rlmA* 欠失株の作製

p $\Delta$ *rlmA* (1-2-4 参照) を *EcoR* I 消化して得られる約 3.9 kbp の DNA 断片を用い、A1149 株、R429A-1 株を親株として形質転換を行った。それぞれピリドキシン要求性の回復した 2 株以上の形質転換体を取得し、これらの株の全 DNA を *Pst* I 消化後、A1149 株の全 DNA を鋳型とし、3pA-*rlmAF*、3*rlmAR* をプライマーとして使用して PCR により増幅した約 1.4 kbp の DNA 断片をプローブとしてサザン解析を行った。A1149 株では 5.2 kbp のバンドが検出されたのに対し、それぞれの形質転換体では 2.0 kbp のバンドが検出され、その他のバンドは検出されなかった (Fig. 1-7)。よってこれらの形質転換体では形質転換に用いた断片が目的の領域のみに単コピーで組換えられたことが確認された。A1149 株由来の株については  $\Delta$ *rlmA*-1、-2、-3、R429A-1 株由来の株については R429A $\Delta$ *rlmA*-1、-2 と命名した。 $\Delta$ *rlmA*-1、-2、-3、または R429A $\Delta$ *rlmA*-1、-2 はそれぞれ生育速度、コロニーの形態が同様であったため、以後の実験では  $\Delta$ *rlmA*-1 株、R429A $\Delta$ *rlmA*-1 株を用いて解析を行った。

### 1-2-7. 培地

#### A. *nidulans* 用培地

Rowland と Turner の最少培地 (Rowland and Turner, 1973) と YG 培地の組成を一部改変して用いた。

#### 最少培地 (MMG)

NaNO <sub>3</sub>	6.0 g
KCl	0.52 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.52 g
Trace elements solution *	1.0 ml
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.52 g
Glucose	20 g

Distilled water	up to 1000 ml
-----------------	---------------

\*Trace elements solution

FeSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	1.0 g
ZnSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	8.8 g
CuSO <sub>4</sub> •5H <sub>2</sub> O	0.4 g
MnSO <sub>4</sub> •4H <sub>2</sub> O	0.15 g
Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> •10H <sub>2</sub> O	0.1 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> •4H <sub>2</sub> O	0.05 g
Distilled water	up to 1000 ml

YG 培地

Bacto yeast extract (Difco)	5.0 g
Trace elements solution	1.0 ml
Glucose	10 g
Distilled water	up to 1000 ml

アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子 (*alcA*) プロモーターを用いて遺伝子発現を誘導する際には、炭素源を glucose から 100 mM threonine に変更した最少培地 (MMT 培地) または 100 mM threonine と 0.1% fructose に変更した完全培地 (YTF 培地)、最少培地 (MMTF 培地) を使用した。

栄養要求性を持つ株については、必要に応じて以下の試薬を培地に加え、その場合培地名の後に小文字で示した。

Pyridoxine	0.5 µg/ml
Uridine	2.44 mg/ml
Uracil	1.12 mg/ml
Riboflavin	2.5 µg/ml

*E. coli* 用培地

LB 培地

Bacto Tryptone (Difco)	10 g
Bacto yeast extract	5 g

NaCl	5 g
Distilled water	up to 1000 ml

*E. coli* 用培地には必要に応じて Ampicillin を 50 µg/ml になるように加えた。

固体培地を調製する場合には、寒天末を終濃度 1.5% となるように加えた。

#### 1-2-8. DNA の取扱法

制限酵素、Bacterial alkaline phosphatase (BAP) は TaKaRa の製品を用い、使用法はその説明書に従った。DNA の連結には DNA Ligation Kit ver. 2.1 (TaKaRa) または DNA Ligation Kit <Mighty Mix> (TaKaRa) を用い、使用法はその説明書に従った。電気泳動後のアガロースゲルからの DNA の回収には Quantum Prep Freeze 'N Squeeze DNA Gel Extraction Spin Columns (BIO-RAD) または Ultrafree Centrifugal Filters (MILLIPORE) を用い、使用法はその説明書に従った。

#### 1-2-9. 塩基配列の決定法

塩基配列決定の際の増幅反応は、Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いて行い、方法は Kit の説明書に従った。その反応物を ABI PRISM 310 Genetic Analyzer を用いて解析することにより塩基配列を決定した。操作法は付属の説明書に従った。

#### 1-2-10. *E. coli* の形質転換法と *E. coli* からのプラスミド抽出法

*E. coli* の形質転換には  $\text{CaCl}_2/\text{RbCl}$  法を用い、プラスミド抽出には Alkaline lysis 法を用いた (sambrook *et al.*, 1989)。

#### 1-2-11. *A. nidulans* の形質転換法

分生子約  $10^7$  個を YG<sub>uu</sub> 培地 50 ml の入った 300 ml 容臍付き三角フラスコに植菌し、30°C または 37°C で一晩振盪培養した。それを 50 ml 容コニカルチューブに移し、3,500 rpm で 10 分間遠心し、デカンテーションにより培地を除くことで菌体を回収した。菌体に酵素溶液 (Solution 1) 10 ml を加え、30°C で 2 時間から 4 時間穏やかに振盪培養した。その後、3,000 rpm、4°C で 5 分間遠心し、

デカンテーションにより上清を除き、プロトプラストを回収した。このプロトプラストに 10 ml の Solution 2 を加え、ピペッティングにより穏やかに懸濁し、3,000 rpm、4°C で 5 分間遠心後、上清を除くという操作を 2 回繰り返すことによりプロトプラストを洗浄した。デカンテーションにより上清を取り除いた後、Solution 3 を 400  $\mu$ l 加え、ピペッティングにより穏やかに懸濁した。この懸濁液 100  $\mu$ l に数  $\mu$ g の DNA を含む水 10  $\mu$ l および 50  $\mu$ l の Solution 4 を加え、ピペッティングにより穏やかに懸濁した。氷上に 15 分静置後、1 ml の Solution 4 を加えピペッティングにより穏やかに懸濁し、室温で 30 分静置した。これをあらかじめ 48°C に保温しておいた上層培地 5 ml に混ぜ、下層培地に広げ、37°C または 30°C で培養した。

Solution 1、2、3、4 の組成は以下の通りである。

Solution 1 (10 ml, filter-sterilized)

10 mM Na phosphate 0.8 M NaCl buffer (pH 6.0)	10 ml
Yatalase™ (TaKaRa)	30 mg
LYSING ENZYMES L1412 (SIGMA)	3 mg

Solution 2

NaCl	0.8 M
------	-------

Solution 3

KCl	0.6 M
CaCl <sub>2</sub>	0.1 M
Tris-HCl (pH 7.5)	10 mM

Solution 4 (filter-sterilized)

PEG8000	25% (w/v)
KCl	0.6 M
CaCl <sub>2</sub>	0.1 M
Tris-HCl (pH 7.5)	10 mM

#### 上層培地

MMG	1x
Sucrose	1 M
Agar	0.8%

#### 下層培地

MMG	1x
Sucrose	0.2 M
Agar	1.5%

#### 1-2-12. *A. nidulans* からの全 DNA の抽出法

*A. nidulans* からの全 DNA の抽出は Hynes らの方法 (Hynes *et al.*, 1983) と Oakley らの方法 (Oakley *et al.*, 1987) を参考に以下のように行った。完全培地 5 ml を入れた希釈管で 1-2 日間または、完全培地 50 ml を入れた 300 ml 容積付き三角フラスコに、分生子約  $10^7$  個を植菌し一晩培養した菌体を、G3 ガラスフィルターまたは G4 ガラスフィルター (柴田化学器械工業) で濾過して回収した。この菌体をエッペンドルフチューブに入れ凍結乾燥した後、爪楊枝を用いて粉状になるまで破碎した。菌体破碎物に 500  $\mu$ l の 50-20 TE 溶液 (50 mM Tris-HCl pH 8.0、20 mM EDTA)、250  $\mu$ l の TE-SDS 溶液 (10 mM Tris-HCl pH 8.0、1 mM EDTA、10% SDS) を加えて穏やかによく懸濁した後、60°C で 30 分間、時々穏やかに攪拌しながらインキュベートした。その後、275  $\mu$ l の酢酸カリウム液 (3 M CH<sub>3</sub>COOK、5 M CH<sub>3</sub>COOH) と 500  $\mu$ l のフェノール：クロロフォルム：イソアミルアルコールを加えよく混ぜ、氷上で 10 分以上静置した。その後、15,000 rpm、4°C で 10 分間遠心した後、上清を別のエッペンドルフチューブに移した。これに 500  $\mu$ l のイソプロパノールを加え室温で 10 分間静置した。15,000 rpm、室温で 15 分間遠心し、沈殿を 70% エタノールで洗浄し、15,000 rpm、室温で 5 分間遠心し、上清を注意深く取り除き、1 分間風乾させた。これに RNase A 溶液 (1 ml の蒸留水に 10 mg/ml RNaseA を 3  $\mu$ l、7.5 M CH<sub>3</sub>COONH<sub>3</sub> を 2  $\mu$ l 加えたもの) を 100  $\mu$ l を加え、50°C で 1 時間インキュベートした後、15,000 rpm、4°C で 10 分間遠心し、上清のうち 90  $\mu$ l を新しいエッペンドルフチューブに取り分けた。これに 10  $\mu$ l の酢酸カリウム液と 250  $\mu$ l のエタノールを加えて攪拌後、-20°C で 15 分以上静置した。15,000 rpm、4°C で 15 分間遠心後、上清を捨

て、沈殿を 70%エタノールで洗浄し、15,000 rpm で 5 分間遠心した。上清を取り除き、1 分間風乾させた後、10  $\mu$ l の TE を加えて全 DNA 液とした。

#### 1-2-13. サザン解析

野生型株、形質転換体から抽出した全 DNA を適当な制限酵素で処理した後、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離し、アガロースゲルを 0.25 M HCl で 20 分間処理した。その後、0.4 M NaOH を用いて、Hybond-N+ (GE HEALTHCARE) に 3~4 時間 DNA 断片をトランスファーした。プローブのラベリング、ハイブリダイゼーションには AlkPhos Direct system (GE HEALTHCARE) を用い、方法は付属の説明書に従った。

#### 1-2-14. *A. nidulans* の細胞抽出液の調製法

菌糸をかきとりやすくするためにセロファンを敷いた固体培地で生育させた菌体を直接プレートからかきとり、即座に予め液体窒素で冷却しておいた乳鉢、乳棒を用いて破碎した。この菌体破碎物を予め 100°C で熱しておいた SDS-PAGE sample buffer (0.058 M Tris-HCl pH 6.8、1.66% (w/v) SDS、5% (v/v) glycerol、0.1 M DTT、0.03 mM bromophenol blue) に懸濁し、100°C で 5 分間煮沸した。氷上で 5 分間静置した後、5000 g、15 分間 4°C で遠心し、上清を細胞抽出液とした。

#### 1-2-15. Coomassie Brilliant Blue (CBB) 染色

1-2-14 で調製したサンプルはタンパク質の定量を行うことが困難であるため、CBB 染色を行い各サンプルのタンパク質量を揃えた。まずサンプルを 10% のポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動し、泳動後のゲルを蒸留水で軽くすすいだ後、約 60°C に温めた CBB 染色液 (0.5% (w/v) CBB-R250、50% (v/v) メタノール、10% (v/v) 酢酸) に浸し 1 時間振盪した。その後、ゲルを蒸留水ですすぎ約 60°C に温めた CBB 脱色液 (20% (v/v) メタノール、10% (v/v) 酢酸) に浸し 1 時間以上振盪した。

#### 1-2-16. ウェスタン解析

1-2-15 の結果から各サンプルのタンパク質量が揃うよう適当な量の細胞抽出液を 10% のポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動した。泳動後のサンプル

をポリアクリルアミドゲルより Hybond-ECL (GE HEALTHCARE) メンブレンに一晩、トランスファーバッファー中において 20 mA で電氣的にトランスファーした。メンブレンを 5% skim milk (Difco) を含む TBS Tween 20 溶液 (0.1% Tween 20 を含む TBS) または TBS Tween 20 溶液で 10 倍に希釈した EZ Block (ATTO CORPORATION) で室温、3 時間振盪後、TBS Tween 20 溶液で 15 分、2 回洗浄し、Can Get Signal<sup>®</sup> Immunoreaction Enhancer Solution 1 (TOYOBO) で 1:5000 で希釈したマウス由来の抗 FLAG 抗体 (SIGMA)、1:1000 で希釈したラビット由来の抗 Phospho-p44/42 MAP kinase 抗体 (Cell Signaling) または 1:2000 で希釈した p44/42 MAP Kinase (L34F12) 抗体 (Cell signaling) を含む溶液中で、室温で抗 FLAG 抗体、p44/42 MAP Kinase (L34F12) 抗体の場合は 1 時間、抗 Phospho-p44/42 MAP kinase 抗体の場合は一晩振盪した。その後、TBS Tween 20 溶液で 15 分、2 回洗浄し、Can Get Signal<sup>®</sup> Immunoreaction Enhancer Solution 2 (TOYOBO) で 1:5000 に希釈した horseradish peroxidase (HRP) が連結した mouse IgG 抗体 (Sigma) あるいは、1:10000 で希釈した HRP が連結した rabbit IgG 抗体 (Santa Cruz) を含む溶液中で室温 1 時間振盪させた。その後、TBS Tween 20 溶液で 15 分、2 回洗浄し、HRP 活性を検出した。HRP 活性の検出は、ECL detection system (GE HEALTHCARE) を用い、方法は付属の説明書に従った。それぞれの溶液の組成は以下の通りである。

