

第2章 高温条件における PkcA の機能解析

2-1. 序

序章で述べたように *Saccharomyces cerevisiae* の PKC である Pkc1p は細胞壁の完全性維持に必要とされ、*pkc1* 欠失株は浸透圧安定化剤のない条件では生育不能であるが、浸透圧安定化剤の存在によりその生育が支持される (Levin and Bartlett-Heubusch, 1992)。一方、*Aspergillus nidulans* の PKC である PkcA には真菌類の PKC において保存されている複数の領域が保存されている (一宮, 2004)。しかし、*S. cerevisiae* と異なり *pkcA* 欠失株は浸透圧安定化剤の存在する条件下でも生育不能であり、*pkcA* 温度感受性株 (*pkcA-ts* 株) も 42°C では生育することができないことから、PkcA は Pkc1p とは異なる生育に必須な機能を持つことが示唆されている (Fig. 1-8A) (Ichinomiya *et al.*, 2007、内田, 2008)。

アポトーシスは能動的に細胞死を誘導する機構であり、多細胞生物において不必要な細胞を除去することで適切な成長を保障するだけでなく、ウイルスの感染した細胞や DNA の損傷した細胞を除去することで生物に対する脅威を抑制すると考えられている。多細胞生物においてアポトーシスが誘導された細胞では細胞内における活性酸素種の蓄積、ホスファチジルセリンの細胞膜外層への露出、クロマチンの凝集、DNA の断片化などの特徴的な表現型が見られるが、これらの表現型は *S. cerevisiae* においても観察されている。また、ほ乳類においてアポトーシスに関連するタンパク質のオルソログが *S. cerevisiae* にも多数保存されていることが示唆されている (Carmona-Gutierrez *et al.*, 2010)。*A. nidulans* においてもアポトーシスを誘導する farnesol を用いた研究がなされているが、アポトーシスの詳細な制御機構についてはほとんど明らかとなっていない (Savoldi *et al.*, 2008、Dinamarco *et al.*, 2010、Colabardini *et al.*, 2010)。

細胞の方向性のある生長や形態変化は生物が増殖し、生長、分化する過程において必要不可欠なものである。*S. cerevisiae* では出芽時やフェロモン応答時に新たに極性が形成され、細胞の形態変化が起こる (Fig. 2-1) (Slaughter *et al.*, 2009)。この過程ではまず細胞の表層に存在するタンパク質により Rho-type GTPase である Cdc42p が部位特異的に活性化され、そこに極性形成に働くタンパク質が輸送される。これらは活性化された Cdc42p や Cdc42p 依存的に活性化される formin の働きにより重合されたアクチンによって極性形成部位に輸送される (Slaughter *et al.*, 2009)。*A. nidulans* は発芽管形成や分岐の形成、有性、

無性生殖器官の分化などの形態変化を伴う過程を有し、極性の形成はより厳密に制御されていると考えられる。*A. nidulans* の分生子発芽過程ではまず無極性生長により細胞が膨張し、その後ある時点において極性が形成されて発芽管が形成される (Fig. 2-2)。*A. nidulans* は Cdc42p のオルソログである ModA の他に極性形成に関わる Rho-type GTPase として RacA を持つ。ModA や RacA、Bni1p のオルソログである SepA の解析から、*A. nidulans* においても極性形成過程で ModA、RacA、SepA が重要な役割を担うと考えられている (Virag *et al.*, 2007, Sharpless and Harris, 2002)。しかしながら、ModA や RacA、SepA の詳細な制御機構は明らかとなっていない。

本章では高温条件における PkcA の機能解析を目的とし、まず *pkcA* 温度感受性株の高温条件における表現型を詳細に解析した。分生子発芽時に、アポトーシスが誘導された細胞に特徴的な表現型が見られたことから、PkcA がアポトーシス誘導の抑制に関わる機能をもつことが推定され、その機構について解析した。また、浸透圧安定化剤の存在によりアポトーシスの誘導は抑圧されるが、過度に膨張した細胞が見られたことから、Lifeact-EGFP を用いて F-アクチンの観察を行い、PkcA の極性形成に対する機能についても解析した。

2-2. 材料と方法

2-2-1. 本章で用いた菌株

Escherichia coli

DH5 α : F⁻, Φ 80d*lacZ* Δ M15, Δ (*lacZYA-argF*)U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*,
hsdR17(*r_K*⁻, *m_K*⁺), *phoA*, *supE44*, λ ⁻, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*

Saccharomyces cerevisiae

W303-1A : *MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100*

本章で用いた *A. nidulans* 菌株を Table 2-1 に示した。

2-2-2. 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 2-2 に示した。

2-2-3. 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⁺ (Stratagene)
pEGFP (CLONTECH)
pUCpyroA2 (小野, 2008) (第 1 章 1-2-3 参照)
pBSpyrG (本論文)
ppyrGLA (本論文)
pBSbckA (本論文)
pBSbckA Δ (本論文)
pbckA::pyroA (本論文)
pSBegfp (本論文)
ppyroA-GFP (本論文)
psepA3 (本論文)
pGFP-sepA3 (本論文)
psepAORF (本論文)
psepAOC (本論文)
psepA-GFP (本論文)

2-2-4. プラスミドの構築

・ pBSpyrG

FGSC A26 株の全 DNA を鋳型とし、pyrGF、pyrGR をプライマーとして使用して PCR により増幅した *pyrG* の ORF 全長を含む約 4.5 kbp の DNA 断片を *Bgl* II -*EcoR* V 消化して得られる約 3.5 kbp の DNA 断片と、pBluescript II SK⁺ を *Bam*HI - *EcoR* V 消化して得られる約 3.0 kbp の DNA 断片とを連結し、pBSpyrG を作製した。

・ ppyrGLA

alcA(p)-*pkcA*-3 株の全 DNA を鋳型とし、*ribo*BF、*alcApR* 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)) を連結した約 2.5 kbp の DNA 断片を PCR により増幅した。次に *S. cerevisiae* W303-1A 株の全 DNA を

鋳型とし、*alcA(p)-abp140*、*abp140R-link2* をプライマーとして使用して *ABP140* の 5'末 51 bp を含む約 0.1 kbp の DNA 断片を PCR により増幅した。さらに、*pEGFP* を鋳型とし、*link2-egfpF*、*BamHI-egfpR* をプライマーとして使用して *egfp* の ORF を含む約 0.7 kbp の DNA 断片 PCR により増幅した。これら 3 断片を鋳型とし、*riboBF*、*BamHI-egfpR* をプライマーとして使用して *alcA(p)* の直下流に、*ABP140* の 5'末 51 bp の 3'末端に *egfp* が連結した断片が連結した約 3.3 kbp の DNA 断片を PCR により増幅した。この DNA 断片を *BamH I - Nde I* 消化して得られる約 1.5 kbp の断片と *pBSpyrG* を *BamH I - Nde I* 消化して得られる約 6.5 kbp の断片を連結し、*ppyrGLA* を作製した。

- ・ *pBSbckA*

FGSC A26 株の全 DNA を鋳型とし、*5bckAF*、*3bckAR-2* をプライマーとして使用して PCR により増幅した *S.cerevisiae BCK1* のオルソログ *bckA (AN4887)* の ORF を含む約 9.9 kbp の DNA 断片を *Hind III - Sca I* 消化して得られる約 9.1 kbp の DNA 断片と *pBluescriptII SK+* を *Hind III - Sma I* 消化して得られる約 3.0 kbp の DNA 断片とを連結し、*pBSbckA* を作製した。

- ・ *pBSbckAΔ*

pBSbckA を *Bsp1407 I* 消化して得られる、*pBSbckA* から *bckA* の ORF を除いた約 6.7 kbp の DNA 断片を自己連結し、*pBSbckAΔ* を作製した。

- ・ *pbckA::pyroA*

pBSbckAΔ を *Bst1107 I* 消化して得られる約 6.7 kbp の DNA 断片と *pUCpyroA2* を *Bst1107 I - Aor51H I* 消化して得られる *pyroA* ORF 全長を含む約 2.3 kbp の DNA 断片を連結して *pbckA::pyroA* を作製した。

- ・ *pSBegfp*

pEGFP を鋳型とし、*Smaegfp*、*BamHI-egfpR* をプライマーとして使用して PCR により増幅した *egfp* の ORF を含む約 0.7 kbp の DNA 断片を *BamH I - Sma I* 消化して得られる約 0.7 kbp の DNA 断片と *pUC18* を *BamH I - Sma I* 消化して得られる約 2.7 kbp の DNA 断片とを連結し、*pSBegfp* を作製した。

- ・ ppyroA-GFP

pSBegfp を *Bam*H I - *Pst* I 消化して得られる約 3.4 kbp の DNA 断片と pUCpyroA2 を *Bam*H I - *Pst* I 消化して得られる約 2.7 kbp の DNA 断片とを連結し、ppyroA-GFP を作製した。

- ・ psepA3

FGSC A1149 株の全 DNA を鋳型とし、ERV-sepA3F、sepAR をプライマーとして使用して PCR により増幅した *sepA* の ORF 下流約 1.3 kbp の DNA 断片を *Eco*R V - *Sca* I 消化して得られる約 1.1 kbp の DNA 断片と pBluescript II SK⁺を *Eco*R V 消化して得られる約 3.0 kbp の DNA 断片とを連結し、psepA3 を作製した。

- ・ pGFP-sepA3

psepA3 を *Hind* III - *Eco*R V 消化して得られる約 1.1 kbp の DNA 断片と、ppyroA-GFP を *Hind* III - *Aor*51H I 消化して得られる約 5.1 kbp の DNA 断片とを連結し、pGFP-sepA3 を作製した。

- ・ psepAORF

FGSC A1149 株の全 DNA を鋳型とし、ERV-sepAF、ERV-sepAORFR をプライマーとして使用して PCR により増幅した *sepA* の ORF を含む約 5.4 kbp の DNA 断片を *Eco*R V 消化して得られる約 5.4 kbp の DNA 断片と pBluescript II SK⁺を *Eco*R V 消化して得られる約 3.0 kbp の DNA 断片とを連結し、psepAORF を作製した。

- ・ psepAOC

psepAORF を *Eco*R I 消化して得られる *sepA* の ORF を切り縮めた約 4.6 kbp の DNA 断片を自己連結し、psepAOC を作製した。

- ・ psepA-GFP

psepA-AOC を *Eco*R I - *Eco*R V 消化して得られる約 1.7 kbp の DNA 断片と pGFP-sepA3 を *Eco*R I - *Sma* I 消化して得られる約 6.2 kbp の DNA 断片とを連結し、psepA-GFP を作製した。

2-2-5. 本章で使用した *A. nidulans* 菌株の作製

2-2-5-1. *alcA(p)* 制御下で *lifeact-egfp* を発現する *A. nidulans* 菌株 (*alcA(p)-lifeact-egfp* 株) の作製

ppyrGLA (2-2-4 参照) を鋳型とし、pyrG5、pyrGRn をプライマーとして PCR により増幅した約 3.0 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。ウリジン及びウラシル要求性の回復した 2 株以上の形質転換体を取得し、これらの株の全 DNA を *EcoR* V 消化後、ppyrGLA を鋳型とし、pyrG5、pyrG3 をプライマーとして使用して PCR で増幅した約 0.9 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 4.7 kbp のバンドが検出されたのに対し、A1149 株由来の形質転換体 2 株、pkcA-ts-2 株由来の形質転換体 2 株では 5.8 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. 2-4)。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 A1149LA-1、-2、pkcA-ts-2 株由来の株については pkcA-tsLA-1、-2 と命名した。A1149LA-1、-2 あるいは pkcA-tsLA-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 A1149LA-1 および pkcA-tsLA-1 を用いて解析を行った。

2-2-5-2. *bckA* 欠失株の作製

pbckA::pyroA (2-2-4 参照) を *Hind* III、*Spe* I 消化して得られる約 6.2 kbp の DNA 断片を用い、A1149 株、A1149LA-1 株を親株として形質転換を行った。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、p**Δ**bckA を *Bst*1107 I、*Hind* III 消化して得られる約 0.8 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 2.0 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 3.2 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. 2-3)。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それぞれ **Δ**bckA-1、-2、A1149LA 株由来の株についてはそれぞれ **Δ**bckALA-1、-2 と命名した。**Δ**bckA-1、-2 あるいは **Δ**bckALA-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 **Δ**bckA-1、**Δ**bckALA-1 を用いて解析を行った。

2-2-5-3. N 末端に EGFP の連結した ModA を生産する株の作製

FGSC A1149 株の全 DNA を鋳型とし、*modA1*、*modAupR* をプライマーとして使用して *modA* の ORF 上流約 1.3 kbp の位置から約 2.4 kbp の位置までの約 1.1 kbp の DNA 断片 (断片 1) を、*modA(p)F*、*modA(p)R* をプライマーとして使用して *modA* の ORF 上流約 1.3 kbp (*modA* プロモーター領域) の DNA 断片 (断片 2) を、*modAORFF*、*modA4* をプライマーとして使用して *modA* の ORF と下流を含む約 2.0 kbp の DNA 断片 (断片 3) を PCR により増幅した。次に 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 (断片 4) を PCR により増幅した。さらに、pEGFP を鋳型と、5EGFPF、*egfpR-L1* をプライマーとして使用して *egfp* の ORF を含む約 0.9 kbp の DNA 断片 (断片 5) を PCR により増幅した。断片 1、2、5 を鋳型とし、*modA1*、*modA(p)R* をプライマーとして使用して *modA* プロモーター領域より上流の領域と *pyroA*、*modA* プロモーター領域がこの順番で連結した約 5.7 kbp の DNA 断片 (断片 6) を PCR により増幅した。次に断片 3、4 を鋳型とし、5EGFPF、*modA4* をプライマーとして使用して *modA* の 5' 末端に *egfp* が連結した約 2.9 kbp の DNA 断片 (断片 7) を PCR により増幅した。さらに、断片 6、7 を鋳型とし、*modA5*、*modA6* をプライマーとして使用して PCR により増幅した N 末端に EGFP の連結した ModA を生産する株を作製するため約 7.5 kbp の DNA 断片を用い、A1149 株を親株として形質転換を行った。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、これらの全 DNA を *Nco* I 消化後、FGSC A1149 株の全 DNA を鋳型とし、*modA1*、*modAupR* をプライマーとして使用して PCR により増幅した約 1.1 kbp の DNA 断片をプローブとしてサザン解析を行った。A1149 株では約 4.6 kbp のバンドが検出されたのに対し、形質転換体では約 7.5 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. 2-4)。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 WEM-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 WEM-1 を用いて解析を行った。

2-2-5-4. C 末端に EGFP の連結した SepA を生産する株の作製

psepA-GFP (2-2-4 参照) を *Eco*R I - *Pma*C I 消化して得られる約 5.3 kbp の

DNA 断片を用い、A1149 株を親株として形質転換を行った。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、これらの全 DNA を *EcoR* I 消化後、psepA3 を *Bgl* II 消化して得られる約 0.6 kbp をプローブとしてサザン解析を行った。A1149 株では約 4.2 kbp のバンドが検出されたのに対し、形質転換体では約 7.0 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. 2-5)。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。これらの形質転換体を SepA-EGFP-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 SepA-EGFP-1 を用いて解析を行った。

2-2-6. PCR

2-2-7. 培地

2-2-8. DNA の取扱法

2-2-9. 塩基配列の決定法

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

2-2-11. *A. nidulans* の形質転換法

2-2-12. *A. nidulans* からの全 DNA の抽出法

2-2-13. サザン解析

以上の項目は第 1 章「1-2. 材料と方法」に示した方法で行った。

なお「2-2-7. 培地」では *alcA*(p)を用いて遺伝子発現を誘導する際に「1-2-7. 培地」に示した培地に加え、炭素源を Glucose から 100 mM の threonine に変更した完全培地 (YT 培地) を使用した。

2-2-14. *S. cerevisiae* からの全 DNA の抽出法

S. cerevisiae からの全 DNA の抽出には Gen とるくん™ (酵母用) を用い、使用法はその説明書に従った。

2-2-15. 蛍光顕微鏡観察

蛍光顕微鏡観察では、必要に応じて以下の試薬を用いた。

4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Wako)

2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCFDA, invitrogen)

核の染色には、蒸留水または TBS で 50 µg/ml に調製した DAPI 溶液を用いた。各条件、1 ml の液体培地で培養した菌体を 70%エタノールで -20°C、一晚固定した。その後遠心により菌体を回収し、1 ml の蒸留水または TBS で洗浄後、DAPI 溶液を 50 µl 加え、暗所で 5 分間染色した。これを 1 ml の蒸留水または TBS で洗浄し、顕微鏡観察に供した。細胞内の活性酸素種 (Reactive oxygen species (ROS)) の検出には、ジメチルスルホキシド (DMSO) で 1 mM に調製した H₂DCFDA を用いた。H₂DCFDA は安定に細胞内に保持され、酸化されることによって蛍光を発するため、細胞内の活性酸素の検出に用いられる。各条件、1 ml の液体培地で培養した菌体を 200 µl の TBS で洗浄後、200 µl の TBS に懸濁した。これに 1 mM の H₂DCFDA を 2 µl 加え、30°C で 3 時間インキュベートした。その後、これを 200 µl の TBS で 2 回洗浄し、20 µl の MOPS7 buffer (0.1 M MOPS-NaOH (pH 7.0)) に懸濁して顕微鏡観察に供した。

観察には落射蛍光顕微鏡 (BX52、Olympus) を用い、観察像は冷却 CCD カメラ ORCA-ER (浜松ホトニクス) を用いて取込み、AQUACOSMOS 基本ソフトウェア (浜松ホトニクス) を用いて解析した。

TBS の組成は「1-2-16. ウェスタン解析」に示した。

2-2-16. FACS 解析

各条件、1 ml の液体培地培養した菌体を 70%エタノールで -20°C、一晚固定した。その後、遠心により菌体を回収し、1 ml の 50 mM クエン酸溶液で洗浄後、10 µg/ml の RNase A を含む 50 mM クエン酸溶液を 500 µl 加え、37°C で 4 時間静置した。その後、16 µg/ml のヨウ化プロピジウムを含む 50 mM クエン酸溶液を 500 µl 加え、4°C で 1 時間以上インキュベートした。この上清を遠心により取り除き、1 ml の PBS で 2 回洗浄した後、1 ml の PBS に懸濁して FACStar fluorescence-activated cell sorter (Becton Dickinson) による解析に供した。

それぞれの溶液の組成は以下の通りである。

PBS

| | |
|----------------------------------|--------|
| NaCl | 8.0 g |
| KCl | 0.2 g |
| Na ₂ HPO ₄ | 1.44 g |
| KH ₂ PO ₄ | 0.24 g |

Distilled water

up to 1000 ml

2-2-17. 生菌率測定法

希釈管に入れた 5 ml の液体培地に 10^7 個の分生子を植菌し、0~6 時間振盪培養した。その後、水で 10^3 個/ml となるように希釈し、この溶液 100 μ l を固体 YGuu 培地にプレーティングして 30°C で一晩培養した。形成されたコロニー数を計測した。

2-2-18. TUNEL assay

TUNEL assay は Terminal deoxynucleotidyl transferase を用い、DNA の断片化によって生じる 3'遊離ヒドロキシル基に標識ヌクレオチドを付加することで、断片化 DNA を標識し、可視化する手法である。150 μ l の液体培地に約 10^6 個の分生子を植菌し、カバーガラス上で静置培養した。その後、カバーガラスに付着した菌体を 200 μ l の PBS で 3 度洗浄し、2%パラホルムアルデヒドを含む 200 μ l の PBS を滴下し、室温で 1 時間固定した。200 μ l の PBS で 2 度洗浄後、200 μ l の消化酵素液 (3 mg/ml Yatalase、1 mg/ml LYSING ENZYME、10 mg/ml EGG WHITE) を滴下し、室温で 1 時間静置した。200 μ l の PBS で 2 度洗浄後、100 μ l の浸透化溶液 (0.1% クエン酸ナトリウム、0.1% Triton X-100) を滴下し、室温で 10 分間静置した。200 μ l の PBS で 2 度洗浄後、50 μ l の TUNEL reaction (Roche) mixture を滴下し、37°C、暗所で 1 時間静置した。200 μ l の PBS で 2 度洗浄後、50 μ l の 50 μ g/ml DAPI 溶液を滴下し、暗所で 5 分間静置した。200 μ l の PBS で 2 度洗浄後、カバーガラスをスライドガラスにかぶせ、顕微鏡観察を行った。

2-3. 結果

2-3-1. 高温条件における *pkcA-ts* 株の生菌率

高温条件において PkcA の担う生育に必須な機能について詳細に解析するため、まず野生型株、*pkcA-ts* 株の分生子を 42°C、液体 YGuu 培地で培養した場合の生菌率を経時的に測定した。この結果、*pkcA-ts* 株では培養 3 時間後に著しい生菌率の低下が見られた (Fig. 2-7)。このことから、高温条件において PkcA は発芽初期に生育に必須な機能を担うことが示唆された。

2-3-2. 高温条件における *pkcA-ts* 株の分生子の発芽時の形態および核分裂

高温条件において *PkcA* が発芽初期に生育に必須な機能を担うことが示唆されたため、野生型株、*pkcA-ts* 株の分生子を 42°C、液体 YGuu 培地で 5 時間培養した場合の細胞の形態を観察した。野生型株の分生子では無極性生長とそれに続く発芽管形成が見られたのに対し、*pkcA-ts* 株の分生子では無極性生長が途中で停止し、発芽管の形成は見られなかった (Fig. 2-8)。さらに、*pkcA-ts* 株の一部の細胞では溶菌している様子が観察された (Fig. 2-8 矢頭)。これらの結果から、*pkcA-ts* 株では発芽時の無極性生長が正常に行われないと考えられた。