#### TBS

Tris-HCl (pH 7.5)	10 mM
NaCl	0.1 M
Distilled water	up to 1000 ml

#### Transfer buffer

Tris-HCl (pH 8.3)	25 mM
Glycine	9.0 g
Methanol	160 ml
SDS	0.8 g
Distilled water	up to 800 ml

#### 1-2-17. *A. nidulans* からの全 RNA の抽出法

各条件で培養した菌体を液体窒素で凍結し、乳鉢、乳棒で破砕することによ



って細胞破碎液を調製した。この細胞破碎液からの全 RNA の抽出には RNeasy Mini Kit (QIAGEN) または Isogen reagent (Nippon Gene) を用い、方法は付属の説明書に従った。

#### 1-2-18. 定量 real-time RT-PCR 法

逆転写には PrimeScript™ reagent Kit (perfect realtime) (TaKaRa) を用い、方法は付属の説明書に従った。ただし、逆転写に用いた RNA は、反応液 10  $\mu$ l 中 500 ng とした。リアルタイム PCR 用試薬には SYBR® Premix Ex Taq™ (TaKaRa) を用い、また反応は Smart Cycler II (Cepheid) を用いて行い、いずれも付属の説明書に従って操作した。ただし、PCR 反応は 1 サイクル (95°C で 10 秒)、40 サイクル (95°C で 5 秒、60°C で 20 秒) で行った。なお定量 real-time RT-PCR に用いたプライマーは Table 1-2 に示した。

#### 1-2-19. 分生子形成効率の測定法

固体培地に分生子懸濁液 ( $2 \times 10^5$  個/ml) を 10  $\mu$ l スポット植菌し、適当な培養温度で 72 時間培養した。コロニーの直径を測定後、コロニー上の分生子をスパーテルを用いてほぼ全てかきとり、蒸留水 1 ml に懸濁した後、血球計数版を用いて分生子の数を計数した。計数結果から得られた分生子数をコロニーの面積で割り、単位面積あたりの分生子数を分生子形成効率として示した。

### 1-3. 結果

#### 1-3-1. *pkcA-ts* 株における表現型解析および PkcA 活性

これまでに内田により *pkcA-ts* 株の解析は行われているが、詳細な表現型解析やこの株における PkcA 活性についての解析は行われていなかった。そこで本章ではまずこの株の更なる解析を行った。この株の表現型について解析したところ、この株は 37°C では部分的な生育の悪化を示し、分生子形成効率が低下した。また、42°C ではコロニーを形成しなかった (Fig. 1-8A、B) (Katayama *et al.*, 2012)。 *S. cerevisiae* の *pkc1* 欠失株は通常の培養条件では生育不能であるが、培地に浸透圧安定化剤を添加することによってその生育が支持されることが示されている (Levein and Bartlett-Heubusch, 1992)。また、培地に塩化カルシウムを添加することによって *pkc1* 温度感受性株の制限温度下での生育が支持されることも示されている (Levein and Bartlett-Heubusch, 1992)。そこで 1.2 M の

ソルビトールまたは 200 mM の塩化カルシウムを添加した固体 YGuu 培地における *pkcA-ts* 株の表現型を観察した。その結果、1.2 M のソルビトールの培地への添加により 37°C で見られた生育の悪化、分生子形成効率の低下は部分的に回復したが、42°C ではコロニーを形成しなかった (Fig. 1-8A、B) (Katayama *et al.*, 2012)。また、200 mM の塩化カルシウムを添加した場合でも、*pkcA-ts* 株は 42°C においてコロニーを形成しなかった (data not shown)。

*S. cerevisiae* では CWI 経路において Pkc1p の下流で機能する MAP キナーゼである Slt2p のリン酸化レベルを指標にして Pkc1p の活性測定がなされている (Reinoso-Martin *et al.*, 2003)。PkcA の活性を測定するため、C 末端に 3xFLAG を付加した MpkA を生産する野生型株、*pkcA-ts* 株を 1-2-6-1 に示した方法で作製した。これらの株を用い、37°C、固体 YGuu 培地で 16 時間培養した場合の MpkA-FLAG のリン酸化レベルを測定したところ、*pkcA-ts* 株の MpkA-FLAG のリン酸化レベルは野生型株と比較して減少していた (Fig. 1-8C) (Katayama *et al.*, 2012)。このことから、37°C において *pkcA-ts* 株では PkcA が部分的に失活していることが示唆された。次に 30°C、固体 MMGuu 培地で 20 時間培養した後、42°C に移した場合の MpkA-FLAG のリン酸化レベルを経時的に測定したところ、野生型株では 42°C にシフト後 1.5 時間後に MpkA-FLAG のリン酸化レベルの亢進が見られ、その後 6.0 時間後まで大きな変化は見られなかった (Fig. 1-8D) (Katayama *et al.*, 2012)。一方、*pkcA-ts* 株では 42°C にシフト後 MpkA-FLAG のリン酸化レベルは著しく低下した (Fig. 1-8D) (Katayama *et al.*, 2012)。このことから 42°C において野生型株では PkcA は活性化するが、*pkcA-ts* 株では PkcA 活性が著しく低下することが示唆された。また、1.2 M のソルビトールを含む固体 MMGuu 培地において、30°C から 42°C に移した場合の MpkA-FLAG のリン酸化レベルを測定したところ、この条件においても *pkcA-ts* 株では 42°C にシフト後のリン酸化レベルは著しく低下した (Fig. 1-8E) (Katayama *et al.*, 2012)。このことから、浸透圧安定化剤の添加によって高温条件における *pkcA-ts* 株での PkcA の失活は抑圧されないことが示唆された。

### 1-3-2. 活性化型 PkcA を高生産する株の表現型及び PkcA 活性

PkcA が細胞壁合成酵素遺伝子の転写制御に関与するかどうか検討するため、まず活性化型 PkcA を高生産できる株の作製を試みた。*S. cerevisiae* では Pkc1p の 398 番目のアルギニンをアラニンに置換した Pkc1p(R398A)は活性化型

Pkc1p として振る舞うことが示されている (Watanabe *et al.*, 1994)。このアルギニンは *A. nidulans* の PkcA にも保存されていることから、これをアラニンに置換した PkcA をコードする *pkcA*(R429A) を *alcA*(p) 制御下、染色体上の *riboB* 部位で発現する株 (R429A 株) を 1-2-6-2 に示した方法で作製した。

R429A 株を *pkcA*(R429A) 発現抑制条件 (MMGpuu) で培養したところ、コロニー直径は野生型株とほぼ同等であったが、分生子形成効率が低下していた (Fig. 1-9A、B)。一方 *pkcA*(R429A) 発現誘導条件 (MMTFpuu) で培養したところ、コロニー直径は野生型株の約 80% であったが、分生子形成効率は野生型株と同等であった (Fig. 1-9A、B)。R429A 株を *pkcA*(R429A) 発現誘導条件で培養した場合の MpkA のリン酸化レベルについて検討したところ、R429A 株ではそのリン酸化レベルが著しく亢進していた (Fig. 1-9C)。このことから、*A. nidulans* において PkcA(R429A) は活性化型 PkcA として振る舞うことが示唆された。

### 1-3-3. *pkcA*(R429A) 発現抑制条件から誘導条件に移した場合の細胞壁合成酵素遺伝子群の転写解析

PkcA が細胞壁合成酵素遺伝子群の転写制御に関与するかどうか検討するため、*pkcA*(R429A) 発現抑制条件下で 20 時間培養後、*pkcA*(R429A) 発現誘導条件に移して 0 または 1 時間培養した菌体から全 RNA を抽出し、real-time RT-PCR 法により細胞壁合成酵素遺伝子群の転写解析を行った。この際、MMTFpuu 培地では *alcA*(p) の短時間での発現誘導には遅れが生じることから (data not shown)、より迅速な発現誘導を引き起こす MMTpuu 培地を用いた。この結果を Fig. 1-10 と Table 1-3 にまとめた。まず Table 1-3 左側の表の Fold-change のカラムより明らかのように、*pkcA*(R429A) 発現誘導条件に移して 1 時間後に *chsB*、*chsC*、*chsD*、*chsF*、*csmA*、*csmB*、*agsB* の mRNA 量が野生型株と比較して 1.5 倍以上に有意に増加していた (Fig. 1-10、Table 1-3 左)。しかし、培地シフト前でも R429A 株における *chsF* の mRNA 量は野生型株より有意に多かったことから、PkcA が *chsF* の転写に関与するかはこの結果からは断定できない (Fig. 1-10、Table 1-3 左)。これらのことから PkcA が少なくとも *chsB*、*chsC*、*chsD*、*csmA*、*csmB*、*agsB* の転写を正に制御することが示唆された。また逆に *chsG* の転写を負に制御することも示唆された。

#### 1-3-4. *pkcA*(R429A)発現抑制条件から誘導条件に移した場合の *rlmA* 欠失株における細胞壁合成酵素遺伝子群の転写解析

本章の序でも述べたように *A. nidulans* において micafungin 処理時の  $\beta$ -1,3-グルカン合成酵素遺伝子やキチン合成酵素遺伝子の転写誘導は CWI 経路の転写因子をコードする *rlmA* の欠失により影響を受けないことから、RlmA はこれらの転写制御には関与しないことが示唆されている (Fujioka *et al.*, 2007)。しかし、竹下らにより行われた *csmA*、*csmB* のプロモーターの構造解析では、それら遺伝子間のプロモーター領域には *S. cerevisiae* における RlmA のオルソログである Rlm1p が結合するコンセンサス配列 (CTA(T/A)<sub>4</sub>TA) に類似する配列が 5 カ所存在することが示されており、RlmA が *csmA*、*csmB* の転写制御に関わる可能性が考えられた (Fig. 1-11) (Takeshita *et al.*, 2002、Takeshita *et al.*, 2006)。他の細胞壁合成酵素遺伝子群のプロモーターについても構造解析を行ったところ、PkcA によって転写が制御されることが示唆された遺伝子群のプロモーターには Rlm1p 結合配列に類似した配列が見られた (Fig. 1-11)。そこで、PkcA が RlmA を介してこれらの遺伝子の転写を制御するかどうか検討するため、1-2-6-3 に示した方法で *rlmA* 欠失株 ( $\Delta$ rlmA 株) と *rlmA* を欠失した R429A 株 (R429A $\Delta$ rlmA 株) を作製した。 $\Delta$ rlmA-1 株、R429A $\Delta$ rlmA-1 株を用い、同様の培養条件における細胞壁合成酵素遺伝子群の転写解析を行った。その結果、培地シフト後の R429A $\Delta$ rlmA 株における *chsB*、*chsD*、*chsF*、*csmB* の mRNA 量は  $\Delta$ rlmA 株と同等であった。また、培地シフト後に R429A 株では *csmA* の mRNA レベルが野生型株の 4.52 倍に上昇したのに対し、R429A $\Delta$ rlmA 株では  $\Delta$ rlmA 株の 1.37 倍しか上昇しなかった (Fig. 1-10、Table 1-3 右)。このことから RlmA が *chsB*、*chsD*、*chsF*、*csmA*、*csmB* の転写を制御することが示唆された。一方、培地シフト後の R429A $\Delta$ rlmA 株における *chsC*、*agsB* の mRNA 量は  $\Delta$ rlmA 株と比較して 1.5 倍以上に有意に増加していた (Fig. 1-10、Table 1-3)。しかし、培地シフト後に R429A 株では *chsC*、*agsB* の mRNA レベルがそれぞれ野生型株の 2.86 倍、9.32 倍に上昇したのに対し、R429A $\Delta$ rlmA 株ではそれぞれ  $\Delta$ rlmA 株の 1.75 倍、5.19 倍しか上昇しなかったことから、RlmA は *chsC*、*agsB* の転写制御にも関与することが示唆された (Table 1-3)。

#### 1-3-5. *pkcA*(R429A)発現誘導条件下で長時間培養した場合の細胞壁合成酵素遺伝子群の転写解析

*PkcA* 活性化条件下で長時間培養した場合の細胞壁合成酵素遺伝子群の転写への影響について検討するため、*pkcA*(R429A)発現誘導条件下で 20 時間培養した場合の細胞壁合成酵素遺伝子群の転写解析を行った。その結果、*pkcA*(R429A)発現誘導条件において R429A 株では *chsB*、*chsC*、*chsD*、*chsF*、*csmA*、*csmB*、*fksA*、*agsB* の mRNA 量が野生型株と比較して 1.5 倍以上に有意に増加していた (Fig. 1-12、Table 1-4 左)。このことから、*PkcA* が *chsB*、*chsC*、*chsD*、*chsF*、*csmA*、*csmB*、*fksA*、*agsB* の転写制御に関わる可能性が考えられた。