高温条件において *pkcA-ts* 株の分生子では無極性生長が停止するという表現型が見られたことから、細胞周期が正常に進行しない可能性が考えられた。そこで、42°C、液体 YGuu 培地で 5 時間振盪培養した野生型株、*pkcA-ts* 株の核を DAPI で染色して観察した。野生型株では複数の核をもつ細胞が観察されたのに対し、*pkcA-ts* 株では一つの核をもつ細胞しか観察されなかった (Fig. 2-8)。このことから、高温条件において *pkcA-ts* 株では発芽時に核分裂が起こらないことが示唆された。

2-3-3. 高温条件における *pkcA-ts* 株の DNA 複製

高温条件において *pkcA-ts* 株では発芽時に核分裂が起こらないことが示唆された。次に、高温条件において *pkcA-ts* 株で DNA 複製が正常に行われるかどうか検討するため、42°C、液体 YGuu 培地で 0~5 時間培養した野生型株、*pkcA-ts* 株の細胞における DNA 含量あたりの細胞数を FACS 解析により測定した。野生型株では培養 3 時間後から DNA 複製が起こったと考えられる 2n の細胞数の増加が見られ、培養 5 時間後にはさらに DNA 複製が行われたと考えられる 4n の細胞数の増加が見られた (Fig. 2-9)。これに対し、*pkcA-ts* 株では 2n や 4n の細胞数の増加が見られず、培養 2 時間後以降で DNA 含量が n 未満の細胞数の増加が見られた (Fig. 2-9)。このことから、高温条件で *pkcA-ts* 株を培養した場合、DNA 複製は起こらず、DNA が分解し、核分裂が起こらないことが示唆された。

2-3-4. 高温条件における *pkcA-ts* 株でのアポトーシス誘導の検討

DNA の分解はアポトーシスが誘導された細胞で見られる特徴的な表現型の一つであることから、高温条件において *pkcA-ts* 株ではアポトーシスが誘導される可能性が考えられた。様々な真核生物においてアポトーシスが誘導された場合

に、細胞内における ROS の蓄積や DNA の断片化といった特徴的な表現型が見られることが示されている (Carmona-Gutierrez *et al.*, 2010)。そこで、高温条件で培養した *pkcA-ts* 株においてこれらの表現型が見られるかどうか検討した。細胞内における ROS の蓄積、DNA の断片化はそれぞれ H₂DCFDA、TUNEL assay により検出した。また、これまでに *A. nidulans* においてアポトーシスを誘導することが知られている farnesol で処理した細胞をポジティブコントロールとして用いた。野生型株、*pkcA-ts* 株の分生子を 42°C、液体 YG_{uu} 培地で培養し、細胞内の ROS の蓄積、DNA の断片化について検討したところ、野生型株では ROS が蓄積した細胞の割合が 20%以下であり DNA の断片化もほとんど検出されなかったのに対し、*pkcA-ts* 株とポジティブコントロールでは ROS の蓄積した細胞の割合が 70%以上であり DNA の断片化も検出された (Fig. 2-10、11)。これらの結果から、高温条件において発芽初期に PkcA がアポトーシス誘導の抑制に関与することが示唆された。

2-3-5. 高温条件における *bckA* 欠失株、*mpkA* 欠失株の表現型

S. cerevisiae の Pkc1p は CWI 経路において Bck1p、Mkk1p/2p、Slit2p からなる MAP キナーゼカスケードを活性化することが示されている。*A. nidulans* におけるこれらのオルソログが高温条件におけるアポトーシス誘導の抑制に関与するかどうか検討するため、*BCK1* のオルソログである *bckA* (AN4887) の欠失株を 2-2-5-2 に示した方法で作製した。

bckA 欠失株のコロニーの形態を観察するため、野生型株、*bckA* 欠失株の分生子 10³ 個を個体 YG_{uu} 培地および 1.2 M のソルビトールを含む個体 YG_{uu} 培地にスポット植菌し、37°C、42°C で 72 時間培養した。固体 YG_{uu} 培地において 37°C では *bckA* 欠失株のコロニーは野生型株と比べて著しく小さく、分生子の形成がほとんど見られず、42°C では *bckA* 欠失株はコロニーを形成しなかった (Fig. 2-12A)。1.2 M のソルビトールを含む個体 YG_{uu} 培地において 37°C では *bckA* 欠失株の生育、分生子形成能に回復が見られ、42°C でも *bckA* 欠失株はコロニーを形成したが、どちらの温度においても野生型株のコロニーより小さかった (Fig. 2-12A)。

これまでに内田により *S. cerevisiae* の *SLT2* のオルソログである *mpkA* の欠失株が作製されているが、その高温条件における表現型解析はなされていなかった (内田, 2008)。そこで、*bckA* 欠失株の場合と同様の培養条件で *mpkA* 欠失

株のコロニーの形態観察を行った。その結果、それぞれの温度、培地における *mpkA* 欠失株のコロニー形態は *bckA* 欠失株と同様であった (Fig. 2-12B)。これらの結果から、浸透圧安定化剤のない場合 BckA、MpkA は高温条件における生育に必須であることが示唆された。

2-3-6. 高温条件で培養した *bckA* 欠失株、*mpkA* 欠失株におけるアポトーシスの誘導

42°Cにおいて YGuu 培地では *bckA* 欠失株、*mpkA* 欠失株は生育不能であったため、このときこれらの株においてアポトーシスが誘導されている可能性が考えられた。そこでまず 42°C、液体 YGuu 培地で 5 時間振盪培養した野生型株、*bckA* 欠失株、*mpkA* 欠失株の核を DAPI で染色して観察した。野生型株では複数の核をもつ細胞が観察されたのに対し、*bckA* 欠失株、*mpkA* 欠失株では一つの核をもつ細胞しか観察されなかった (Fig. 2-13)。さらに、*bckA* 欠失株、*mpkA* 欠失株の分生子を 42°C、液体 YGuu 培地で培養し、細胞内の ROS の蓄積、DNA の断片化について検討したところ、これらの変異株において ROS の蓄積した細胞の割合が 60%以上であり DNA の断片化も検出された (Fig. 2-14、15)。これらの結果から、BckA、MpkA も高温条件におけるアポトーシス誘導の抑制に関与することが示唆された。

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

高温条件において発芽時の *pkcA-ts* 株では DNA の複製が起こっていなかったことから、この株で見られるアポトーシスは DNA 複製が起こらないために誘導される可能性が考えられた。そこで 42°Cにおいて、DNA 合成を阻害するヒドロキシ尿素 (HU) を含む液体 YGuu 培地で 0~5 時間培養した野生型株、*pkcA-ts* 株の細胞における DNA 含量あたりの細胞数を FACS 解析により測定した。野生型株では培養 5 時間後まで DNA 含量が 2n の細胞数も n 未満の細胞数も増加しなかった (Fig. 2-16)。*pkcA-ts* 株では HU を含まない培地で見られたパターンと同様に培養 2 時間後以降で DNA 含量が n 未満の細胞数の増加が見られた (Fig. 2-16)。さらに、42°C、HU を含む液体 YGuu 培地で 4 時間培養した場合の細胞内の ROS の蓄積、8 時間培養した場合の DNA の断片化について検討したところ、*pkcA-ts* 株では ROS の蓄積した細胞の割合が 60%以上であり DNA の断片化も検出されたが、野生型株ではこれらの表現型を示す蛍光は検出されなかつ

た (Fig. 2-17、18)。これらの結果から、高温条件において DNA 複製阻害はアポトーシスを誘導しないことが示唆された。

2-3-8. 37°Cにおける *pkcA-ts* 株でのアポトーシス誘導の検討

pkcA-ts 株を 37°Cで培養した時 MpkA-FLAG のリン酸化レベルが野生型株より低かったことから (第 1 章参照、Fig. 1-8C)、この株では 37°Cにおいてもアポトーシスが誘導されている可能性が考えられた。37°C、液体 YGuu 培地で 0~5 時間培養した *pkcA-ts* 株の細胞における DNA 含量あたりの細胞数を FACS 解析により測定したところ、DNA 含量が n 未満の細胞数の増加は見られず、培養 5 時間後までに DNA 含量が $2n$ 、 $4n$ 、 $8n$ の細胞数の増加が見られた (Fig. 2-19)。さらに *pkcA-ts* 株の分生子を 37°C、液体 YGuu 培地で培養した場合には、ROS の蓄積した細胞の割合が 20%未満であり DNA の断片化を示す蛍光はほとんど見られなかった (Fig. 2-20、21)。さらに、37°Cにおいて細胞壁ストレス、小胞体ストレスがアポトーシスを誘導するかどうか検討した。その結果、calcofluor white、Congo red、micafungin 処理による細胞壁ストレス時、dithiothreitol 処理による小胞体ストレス時に細胞内に ROS の蓄積した細胞の著しい増加は見られなかった (Fig. 2-22)。しかし、micafungin で処理した場合に ROS の蓄積した細胞数がやや増加していた。

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

A. fumigatus において MKK1/2 のオルソログである *mkk2* の欠失株や SLT2 のオルソログである *mpkA* の欠失株は farnesol 高感受性を示すことが示されている (Dichtl, et al., 2010)。このことから、*A. nidulans* において PkcA および CWI 経路の MAP キナーゼカスケードが farnesol によって誘導されるアポトーシスの抑制にも関与する可能性が考えられる。そこで、*pkcA-ts* 株、*bckA* 欠失株、*mpkA* 欠失株の farnesol 感受性を検討した。その結果、*pkcA-ts* 株で PkcA が部分的に失活すると考えられる 37°Cにおいて *pkcA-ts* 株は farnesol に高感受性を示し、また *bckA* 欠失株、*mpkA* 欠失株も farnesol に高感受性を示した (Fig. 2-23)。これらのことから、*A. nidulans* において PkcA および CWI 経路の MAP キナーゼカスケードが farnesol によって誘導されるアポトーシスの抑制にも関与することが示唆された。

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

bckA や *mpkA* の欠失株は 42°C、YGuu 培地では生育できず、この条件ではアポトーシスの誘導が見られた (Fig. 2-12 ~ 2-15)。しかし、これらの株は 1.2 M のソルビトールを添加した YGuu 培地では 42°C で生育が可能であった (Fig. 2-12)。このことから、高温条件においてこれらの株で見られるアポトーシスの誘導は培地に浸透圧安定化剤を添加することにより抑制されることが示唆された。そこで、*pkcA-ts* 株においても同様にアポトーシスの誘導が抑制されるかどうか検討するため、42°C、1.2 M のソルビトールを含む液体 YGuu 培地で 0~8 時間培養した *pkcA-ts* 株の細胞における DNA 含量あたりの細胞数を FACS 解析により測定した。この結果、*pkcA-ts* 株において培養 4 時間後から DNA 含量が n 未満の細胞が見られたが、その後培養 8 時間後まで著しい増加は見られず、DNA 複製が起こったことを示す DNA 含量が $2n$ や $4n$ の細胞数の増加がみられた (Fig. 2-24)。このことから *pkcA-ts* 株を 42°C で培養した場合においても、浸透圧安定化剤の添加によりアポトーシスの誘導は大きく抑圧されることが示唆された。

次に、この条件において *pkcA-ts* 株で核分裂が起こるかどうか検討した。42°C、1.2 M のソルビトールを含む液体 YGuu 培地で 9 時間振盪培養した菌体の核を DAPI で染色して観察したところ、*pkcA-ts* 株では過度に肥大化した細胞が見られ、一部の細胞は溶菌していたが、肥大化した細胞では複数の核が見られた (Fig. 2-25A)。これらの細胞において 1 細胞あたりの核の数を計数したところ、野生型株と *pkcA-ts* 株との間で差が見られなかったことから、この条件において *pkcA-ts* 株では核分裂が正常に起こることが示唆された (Fig. 2-25B)。これらの結果から、浸透圧安定化剤が存在する場合、高温条件において *pkcA-ts* 株でもアポトーシスの誘導が抑圧されることが示唆された。しかしながら、*pkcA-ts* 株は 42°C、1.2 M のソルビトールを含む固体 YGuu 培地においてコロニーを形成しない (Fig. 1-8A)。従って高温条件において PkcA はアポトーシス誘導の抑制以外に生育に必須な機能を有すると考えられた。*pkcA-ts* 株の分生子を 42°C、1.2 M のソルビトールを含む液体 YGuu 培地で 9 時間振盪培養した場合に、過度に肥大化した細胞が観察され、それらの細胞では異常な形態の発芽管の形成が見られたことから、高温条件において *pkcA-ts* 株では発芽過程における極性の形成に異常が生じている可能性が考えられた (Fig. 2-25A 矢頭)。

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

様々な生物においてアクチンの重合は極性の確立に必要であり、単量体アクチンの重合体である F-アクチンの形成は極性の指標とされている。そのため、生細胞においてアクチンを観察することで、高温条件における PkcA の極性形成に関わる機能の解析に繋がると考えられた。*A. nidulans* のアクチンである ActA に GFP を付加したタンパク質を生産する株では生育が悪化することが知られている (Upadhyay and Shaw, 2008)。そこでレポーターを用いて間接的に F-アクチンを観察することとした。*S. cerevisiae* のアクチン結合タンパク質 Abp140p の N 末端 17 アミノ酸 (Lifeact) は F-アクチン特異的に結合することが示されており、哺乳細胞において GFP が付加された Lifeact は F-アクチンの効率的なレポーターとして用いられている (Riedl *et al.*, 2008)。糸状菌 *N. crassa* においても C 末端に GFP が付加された Lifeact-GFP を用いた生細胞における F-アクチンの観察がなされている (Berepiki *et al.*, 2010、Delgado-Alvarez *et al.*, 2010、Roca *et al.*, 2010)。以上の知見を基に *lifeact-egfp* を *alcA(p)* 制御下で発現する Lifeact-EGFP 株を 2-2-5-1 に示した方法で作製した。

37°C、*alcA(p)* による発現を抑制する YG_{uu} 培地または *alcA(p)* による発現を誘導する YTF_{uu} 培地で Lifeact-EGFP 株を培養したところ、どちらの培地においてもこの株のコロニーの形態は野生型株と同様であった (Fig. 2-26A)。従って、Lifeact-EGFP の高生産は生育に影響を与えないことが示唆された。次にこの株を用い、生育の様々な時期における Lifeact-EGFP の観察を行った。ただし発芽時において Lifeact-EGFP を観察する際にはフルクトースによって *alcA(p)* が抑制されるのを避けるため YT_{uu} 培地を、菌糸生長時にはバックグラウンドを低減するために MMTF_{puu} 培地を用いた。Lifeact-EGFP は分生子の無極性生長時には細胞質中にドット状またはフィラメント状に見られ、発芽管形成時や菌糸生長時には発芽管や菌糸の先端においてスポット状、細胞質中にフィラメント状に見られた (Fig. 2-26B)。加えて Lifeact-EGFP は形成中と考えられる隔壁においても観察された (Fig. 2-26B)。*A. nidulans* ではこれまでに抗アクチン抗体を用いた間接蛍光抗体法や、アクチン結合性タンパク質などを用いたアクチンの細胞内観察が行われている (Harris *et al.*, 1994、Torralba *et al.*, 1998、Araujo-Bazan *et al.*, 2008)。今回観察された Lifeact-EGFP の局在はこれらの手法により観察されたアクチンの局在と類似していた。また、アクチン重合阻害剤である cytochalasin A を処理することにより菌糸先端における Lifeact-EGFP

の蛍光が消失した (Fig. 2-26C) これらのことから *A. nidulans* においても Lifeact-EGFP は F-アクチンのレポーターとして使用できると考えられた。

2-3-12. 高温条件における *pkcA-ts* 株での発芽時の Lifeact-EGFP の観察

PkcA の不活性化が F-アクチンの局在に与える影響について検討するため、*lifeact-egfp* を発現する *pkcA-ts* 株、 $\Delta bckA$ 株を 2-2-5-1、-2 に示した方法で作製し、42°C、0.6 M の KCl を含む液体 YTu0 培地で 6 時間または 8 時間振盪培養した場合の Lifeact-EGFP の観察を行った。この際、バックグラウンドを低減するために浸透圧安定化剤としてソルビトールの代わりに 0.6 M の KCl を使用した。野生型株では発芽管先端にスポット状、細胞質中にフィラメント状に Lifeact-EGFP が観察された (Fig. 2-27A)。*pkcA-ts* 株では培養 6 時間後には細胞質中にドット状に Lifeact-EGFP が観察されたが、この蛍光強度は野生型株のものに比べて弱いものであった (Fig. 2-27B)。また、細胞質中のフィラメント状の Lifeact-EGFP は観察されなかった。さらに、培養 8 時間後には Lifeact-EGFP の蛍光は細胞質中に拡散していた (Fig. 2-27A)。これらのことから PkcA は高温条件において発芽時の極性形成に必要であることが示唆された。 $\Delta bckA$ 株では発芽管先端にスポット状、細胞質中にフィラメント状に Lifeact-EGFP が観察された (Fig. 2-27A)。 $\Delta bckA$ 株における Lifeact-EGFP の局在は野生型株のものに類似していた。従って、高温条件における発芽時の極性形成には BckA を含む MAP キナーゼカスケードは必要ではないことが示唆された。

2-3-13. *pkcA-ts* 株における高温ストレス時の菌糸先端での Lifeact-EGFP の観察

PkcA の菌糸生長時の極性維持への関与について検討するため、Lifeact-EGFP を発現する野生型株、*pkcA-ts* 株、 $\Delta bckA$ 株を 30°C で培養後、42°C に移した場合の Lifeact-EGFP の局在を観察した (Fig. 2-28)。この際、*pkcA-ts* 株では温度シフト後に菌糸の生長が止まり、菌糸先端が膨張する様子が見られた。野生型株では、温度シフト前には菌糸先端にスポット状、細胞質中にフィラメント状に観察されていた Lifeact-EGFP が温度シフト後 15 分以内にほとんど見られなくなり、温度シフト後 60 分後から再び観察された。*pkcA-ts* 株では野生型株で観察されたように、温度シフト後 15 分以内に菌糸先端における Lifeact-EGFP の局在は消失した。しかしその後、温度シフト 120 分後まで局所的な Lifeact-EGFP の蛍光は観察されなかった。30°C で培養した *pkcA-ts* 株を 42°C に

移して 1 時間培養後、再び 30°C に移して培養したところ、膨張した菌糸先端から菌糸生長が再開し、42°C にシフトした後に消失していた局所的な Lifeact-EGFP の蛍光も再び観察された (Fig. 2-29)。このことから、*pkcA-ts* 株は 42°C にシフトして 1 時間後にはまだ生きており、42°C に Lifeact-EGFP の蛍光の再出現が見られないのは細胞が死んだためではないことが示唆された。また、 $\Delta bckA$ 株においても 42°C シフト後に一時的な Lifeact-EGFP の蛍光の消失、その後の再出現が観察された (Fig. 2-28)。これらのことから、PkcA は高温ストレス時の一時的な脱極性化後の再極性化に必要であり、BckA は必要ではないことが示唆された。

2-4. 考察

本章ではまず *pkcA-ts* 株を 42°C で培養した場合、核分裂異常、DNA 分解、細胞内 ROS の蓄積、DNA の断片化などアポトーシスが誘導された細胞に特徴的な表現型が見られたことから、高温条件において PkcA がアポトーシスの誘導を抑制する機能を持つことを示唆した。また、培地に浸透圧安定化剤を添加することにより核分裂異常、DNA 分解の表現型が抑圧されることから、浸透圧安定化剤の存在によりアポトーシスの誘導が抑圧されることを示唆した。次に *pkcA-ts* 株を 42°C、浸透圧安定化剤を添加した培地で培養した場合の F-アクチンの局在観察から PkcA が発芽管形成時の極性の確立に必要であることを示唆した。また、高温ストレス時の菌糸先端における F-アクチンの動態観察の結果、*pkcA-ts* 株では高温ストレス時に一度消失した菌糸先端の F-アクチンの再出現が見られないことから、PkcA が高温条件における菌糸内での脱極性化後の再極性化に必要であることが示唆された。さらに、*bckA* 欠失株、*mpkA* 欠失株を用いた解析により、*bckA* 欠失株、*mpkA* 欠失株を 42°C、浸透圧安定化剤を含まない条件下で培養した場合にもアポトーシスが誘導されることを示唆した。一方、*bckA* 欠失株では 42°C でもアクチンの動態に異常が見られなかった。これらのことから PkcA のアポトーシス誘導の抑制に関わる機能は BckA を含む MAP キナーゼ経路に依存し、アクチンの局在に関連する機能はこの経路に依存しないことが示唆された。また、CWI 経路において BckA、MpkA の下流で機能すると考えられる RlmA については、第 1 章で示したように *rlmA* 欠失株が 42°C において野生型株と同等の生育を示すことから、RlmA はアポトーシス誘導の抑制には関与しないことが示唆される。これらの結果をまとめたモデル図を Fig. 2-30

に示した。

以下で高温条件における PkcA のアポトーシスの誘導の抑制、極性形成に関わる機能について考察する。

2-4-1. PkcA のアポトーシス誘導の抑制に関わる機能

今回、*pkcA-ts* 株、*bckA* 欠失株、*mpkA* 欠失株を、浸透圧安定化剤が存在しない条件において 42°C で培養したときにアポトーシスが誘導されたことから、高温条件において CWI 経路が活性化しないとアポトーシスが誘導されることが示唆された。培地に DNA 合成阻害剤であるヒドロキシ尿素を加えた条件で野生型株を 42°C で培養してもアポトーシスの誘導を示す表現型は見られなかったことから、アポトーシスは DNA 合成の異常によって誘導されたものではないことが示唆された。一方、*pkcA-ts* 株、*bckA* 欠失株、*mpkA* 欠失株を、浸透圧安定化剤を含む条件において 42°C で培養したとき、アポトーシスの誘導を示す表現型が抑圧されることから、細胞壁ストレスがアポトーシスの誘導に関与する可能性が考えられる。37°C において micafungin 処理時に *pkcA-ts* 株で ROS の蓄積した細胞数がやや増加したことはこの可能性を支持するが、CFW、CR 処理では ROS の蓄積が起こらないことと、アポトーシスの抑制には RlmA は関与しないことが示唆されたことなどから、細胞壁の修復に関わる経路とは一部異なることが考えられる。