#### 1-3-6. *pkcA*(R429A)発現誘導条件下で長時間培養した場合の *rlmA* 欠失株における細胞壁合成酵素遺伝子群の転写解析

*pkcA*(R429A)発現誘導条件下で 20 時間培養した場合の細胞壁合成酵素遺伝子の転写誘導に *RlmA* が関与するかどうか検討するため、 $\Delta$ *rlmA*-1 株、R429A $\Delta$ *rlmA*-1 株を 37°C、固体 MMTFpuu 培地で 20 時間培養後、細胞壁合成酵素遺伝子群の転写解析を行った。その結果、R429A $\Delta$ *rlmA* 株における *chsD*、*csmA*、*csmB*、*agsB* の mRNA 量は  $\Delta$ *rlmA* 株と同等であった (Fig. 1-12、Table 1-4 右)。このことから、*pkcA*(R429A)発現誘導条件下で 20 時間培養した場合に R429A 株で見られる *chsD*、*csmA*、*csmB*、*agsB* の mRNA 量の増加は *RlmA* に依存することが示唆された。一方、R429A $\Delta$ *rlmA* 株における *chsB*、*chsC*、*chsF*、*fksA* の mRNA 量は  $\Delta$ *rlmA* 株と比較して 1.5 倍以上に有意に増加していた (Fig. 1-12、Table 1-4 右)。しかし、R429A 株では *chsB*、*chsC*、*chsF* の mRNA レベルがそれぞれ野生型株の 2.20 倍、2.20 倍、5.19 倍に上昇したのに対し、R429A $\Delta$ *rlmA* 株ではそれぞれ  $\Delta$ *rlmA* 株の 1.54 倍、1.75 倍、3.63 倍しか上昇しなかったことから、*pkcA*(R429A)発現誘導条件下で 20 時間培養した場合に R429A 株で見られる *chsB*、*chsC*、*chsF* の mRNA 量の増加は部分的に *RlmA* に依存することが示唆された。(Table 1-4)。

*pkcA*(R429A)発現誘導条件下で短時間培養した場合に、*chsB* は *RlmA* 依存的に転写が誘導された。また、*pkcA*(R429A)発現誘導条件下で短時間培養した場合に、*chsF* の転写が *PkcA* によって直接制御されるかどうかは断定できないが、1-3-4 で述べたように *RlmA* によって制御されることが示唆された。*pkcA*(R429A)発現誘導条件下で短時間培養した場合に *fksA* は転写が誘導されな

かった。これらに対し、*pkcA*(R429A)発現誘導条件下で長時間培養した場合には、これらの遺伝子は RlmA に依存せずにも転写が誘導されることが示唆された。これらことから、PkcA(R429A)発現誘導条件下で長時間培養した場合の *chsB*、*chsF*、*fksA* の転写誘導は、PkcA 活性化条件下で長時間培養した結果、細胞レベルで何らかの変化が起こり、それによる二次的な影響のために RlmA 非依存的な経路で誘導が起こった可能性が考えられた。

#### 1-3-7. *pkcA* 失活条件下における細胞壁合成酵素遺伝子群の転写解析

R429A 株を用いた転写解析の結果から、PkcA が RlmA を介して *chsB*、*chsC*、*chsD*、*csmA*、*csmB*、*agsB* の転写を制御することが示唆された。30°C で培養した菌体を 42°C に移した場合、温度シフト後に PkcA が活性化することから (Fig. 1-8D)、高温ストレス時にこれらの遺伝子の転写制御に PkcA が関与する可能性が考えられた。そこで、30°C で培養した野生型株、*pkcA-ts* 株を 42°C に移して 0、1.5、3 時間後において細胞壁合成酵素遺伝子群の転写解析を行った。その結果、野生型株を 42°C に移して 1.5 時間後に *chsB*、*chsF*、*csmA*、*csmB*、*agsB* の mRNA 量が増加しているのに対し、*pkcA-ts* 株ではそのうち *csmA*、*csmB*、*agsB* の mRNA 量の増加はほとんど見られなかった (Fig. 1-13)。また、野生型株では *chsC*、*chsG* の mRNA 量は温度シフト後ほとんど変化しないのに対し、*pkcA-ts* 株では温度シフト後にこれらの遺伝子の mRNA 量の増加が見られた (Fig. 1-13)。この解析において *chsB*、*chsF* のように野生型株、*pkcA-ts* 株の両方で mRNA 量の増加が見られた遺伝子については、高温ストレス下での発現誘導が PkcA に非依存的である可能性と、PkcA には依存しているがその誘導が非常に速い現象で PkcA-ts が失活する前に誘導されるが、その mRNA が安定であるために PkcA 失活後も mRNA が高いレベルで維持されている可能性も捨てきれない。これらことから、少なくとも PkcA は高温ストレス時に起こる *chsD*、*csmA*、*csmB*、*agsB* の転写誘導、*chsC*、*chsG* の転写抑制に必要であることが示唆された。

#### 1-3-8. *rlmA* 欠失株のストレス感受性の検討

PkcA による RlmA を介した細胞壁合成酵素遺伝子の転写制御の意義について検討するため、*rlmA* 欠失株のストレス感受性について検討した。これまでに *rlmA* 欠失株は細胞壁ストレスを与える薬剤である calcofluor white や高濃度の Congo

red に感受性を示すことが明らかにされている (Fujioka *et al.*, 2007、Kovacs *et al.*, 2013)。そこで CFW、Congo red (CR) に加えて  $\beta$ -1,3-グルカン合成阻害剤である micafungin と高温ストレスについて検討した。37°C、固体 YGuu 培地で培養した場合、*rlmA* 欠失株は野生型株と比較してやや生育の悪化が見られた (Fig. 1-14)。また、*rlmA* 欠失株は calcofluor white に高感受性を示したが、他の条件では野生型株と比較して顕著な生育の悪化は示さなかった (Fig. 1-14)。このことから RlmA は CFW 耐性化には必要であるが、CR や micafungin、高温ストレスへの耐性化には必要ないことが示唆された。

#### 1-4. 考察

本章における結果をまとめたものが Table 1-5 である。

本章ではまず活性化型 PkcA を高生産できる株 (R429A 株) を作製し、*pkcA*(R429A)発現抑制条件から誘導条件に移した場合の細胞壁合成酵素遺伝子群の転写解析を行った。また、CWI 経路で PkcA の下流で機能すると考えられる転写因子をコードする *rlmA* の欠失株と *rlmA* を欠失した R429A 株を用い、同様の培養条件で転写解析を行った。これらの結果から PkcA が RlmA を介して *chsB*、*chsC*、*chsD*、*csmA*、*csmB*、*agsB* の転写を誘導することを示唆した。先にも述べたが *chsF* については培地シフト前においても R429A 株では野生型株より mRNA 量が多く、培地シフト後に R429A 株でさらに mRNA 量が増加することはなかったため (Fig. 1-10)、PkcA が直接 *chsF* の転写を制御するかどうかは断定できなかった。また、培地シフト後において R429A $\Delta$ *rlmA* 株における *chsC*、*agsB* の mRNA 量が  $\Delta$ *rlmA* 株と比較して有意に多いことから (Table 1-3 右)、PkcA が RlmA 非依存的にも *chsC*、*agsB* の転写を制御する可能性が考えられた。また PkcA が *chsG* の発現を負に制御することも示唆された。

次に、*pkcA*(R429A)発現誘導条件で 20 時間培養した場合の細胞壁合成酵素遺伝子群の転写解析を行った。さらに *rlmA* 欠失株を用いて同様の培養条件で転写解析を行い、*pkcA*(R429A)発現誘導条件で 20 時間培養した場合の *chsD*、*csmA*、*csmB*、*agsB* の mRNA 量の増加は RlmA に依存し、*chsB*、*chsC*、*chsF*、*fksA* の mRNA 量の増加は RlmA に依存せずにも起こることを示唆した。また、*pkcA*(R429A)発現誘導条件下で長時間培養した場合の *chsB*、*chsF*、*fksA* の転写誘導は、PkcA 活性化条件で長時間培養した結果、細胞レベルで何らかの変化が起こり、それによる二次的な影響のために起こった可能性が考えられたが、PkcA

によるこれらの遺伝子の転写制御には時間がかかる可能性も考えられた。

さらに 30°Cで培養した *pkcA-ts* 株を 42°Cに移した場合の転写解析の結果、PkcA は少なくとも高温ストレス時の *csmA*、*csmB*、*agsB* の転写誘導、*chsC*、*chsG* の転写抑制に必要であることが示唆された。

これらの結果をまとめたモデル図を Fig. 1-15 に示した。

以下で PkcA の細胞壁合成酵素遺伝子群の転写制御に関わる機能について考察する。

#### 1-4-1. RlmA を介して PkcA によって制御される細胞壁合成酵素遺伝子

本章における *rlmA* 欠失株を用いた、*pkcA*(R429A)発現抑制条件から誘導条件に移した場合の転写解析から、PkcA は RlmA を介して *chsB*、*chsC*、*chsD*、*csmA*、*csmB*、*agsB* の転写を誘導する機能を持つことが示唆された (Table 1-5)。Fig. 1-11 に示したようにこれらの遺伝子のプロモーター領域には *S. cerevisiae* における RlmA のオルソログである Rlm1p の結合する配列に類似した配列が存在することから、RlmA がこれらの遺伝子の転写を直接誘導する可能性が考えられる。Fujioka らは micafungin 処理時の細胞壁関連遺伝子群の転写解析を行い、micafungin 処理時の *agsB* の転写誘導は MpkA や RlmA 依存的であるが、キチン合成酵素遺伝子群や  $\beta$ -1,3-グルカン合成酵素遺伝子 *fksA* の転写誘導には MpkA、RlmA は関与しないことを示唆している (Fujioka *et al.*, 2007)。また、最近 Futagami らは Fujioka らと同様の実験条件において *fksA*、*csmB* の micafungin 処理時の転写誘導が *mpkA* 欠失株では起こらないこと、*chsB* の micafungin 処理時の転写レベルが *mpkA* 欠失株で低下することを報告した (Futagami *et al.*, 2014)。本章における結果では RlmA が *chsB*、*csmB* だけでなく *chsC*、*chsD*、*csmA* の転写制御にも関与すること、*fksA* の転写制御には関与しないことを示しており、これら二つの報告の結果とは異なる。Fig. 1-14 に示したように *rlmA* 欠失株は CFW には高感受性を示したのに対し、CR や micafungin、高温ストレスに対しては高感受性を示さなかった。このことから、RlmA は CFW に対する耐性には必要であるが、CR や micafungin、高温ストレスに対する耐性には必要でないことが示唆される。序章でも述べたように CWI 経路の活性化はインプットされるシグナルの違いによってそのレスポンスが異なることが示唆されていることから、今回使用した PkcA の活性化条件と micafungin 処理ではレスポンスが異なる可能性があり、今後 CFW 処理時の細胞壁合成酵素遺伝子群の転写に



についても検討する必要があると考えられる。

#### 1-4-2. PkcA 活性化条件で短時間培養した場合に RlmA 非依存的にも PkcA によって制御される細胞壁合成酵素遺伝子

先にも述べたように PkcA は RlmA 非依存的な機構によっても *chsC*、*agsB* の転写を制御することが示唆された。本章の序でも述べたように *S. cerevisiae* において CWI 経路では RlmA の他に、転写因子である SBF 複合体が MpkA の下流で機能することが示されている (Levin, 2011)。*A. nidulans* においても *SWI4*、*SWI6* のオルソログが存在することから、それらによって *chsC*、*agsB* の転写が制御される可能性が考えられた。しかし、これらの遺伝子のプロモーター領域には *S. cerevisiae* における SBF 複合体の認識配列やそれに類似する配列は存在しない。このことから、PkcA は *A. nidulans* における SBF 複合体のオルソログ以外の転写因子を介して *chsC*、*agsB* の転写を制御する可能性が考えられる。

#### 1-4-3. PkcA 活性化条件で長時間培養した場合に RlmA 非依存的に PkcA によって制御される細胞壁合成酵素遺伝子

*pkcA(R429A)* 発現誘導条件下で長時間培養した場合の *chsB*、*chsF*、*fksA* の転写誘導は、PkcA 活性化条件で長時間培養した結果、細胞レベルで何らかの変化が起こり、それによる二次的な影響のために起こった可能性が考えられた。しかし、PkcA によるこれらの遺伝子の転写制御が比較的時間を要するものである可能性も現時点では排除できない。これらの遺伝子のプロモーターには *S. cerevisiae* において酸化ストレスや高温ストレス応答に関わる転写因子である Msn2p/4p や広域な遺伝子の転写制御に関わる HAP 複合体の認識配列が存在することから (data not shown)、PkcA が *A. nidulans* における Msn2p/4p のオルソログである MsnA や HAP 複合体を介してこれらの遺伝子の転写を制御する可能性が考えられる。この可能性については、*msnA*、HAP 複合体の構成因子をコードする遺伝子の欠失株における転写解析や *chsB*、*chsF*、*fksA* の遺伝子のプロモーターに存在する MsnA や HAP 複合体が認識すると考えられる配列に変異を導入し転写解析を行うことにより明らかになると思われる。

#### 1-4-4. PkcA による高温ストレス時の細胞壁合成酵素遺伝子群の転写制御

30°Cで培養した菌体を 42°Cに移した場合、野生型株では *csmA*、*csmB*、*agsB* の mRNA 量が増加するのに対し、*pkcA-ts* 株ではこの増加がほとんど見られなかったことから (Fig. 1-13)、少なくとも PkcA は高温ストレス時におけるこれら遺伝子の転写制御に関与することが示唆された。一方、*rlmA* 欠失株は高温ストレスに対して高感受性を示さなかったことから (Fig. 1-14)、RlmA は高温ストレス時のこれらの転写制御には関与しない可能性、または RlmA が高温ストレス時のこれらの遺伝子の転写誘導に関与するものの、この転写誘導が高温条件における生育に重要ではない可能性が考えられる。

30°Cで培養した菌体を 42°Cに移した場合、野生型株では *chsC*、*chsG* の mRNA 量に変化が見られないのに対し、*pkcA-ts* 株では *chsC*、*chsG* の mRNA 量が増加したことから (Fig. 1-13)、PkcA が高温ストレス時のこれらの遺伝子の転写抑制に必要であることが示唆された。*A. fumigatus* では *chsC* のオルソログである *AfchsA* の転写制御にカルシウム応答シグナル伝達経路が関与することが示唆されている (Fortwendel *et al.*, 2010、Pinchai *et al.*, 2009)。この場合、カルモジュリン (CaM) が  $Ca^{2+}$  イオンと結合することで、カルシニューリン (AfCnaA) と結合可能となる。カルシニューリンは CaM と結合することで活性化し、カルシニューリンがこの経路の転写因子 (AfCrzA) を脱リン酸化すると、AfCrzA が核内に移行し遺伝子の転写が誘導される (Cui *et al.*, 2009)。 $\beta$ -1,3-グルカン合成阻害剤である caspofungin 処理時に *AfchsA* の転写が誘導されるが、この転写誘導は AfCnaA 依存的であることが示されている (Fortwendel *et al.*, 2010)。また、ほ乳類においてカルシニューリンを阻害することが知られるタンパク質カルシプレシンの *A. fumigatus* のオルソログ CbpA は、その遺伝子の欠失株において *AfchsA* の発現が CnaA 依存的に誘導されることが報告されている (Pinchai *et al.*, 2009)。一方、*A. nidulans* の *chsC* のプロモーター領域には CrzA の結合配列が存在し、*chsG* のプロモーターにもこの配列に類似する配列が存在する (data not shown)。第 3 章で行った PkcA 失活条件における網羅的転写解析により、PkcA 失活時には CrzA が活性化されることが示唆されたことから (第 3 章参照、Table 3-9)、30°Cで培養した菌体を 42°Cに移した場合、*pkcA-ts* 株では CrzA が活性化した結果、*chsC*、*chsG* の転写が誘導された可能性が考えられる。

#### 1-4-5. PkcA による細胞壁合成酵素遺伝子の転写制御の意義

本章の解析により PkcA は少なくとも *chsB*、*chsC*、*chsD*、*csmA*、*csmB*、*agsB* の転写を正に制御することが示唆された。本章の序で述べたように ChsB は菌糸の正常な細胞壁の形成に非常に重要であり、菌糸の極性生長に深く関与することが示唆されている (Yanai *et al.*, 1994、Fukuda *et al.*, 2009)。また、ChsD は本章の序でも述べたように、*chsB* の発現を抑制した条件ではその重要性が増すこと (Ichinomiya *et al.*, 2002) から、細胞壁に異常が生じた場合の菌糸生長に重要であることが示唆されている。これらのことから PkcA が *chsB*、*chsD* の転写制御を介してストレス条件下での菌糸生長を保障している可能性が考えられる。ChsC は正常な細胞壁の形成や隔壁形成に関わる機能を持つことが示唆されていることから (Fujiwara *et al.*, 2000、Ichinomiya *et al.*, 2005)、PkcA は *chsC* の転写制御を介して正常な隔壁の形成に寄与する可能性が考えられる。*csmA*、*csmB* はプロモーター領域を一部共有するように染色体上に head-to-head で位置することから (Takeshita *et al.*, 2006)、これらが同様の転写制御を受ける可能性が考えられていたが、本章のいずれの転写解析においてもこれらの遺伝子が同様の転写パターンを示したこと (Table 1-5) は、この可能性を支持する。CsmA は異常の生じた細胞壁の修復に機能することが示唆されており (Yamada *et al.*, 2005)、CsmB が CsmA と類似した機能を有することが強く示唆されていることから、CsmA、CsmB が協調してストレス条件下での細胞壁の修復に機能する可能性が考えられる。また、AgsB も細胞壁ストレスへの応答に関与することが示唆されている (Fujioka *et al.*, 2007、Damveld *et al.*, 2005)。これらのことから、PkcA はストレス条件においてこれらの細胞壁合成酵素遺伝子の転写を誘導することで菌糸の様々な部位でキチンやグルカンの合成を誘導し、ストレスによって損傷を受けた細胞壁の修復や環境の変化に適応した細胞壁の形成を促進する役割を持つと考えられる。

一方、本章の解析により PkcA は *chsG* の転写を負に制御することが示唆された。本章の序でも述べたように *A. nidulans* では *chsG* の解析はなされておらず、*A. fumigatus* では *chsG* のオルソログの欠失株の解析がなされているが、この他に *chsG* のオルソログを解析した例はなく *chsG* の機能は不明であり、PkcA が *chsG* の転写を制御する意義は現在のところ不明である。

Table 1-1 本章で使用した *A. nidulans* 菌株

Strain	Genotype	Source
FGSC A26	<i>biA1</i>	FGSC*
FGSC A1149	<i>pyrG89 pyroA4 nkuA::argB veA1</i>	FGSC*
FGSC A1145	<i>pyrG89 pyroA4 riboB2 nkuA::argB veA1</i>	FGSC*
A1149/pyroA	<i>pyrG89 pyroA4::pyroA nkuA::argB veA1</i>	山崎 未発表
A1149/pyrG-1	<i>pyrG89::pyrG pyroA4 nkuA::argB veA1</i>	Katayama <i>et al.</i> , 2012
pkcA-ts-2	<i>pyrG89 pyroA4 riboB2 nkuA::argB veA1</i> <i>pkcA::riboB-pkcA(P959L)</i>	Katayama <i>et al.</i> , 2012
alcA(p)-pkcA-3	<i>pyrG89 pyroA4 riboB2 nkuA::argB veA1</i> <i>pkcA::riboB-alcA(p)-pkcA</i>	Katayama <i>et al.</i> , 2012
A1149/MF-1,-2	<i>pyrG89 pyroA4 nkuA::argB veA1</i> <i>mpkA::mpkA-3xflag-pyroA</i>	Katayama <i>et al.</i> , 2012
pkcA-ts/MF-1,-2	<i>pyrG89 pyroA4 riboB2 nkuA::argB veA1</i> <i>pkcA::riboB-pkcA(P959L) mpkA::mpkA-3xflag-pyroA</i>	Katayama <i>et al.</i> , 2012
R429A-1,-2	<i>pyrG89 pyroA4 riboB2::riboB-alcA(p)-pkcA(R429A)</i> <i>nkuA::argB veA1</i>	本論文
$\Delta$ rlmA-1,-2,-3	<i>pyrG89 pyroA4 nkuA::argB veA1 rlmA::pyroA</i>	本論文
R429A $\Delta$ rlmA-1,-2	<i>pyrG89 pyroA4 riboB2::riboB-alcA(p)-pkcA(R429A)</i> <i>nkuA::argB veA1 rlmA::pyroA</i>	本論文

\*Fungal Genetics Stock Center, Kansas City, MO, USA

Table 1-2 本章で使用したオリゴヌクレオチド

プライマー	配列
5riboBn	GGGCGGCCGCCCCGATCTCCCTTTATTC
3riboBn	GGCTCGAGCCCATTCTTTTCGTCACCC
riboBF	CTGTTGGAAGATAGATGAC
PkcAR429AR	ACCTTGAGCGTTGAGACC
PkcAR429AF	GGTCTCAACGCTCAAGGT
3pkcARnew	CAGCTATGAAGTTATCAACCCAA
3pkcARnest	CCAGATCAGTGCTAGTTTAGGG
5rlmAF	TGGCACATCCTACCTCG
5pA-rlmAR	ATGTTACTCCGCACAGGGCGAGGGAGAGTGTTTGCG
3pA-rlmAF	CTTATTTCAACACCACGCGCCATCCGCCCTATGTCC
3rlmAR	TGCTCATCGACCTTAAACC
pyroA5n	GCCCTGTGCGGAGTAACAT
pyroA3n	GCGCGTGGTGTGAAATAAG
mpkA5	GGGGATCCCTATGCATTATGGACGG
mpkA3	GGGGATCCGCATGAAACTCTCGGTAAG
5mpkA-FLAG	ATGGTCTTTGTAGTCCATGGCGCGTGAGACTGAGATT
3FLAG-mpkA	AGGATGACGATGTCAAGTCTGACTTACAAGTACAGGGACGG
3xFLAGF	ATGGACTACAAAGACCAT
3xFLAGR	CTTGTCATCGTCATCCT

Table 1-2 本章で使用したオリゴヌクレオチド (続き)

プライマー	配列
histoneF-RT	CACCCGGACATGGTATCTC
histoneR-RT	GAATACTTCGTAACGGCCTTGG
pkcA-f	GAGGGCCGACGAATTGAGAG
pkcA-r	TTAGCGGCTTGCGCAGATT
chsAF-RT	CCCGAATTCATATCTCAGCGTC
chsAR-RT	CGAATGATCGGTTTTCCACAG
chsB-f	ACGGCGACTCCAATCATCAA
chsB-r	TGGATAATACCAAAGGCGACGAA
chsC-f	TCTGCAACACGCACGACATAA
chsC-r	ACCGGGCTTGAGATTTGCTG
chsD-f	TGCTCGCCCTTATTCTTGGAC
chsD-r	CCAGATTGGCAGCGAAATGA
chsF-f	TGGCTCACTACCTCGGTCATC
chsF-r	ACTTCATTTCCAAACGGCCAAC
chsG-f	GCCGTCACTGGATTGACAA
chsG-r	CTGGACTCGTTCGGTGGACA
csmA-f	TTCATACGGCACCAAGTACCAC
csmA-r	GGCGGCTCATCATCTCTGAC
csmB-f	TTGAGTTGGCGGCCTTGA
csmB-r	GTAGACGCAGGTCGCTGGAA
fksA-f	CACCAGTTTGCCTGGAACGA
fksA-r	AATCCATGAGGATGCGTGTGA
agsAF-RT	GCTTTCCAAATCCCACAGTTGG
agsAR-RT	GTGAAGCAGATATGCATCCGTG
agsBF-RT	ATCGGACACTACCTTCCCTG
agsBR-RT	GACTTGGCTGACGATCAACG

Table 1-3. *pkcA*(R429A)発現抑制条件から誘導条件に移した場合の PkcA 活性化による細胞壁合成酵素遺伝子群の mRNA 量

	Wild-type	R429A	Fold-change		$\Delta$ rlmA	R429A $\Delta$ rlmA	Fold-change
<i>chsA</i>	154.99	157.85	1.02	<i>chsA</i>	145.50	93.29	0.64
<i>chsB</i>	644.62	1596.32	<u>2.48</u>	<i>chsB</i>	530.19	403.51	0.76
<i>chsC</i>	169.15	482.99	<u>2.86</u>	<i>chsC</i>	158.69	278.19	<u>1.75</u>
<i>chsD</i>	328.06	920.15	<u>2.80</u>	<i>chsD</i>	339.90	338.46	1.00
<i>chsF</i>	19.59	37.73	<u>1.93</u>	<i>chsF</i>	21.48	17.49	0.81
<i>chsG</i>	31.43	9.54	<u>0.30</u>	<i>chsG</i>	104.33	16.10	<u>0.15</u>
<i>csmA</i>	1075.78	4866.63	<u>4.52</u>	<i>csmA</i>	1040.61	1424.26	1.37
<i>csmB</i>	601.37	2470.99	<u>4.11</u>	<i>csmB</i>	507.18	784.42	1.55
<i>fksA</i>	1074.92	1723.24	1.60	<i>fksA</i>	1152.67	1195.93	1.04
<i>agsA</i>	3.16	2.69	0.85	<i>agsA</i>	3.95	1.64	0.41
<i>agsB</i>	698.14	6509.86	<u>9.32</u>	<i>agsB</i>	244.29	1266.79	<u>5.19</u>