S. cerevisiae では高温ストレス時にトレハロースが蓄積することによって細胞内の膨圧が上昇し、その結果 CWI 経路が活性化すると考えられている (Levin, 2005)。*A. nidulans* にはこの経路に関わる遺伝子のオルソログが保存されていることから、*A. nidulans* にも *S. cerevisiae* と同様の CWI 経路の活性化機構が存在すると考えられる。*A. fumigatus* ではアポトーシスを誘導することが知られる farnesol は *S. cerevisiae* の Rho1p のオルソログである Rho1 の菌糸先端からの脱局在化によって CWI 経路の活性化を阻害することが示唆されている。加えて、*A. fumigatus* では *S. cerevisiae* の MKK2、SLT2 のオルソログである *mkk2*、*mpkA* の各欠失株は farnesol に高感受性を示すことが明らかにされている (Dichtl *et al.*, 2009)。本研究において、*pkcA-ts* 株が 37°C において farnesol 高感受性を示すこと、*bckA* 欠失株、*mpkA* 欠失株も farnesol 高感受性を示すことが明らかにされたことから、*A. nidulans* において PkcA および CWI 経路の MAP キナーゼカスケードは高温条件で誘導されるアポトーシスだけでなく farnesol によって誘導

されるアポトーシスの抑制にも関与することが示唆された。

A. fumigatus において MpkA は細胞内 ROS の除去に関わるカタラーゼ (Cat1) やマンガンスーパーオキシドジスムターゼ (MnSOD)、酸化ストレス耐性に寄与する non-ribosomal peptide synthase (NRPS) をコードする遺伝子の誘導に関与することが示唆されている (Jain *et al.*, 2006)。第 3 章で行った網羅的転写解析の結果、PkcA 活性化条件においてカタラーゼをコードする *catA* やマンガンスーパーオキシドジスムターゼをコードする *sodM* の mRNA 量が増加していた (第 3 章参照、Table 3-3)。これらのことから高温条件において MpkA が活性化しない場合に細胞内の ROS の蓄積が加速し、その結果アポトーシスが誘導される可能性が考えられる。また、第 3 章で行った PkcA 失活条件における網羅的転写解析の結果、PkcA 失活条件では apoptosis-inducing factor (AIF) like mitochondrial oxidoreductase をコードする *aifA* の mRNA 量が増加していた (第 3 章参照、Table 3-6)。哺乳類において AIF はカスパーゼ非依存性アポトーシスを誘導することが知られており、ミトコンドリア外膜の透過性が上がることで核内に移動し、DNA の断片化とクロマチンの凝集を誘導することによってアポトーシスを引き起こす (Norberg *et al.*, 2010)。*A. nidulans* において AifA は farnesol によって誘導されるアポトーシスには関与しないことが示唆されている (Savoldi *et al.*, 2008)。しかし、高温条件において PkcA が失活した場合には *aifA* の転写が誘導されることでアポトーシスが誘導される可能性が考えられる。

2-4-2. PkcA の極性形成に関わる機能

N. crassa において Lifeact は F-アクチンのレポーターとして用いられている (Berepiki *et al.*, 2010、Delgado-Alvarez *et al.*, 2010、Roca *et al.*, 2010)。本章では Lifeact-EGFP が *A. nidulans* においても F-アクチンのレポーターとして用いることができることを示した。42°C、浸透圧安定化剤を含む条件において *pkcA-ts* 株では、分生子発芽時にフィラメント状の Lifeact-EGFP の蛍光が観察されなかったことから、PkcA は高温条件において発芽管形成時のフィラメント状の F-アクチンの形成に必要であることが示唆された (Fig. 2-27A)。また、この F-アクチンの形成には CWI 経路の MAP キナーゼカスケードが必要ないことも示唆された。*S. cerevisiae* ではフィラメント状の F-アクチンは formin である Bni1p、Bnr1p によって形成される (Slaughter, 2009)。*BNI1* の高発現によって *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、Pkc1p が高温条件

における formin の活性化に必要であることが示唆されている (Zanelli and Valentini, 2005、Dong *et al.*, 2003)。 *A. nidulans* において formin をコードする *sepA* は高温条件における生育に必須であることが示されている (Harris *et al.*, 1997)。これらのことから、 *A. nidulans* においても PkcA が SepA の活性化に必要であり、浸透圧安定化剤が存在する場合に高温条件において *pkcA-ts* 株では SepA が活性化されないために発芽管が形成されず、生育することができない可能性が考えられる。

42°C、浸透圧安定化剤を含む条件において *pkcA-ts* 株では、分生子発芽時にドット状の Lifeact-EGFP の蛍光強度が野生型株のものと比較して弱かった (Fig. 2-27B)。このことから、PkcA は高温条件において発芽時のドット状の F-アクチンの形成にも関わることを示唆された。 *S. cerevisiae* においてドット状の F-アクチンは Arp2p と Arp3p 複合体によって形成される (Slaughter, 2009)。 *A. nidulans* においてもこれらのオルソログが保存されていることから、PkcA はこれらのオルソログの制御に関わる可能性が考えられる。

30°Cで培養した *pkcA-ts* 株を 42°Cに移した場合、菌糸先端において一時的に消失したアクチン構造の再出現が見られなかった (Fig. 2-28)。一方、*bckA* 欠失株では高温ストレス時のアクチン構造の一時的な消失とその後の再出現が見られた (Fig. 2-28)。このことから、PkcA が高温ストレス時の菌糸の再極性化に必要であり、CWI 経路の MAP キナーゼカスケードはこの過程に必要でないことが示唆された。 *S. cerevisiae* において Pkc1p は CWI 経路の MAP キナーゼカスケードには依存せず高温ストレス時の細胞の脱極性化に関与することが示唆されている。また、高温ストレス時の細胞の脱極性化後、Mpk1p が CWI 経路の上流で働くグアニンヌクレオチド交換因子である Rom2p をリン酸化して CWI 経路を負に制御することで細胞の再極性化がおこることが示唆されている (Guo *et al.*, 2009)。これらのことから、 *A. nidulans* における高温ストレス時の菌糸の極性制御に関わる PKC の機能と *S. cerevisiae* における高温ストレス時の細胞極性制御に関わる PKC の機能は異なることが示唆される。

S. cerevisiae において Pkc1p は Bni1p の活性化に必要であることが示唆されているものの、Pkc1p がどのような機構で Bni1p の活性化を制御しているかは明らかにされていない。PkcA がどのようにして発芽時や高温ストレス時の極性制御に関与するかについて検討するため、ModA、SepA に EGFP を付加したタンパク質を野生型タンパク質の代わりに生産する株を作製し、これらの観察を

試みた。しかし、野生型株においても EGFP-ModA は細胞質に一様に存在し、極性的な局在は観察されず、PkcA が ModA の局在に関与するかどうかについて検討することはできなかった (data not shown)。また、SepA-EGFP は固体最少培地においてのみ菌糸先端に観察されたのに対し、*pkcA-ts* 株を浸透圧安定化剤を含む固体最少培地、42°C で培養した場合、高頻度で溶菌が見られ、PkcA が SepA の局在に関与するかどうか検討することはできなかった (data not shown)。そのため、PkcA が極性形成のどの過程に機能するかを明らかにするためには、これらとは異なる極性形成に関わるタンパク質の細胞内局在観察を行う必要があると考えられる。

Table 2-1 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* |
| 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 |
| alcA(p)-pkcA-3 | <i>pyrG89 pyroA4 riboB2 nkuA::argB veA1 pkcA::riboB-alcA(p)-pkcA</i> | Katayama <i>et al.</i> , 2012 |
| pkcA-ts-2 | <i>pyrG89 pyroA4 riboB2 nkuA::argB veA1 pkcA::riboB-pkcA(P959L)</i> | Katayama <i>et al.</i> , 2012 |
| Δ mpkA-1 | <i>pyrG89 pyroA4 nkuA::argB veA1 mpkA::pyrG</i> | Katayama <i>et al.</i> , 2012 |
| Δ bckA-1 | <i>pyrG89 pyroA4 nkuA::argB veA1 bckA::pyroA</i> | Katayama <i>et al.</i> , 2012 |
| A1149LA-1 | <i>pyrG89::pyrG-alcA(p)-lifeact-egfp pyroA4 nkuA::argB veA1</i> | Katayama <i>et al.</i> , 2012 |
| pkcA-tsLA-1 | <i>pyrG89::pyrG-alcA(p)-lifeact-egfp pyroA4 riboB2 nkuA::argB veA1 pkcA::riboB-pkcA(P959L)</i> | Katayama <i>et al.</i> , 2012 |
| Δ bckALA-1 | <i>pyrG89::pyrG-alcA(p)-lifeact-egfp pyroA4 nkuA::argB veA1 bckA::pyroA</i> | Katayama <i>et al.</i> , 2012 |
| WEM-1、-2 | <i>pyrG89 pyroA4 nkuA::argB veA1 modA::egfp-modA-pyroA</i> | 本論文 |
| SepA-EGFP-1、-2 | <i>pyrG89 pyroA4 nkuA::argB veA1 sepA::sepA-egfp-pyroA</i> | 本論文 |

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

Table 2-2 本章で使用したオリゴヌクレオチド

| プライマー | 配列 |
|----------------|--|
| pyrGF | CGAGATCTCCATCCCCG |
| pyrGR | TTCTGCAGGGTTGAGGAAG |
| riboBF | CTGTTGGAAGATAGATGAC |
| alcApR | GGTACCGCTAATTAAGT |
| alcA(p)-abp140 | CTACTCAGTTAATTAGCGGTACCATGGGTGTCGCAGATTT |
| abp140R-link2 | ACCACTACCAGTAGCACTCGCTTCTTCCTTTGAGATGCTTT |
| link2-egfpF | GCGAGTGCTACTGGTAGTGGTATGGTGAGCAAGGGCGA |
| BamHI-egfpR | AAGGATCCTTACTTGTACAGCTCGTCCATGC |
| 5bckAF | GAAGAGAGCTGACATGGAGAAAG |
| 3bckAR-2 | TCTGAGTAGCCTTTGCCCC |
| pyrG 5 | ATGTCTTCGAAGTCCCA |
| pyrG3 | TCAAAGTCCAAGTCTTTTCT |
| pyrGRn | CACTTCAGAAGGGAGTATCA |
| Smaegfp | GTGCCCCGGGGTGAGCAAGGGCGA |
| BamHI-egfpR | AAGGATCCTTACTTGTACAGCTCGTCCATGC |
| ERV-sepA3F | CGATATCCTGTTTCTCAAGCAAAGGAA |
| sepAR | CTTTCCGCTAGTTTTTCGATATG |
| ERV-sepAF | AGATATCATGCCGACATCCGATAA |
| ERV-sepAORFR | GGATATCGCTGGTTCGAGGGGC |
| modA1 | GTGGGCATGGGAGGC |
| modAupR | ATGTTACTCCGCACAGGGCCGATTCATGGCCACAGC |
| modA(p)F | CTTATTTCAACACCACGCGCATGTAAAGGGTCCCCAAAAAAG |
| modA(p)R | TCGCCCTTGCTCACCATTTTCAAACCCGACCGA |
| modAORFF | GGTAGTGGTACTGCTAGTGCGGTTCGTAGCAACTATCAAGTACGTC |
| modA4 | CAAGGGTGAGACGACTGC |
| pyroA5n | GCCCTGTGCGGAGTAACAT |
| pyroA3n | GCGCGTGGTGTGAAATAAG |
| 5EGFPF | ATGGTGAGCAAGGGCGA |
| egfpR-L1 | GCGAGTGCTACTGGTAGTGGTATGGTGAGCAAGGGCGA |
| modA5 | GGAAAYGGGAGGTGCAGT |
| modA6 | GCCGAAGTGCCGGAG |

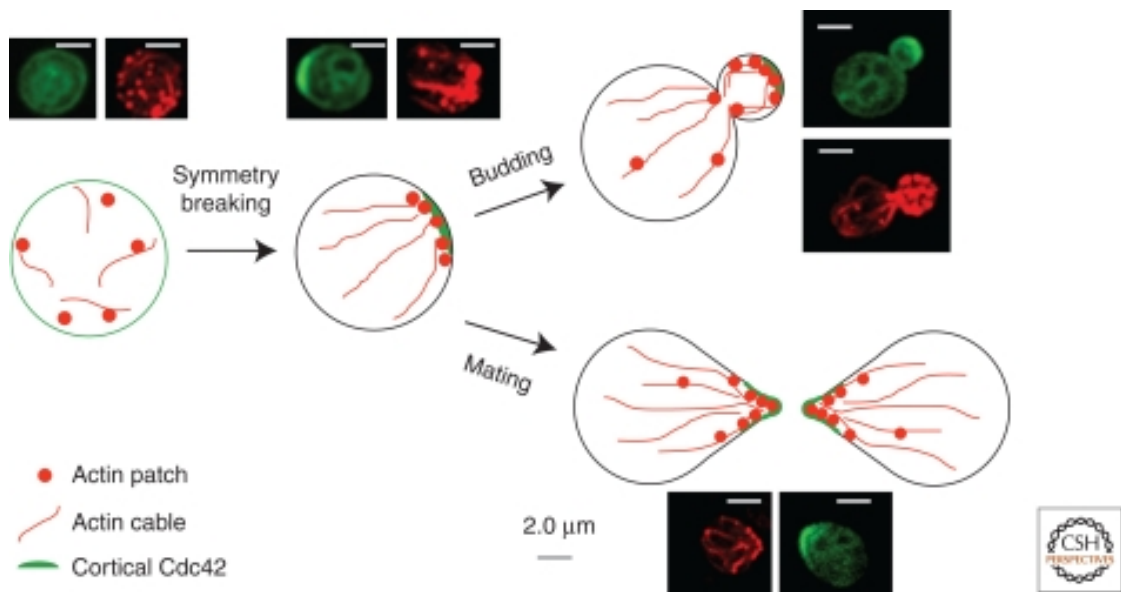


Fig. 2-1 *S. cerevisiae*の極性の形成
(Slaughter *et al.*,2009)

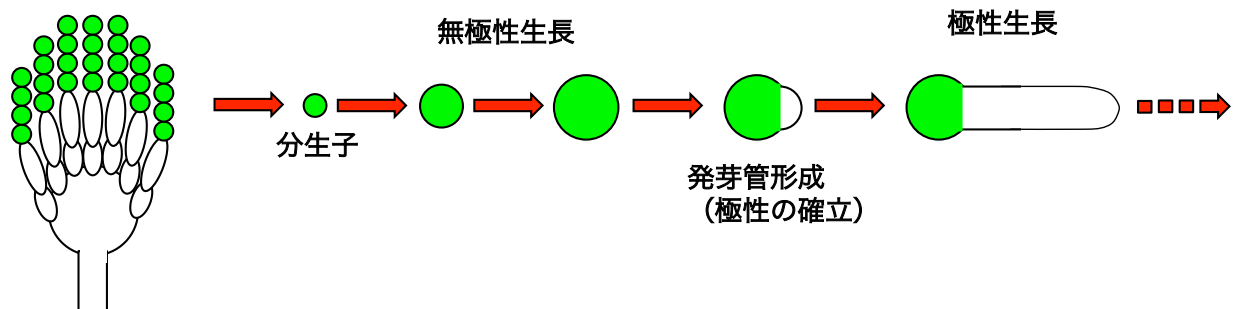


Fig. 2-2 *A. nidulans*の分生子の発芽過程

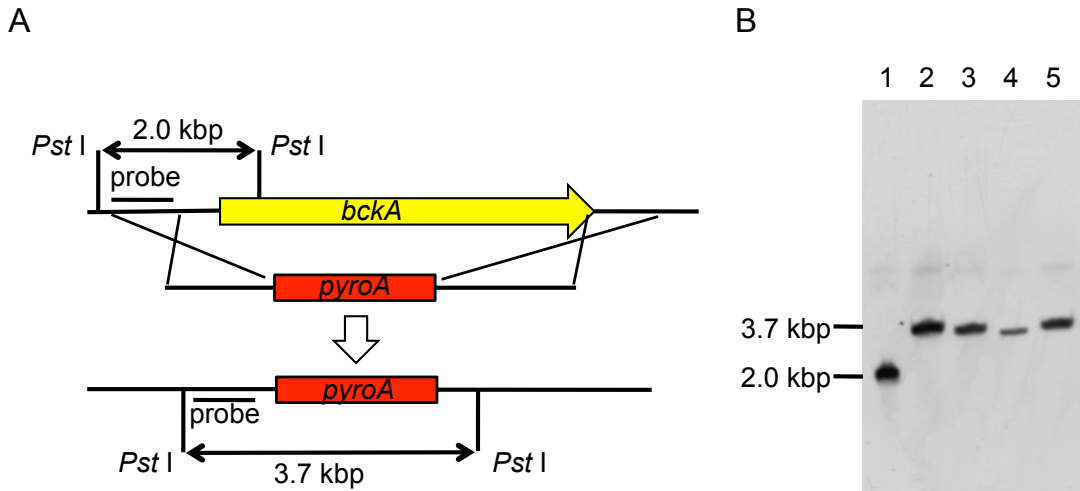


Fig. 2-3 *bckA*欠失株の作製

A. *bckA*欠失株を作製するコンストラクト

B. *bckA*欠失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A1149LA-1株由来の形質転換体。

レーン2 : $\Delta bckA$ -1、レーン3 : $\Delta bckA$ -2、レーン4 : $\Delta bckALA$ -1、レーン5 : $\Delta bckALA$ -2

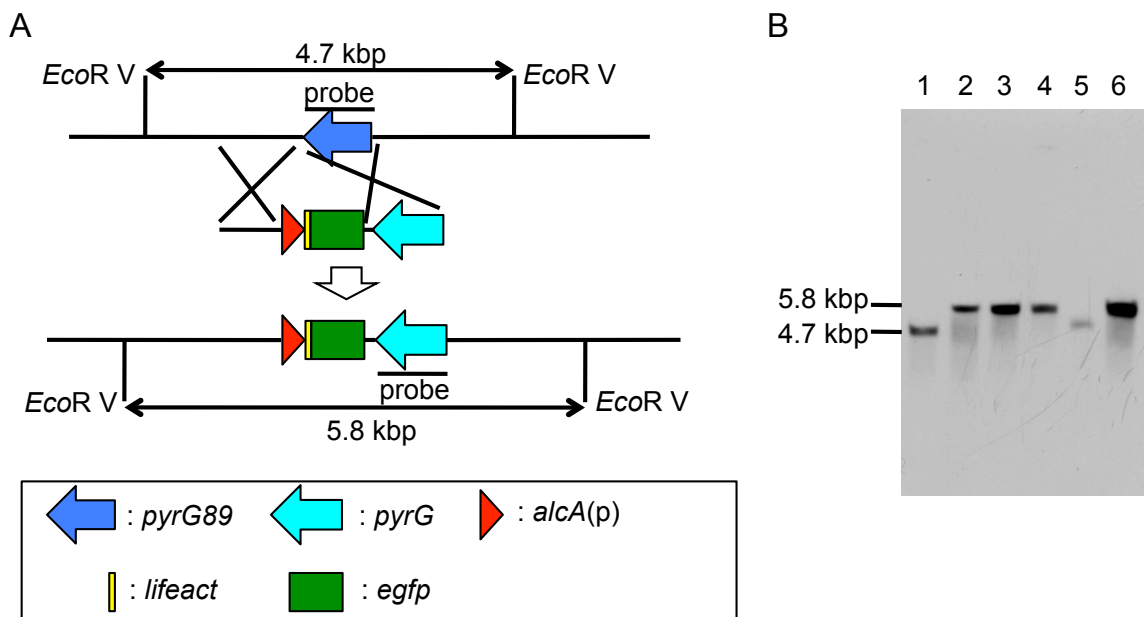


Fig. 2-4 *lifeact-egfp*を発現する株の作製

A. *lifeact-egfp*を発現する株を作製するコンストラクト

B. *lifeact-egfp*を発現する株のサザン解析

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4-6は*pkcA*-*ts*-2株由来の形質転換体。

レーン2 : A1149/LA-1、レーン3 : A1149/LA-2、レーン4 : *pkcA*-*ts*/LA-1、レーン6 : *pkcA*-*ts*/LA-2

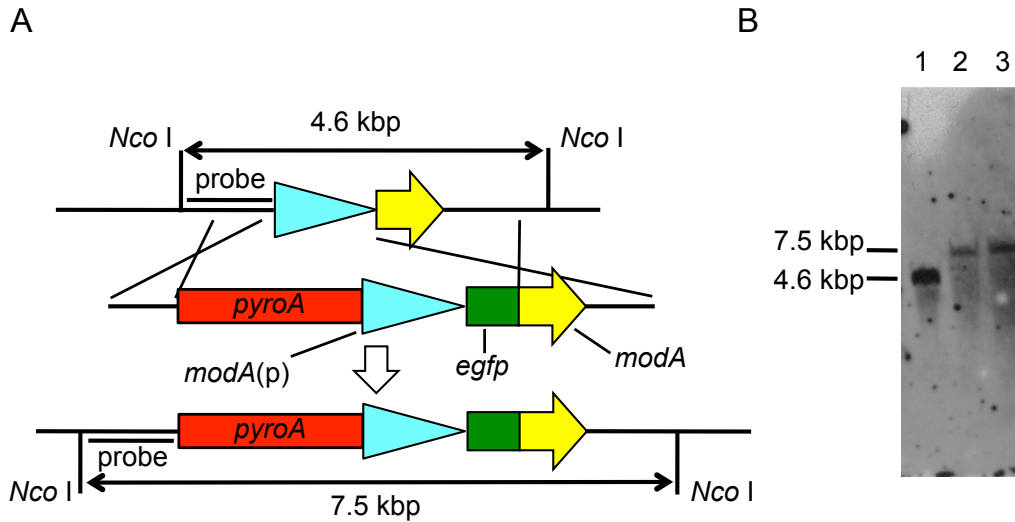


Fig. 2-5 N末端にEGFPの連結したModAを生産する株（WEM株）の作製

A. WEM株を作製するコンストラクト

B. WEM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：WEM-1、レーン3：WEM-2

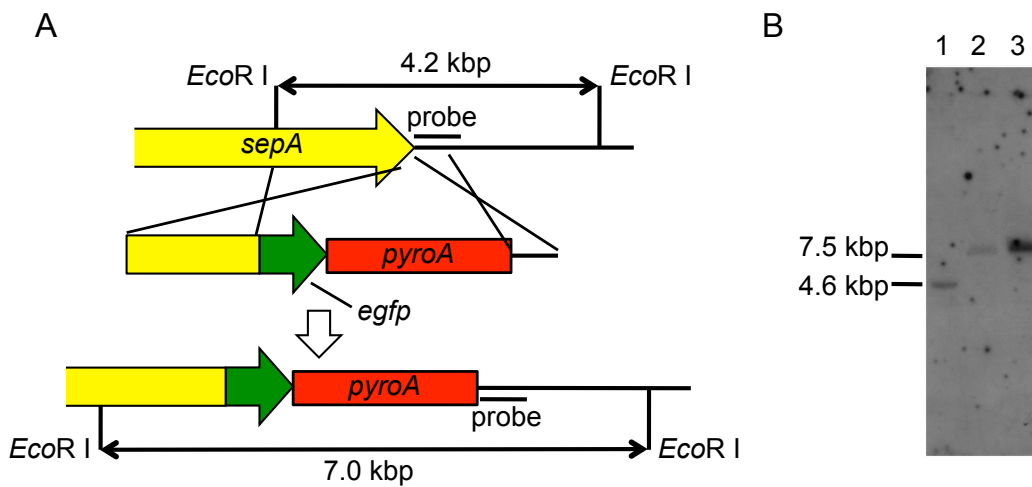


Fig. 2-6 C末端にEGFPの連結したSepAを生産する株（SepA-EGFP株）の作製

A. SepA-EGFP株を作製するコンストラクト

B. SepA-EGFP株のサザン解析

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：SepA-EGFP-1、レーン3：SepA-EGFP-2

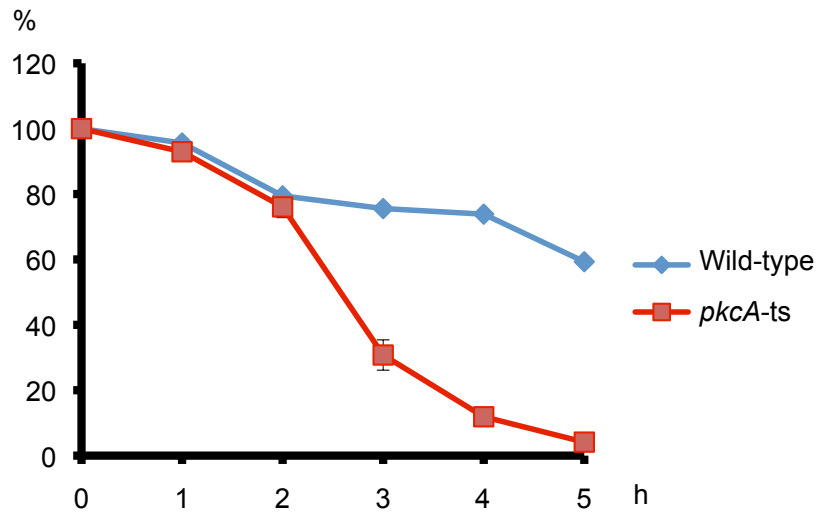


Fig. 2-7 42°Cで培養した*pkcA-ts*株の生菌率

A1149株 (Wild-type)、*pkcA-ts*-2株 (*pkcA-ts*) の分生子を42°C、液体YGuu培地で培養し、生菌率を経時的に測定した。横軸は42°Cで培養した時間、縦軸は42°Cで培養していない場合の生菌率を1として各培養時間での生菌率を百分率で示した。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。

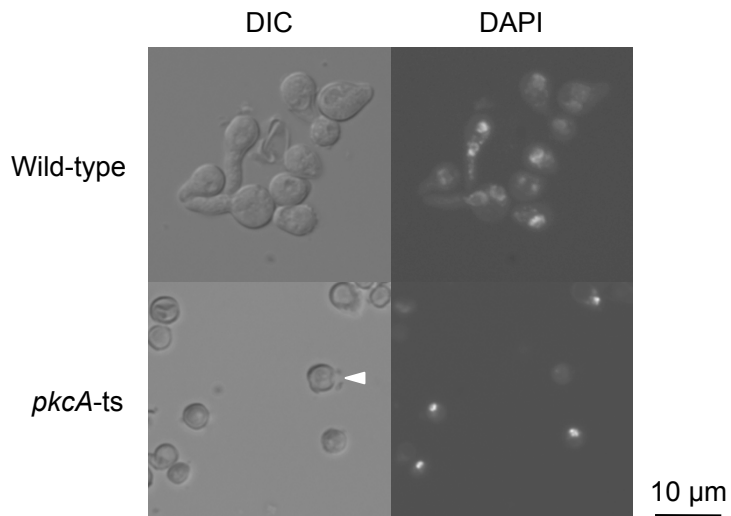


Fig. 2-8 42°Cにおける*pkcA-ts*株の表現型

A1149株 (Wild-type)、*pkcA-ts*-2株 (*pkcA-ts*) の分生子を42°C、液体YGuu培地で5時間振盪培養し、核をDAPIで染色して観察した。溶菌した分生子を矢頭で示した。

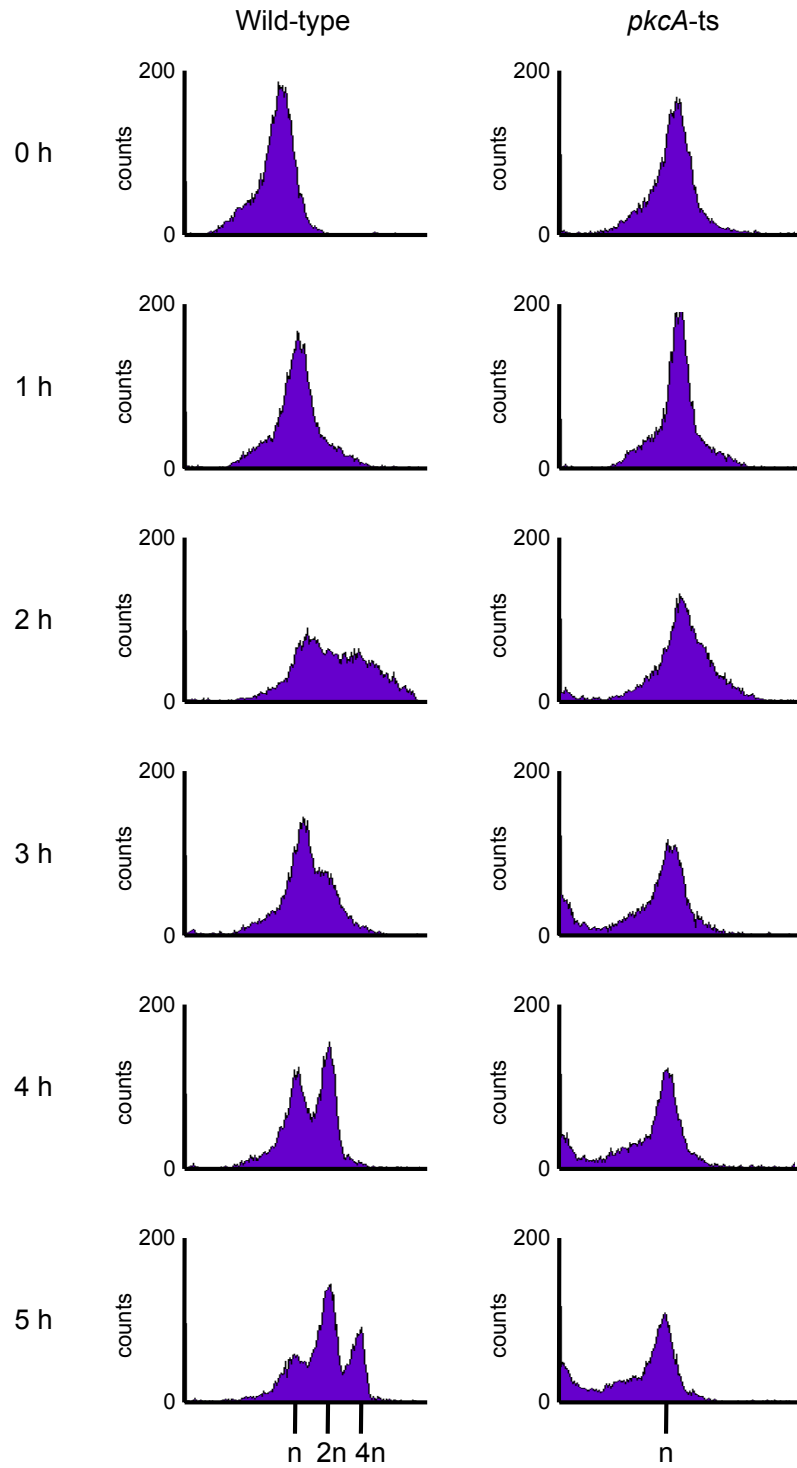


Fig. 2-9 42°Cで培養した*pkcA-ts*株におけるDNA複製

A1149株 (Wild-type)、*pkcA-ts*-2株 (*pkcA-ts*) の分生子を42°C、液体YGuu培地で各時間振盪培養し、DNA含量あたりの細胞数をFACSにより測定した。横軸は蛍光強度、縦軸は細胞数を示した。

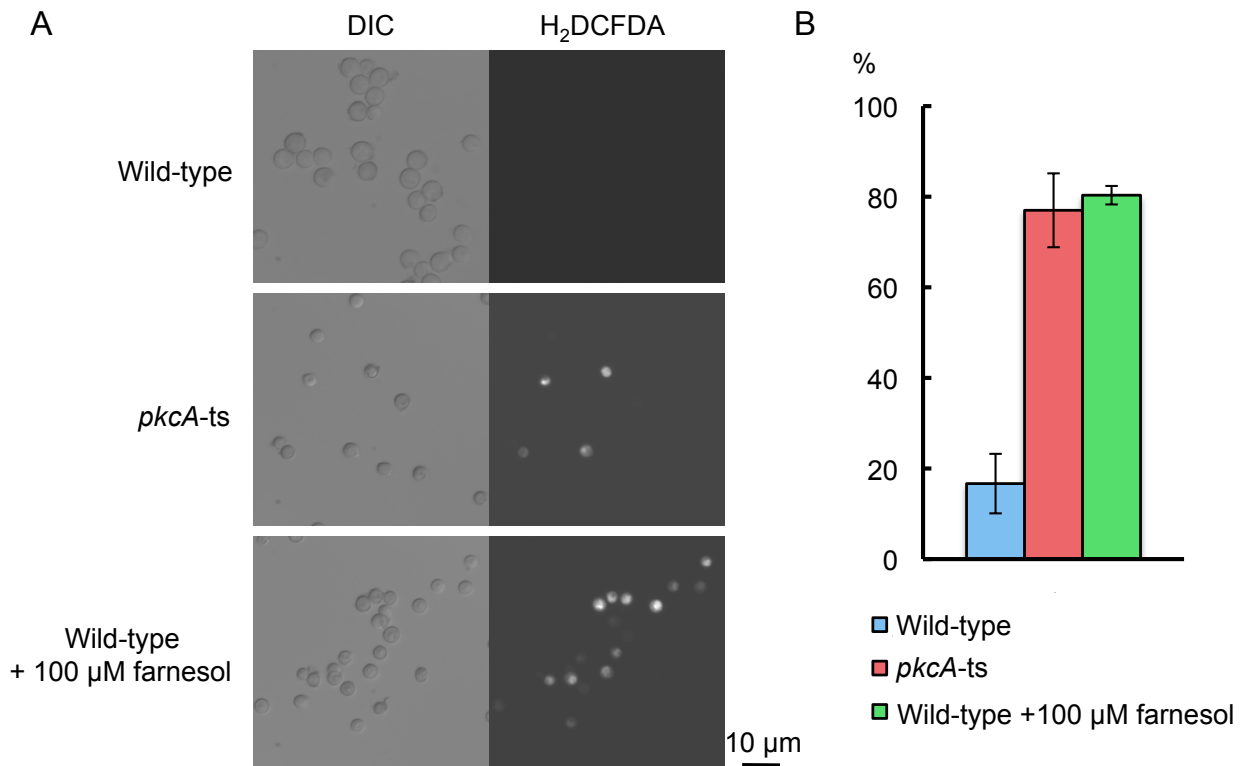


Fig. 2-10 42°Cで培養した*pkcA-ts*株におけるROSの蓄積

- A. A1149株 (Wild-type)、*pkcA-ts*-2株 (*pkcA-ts*) の分生子を42°C、液体YGuu培地で4時間振盪培養し、菌体中のROSをH₂DCFDAを用いて観察した。ポジティブコントロールとして、液体YGuu培地で2時間振盪培養した後、培地に終濃度100 μMとなるようにfarnesolを加え、さらに2時間振盪培養した菌体を用いた。
- B. パネルAの条件においてH₂DCFDAの蛍光が見られた細胞の割合を百分率で示した。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。

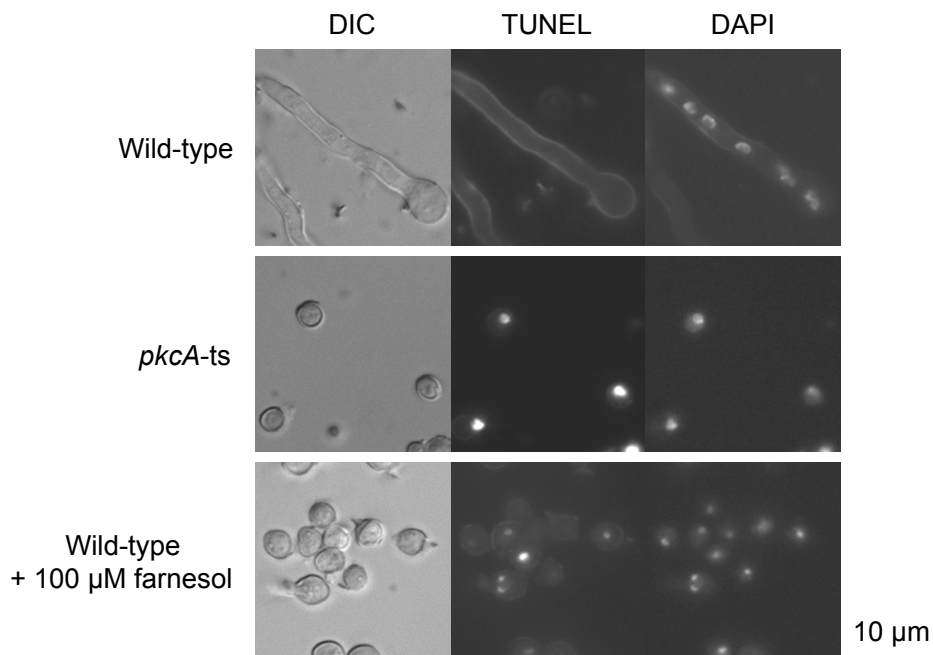


Fig. 2-11 42°Cで培養した*pkcA-ts*株におけるDNAの断片化

- A1149株 (Wild-type)、*pkcA-ts*-2株 (*pkcA-ts*) の分生子を42°C、液体YGuu培地で8時間静置培養し、TUNELおよびDAPIで染色して観察した。ポジティブコントロールとして42°Cで培養6時間後に、培地に終濃度100 μMとなるようにfarnesolを加え、さらに2時間培養した菌体を用いた。

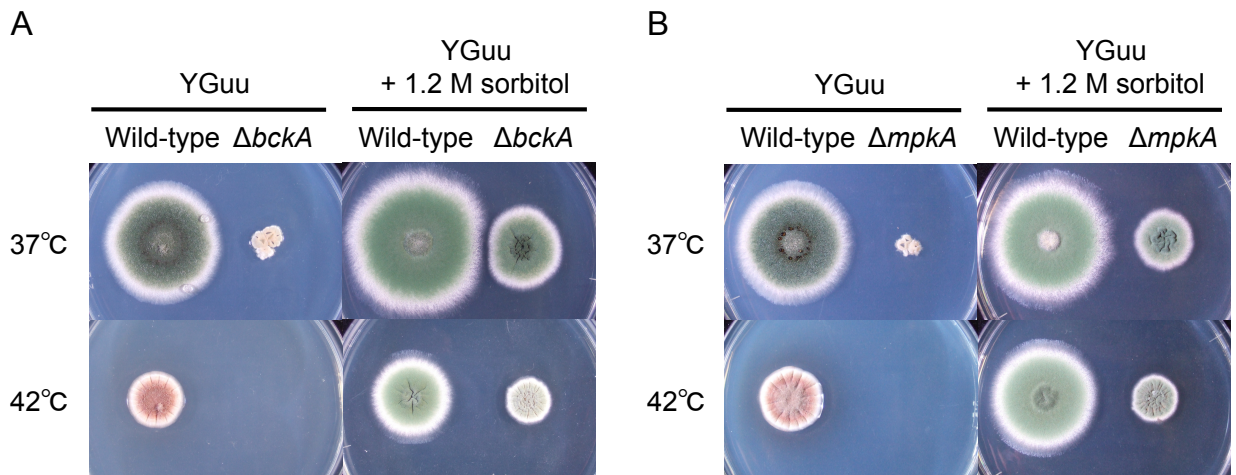


Fig. 2-12 *bckA*欠失株、*mpkA*欠失株のコロニー形態

A. *bckA*欠失株のコロニー形態

A1149/*pyroA*株 (Wild-type)、 $\Delta bckA$ -1株 ($\Delta bckA$) を各温度、各培地で72時間培養した。

B. *mpkA*欠失株のコロニー形態

A1149/*pyrG*-1株 (Wild-type)、 $\Delta mpkA$ -1株 ($\Delta mpkA$) を各温度、各培地で72時間培養した。

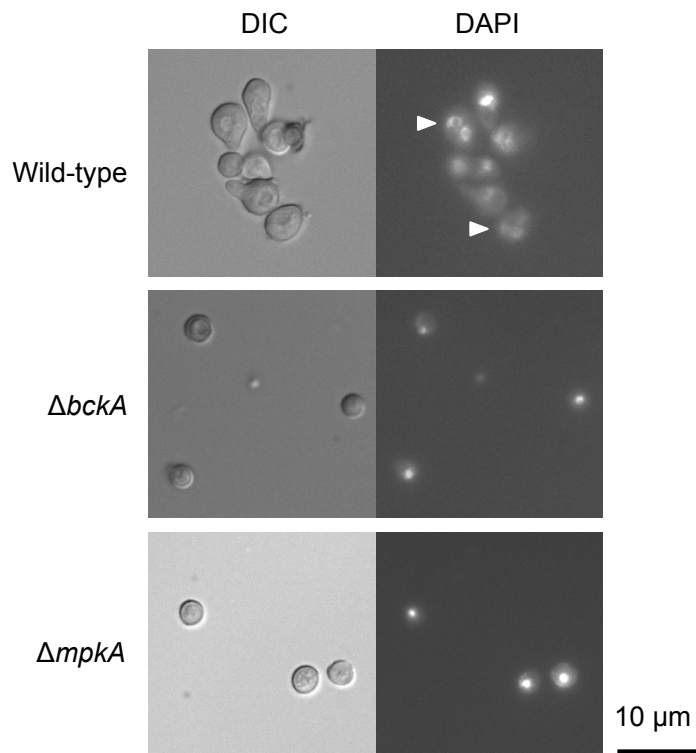


Fig. 2-13 42°Cにおける*bckA*欠失株、*mpkA*欠失株の表現型

A1149株 (Wild-type)、 $\Delta bckA$ -1株 ($\Delta bckA$)、 $\Delta mpkA$ -1株 ($\Delta mpkA$) の分生子を42°C、液体YGuu培地で5時間振盪培養し、核をDAPIで染色して観察した。複数の核をもつ細胞を矢頭で示した。

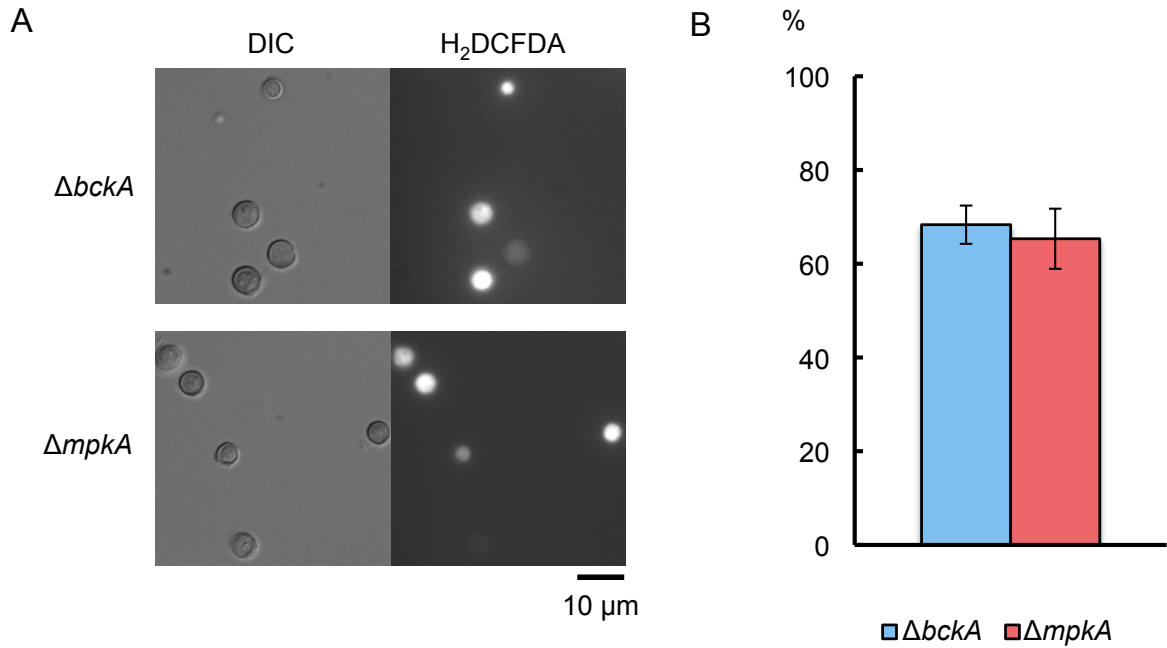


Fig. 2-14 42°Cで培養した**bckA**欠失株、**mpkA**欠失株におけるROSの蓄積

A. $\Delta bckA$ -1株 ($\Delta bckA$)、 $\Delta mpkA$ -1株 ($\Delta mpkA$) の分生子を42°C、液体YGuu培地で4時間振盪培養し、菌体中のROSをH₂DCFDAを用いて観察した。