*pkcA*(R429A)発現抑制条件から誘導条件に移して 1 時間培養後の各遺伝子の mRNA 量。各遺伝子の mRNA 量は 1 pg total RNA あたりのコピー数で示した。

A1149 株 (Wild-type)、R429A-1 株 (R429A)、 $\Delta$ rlmA-1 株 ( $\Delta$ rlmA)、R429A $\Delta$ rlmA-1 (R429A $\Delta$ rlmA)。

t 検定において有意差 ( $p < 0.05$ ) が認められたもののうち、1.5 倍以上または 2/3 以下の差があったものにはアンダーラインを付した。

Table 1-4 *pkcA*(R429A) 発現誘導条件で 20 時間培養した場合の PkcA 活性化による細胞壁合成酵素遺伝子群の mRNA 量

*pkcA*(R429A)発現誘導条件で 20 時間培養した場合の各遺伝子の mRNA 量。各遺伝子の mRNA 量は histone H2B をコードする遺伝子の mRNA 量に対する相対値 (%) で示した。A1149 株 (Wild-type)、R429A-1 株 (R429A)、 $\Delta$ rlmA-1 株 ( $\Delta$ rlmA)、R429A $\Delta$ rlmA-1 (R429A $\Delta$ rlmA)。

	Wild-type	R429A	Fold-change		$\Delta$ rlmA	R429A $\Delta$ rlmA	Fold-change
<i>chsA</i>	3.83	4.69	1.23	<i>chsA</i>	2.34	3.50	<u>1.50</u>
<i>chsB</i>	6.46	14.21	<u>2.20</u>	<i>chsB</i>	10.28	15.79	<u>1.54</u>
<i>chsC</i>	3.11	6.82	<u>2.20</u>	<i>chsC</i>	2.32	4.06	<u>1.75</u>
<i>chsD</i>	3.22	5.24	<u>1.63</u>	<i>chsD</i>	3.49	3.21	0.92
<i>chsF</i>	0.04	0.21	<u>5.19</u>	<i>chsF</i>	0.08	0.30	<u>3.63</u>
<i>chsG</i>	0.22	0.08	0.37	<i>chsG</i>	0.59	0.13	<u>0.21</u>
<i>csmA</i>	6.13	16.10	<u>2.63</u>	<i>csmA</i>	6.19	8.22	1.33
<i>csmB</i>	1.74	4.29	<u>2.47</u>	<i>csmB</i>	4.83	7.14	1.48
<i>fksA</i>	9.39	17.76	<u>1.89</u>	<i>fksA</i>	9.22	18.30	<u>1.98</u>
<i>agsA</i>	0.05	0.04	0.77	<i>agsA</i>	0.06	0.03	0.58
<i>agsB</i>	0.37	16.62	<u>44.99</u>	<i>agsB</i>	1.81	1.78	0.98

*pkcA*(R429A)発現誘導条件で 20 時間培養した場合の各遺伝子の mRNA 量。各遺伝子の mRNA 量は histone H2B をコードする遺伝子の mRNA 量に対する相対値 (%) で示した。

A1149 株 (Wild-type)、R429A-1 株 (R429A)、 $\Delta$ rlmA-1 株 ( $\Delta$ rlmA)、R429A $\Delta$ rlmA-1 (R429A $\Delta$ rlmA)。

t 検定において有意差 ( $p < 0.05$ ) が認められたもののうち、1.5 倍以上または 2/3 以下の差があったものにはアンダーラインを付した。



Table 1-5 *pkcA* 条件変異株における細胞壁合成酵素遺伝子の転写制御の種類による分類

培養条件	転写制御の種類	遺伝子
<i>pkcA</i> (R429A)発現抑制条件から誘導条件に移した場合	RlmA依存的な機構で転写が誘導される遺伝子	<i>chsB</i> , <i>chsD</i> , <i>csmA</i> , <i>csmB</i>
	RlmA依存的な機構、非依存的な機構の両方で転写が誘導される遺伝子	<i>chsC</i> , <i>agsB</i>
	転写が抑制される遺伝子	<i>chsG</i>
<i>pkcA</i> (R429A)発現誘導条件で20時間培養した場合	RlmA依存的に転写が誘導される遺伝子	<i>chsD</i> , <i>csmA</i> , <i>csmB</i> , <i>agsB</i>
	RlmA依存的な機構、非依存的な機構の両方で転写が誘導される遺伝子	<i>chsB</i> , <i>chsC</i> , <i>chsF</i>
	RlmA非依存的に転写が誘導される遺伝子	<i>fksA</i>
<i>pkcA</i> - <i>ts</i> 株を30°Cから42°Cに移した場合	野生型株では誘導されないが <i>pkcA</i> - <i>ts</i> 株では誘導されない遺伝子	<i>csmA</i> , <i>csmB</i> , <i>agsB</i>
	野生型株では誘導されないが <i>pkcA</i> - <i>ts</i> 株では誘導される遺伝子	<i>chsC</i> , <i>chsG</i>

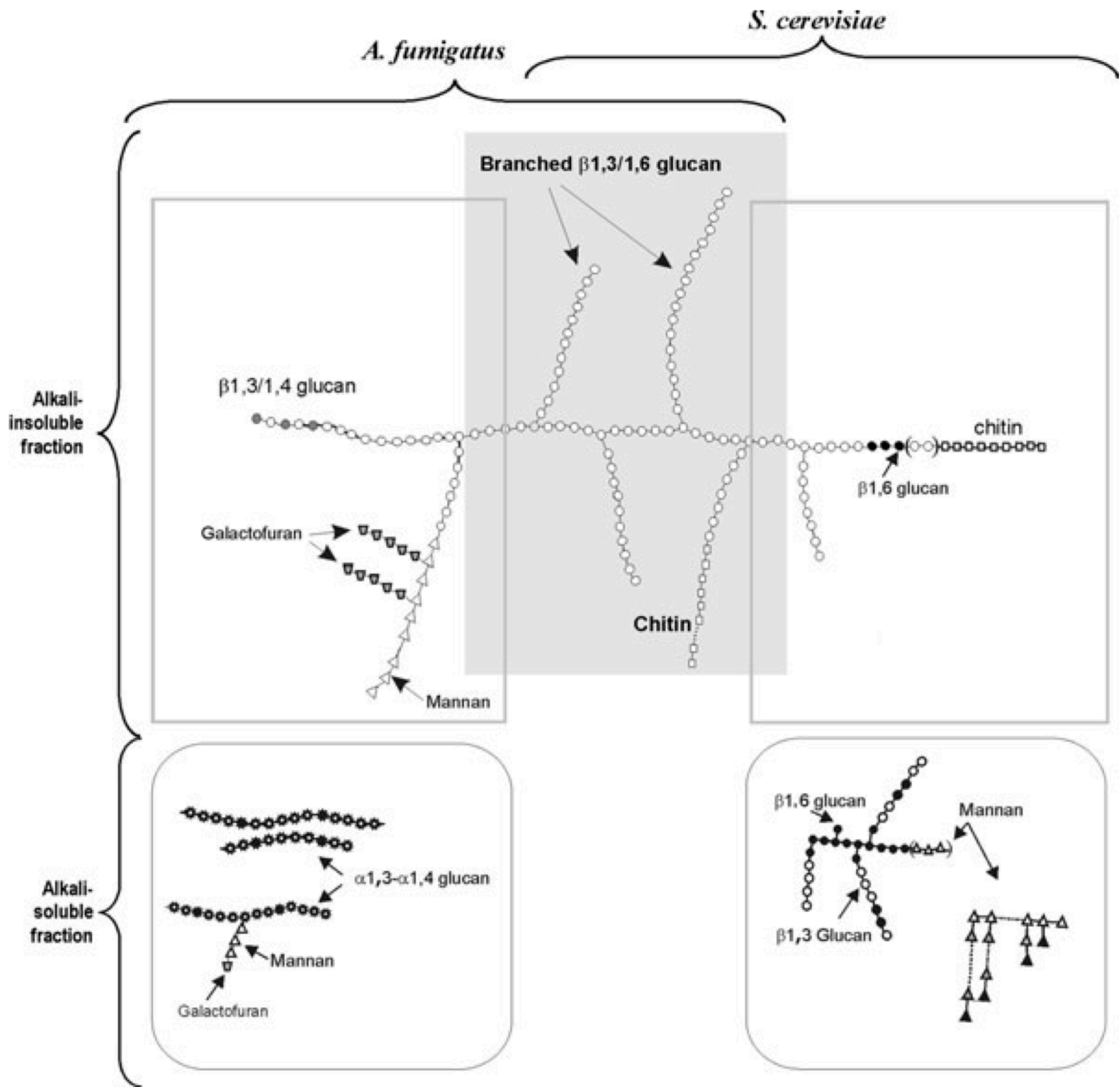


Fig. 1-1 糸状菌 *Aspergillus fumigatus* および出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* における細胞壁を構成する多糖類

(Latge, 2007)

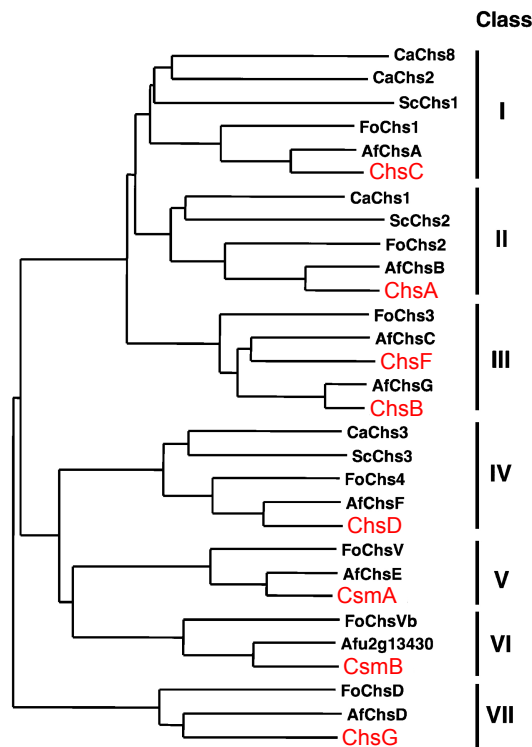


Fig. 1-2 菌類におけるキチン合成酵素の系統樹

(Horiuchi, 2009)

*A. nidulans*のキチン合成酵素を赤字で示した。

Af, *Aspergillus fumigatus*; Bc, *Botrytis cinerea*; Ca, *Candida albicans*; Fo, *Fusarium oxysporum*; Mg, *Magnaporthe grisea*; Nc, *Neurospora crassa*; Sc, *Saccharomyces cerevisiae*; Um, *Ustilago maydis*; Ed, *Exophiala dermatiridis*

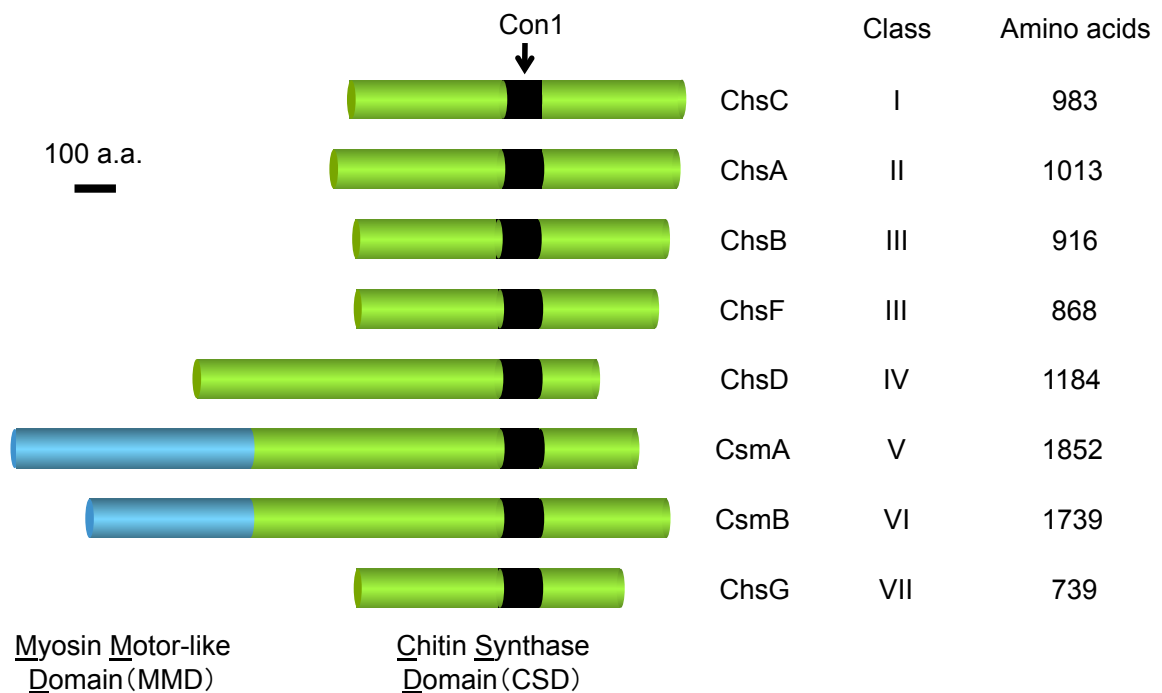


Fig. 1-3 *A. nidulans*におけるキチン合成酵素の構造

Con1はこれらのキチン合成酵素に保存された酵素活性ドメインを示す。

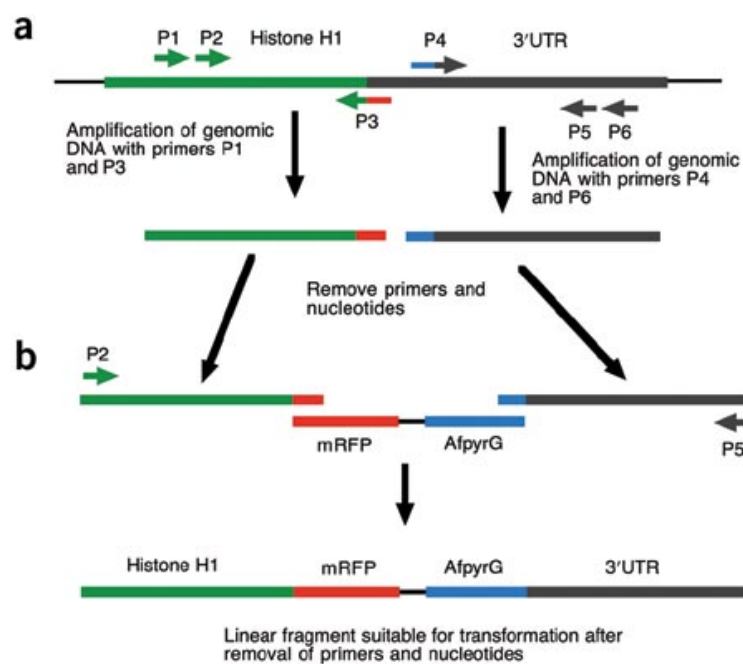


Fig. 1-4 Fusion PCR法による遺伝子置換コンストラクトの構築

A schematic diagram of the use of fusion PCR to synthesize a fragment for creating a fusion of a sequence encoding the mRFP to the 3' end of the histone H1 gene. In panel (a), flanking DNA fragments are amplified with primers P1 and P3 and with P4 and P6. Primers P3 and P4 are designed such that amplification produces fragments that have tails (shown in red and blue) with identity to the ends of a cassette that, in this case, contains the mRFP coding sequence and the *A. fumigatus* *pyrG* gene (*AfpyrG*). In panel (b), the two fragments and the preamplified cassette are mixed and fused together by PCR using 'nested' primers (P2 and P5) creating a linear fragment suitable for transformation.

(Szewczyk *et al.*, 2007)

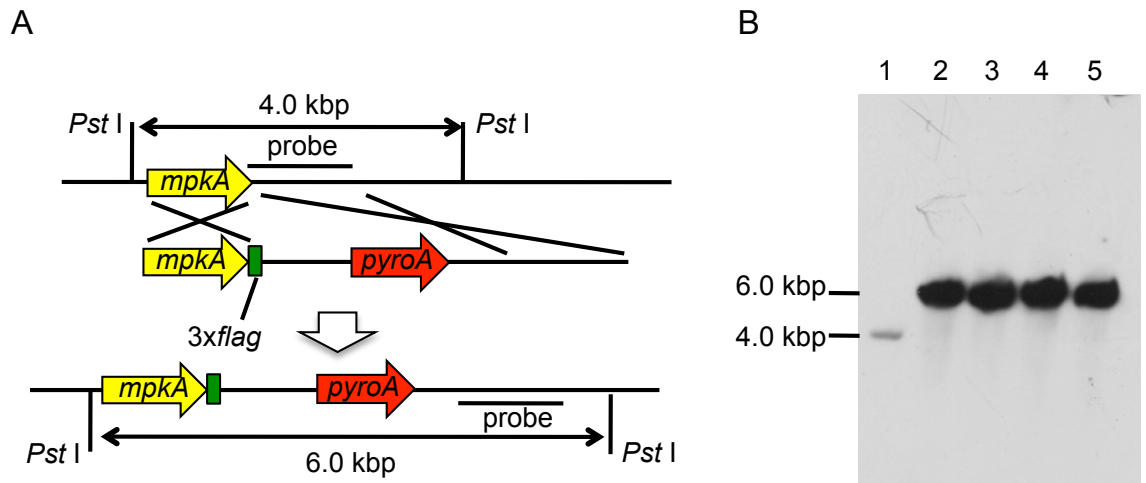


Fig. 1-5 MpkA-3xFLAGを生産する株の作製

A. MpkA-3xFLAGを生産する株を作製するコンストラクト

B. MpkA-3xFLAGを生産する株のサザン解析による確認

レーン1はA1149株（野生型株）、レーン2、3はA1149株由来の形質転換体、レーン4、5はpkcA-ts-2株由来の形質転換体。

レーン2 : A1149/MF-1、レーン3 : A1149/MF-2、レーン4 : pkcA-ts/MF-1、レーン5 : pkcA-ts/MF-2

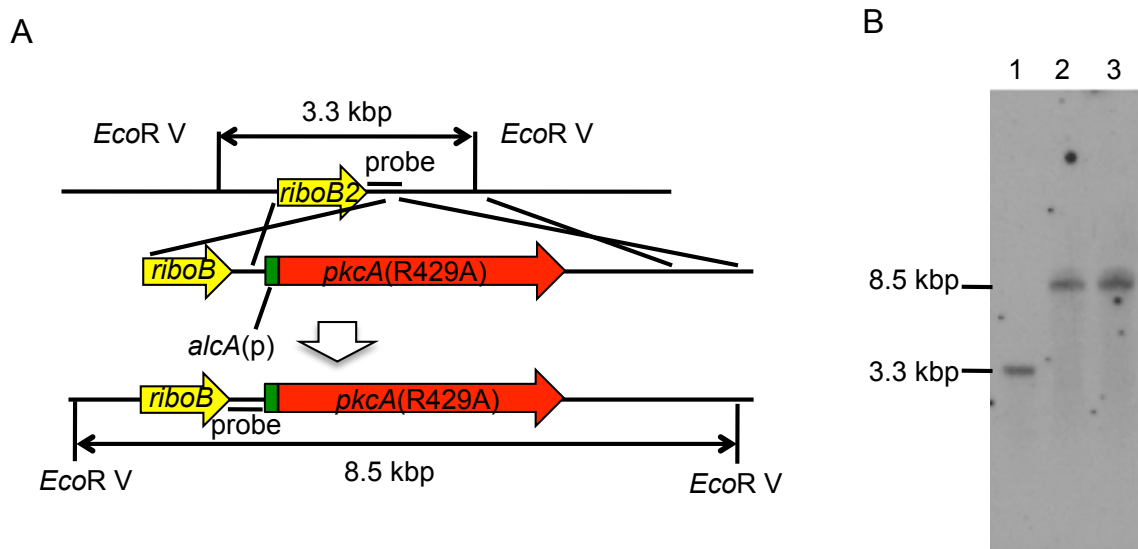


Fig. 1-6 活性型PkcA (PkcA(R429A)) を高生産できる株の作製

A. PkcA(R429A)を高生産できる株を作製するコンストラクト

B. PkcA(R429A)を高生産できる株のサザン解析による確認

レーン1はA1149株（野生型株）、レーン2、3は形質転換体

レーン2 : R429A-1、レーン3 : R429A-2

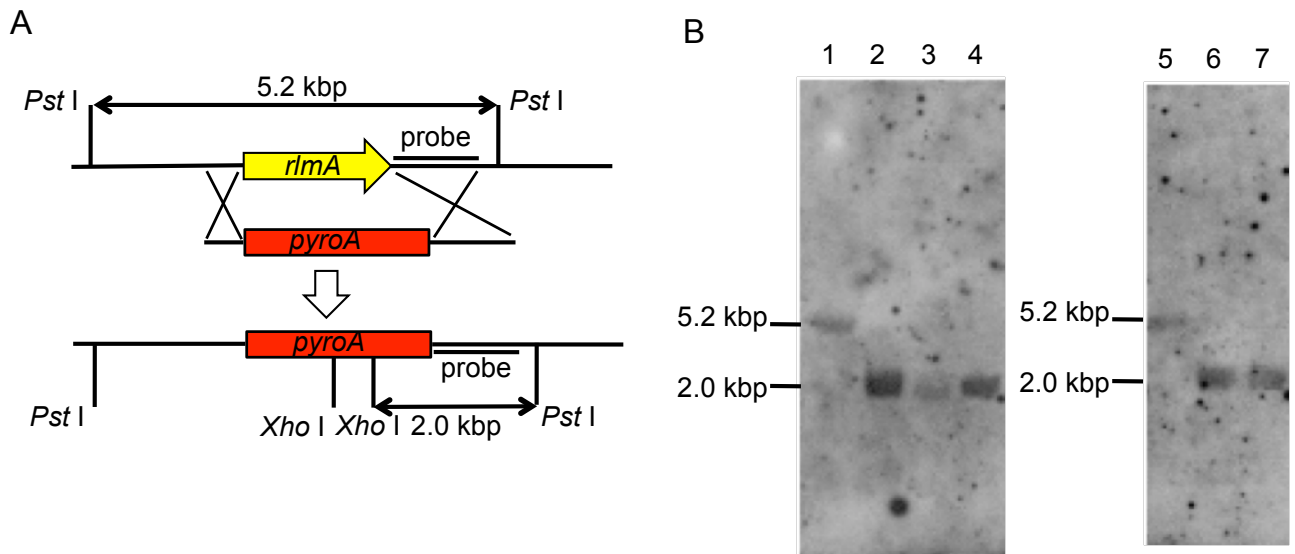


Fig. 1-7 *rlmA*欠失株の作製

A. *rlmA*欠失株を作製するコンストラクト

B. *rlmA*欠失株のサザン解析による確認

レーン1、5はA1149株（野生型株）、レーン2、3、4はA1149株由来の形質転換体、レーン6、7はR429A-1株由来の形質転換体

レーン2： $\Delta rlmA$ -1、レーン3： $\Delta rlmA$ -2、レーン4： $\Delta rlmA$ -3、レーン6：R429A $\Delta rlmA$ -1、レーン7：R429A $\Delta rlmA$ -2