B. パネルAの条件においてH₂DCFDAの蛍光が見られた細胞の割合を百分率で示した。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。

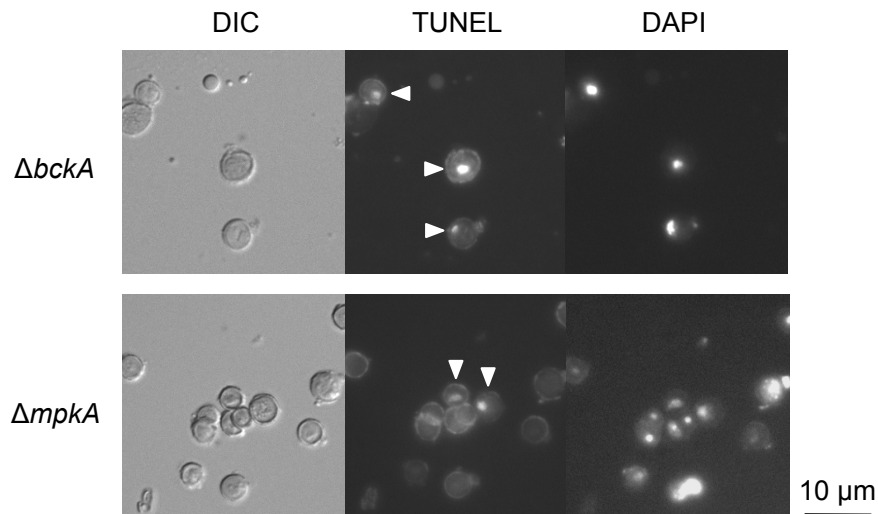


Fig. 2-15 42°Cで培養した**bckA**欠失株、**mpkA**欠失株におけるDNAの断片化

$\Delta bckA$ -1株 ($\Delta bckA$)、 $\Delta mpkA$ -1株 ($\Delta mpkA$) の分生子を42°C、液体YGuu培地で8時間静置培養し、菌体をTUNELおよびDAPIで染色して観察した。核にTUNELの蛍光が見られる細胞を矢頭で示した。

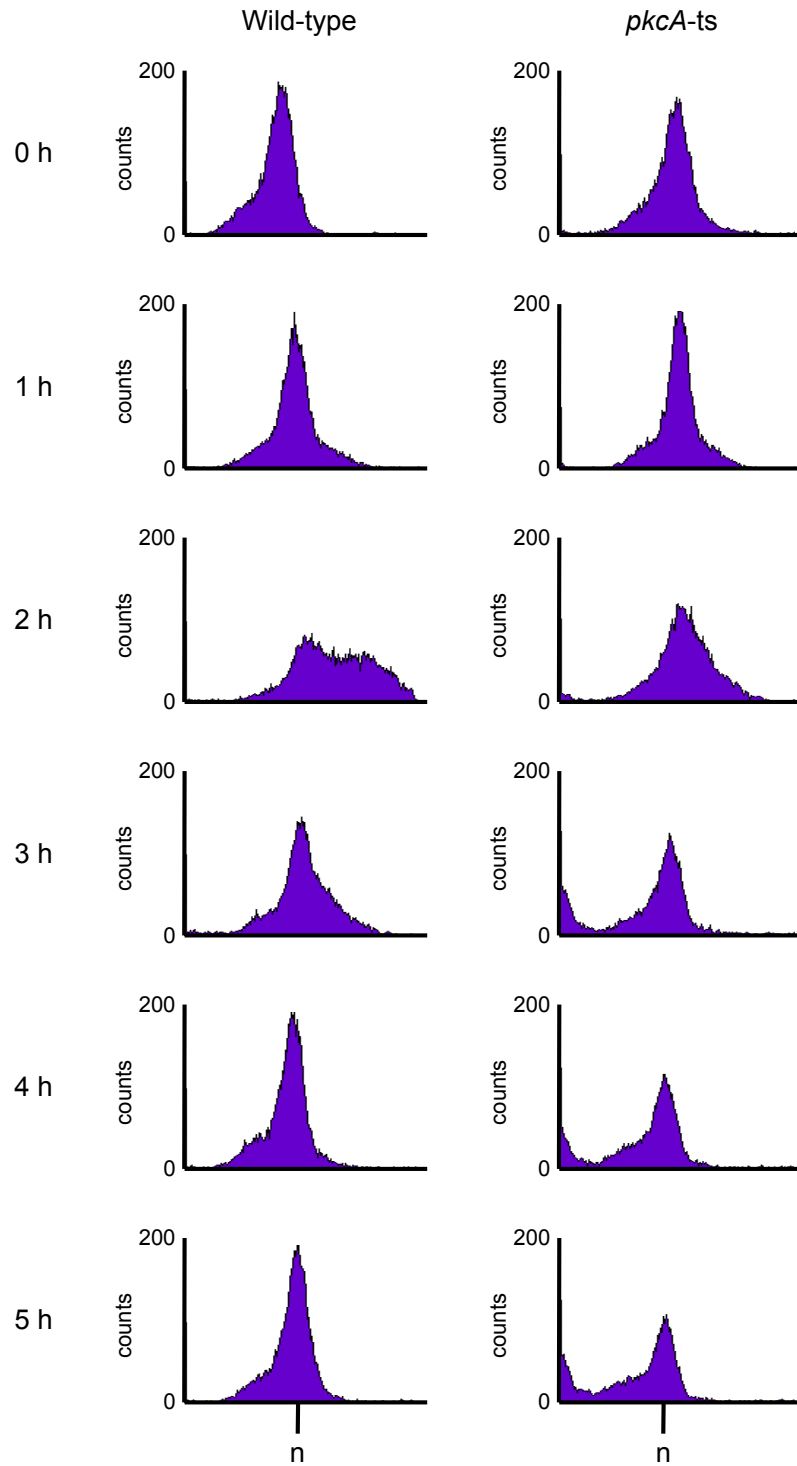


Fig. 2-16 ヒドロキシ尿素処理時の42°Cで培養した*pkcA-ts*株におけるDNA複製
 A1149株 (Wild-type)、*pkcA-ts*-2株 (*pkcA-ts*) の分生子を42°C、100 mMのヒドロキシ尿素を含む液体YGuu培地で各時間振盪培養した菌体のDNA含量あたりの細胞数をFACSにより測定した。横軸は蛍光強度、縦軸は細胞数を示した。

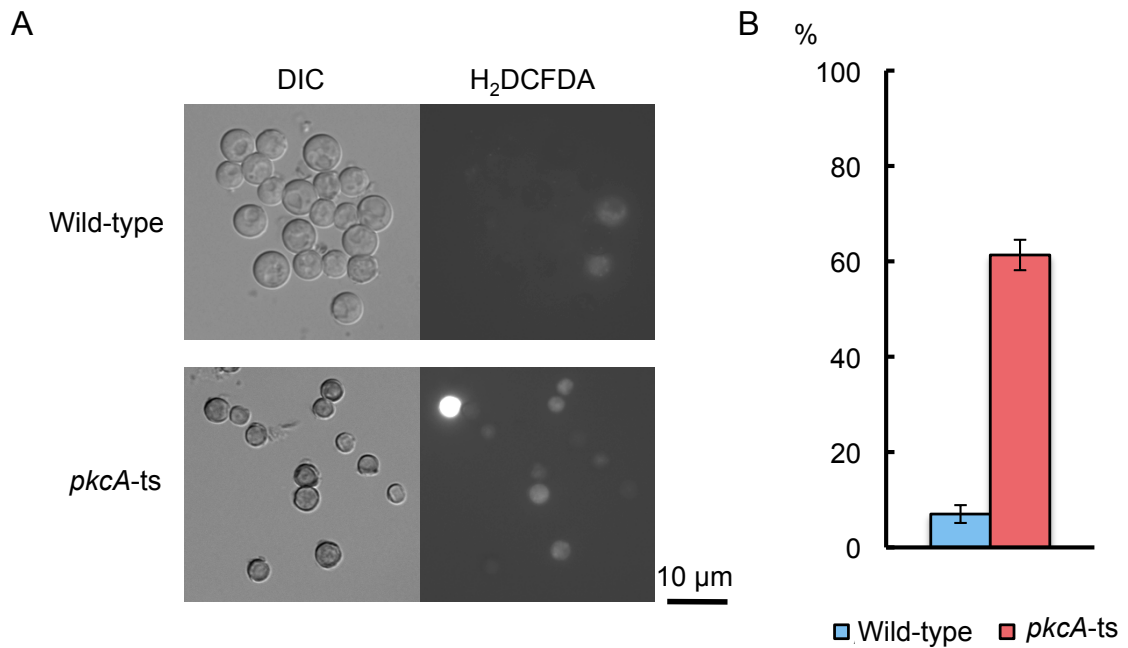


Fig. 2-17 ヒドロキシ尿素処理時の42°Cで培養した*pkcA-ts*株におけるROSの蓄積

A. A1149株 (Wild-type)、*pkcA-ts*-2株 (*pkcA-ts*) の分生子を42°C、100 mMのヒドロキシ尿素を含む液体YGuu培地で4時間振盪培養し、菌体中のROSをH₂DCFDAを用いて観察した。

B. パネルAの条件においてH₂DCFDAの蛍光が見られた細胞の割合を百分率で示した。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。

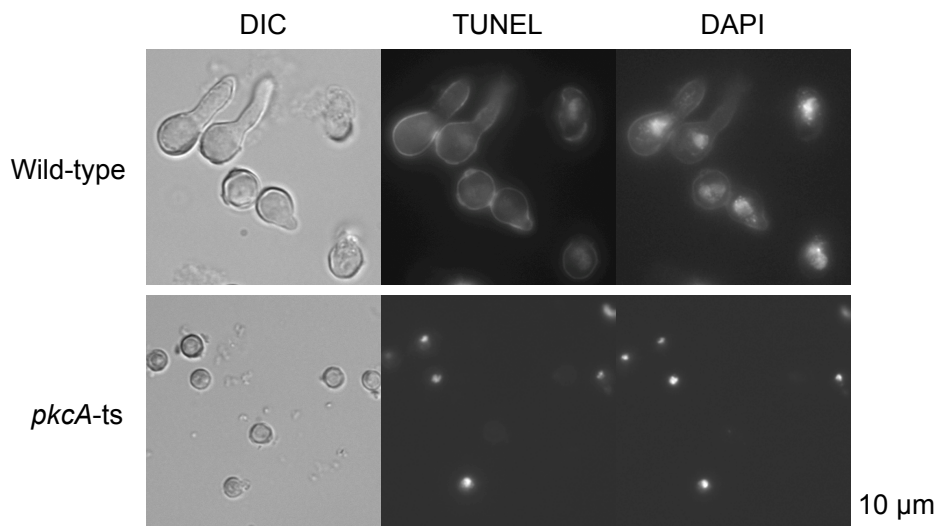


Fig. 2-18 ヒドロキシ尿素処理時の42°Cで培養した*pkcA-ts*株におけるDNAの断片化

A1149株 (Wild-type)、*pkcA-ts*-2株 (*pkcA-ts*) の分生子を42°C、100 mMのヒドロキシ尿素を含む液体YGuu培地で8時間静置培養し、菌体をTUNELおよびDAPIで染色して観察した。

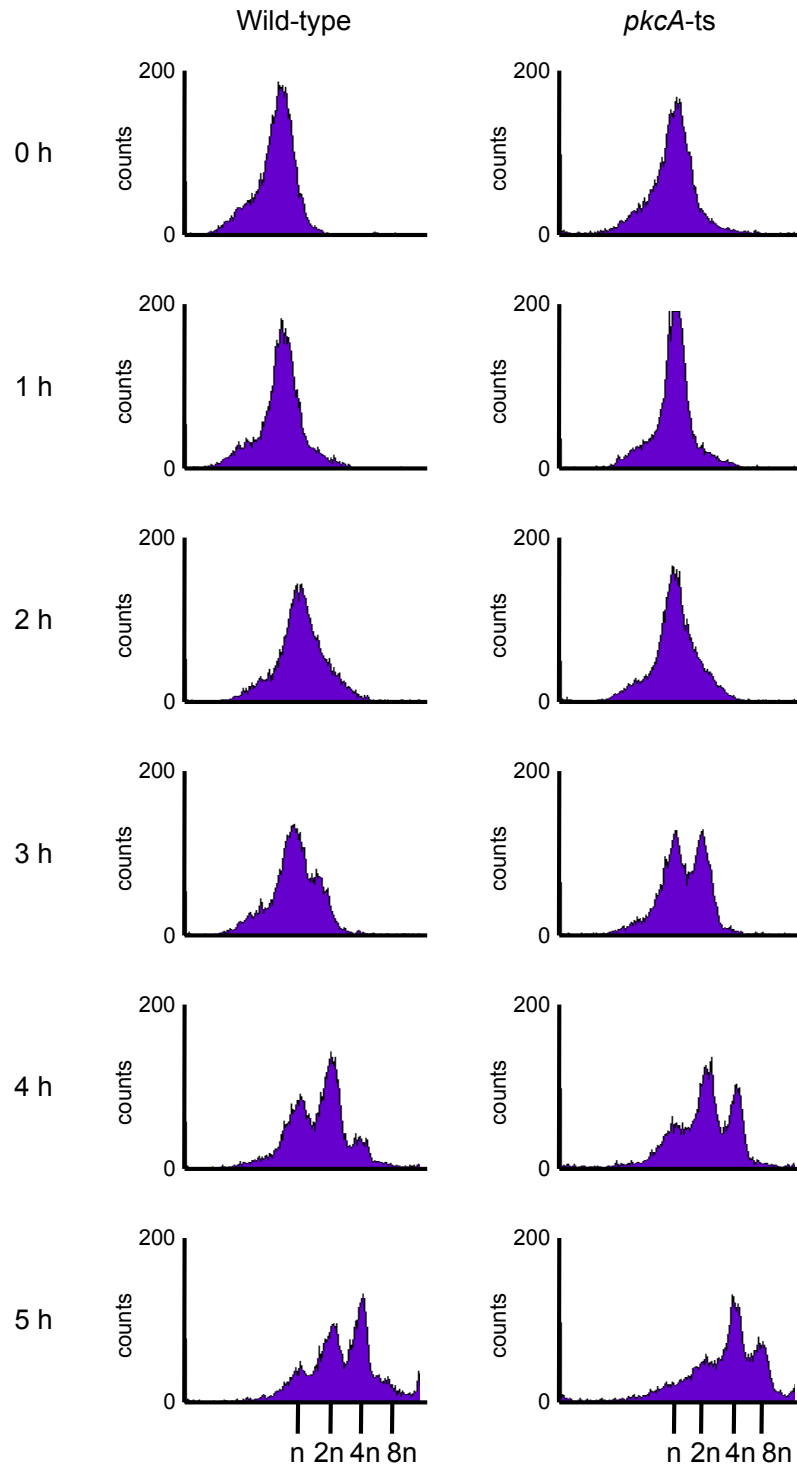


Fig. 2-19 37°Cで培養した*pkcA-ts*株のDNA複製

A1149株 (Wild-type)、*pkcA-ts*-2株 (*pkcA-ts*) の分生子を42°C、液体YGuu培地で各時間振盪培養し、菌体のDNA含量あたりの細胞数をFACSにより測定した。横軸は蛍光強度、縦軸は細胞数を示した。

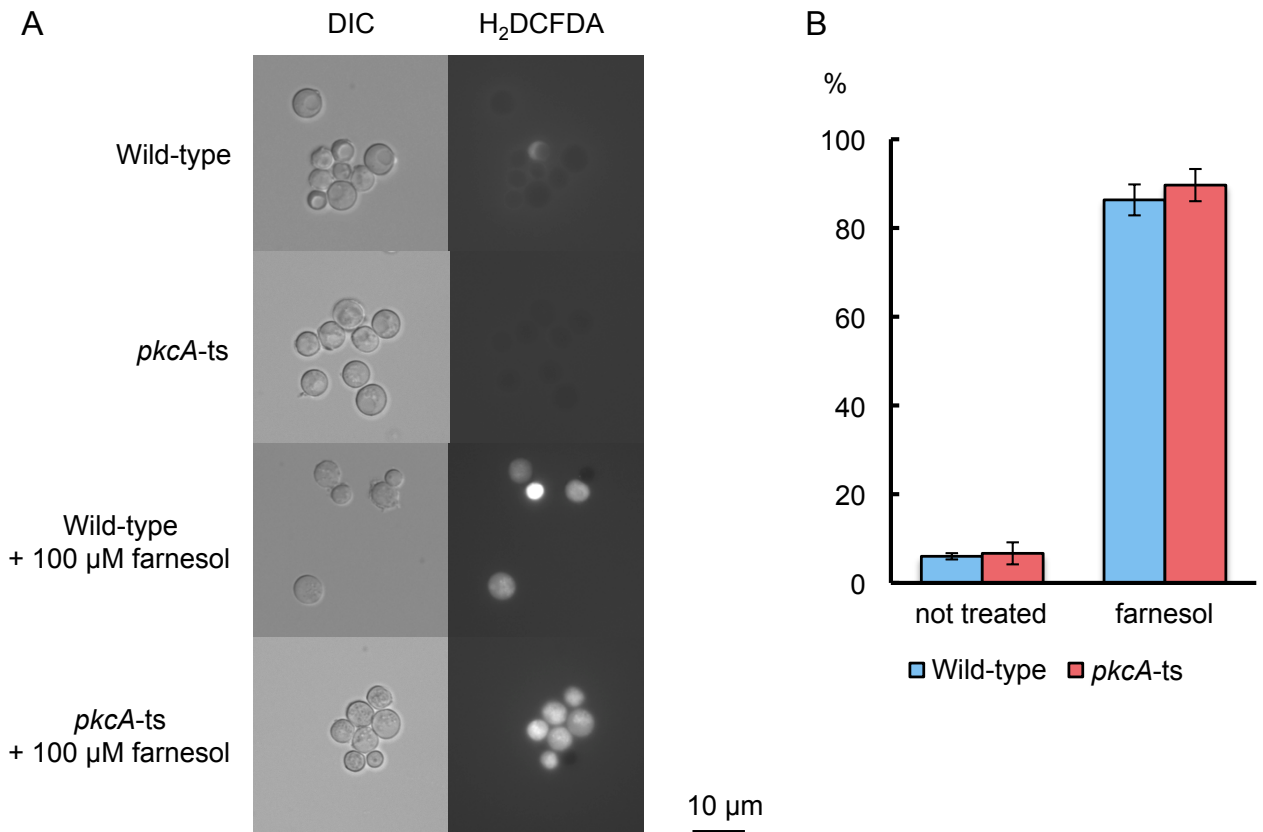


Fig. 2-20 37°Cで培養した*pkcA-ts*株のROSの蓄積

- A. 1149株 (Wild-type)、*pkcA-ts*-2株 (*pkcA-ts*) の分生子を37°C、液体YGuu培地または100 μMのfarnesolを含む液体YGuu培地で4時間振盪培養し、菌体中のROSをH₂DCFDAを用いて観察した。
- B. パネルAの条件においてH₂DCFDAの蛍光が見られた細胞の割合を百分率で示した。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。

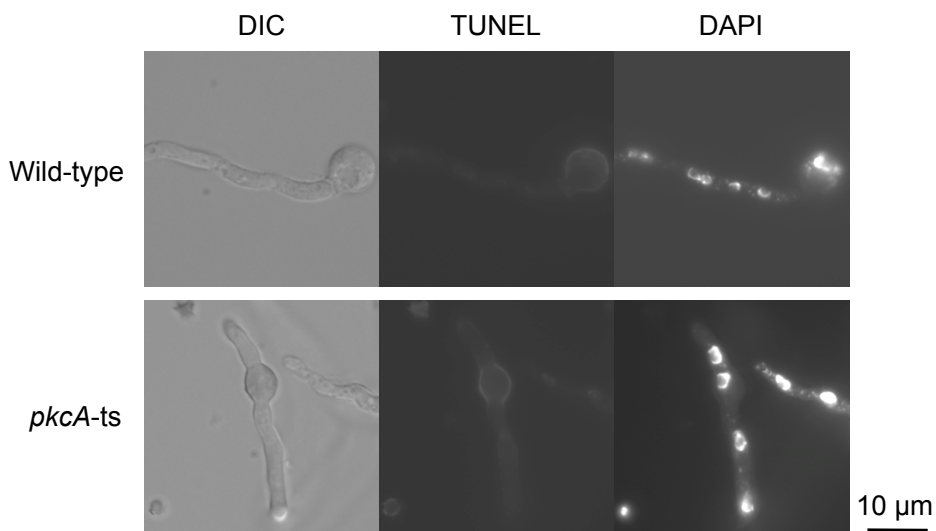


Fig. 2-21 37°Cで培養した*pkcA-ts*株のDNAの断片化

- A1149株 (Wild-type)、*pkcA-ts*-2株 (*pkcA-ts*) の分生子を37°C、液体YGuu培地で8時間静置培養し、菌体をTUNELおよびDAPIで染色して観察した。

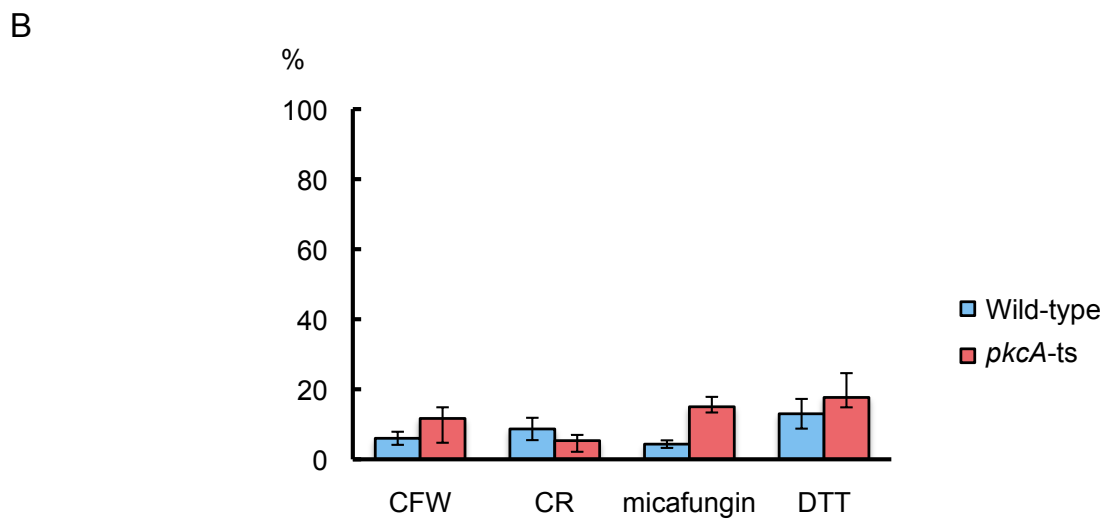
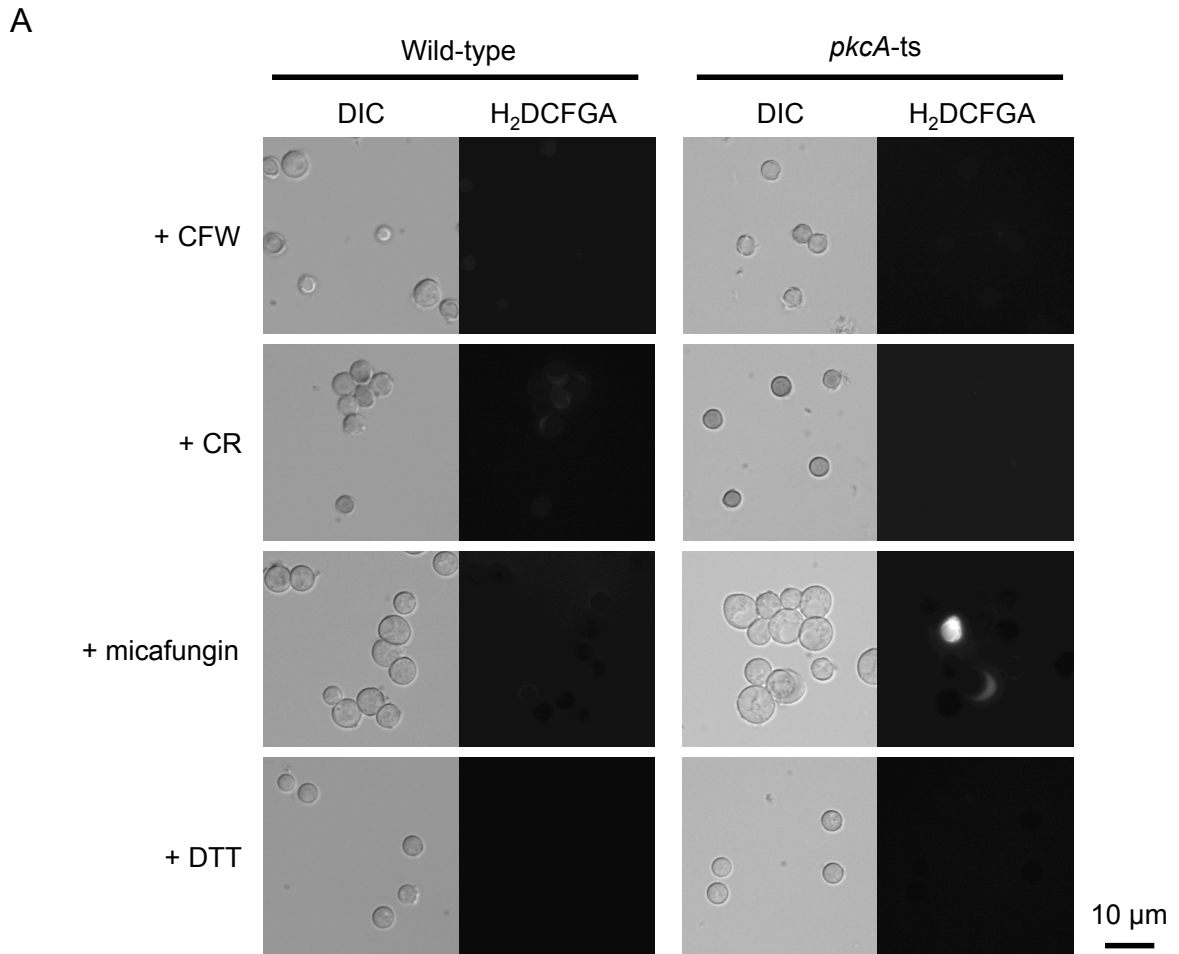


Fig. 2-22 薬剤ストレスのアポトーシス誘導への関与

A. 1149株 (Wild-type)、*pkcA-ts*-2株 (*pkcA-ts*) の分生子を37°C、各薬剤を含む液体YGuu培地で4時間振盪培養し、菌体中のROSをH₂DCFDAを用いて観察した。薬剤は100 μg/ml calcofluor white (+ CFW)、100 μg/ml congo red (+ CR)、1 μg/ml micafungin、10 mM dithithreitol (+ DTT) を用いた。

B. パネルAの条件においてH₂DCFDAの蛍光が見られた細胞の割合を百分率で示した。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。

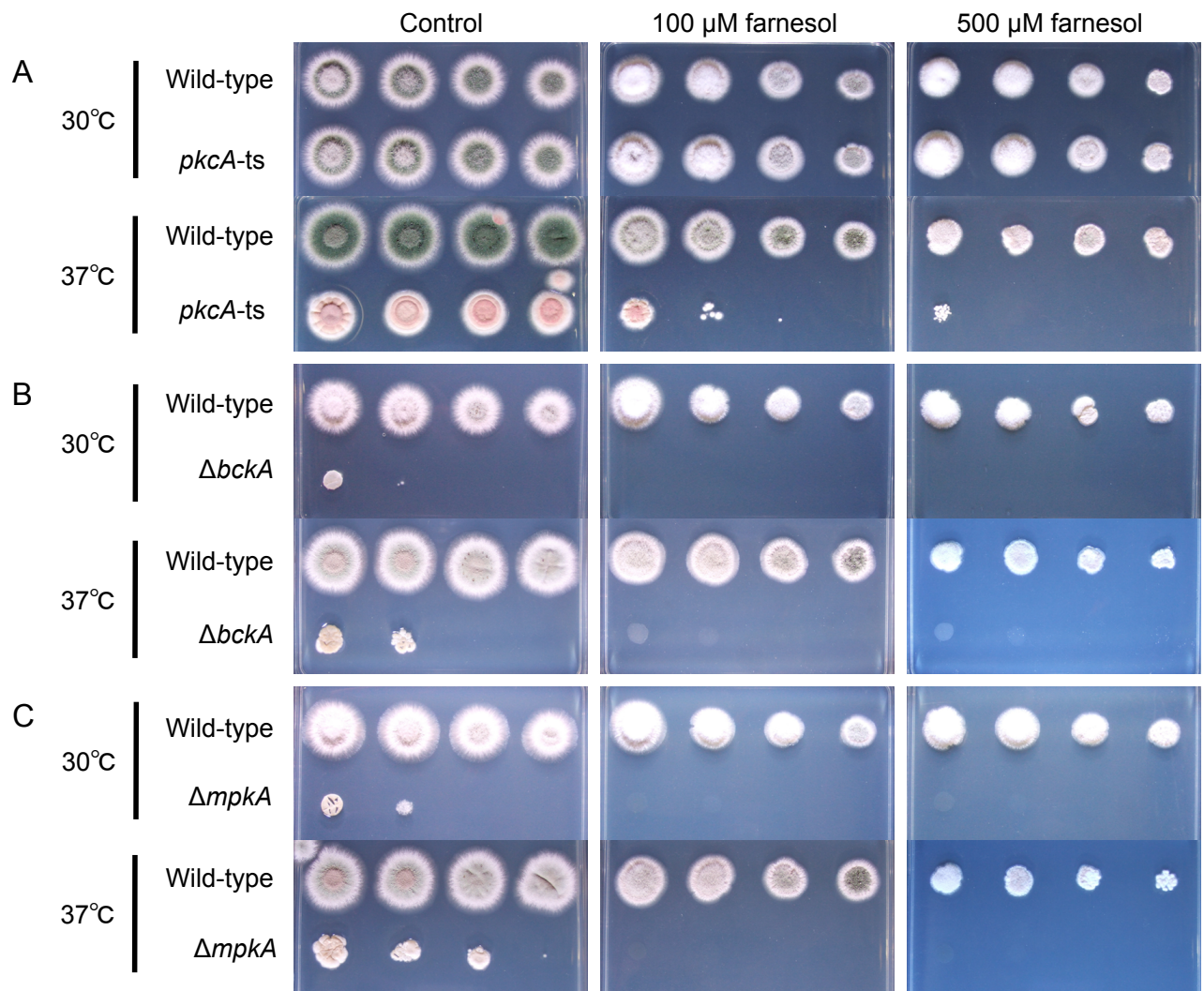


Fig. 2-23 CWI経路の変異株のfarnesol感受性

各株のの分生子 5×10^5 、 5×10^4 、 5×10^3 、 5×10^2 個を各濃度のfarnesolを含むYGuu培地にスポット植菌し、各温度で72時間培養した。A. A1149株 (Wild-type)、*pkcA-ts*-2株 (*pkcA-ts*) B. A1149/*pyrA*株 (Wild-type)、 $\Delta bckA$ -1株 ($\Delta bckA$) C. A1149/*pyrG*-1 (Wild-type)、 $\Delta mpkA$ -1株 ($\Delta mpkA$)

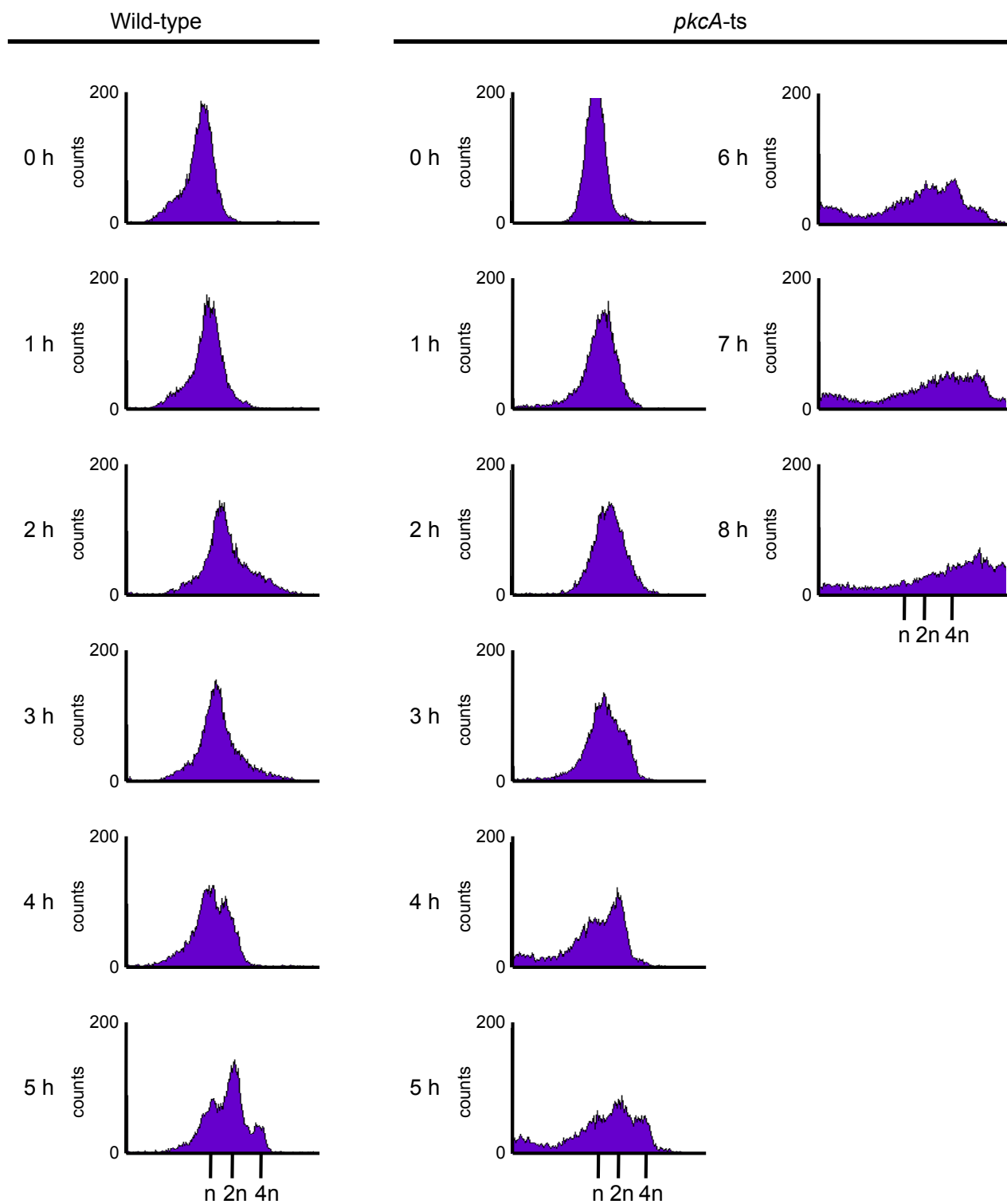


Fig. 2-24 42°C、1.2 Mのソルビトールを含むYGuu培地で培養した*pkcA-ts*株のDNA複製

A1149株 (Wild-type)、*pkcA-ts*-2株 (*pkcA-ts*) の分生子を42°C、1.2 Mのソルビトールを含む液体YGuu培地で各時間振盪培養し、菌体のDNA含量あたりの細胞数をFACSにより測定した。横軸は蛍光強度、縦軸は細胞数を示した。

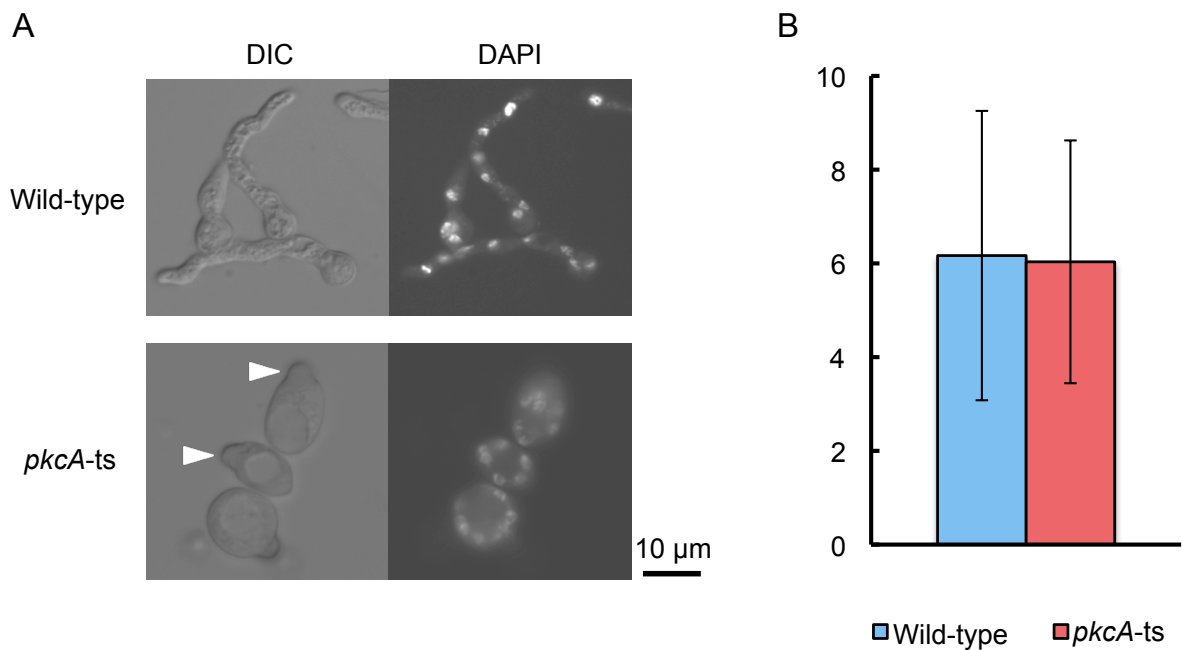


Fig. 2-25 42°C、1.2 Mのソルビトールを添加した培地で培養した*pkcA-ts*株の表現型

- A. A1149株 (Wild-type)、*pkcA-ts*-2株 (*pkcA-ts*) の分生子を42°C、1.2 Mのソルビトールを含む液体YGuu培地で9時間振盪培養し、核をDAPIで染色して観察した。異常な形態の発芽管を形成した細胞を矢頭で示した。
- B. パネルAの条件で培養した場合の1細胞あたりの核の数を計数し、その平均値をグラフで示した。各株において150の細胞について計数を行い、標準誤差をエラーバーで示した。

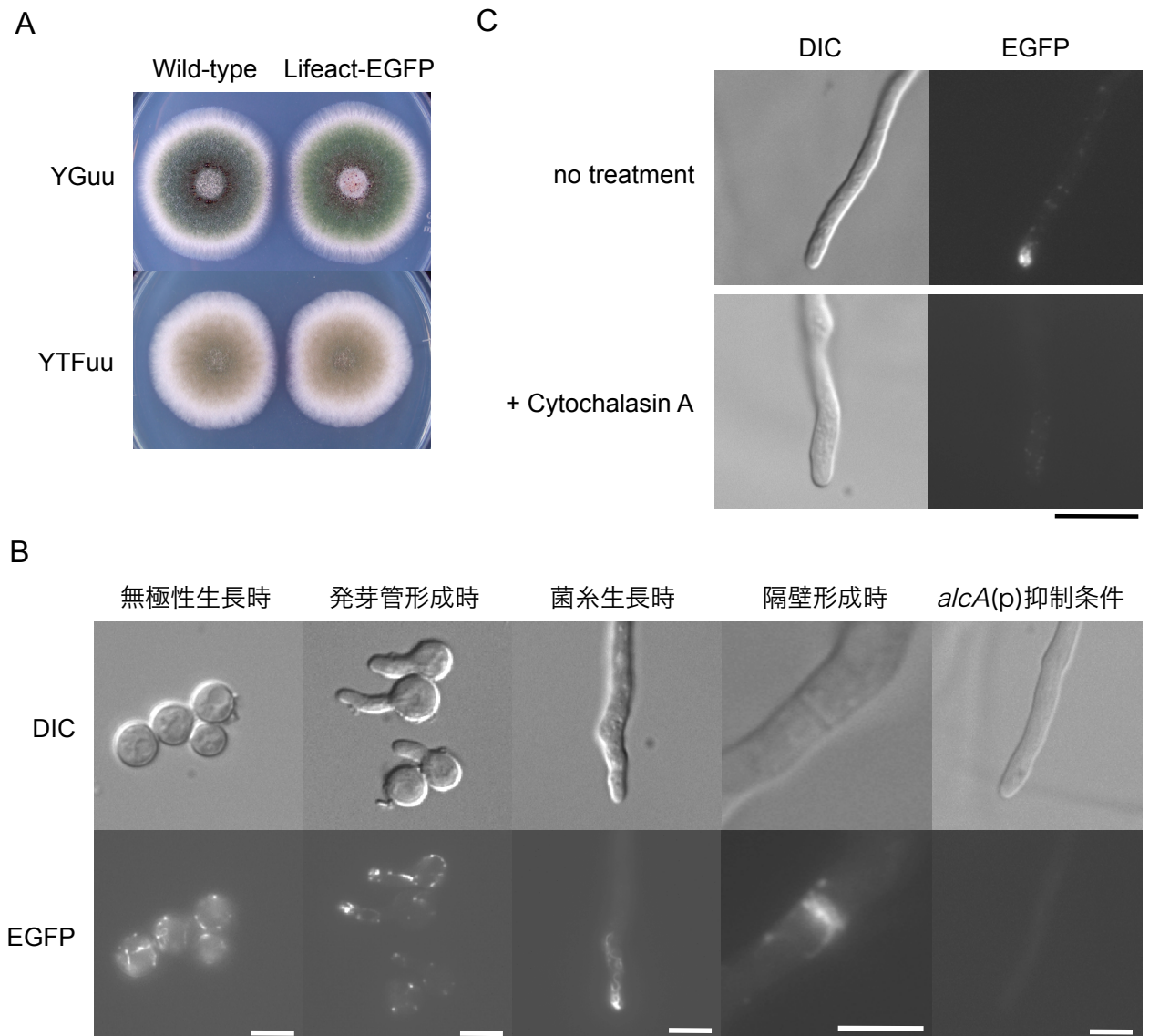


Fig. 2-26 Lifeact-EGFP株の表現型およびLifeact-EGFPの局在

- A. Wild-type (A1149/*pyrG*-1株)、Lifeact-EGFP株 (A1149LA-1株) を37°C、各培地で72時間培養した。
- B. A1149LA-1株を37°C、液体YTuu培地で4時間（無極性生長時）または5時間（発芽管形成時）、液体MMTFpuu培地で30時間（菌糸生長時および隔壁形成時）、液体MMGpuu培地で30時間（*alcA(p)*抑制条件）培養し、Lifeact-EGFPの蛍光を観察した。Bars, 5 μ m
- C. A1149LA-1株を37°C、液体MMTFpuu培地で16時間培養し、DMSO（no treatment）または200 μ g/mlのCytochalasin A（+ Cytochalasin A）を5 μ l加え、37°Cで15分静置し、Lifeact-EGFPの蛍光を観察した。Bar, 10 μ m