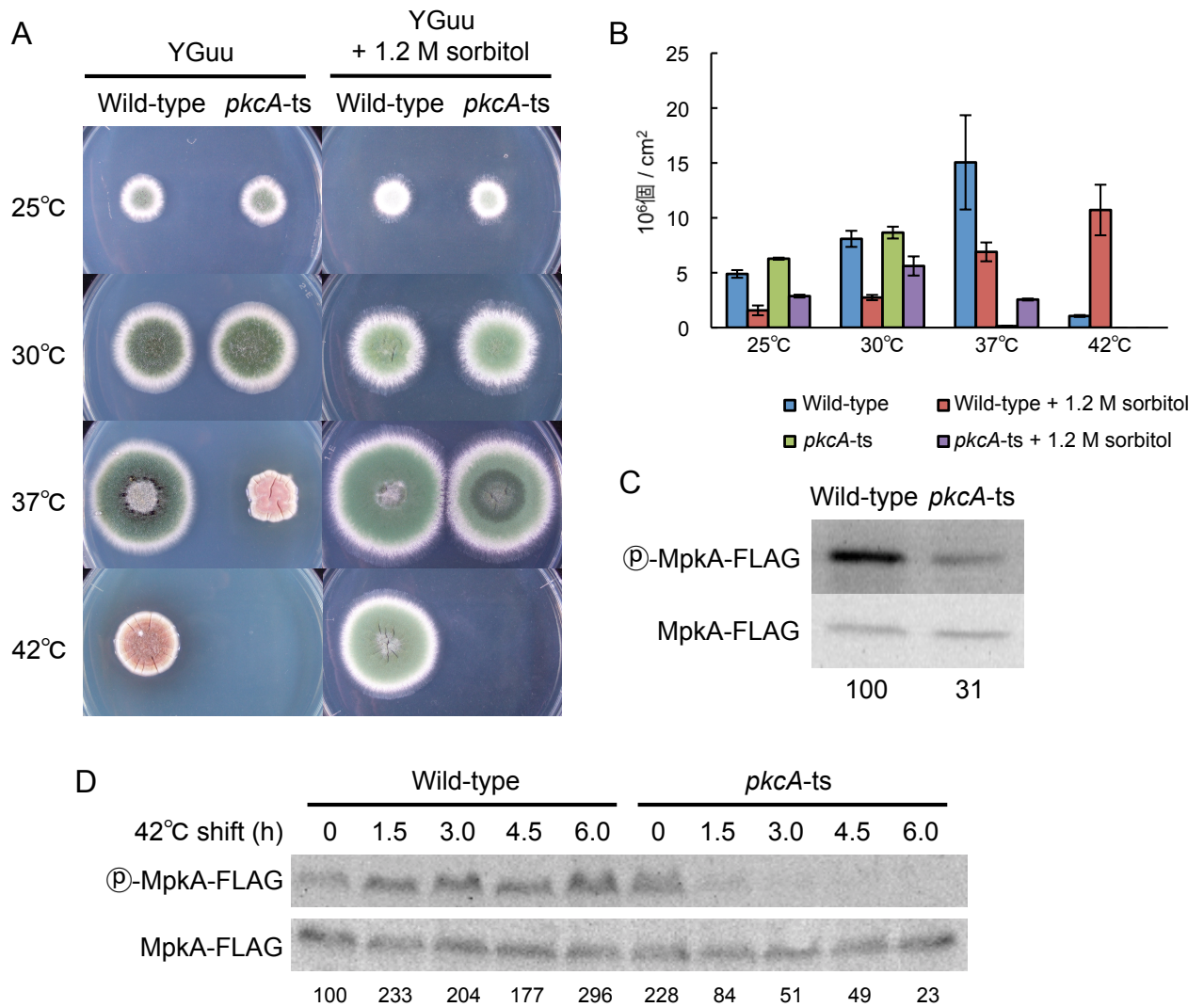


Fig. 1-8 *pkcA-ts*株の表現型およびPkcA活性

- A. A1149株 (Wild-type)、*pkcA-ts*-2株 (*pkcA-ts*) を各温度、各培地で72時間培養した。
- B. *pkcA-ts*株の分生子形成効率。パネルAの条件におけるA1149株 (Wild-type)、*pkcA-ts*-2株 (*pkcA-ts*) の分生子形成効率を示した。独立した3回の実験を行い、標準誤差をエラーバーで示した。
- C. A1149/MF-1株 (Wild-type)、*pkcA-ts*/MF-1株 (*pkcA-ts*) の分生子 $10^6$ 個を37°C、固体YGuu培地で16時間培養し、ウエスタン解析によりMpkA-FLAG及びリン酸化MpkA-FLAGを検出した。下段の数字は野生型株を100とした時のMpkA-FLAGのリン酸化レベル (Ⓟ-MpkA-FLAG / MpkA-FLAG) を示した。
- D. 30°C、セロファンを敷いた固体MMGuu培地で培養したA1149/MF-1株 (Wild-type)、*pkcA-ts*/MF-1株 (*pkcA-ts*) を42°Cに移し、ウエスタン解析により経時的にMpkA-FLAG及びリン酸化MpkA-FLAGを検出した。下段の数字は温度シフト前の野生型株を100とした時の各条件におけるMpkA-FLAGのリン酸化レベル (Ⓟ-MpkA-FLAG / MpkA-FLAG) を示した。

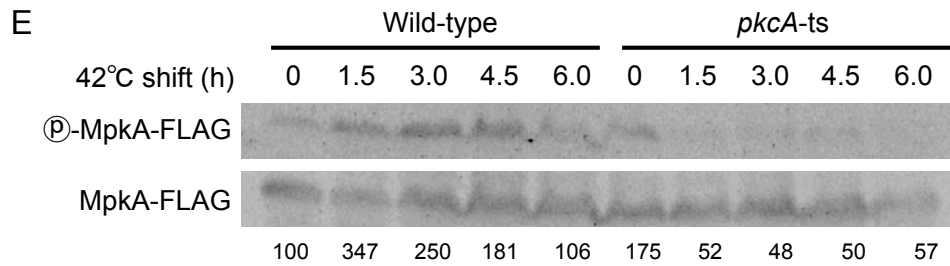


Fig. 1-8 *pkcA-ts*株の表現型およびPkcA活性 (続き)

E. 30°C、セロファンを敷いた1.2 Mのソルビトールを含む固体MMGuu培地で培養したA1149/MF-1株 (Wild-type)、*pkcA-ts*/MF-1株 (*pkcA-ts*) を42°Cに移し、ウエスタン解析により経時的にMpkA-FLAG及びリン酸化MpkA-FLAGを検出した。下段の数字は温度シフト前の野生型株を100とした時の各条件におけるMpkA-FLAGのリン酸化レベル (Ⓟ-MpkA-FLAG / MpkA-FLAG) を示した。

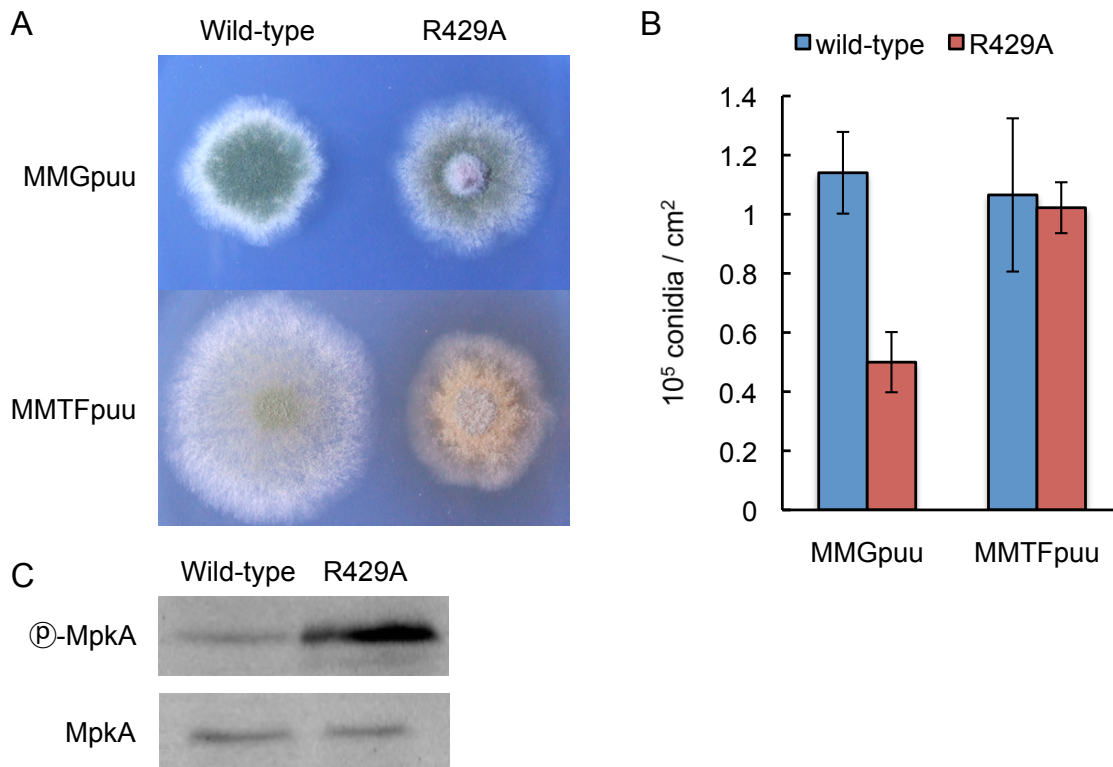


Fig. 1-9 R429A株の表現型及びPkcA活性

- A. A1149株 (Wild-type)、R429A-1株 (R429A) を37°C、各培地で72時間培養した。
- B. パネルAの条件で培養した場合の分生子形成効率。独立した3回の実験を行い、標準誤差をエラーバーで示した。
- C. A1149株 (Wild-type)、R429A-1株 (R429A) の分生子 $10^6$ 個を37°C、セロファンを敷いた固体MMTFpuu培地で20時間培養し、ウエスタン解析によりMpkA及びリン酸化MpkAを検出した。



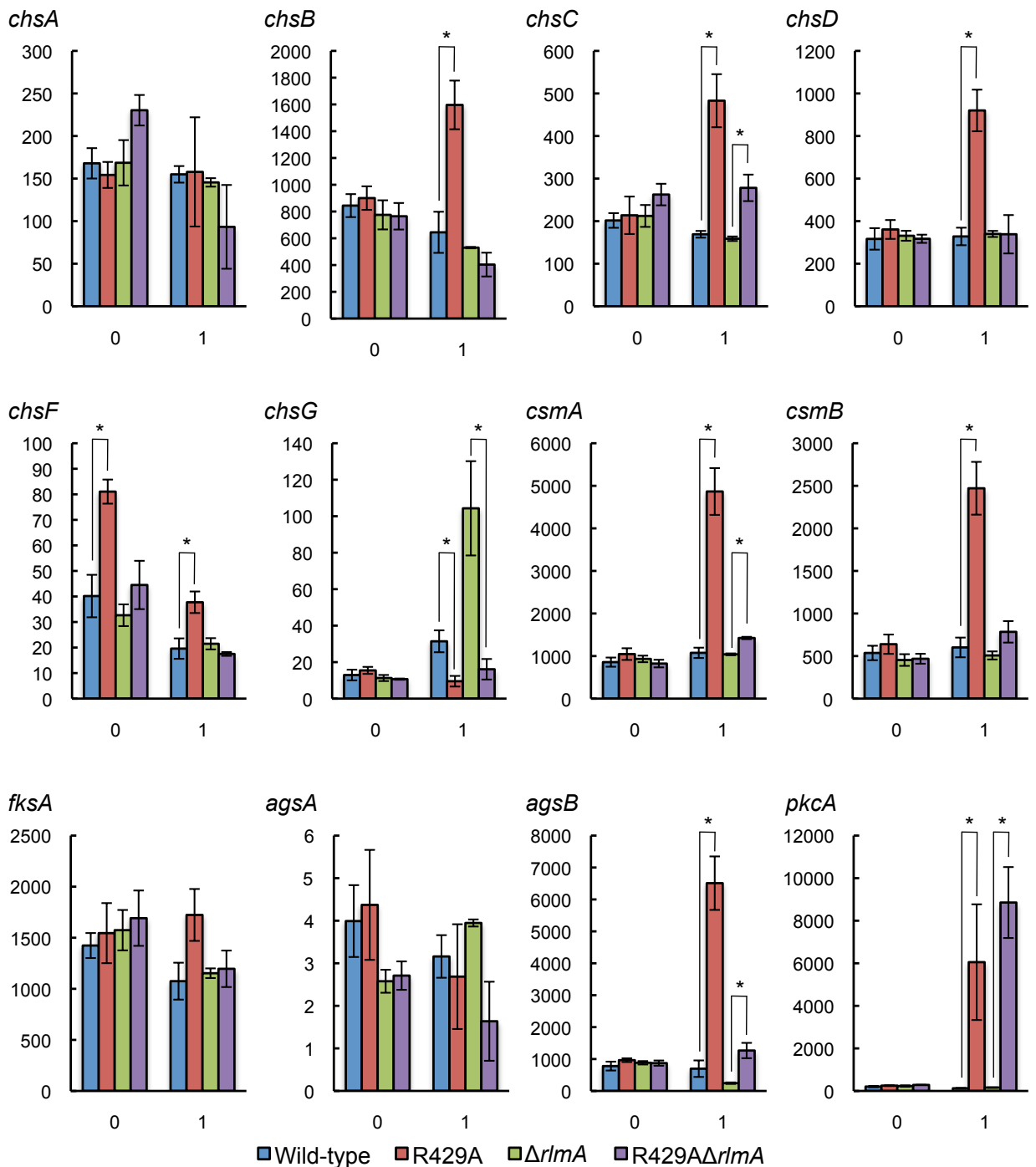


Fig. 1-10 PkcA(R429A)抑制条件で培養後、誘導条件に移した場合の細胞壁合成酵素遺伝子群の転写解析

A1149株 (Wild-type)、R429A-1株 (R429A)、 $\Delta rlmA$ -1株 ( $\Delta rlmA$ )、R429A $\Delta rlmA$ -1株 (R429A $\Delta rlmA$ ) の分生子 $10^6$ 個を $37^{\circ}\text{C}$ 、液体MMGpuu培地で20時間培養後、液体MMTpuu培地に移して各時間培養し全RNAを抽出した。横軸はMMTpuu培地に移した後の培養時間、縦軸は1 pgの全RNAあたりのコピー数を示した。独立した3回の実験を行い、エラーバーで標準誤差を示した。T-検定を行い、Wild-typeとR429Aまたは $\Delta rlmA$ とR429A $\Delta rlmA$ の間で有意差 ( $p < 0.05$ ) が認められたものを\*で示した。