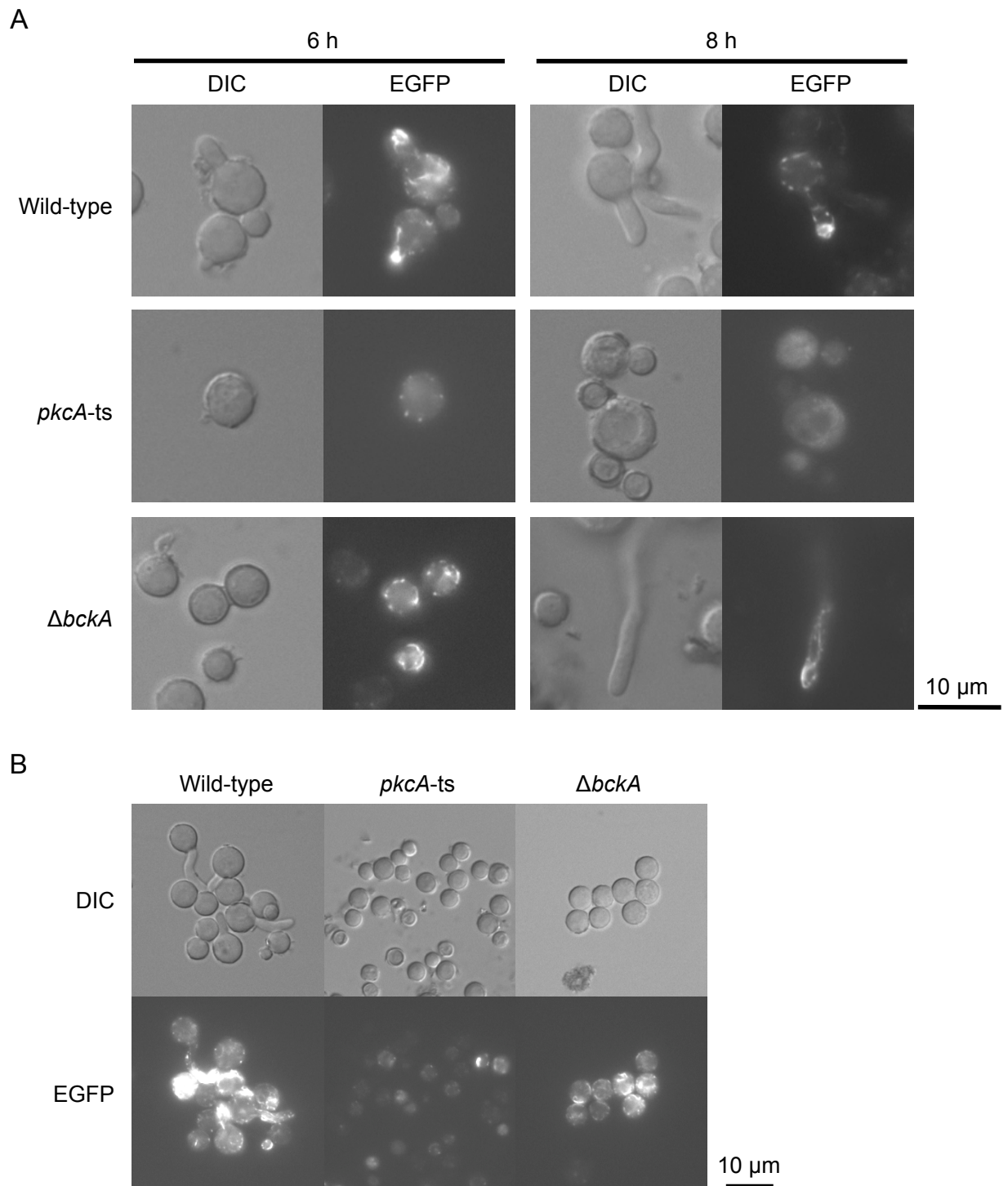


Fig. 2-27 *pkcA-ts*株、 $\Delta bckA$ 株における発芽時のLifeact-EGFPの局在

A. Wild-type (A1149LA-1)、*pkcA-ts* (*pkcA-ts*LA-1)、 $\Delta bckA$ ($\Delta bckA$ LA-1) を42°C、0.6 MのKClを含む液体YTuu培地で各時間培養し、Lifeact-EGFPの蛍光を観察した。

B. Wild-type (A1149LA-1)、*pkcA-ts* (*pkcA-ts*LA-1)、 $\Delta bckA$ ($\Delta bckA$ LA-1) を42°C、0.6 MのKClを含む液体YTuu培地で6時間培養し、Lifeact-EGFPの蛍光を観察した。蛍光強度の比較のためにEGFPの画像は全て365 msの同一の露光時間で撮影した。

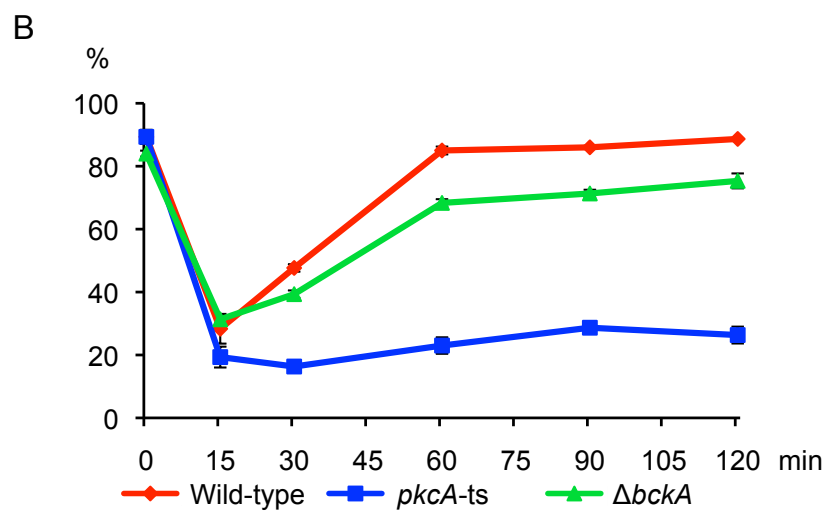
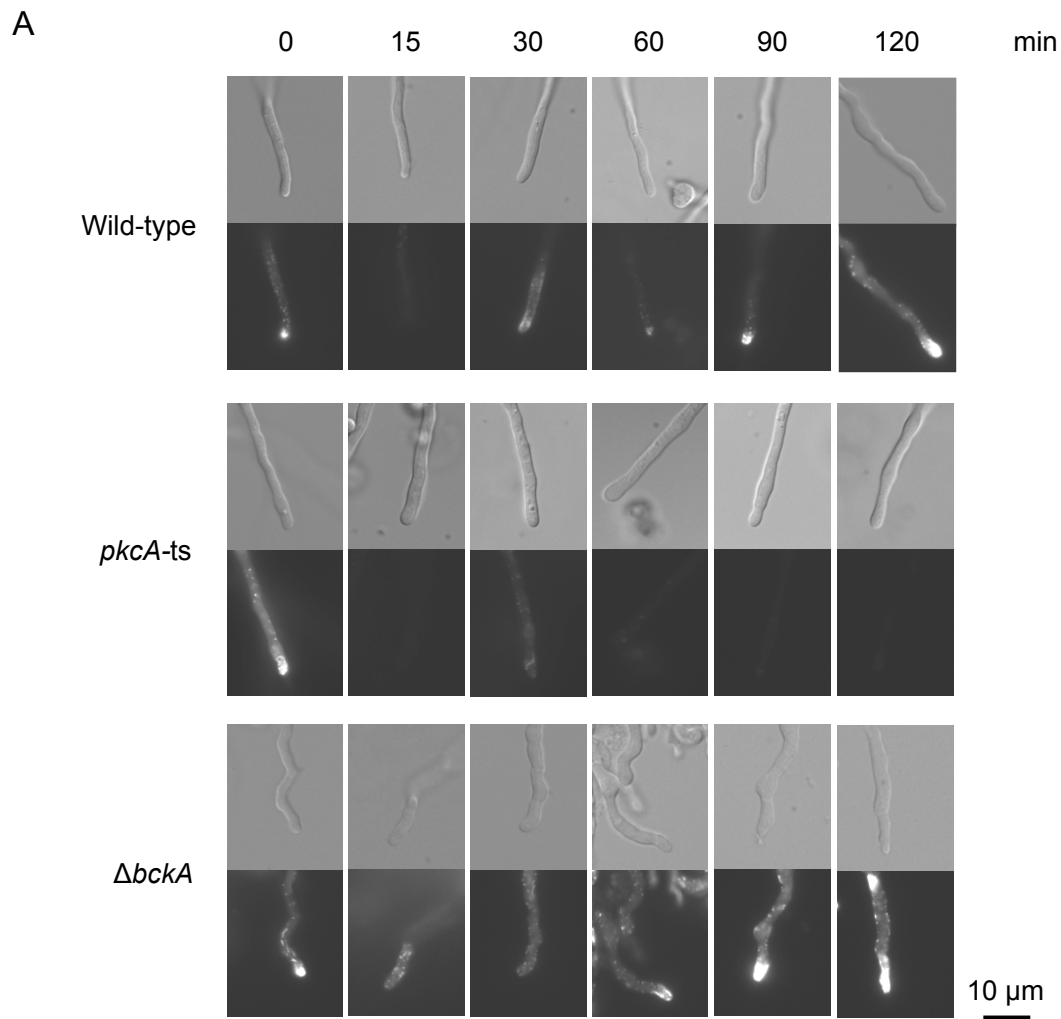


Fig. 2-28 *pkcA-ts*株における高温ストレス時の菌糸先端でのF-アクチンの挙動

A. 30°C、液体MMTFpuu培地でA1149LA-1株 (Wild-type) と*pkcA-ts*LA-1株 (*pkcA-ts*) は16時間、 $\Delta bckA$ LA-1株 ($\Delta bckA$) は24時間静置培養し、培養温度を42°Cにシフト後経時的に菌糸先端のLifeact-EGFPの蛍光を観察した。

B. パネルAの条件において先端に蛍光が見られる菌糸の割合を計測し、その経時変化をグラフで示した。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。

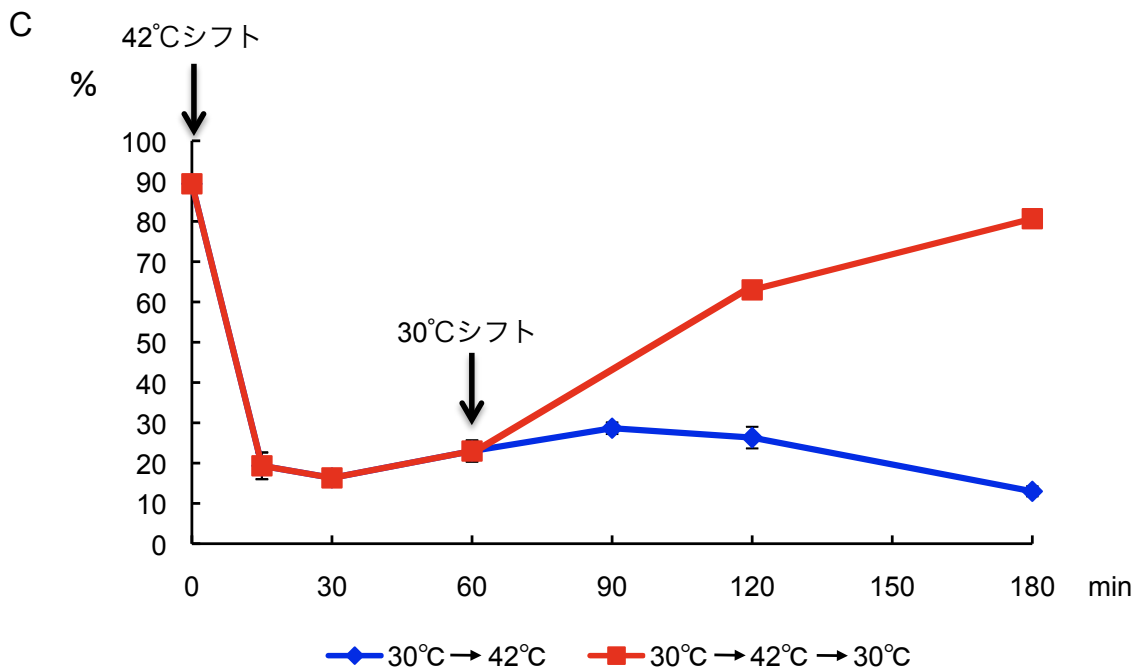
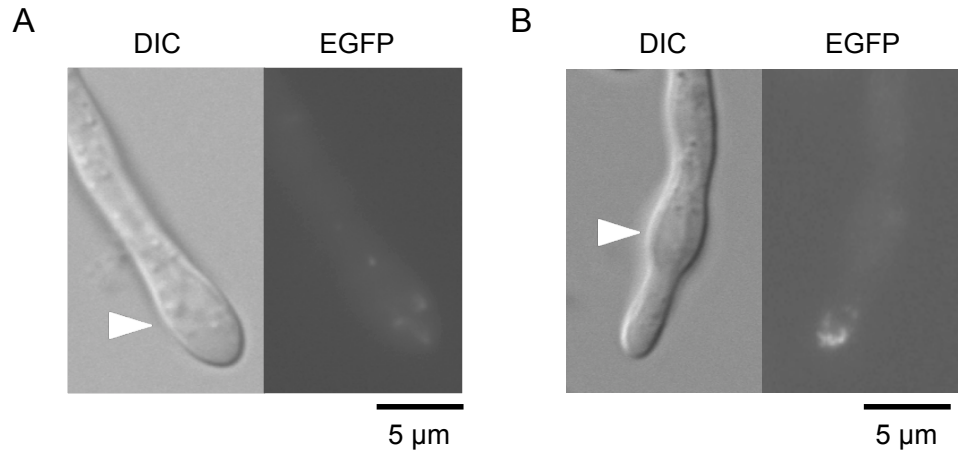


Fig. 2-29 *pkcA-ts*株を42°Cシフト後60分で再び30°Cにシフトした場合のF-アクチンの挙動

A. *pkcA-tsLA-1*株を30°C、液体MMTFpuu培地で16時間培養後、42°Cにシフトし60分後の菌糸先端の様子

B. (A)の後再び30°Cに移し、さらに60分培養後の菌糸先端の様子

(A) (B)について菌糸の膨張した部分を矢頭で示す。

C. *pkcA-tsLA-1*株を30°C、液体MMTFpuu培地で16時間培養後、42°Cにシフトし、60分後に再び30°Cに移したもの(赤)と42°Cで培養し続けたもの(青)の先端にLifact-EGFPの蛍光が見られる菌糸の割合を計測し、その経時変化をグラフで示した。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。

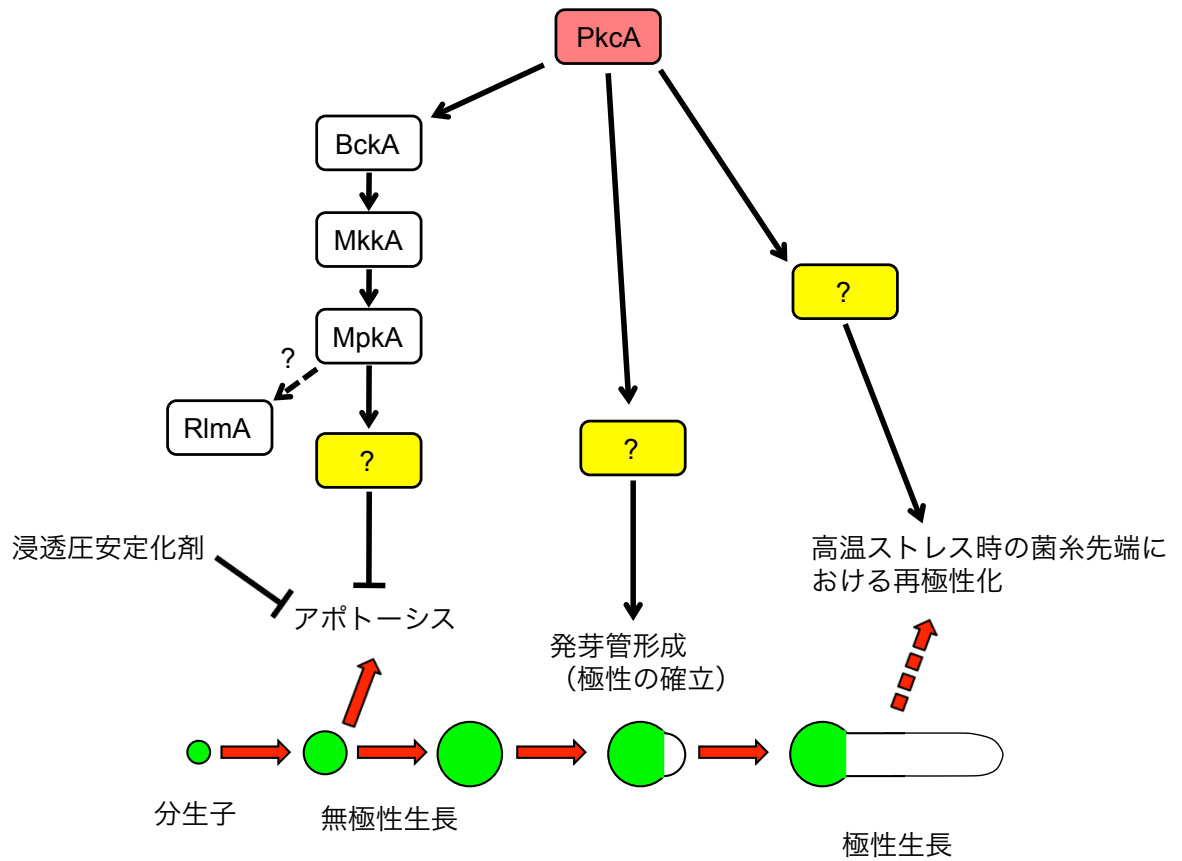


Fig. 2-30 高温条件におけるPkcAの機能のモデル図

Katayama *et al.*, 2012で報告した図を一部改変して示した。

高温条件においてMpkAがRlmAを活性化しているかどうかは不明であるため破線で示した。

第3章 PkcA の sterigmatocystin 合成制御に関わる機能解析

3-1. 序

序章でも述べたように PkcA は細胞壁の完全性維持やペニシリン合成に関わる遺伝子の転写制御、極性生長、隔壁形成、分生子形成、Unfolded Protein Response にも関与することが示唆されている (Herrmann *et al.*, 2006、Teepe *et al.*, 2007、Colabardini *et al.*, 2010)。さらに *Aspergillus oryzae* においては Woronin body タンパク質である AoHex1 のリン酸化、*Neurospora crassa* においては概日リズム、光応答に PKC が関与すること等が示唆されている (Juvvadi *et al.*, 2007、Franchi *et al.*, 2005)。このように糸状菌において PKC は幅広い機能を有することが示唆されている。

Aspergillus flavus や *Aspergillus parasiticus* はマイコトキシンである aflatoxin (AF) の生産菌であることが知られている。*A. nidulans* は AF 合成経路の最後の2段階の反応を触媒する酵素をコードする遺伝子をもっておらず、AF は生産しないが、AF 合成経路の中間体である sterigmatocystin (ST) を生産する (Fig. 3-1) (Bhatnagar *et al.*, 2006)。ST を合成する反応を触媒する酵素をコードする遺伝子群 (*stc* 遺伝子群) はゲノム上にクラスターとして存在し、そのクラスター内にコードされている転写因子 *AflR* によってクラスターに含まれるほとんどの遺伝子の転写が誘導される (Fig. 3-2) (Cary and Ehrlich, 2006)。このことから ST 合成には *AflR* による *stc* 遺伝子群の転写制御と *aflR* 自身の転写、活性制御の2段階の制御が関与すると考えられている。これまでに *AflR* はプロテインキナーゼ A (PKA) によってリン酸化されて核外に排出されることが示されており、PKA が *AflR* による *stc* 遺伝子群の転写誘導を制御することが示唆されている (Shimizu *et al.*, 2003)。一方、*aflR* の転写に関わる転写制御因子の探索、同定が行われており、*S. cerevisiae* において転写制御因子をコードする *TUP1* のオルソログである *rcoA*、転写因子をコードする *mtfA*、*sltA* の欠失株では ST 生産量や *aflR*、*stc* 遺伝子の一つである *stcU* の mRNA レベルが低下することが示されている (Hicks *et al.*, 2001、Ramamoorthy *et al.*, 2013、Shantappa *et al.*, 2013)。転写因子をコードする *rsmA* の高発現によって ST 生産量が増加し、*aflR* や *stcU* の mRNA レベルが上昇することも示されている (Yin *et al.*, 2012)。また、*aflR* や *stc* 遺伝子群の転写はエピジェネティック制御に関わるメチル化酵素である *LaeA* や *LaeA* 様メチル化酵素である *LlmF*、ヒストン脱アセチル化酵素

である HdaA、ヒストンメチル化酵素である ClrD、ヘテロクロマチンタンパク質 HepA によって制御されることが示唆されていることから、これらの転写はエピジェネティック制御を受けると考えられている (Bok and Keller, 2004、Palmer *et al.*, 2013、Shwab *et al.*, 2007、Reyes-Dominguez *et al.*, 2010)。しかし、これまでに *afilR* の転写を制御する上流のシグナル伝達機構についての解析はほとんどなされておらず、どのようにして上記の転写制御因子やヒストン修飾酵素が制御されているかは未解明である。