Rlm1p結合配列 : CTA(T/A)<sub>4</sub>TA

*csmA*プロモーター : -653 CTGAATCAATATAGAATG -635  
-869 TATGACTATTTTAAGAACA -851  
-1022 TGACGCTAATATTGAATGA -1004

*chsB*プロモーター : -451 CGCACCTAAAGATACTGGA -433

*chsC*プロモーター : -386 GCCAACTATTTTCAGAATT -368

*chsD*プロモーター : -1142 GAGCACTATTTTTAGCGCC -1124  
-811 ATAGACTTATTTAAACAA -793

*csmB*プロモーター : -641 TGGGACTAGAAATAGGCCA -623

*agsB*プロモーター : -357 CGTGTTTATTCTTAGCAAT -339

Fig. 1-11 細胞壁合成酵素遺伝子のプロモーターにおけるRlm1p結合配列に類似する配列

Rlm1pの結合配列に類似する配列を赤枠で囲った。

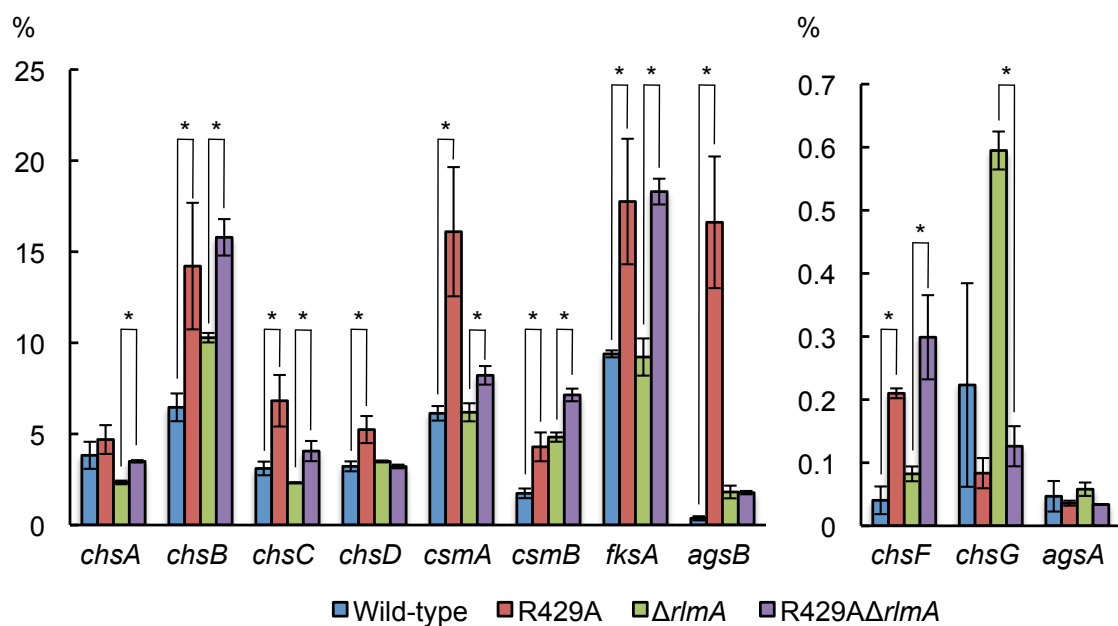


Fig. 1-12 *pkcA*(R429A)発現誘導条件で長時間培養した場合の細胞壁合成酵素遺伝子群の転写解析

A1149株 (Wild-type)、R429A-1株 (R429A)、 $\Delta rlmA$ -1株 ( $\Delta rlmA$ )、R429A $\Delta rlmA$ -1株 (R429A $\Delta rlmA$ ) の分生子 $10^6$ 個を37°C、セロファンを敷いた固体MMTFpuu培地で20時間培養後、全RNAを抽出した。縦軸はHistone H2Bをコードする遺伝子の転写量に対する相対値を百分率で示した。独立した3回の実験を行い、エラーバーで標準誤差を示した。T-検定を行い、Wild-typeとR429Aまたは $\Delta rlmA$ とR429A $\Delta rlmA$ の間で有意差 ( $p < 0.05$ ) が認められたものを\*で示した。

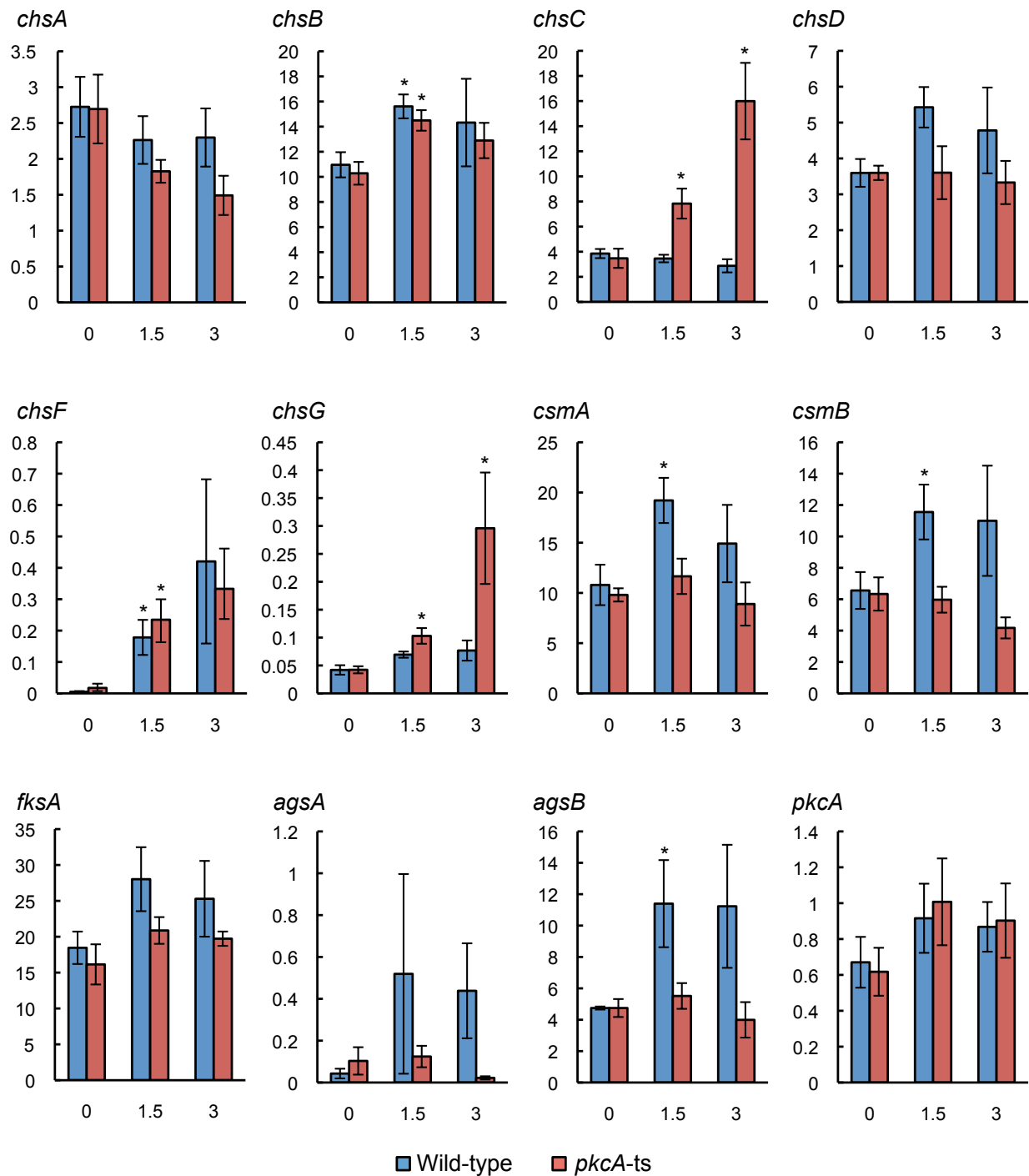


Fig. 1-13 *pkcA-ts*株を許容温度から制限温度に移した場合の細胞壁合成酵素遺伝子群の経時的転写解析

A1149株 (Wild-type)、*pkcA-ts*-2株 (*pkcA-ts*) の分生子 $10^6$ 個を $30^{\circ}\text{C}$ 、セロファンを敷いた固体MMGpuu培地で20時間培養後、 $42^{\circ}\text{C}$ に移して各時間培養し全RNAを抽出した。横軸は $42^{\circ}\text{C}$ に移した後の培養時間、縦軸はHistone H2Bをコードする遺伝子の転写量に対する相対値を百分率 (%) で示した。独立した4回の実験を行い、エラーバーで標準誤差を示した。T-検定を行い、それぞれの株において温度シフト前と比較して有意差 ( $p < 0.05$ ) が認められたものを\*で示した。

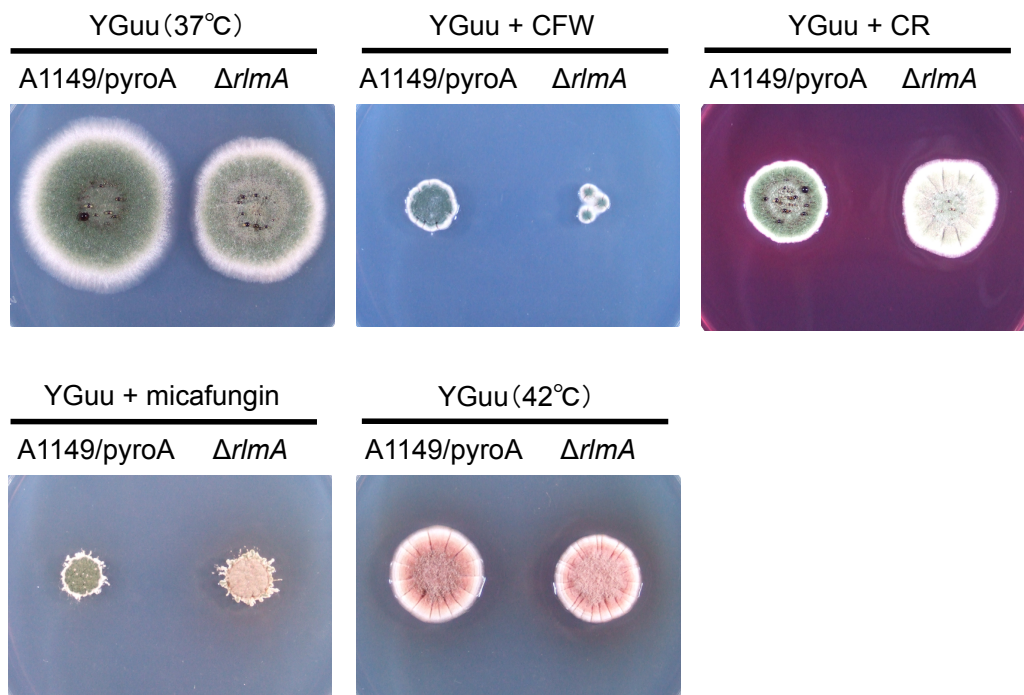


Fig. 1-14  $\Delta rlmA$ 株のストレス感受性

A1149/pyroA株 (Wild-type)、 $\Delta rlmA$ -1株 ( $\Delta rlmA$ ) の分生子 $10^3$ 個を37°Cまたは42°C、各薬剤を含む培地で72時間培養した。なお薬剤は30  $\mu$ g/ml calcofluor white (CFW)、100  $\mu$ g/ml Congo red (CR)、50 ng/ml micafunginを使用した。

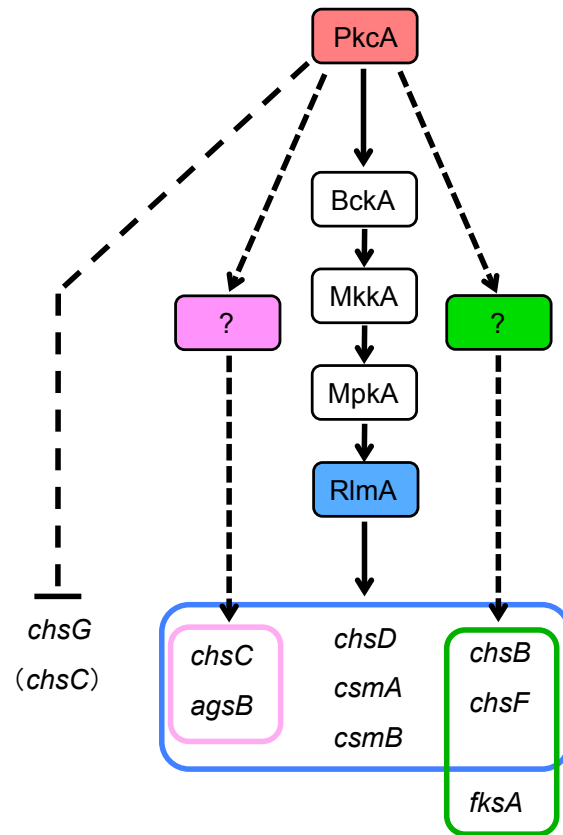


Fig. 1-15 PkcAによる細胞壁合成酵素遺伝子群の転写制御機構のモデル図

RlmA依存的にPkcAによって制御される遺伝子を青枠、*pkcA*(R429A)発現誘導条件でRlmA非依存的にPkcAによって制御される遺伝子を紫の枠、PkcA活性化条件で長時間培養した結果起こる細胞レベルでの変化のために起こった二次的影響により転写が誘導される、またはPkcAによる転写制御に時間がかかる可能性が考えられた遺伝子を緑枠で囲った。これまでの知見と本章の解析から示唆された機構を実線で示し、本章の解析からPkcAの関与が示唆されたがその詳細が不明な機構を破線で示した。