前述のように糸状菌において PKC の機能は非常に多岐にわたることが示唆されており、PKC の条件変異株を用いた網羅的転写解析を行うことは、PKC の制御する遺伝子やその制御機構の解明、PKC 活性化条件や失活条件において細胞内レベルでおこる現象についての理解等に繋がる知見が得られると考えられた。そこで本章では R429A 株と *pkcA-ts* 株を用い、PkcA 活性化条件、PkcA 失活条件における網羅的転写解析を行い、得られた結果からそれぞれの遺伝子を機能について分類した。これらの結果、PkcA が ST 合成に関わる機能をもつ可能性が考えられたため、本章では ST 合成制御に関わる PkcA の機能について解析を行った。

3-2. 材料と方法

3-2-1. 本章で用いた菌株

Escherichia coli

DH5 α : F⁻, Φ 80d*lacZ* Δ M15, Δ (*lacZYA-argF*)U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*,
hsdR17(*r_K⁻*, *m_K⁺*), *phoA*, *supE44*, λ ⁻, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*

本章で用いた *A. nidulans* 菌株を Table 3-1 に示した。

3-2-2. 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 3-2 に示した。

3-2-3. 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。

pBluescript II SK⁺ (Stratagene)

pUCpyroA2 (小野, 2008) (第 1 章 1-2-3 参照)

ppyrGthiF(p) (星, 2011) (第 1 章 1-2-3 参照)

ppyroAthiF(p) (本論文)

pBH1upthiF(p) (本論文)

pthiF(p)AnBH1 (本論文)

3-2-4. プラスミドの構築

・ ppyroAthiF(p)

ppyrGthiF(p)を *Aor51HI* - *Pst* I 消化して得られる *thiF* プロモーター (*thiF*(p)) を含む約 1.0 kbp の DNA 断片、pUCpyroA2 を *Aor51HI* - *Bam*HI 消化して得られる *pyroA* を含む約 2.3 kbp の DNA 断片、pBluescript II SK⁺を *Bam*HI - *Pst* I 消化して得られる約 3.0 kbp の DNA 断片を連結し、ppyroAthiF(p)を作製した。

・ pBH1upthiF(p)

FGSC A1149 株の全 DNA を鋳型とし、*Not*I-AnBH1F、*Spe*I-AnBH1 をプライマーとして使用して PCR により増幅した *anbH1* の ORF の上流約 1.5 kbp の DNA 断片を *Spe* I - *Not* I 消化して得られる約 1.5 kbp の DNA 断片と ppyroAthiF(p)を *Spe* I - *Not* I 消化して得られる約 6.2 kbp の DNA 断片とを連結し、pBH1upthiF(p)を作製した。

・ pthiF(p)AnBH1

FGSC A1149 株の全 DNA を鋳型とし、*Pst*I-AnBH1F、AnBH1-4 をプライマーとして使用して PCR により増幅した *anbH1* の ORF を含む約 2.2 kbp の DNA 断片を *Eco*R I - *Pst* I 消化して得られる約 0.9 kbp の DNA 断片と pBH1upthiF(p) を *Eco*R I - *Pst* I 消化して得られる約 7.7 kbp の DNA 断片とを連結し、pthiF(p)AnBH1 を作製した。

3-2-5. 本章で使用した *A. nidulans* 菌株の作製

3-2-5-1. *thiF* プロモーター制御下で *anbH1* を発現する株の作製

pthiF(p)AnBH1 (3-2-4 参照) を *Eco*R I - *Psh*A I 消化して得られる約 5.4 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。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 *Sma* I 消化後、FGSC A1149 株の全 DNA を鋳型とし、AnBH1-1、*Spe*I-AnBH1 をプライマーとして使用して PCR により増幅した約 1.0 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 2.0 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 4.9 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. 3-3)。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 TBH-1、-2、R429A-1 株由来の株については R429ATBH-1、-2 と命名した。TBH-1、-2 あるいは R429ATBH-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 TBH-1 および R429ATBH-1 を用いて解析を行った。

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

pUCpyroA2 を *Bgl* II - *Mlu* I 消化して得られる約 1.5 kbp の DNA 断片を用い、R429A-1 株を親株として形質転換を行った。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 *Pvu* II 消化後、pUCpyroA2 を *Bgl* II - *Mlu* I 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 株およびそれぞれの形質転換体では 4.0 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. 3-4)。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 R429ApyroA-1、-2 と命名した。これら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 R429ApyroA-1 を用いて解析を行った。

3-2-6. PCR

3-2-7. 培地

3-2-8. DNA の取扱法

3-2-9. 塩基配列の決定法

3-2-10. *E. coli* の形質転換法と *E. coli* からのプラスミド抽出法

3-2-11. *A. nidulans* の形質転換法

3-2-12. *A. nidulans* からの全 DNA の抽出法

3-2-13. サザン解析

3-2-14. *A. nidulans* の細胞抽出液の調製法

以上の項目は第 1 章「1-2. 材料と方法」に示した方法で行った。

3-2-15. RNA-seq 解析

各条件で培養した菌体から 1-2-17 に示した方法で全 RNA を調製し、TruSeq RNA Sample Preparation Kit (Illumina) を用いて RNA-seq 解析に用いるサンプルを調整した。調製したサンプルを Illumina GAIIx (Illumina) を用いて RNA-seq 解析を行った。得られた結果を Genomics Workbench を用いて *A. nidulans* FGSC A4 株のゲノムにマッピングし、解析した。

3-2-16. sterigmatocystin 測定

分生子 10^6 個を固体最少培地にプレーティングし、96 時間培養した。培養後プレートから直径 7 mm の円形状の培地をとり、希釈管に入れた 1 ml の蒸留水の中で破碎した。ここに 1 ml のクロロホルムを加え、ボルテックスで混合後、25°C で 30 分振盪した。3,000 rpm で 5 分間遠心後クロロホルム層を分取し、クロロホルムを飛ばし、50 μ l のクロロホルムに溶解した。このうち 10 μ l を薄層クロマトグラフィー (TLC) で展開後、TLC プレートに、10%塩化アルミニウムを含むエタノールを噴霧し、80°C で 10 分間静置した。これに 360 nm の紫外線をあて ST を検出した。なお TLC の展開溶媒にはトルエン：酢酸エチル：酢酸=8：1：1 で混合した溶媒を用い、コントロールとしてアセトニトリルに溶解した ST を用いた。

3-2-17. 菌体からのヌクレオソーム DNA の回収

菌体からのヌクレオソームの抽出は Gonzalez らの方法に従い、以下のように

行った (Gonzalez and Scazzocchio, 1997)。各条件で培養した菌体をガラスフィルターを用いて回収し、キムタオルで水分を除いた後、100 mg の菌体を液体窒素で凍結し、乳鉢、乳棒で破碎した。破碎した菌体を 1 ml の Micrococcal Nuclease buffer に懸濁し、ボルテックスで 1 分間混合した。新しいエッペンドルフチューブに終濃度 1 U/ml となるように Micrococcal Nuclease (TaKaRa) を入れ、菌体破碎液 200 μ l を加えた後、37°C で 30 分間反応させた。反応後、200 μ l の 40 mM EDTA、2% SDS 溶液を加えて反応を停止した。等量のフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコールを加えてよく混ぜ、15,000 rpm、4°C で 5 分間遠心し、上清を回収するという操作を 2 回繰り返した。さらに等量のクロロホルムを加えてよく混ぜ、15,000 rpm、4°C で 5 分間遠心し、上清を回収した。これに終濃度 100 μ g/ml となるように RNase A を加え、37°C で 15 分間静置した。この溶液からエタノール沈殿によって DNA を回収し、得られた DNA を電気泳動で分離後、100 bp と 200 bp の間に見られるモノヌクレオソームに由来する DNA 断片を切り出し、回収した。

3-2-18. ヌクレオソームのマッピング

3-2-17 に示した方法で回収したヌクレオソーム DNA の両端 101 bp の配列を Illumina GAIIx (Illumina) を用いて決定し、決定された配列を、SOAP2 (Li *et al.*, 2009) を用いて *A. nidulans* FGSC A4 株のゲノムにマッピングし、ヌクレオソーム DNA 断片の中央の位置 (中点) の位置を決定した。

3-3. 結果

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

PkcA 活性化条件における網羅的転写解析を行うため、R429A 株を 37°C、*pkcA*(R429A)発現誘導条件である固体 MMTFpuu 培地で 20 時間培養した菌体から全 RNA を抽出し、RNA-seq 解析を行った。20 時間培養という条件は PkcA 活性化による二次的、三次的影響をも含めた細胞レベルでの変化に対する総合的理解を目的として用いた。得られた結果から、R429A 株において mRNA が野生型株と比較して 2 倍以上または 1/2 以下に有意に変動している遺伝子を抽出した。その結果、R429A 株では 793 遺伝子の mRNA が野生型株と比較して 2 倍以上に増加しており、このうち機能が解析または推定されている遺伝子は 195 遺伝子であった (Table 3-3、Fig. 3-5A)。この 195 遺伝子の機能について分類

したところ、細胞壁や多糖類の分解、二次代謝産物の生産などに関わる遺伝子が多く含まれていた (Fig. 3-5B)。一方、382 遺伝子の mRNA が野生型株と比較して 1/2 以下に減少しており、このうち機能が解析または推定されている遺伝子は 140 遺伝子であった (Table 3-4、Fig. 3-6A)。この 140 遺伝子の機能について分類したところ、多くは代謝関連遺伝子であり、多糖類の分解や二次代謝に関わる遺伝子や細胞壁に関連する遺伝子も含まれていた (Fig. 3-6B)。

次に、PkcA 失活条件における網羅的転写解析を行うため、*pkcA-ts* 株を用い、許容温度(30°C)、固体 MMGpuu 培地で 20 時間培養した菌体を制限温度(42°C)に移し、1.5 時間培養後に菌体から全 RNA を抽出し、RNA-seq 解析を行った。得られた結果から、*pkcA-ts* 株において mRNA が野生型株と比較して 2 倍以上または 1/2 以下に有意に変動している遺伝子を抽出した。この結果、*pkcA-ts* 株では 142 遺伝子の mRNA が野生型株と比較して 1/2 以下に減少しており、このうち機能が解析または推定されている遺伝子は 50 遺伝子であった (Table 3-5、Fig. 3-7A)。この 50 遺伝子の機能について分類したところ、これらの遺伝子の多くは代謝関連遺伝子であり、細胞壁関連遺伝子も含まれていた (Fig. 3-7B)。一方、835 遺伝子の mRNA が野生型株と比較して 2 倍以上に増加しており、このうち機能が解析または推定されている遺伝子は 189 遺伝子であった (Table 3-6、Fig. 3-8A)。この 189 遺伝子の機能について分類したところ、脂質代謝や多糖類の分解、細胞壁などに関わる遺伝子が含まれていた (Fig. 3-8B)。

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

PkcA 失活条件における網羅的転写解析の結果、発現比を比較すると、*p-value* が高いために有意差があるとは言いきれないものの、*pkcA-ts* 株では sterigmatocystin (ST) 合成に関わる遺伝子クラスターに含まれるほとんどの遺伝子の mRNA が野生型株と比較して増加していた (Table 3-7)。AflR がこのクラスターに含まれるほとんどの遺伝子の転写を制御することから、PkcA が *aflR* を介して ST の合成制御に関わる可能性が考えられた。そこで PkcA 失活条件における ST 生産量の測定を行った。PkcA は生育に必須であり、PkcA が完全に失活した条件では ST 生産の測定は不可能であるため、*pkcA-ts* 株において部分的に PkcA が失活する 37°C (第 1 章参照、Fig. 1-8C) で ST 生産量を測定した。その結果、37°C において *pkcA-ts* 株では ST 生産量が野生型株と比較して著しく

増加していた (Fig. 3-9)。次に、R429A 株を用い、PkcA 活性化条件における ST 生産量を測定した。その結果、R429A 株において活性化型 PkcA の生産が誘導される MMTF 培地では ST 生産量が野生型株と比較して著しく減少していた (Fig. 3-10)。これらの結果から、PkcA が ST 合成を負に制御する機能を持つことが示された。

3-3-3. *rlmA* 欠失株における ST 生産量の測定

PkcA が転写因子 RlmA を介して ST 合成を制御するかどうか検討するため、*rlmA* 欠失株における ST 生産量を測定したところ、この株における ST 生産量は野生型株より増加することはなかった (Fig. 3-11)。このことから、PkcA による ST 合成の制御は RlmA を介さない機能であることが示唆された。

3-3-4. PkcA 活性化条件における *afIR*、*stcU* の転写解析

PkcA が *afIR* や *stc* 遺伝子群の転写制御に関与するかどうか検討するため、R429A 株を用い PkcA 活性化条件における *afIR* と *stc* 遺伝子群の一つである *stcU* の転写解析を real time RT-PCR を用いて行った。野生型株、R429A 株を *pkcA*(R429A)誘導条件で 24、48、72、96 時間培養した場合の *afIR*、*stcU* の mRNA 量を測定したところ、野生型株では培養 48 時間後においてこれらの mRNA 量の増加が見られたのに対し、R429A 株では培養 96 時間後までこれらの遺伝子の mRNA 量の増加はほとんど見られなかった (Fig. 3-12)。このことから、PkcA は *afIR*、*stcU* の転写を負に制御することが示された。

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

これまでに PkcA は転写制御因子 AnBH1 を介してペニシリン合成に関わる遺伝子の転写を負に制御することが示唆されている (Herrmann *et al.*, 2006)。そのため、PkcA が AnBH1 を介して *afIR* や *stc* 遺伝子群の転写を抑制する可能性が考えられた。これまでに *anbH1* は生育に必須な遺伝子であることが示唆されているため、培地にチアミンを添加することによって発現抑制が可能な *thiF*(p) (Calcagno-Pizarelli *et al.*, 2011) 制御下で *anbH1* を発現する、野生型株 (TBH 株) と活性化型 PkcA を生産する株 (R429ATBH 株) を 3-2-5-1 に示した方法で作製した。また、これらの株と栄養要求性を揃えるために、ピリドキシン要求性の回復した R429A 株 (R429ApyroA 株) を 3-2-5-2 に示した方法で作製した。

これらの株における ST 生産量を測定したところ、チアミンを添加した培地における TBH 株の ST 生産量は野生型株と比較して増加していた (Fig. 3-13)。このことから *anbH1* はペニシリン合成だけでなく ST 合成も負に制御することが示唆された。一方、R429ATBH 株では R429A 株と同様にチアミンの存在に関わらず ST 生産はほとんど見られなかった (Fig. 3-13)。このことから PkcA は AnBH1 を介さずに ST 合成を制御することが示唆された。

3-3-6. *pkcA* 条件変異株におけるヌクレオソームの位置の変化

これまでに *afIR* や *stc* 遺伝子群の転写はエピジェネティック制御を受けることが示唆されていることから、PkcA 活性化条件や失活条件ではヌクレオソームの位置、存在状態に変化が見られる可能性が考えられた。そこで R429A 株、*pkcA-ts* 株を用い、これらの条件下でのヌクレオソームの位置を決定した。その結果、PkcA 活性化条件で *afIR* の転写開始点付近のヌクレオソームが増加していた (Fig. 3-14)。また、*stcU* の転写開始点は決定されていないが、ORF 直上流の領域でヌクレオソームの増加が見られた (Fig. 3-15)。さらに *stc* 遺伝子の一つである *stcA* の ORF 上流でもヌクレオソームの位置に変化が見られた (Fig. 3-16)。しかし、細胞壁合成酵素遺伝子付近のヌクレオソームの位置について解析した結果、*afIR* や *stc* 遺伝子とは逆に PkcA 活性化条件で mRNA の存在量が多い *fksA* でも転写開始点付近のヌクレオソームが増加し、同様に転写が誘導される *chsF* でも転写開始点上流のヌクレオソームが増加していた (Fig. 3-17、18)。また、PkcA 活性化条件下で mRNA 量が野生型株と比べてほとんど変化しない *agsA* においても転写開始点上流及び下流でヌクレオソームの増加が見られた (Fig. 3-19)。これらのことから、PkcA の活性化はヌクレオソームの位置に影響を与えるものの、ヌクレオソームの位置とそれが存在する遺伝子の mRNA の存在量の相関性は低いと考えられた。一方、30°C で培養した菌体を 42°C に移した場合には、野生型株、*pkcA-ts* 株の両方で明確なヌクレオソームのピークがあまり見られなかった (Fig. 3-14~19)。

3-4. 考察

本章ではまず R429A 株、*pkcA-ts* 株を用いて PkcA 活性化条件及び PkcA 失活条件における網羅的転写解析を行った。その結果、PkcA 活性化条件で mRNA 量の増加した遺伝子には細胞壁合成や多糖類の分解、二次代謝産物生産、シグ

ナル伝達に関わる遺伝子が含まれており、この条件で mRNA の減少した遺伝子には様々な代謝に関わる遺伝子が含まれていた。一方、高温かつ PkcA 失活条件で mRNA 量の減少する遺伝子の多くは代謝に関わる遺伝子であり、この条件で mRNA 量の増加する遺伝子には脂質代謝や多糖類の分解、細胞壁などに関わる遺伝子が含まれていた。PkcA 失活条件における網羅的転写解析の結果、PkcA が ST 合成制御に関与する可能性が考えられた。そこで、PkcA が部分的に失活する条件、PkcA 活性化条件における ST 生産量を測定し、PkcA が ST 合成を負に制御する機能を持つことを示した。また、*rlmA* 欠失株における ST 生産量を測定し、この ST 生産量が野生型株と同等であったことから、PkcA は RlmA に依存せず ST 合成を制御することを示唆した。PkcA 活性化条件では *afIR*、*stcU* の転写誘導がほとんど起こらないことから、PkcA がこれらの遺伝子の転写制御を介して ST 生産を制御することを示唆した。さらに、これまでに PkcA によって制御され、ペニシリン合成に関わる遺伝子の転写を抑制する転写制御因子をコードする *anbH1* の発現を抑制した場合の解析により、AnBH1 が ST 合成を負に制御することを示唆した。一方、PkcA 活性化条件では *anbH1* の発現を抑制した場合にも ST 生産がほとんど見られなかったことから、PkcA は AnBH1 には依存しない経路でも ST 生産を制御することを示唆した。

3-4-1. PkcA 活性化条件、失活条件における網羅的転写解析

3-4-1-1. 細胞壁関連遺伝子

第 1 章において行った *pkcA*(R429A)発現誘導条件で 20 時間培養した場合の real time RT-PCR による転写解析の結果と一致し、PkcA 活性化条件における網羅的転写解析の結果では、R429A 株において *chsB*、*chsC*、*csmA*、*csmB*、*fksA*、*agsB* の mRNA が野生型株と比較して増加していた (Table 3-3)。さらに、第 1 章で行った 30°C で培養した菌体を 42°C に移した場合の転写解析の結果と一致し、PkcA 失活条件における網羅的転写解析の結果では、*pkcA*-ts 株において *chsC* の mRNA 量が増加していた (Table 3-6)。

PkcA 活性化条件、PkcA 失活条件における網羅的転写解析の結果、細胞壁合成酵素遺伝子以外の細胞壁関連遺伝子の mRNA 量も変動していることが明らかとなった。PkcA 活性化条件では *gelA*、*gelC*、*gelD*、*crhA*、*crhC*、*btgC*、*amyD*、*amyG*、*eglC*、*ugmA*、*ugtA*、*gfsA*、*ungA*、*gfaA*、*nagA* の mRNA 量が増加していた (Table 3-3)。また、PkcA 失活条件において *crhC*、*ungA* の mRNA 量が減

少していた (Table 3-6)。 *gelA*、 *gelC*、 *gelD* は β -1,3-glucanotransferase をコードし、 *A. fumigatus* におけるこれらのオルソログは β -1,3-グルカン鎖の伸長に機能することが示唆されている (Mouyna *et al.*, 2013)。 *crhA*、 *crhC* は transglycosidase をコードし、 *S. cerevisiae* におけるこれらのオルソログはキチン鎖と β -グルカン鎖の架橋の形成に機能することが示唆されている (Cabib *et al.*, 2007)。 *btgC* は glycoside hydrolase (GH) 17 family に属する酵素をコードし、 *A. fumigatus* の GH 17 family に属する Bgt1 や Bgt2 は β -グルカン鎖の分岐の形成に機能することが示唆されている (Mouyna *et al.*, 2013)。 また最近、 *A. nidulans* において α -amylase をコードする *amyD* が細胞壁の α -グルカンの分解、 *amyG* が細胞壁の α -グルカンの合成に関与することが報告されている (He *et al.*, 2014)。 *eglC* のコードするエンドグルコシダーゼは細胞壁中の β -グルカンの分解に関与することが示唆されており (Choi *et al.*, 2005)、 *ugmA*、 *ugtA*、 *gfsA* はガラクトフラノースの合成及び糖タンパク質への付加に関与することが示されている (Bakker *et al.*, 2005、 Engel *et al.*, 2009、 Komachi *et al.*, 2013)。 ガラクトフラノースが糖タンパク質に付加されることや *gfsA* 欠失株の生育の悪化が浸透圧安定化剤の培地への添加によって回復することから、ガラクトフラノースは細胞壁の完全性維持に寄与することが示唆されている (Komachi *et al.*, 2013)。 *PkcA* は細胞壁ストレスに応答して活性が亢進することが示唆されていることから、これらの遺伝子はそのような環境において細胞壁を環境に適したものに作りかえる役割を担うと考えられる。 また、 *ungA*、 *gfaA* の *S. cerevisiae* におけるオルソログはキチンの単量体ユニットである *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) の合成に関与することが示されている (Milewski *et al.*, 2006)。 *UngA*、 *GfaA* の *S. cerevisiae* のオルソログ *Qri1p*、 *Gfa1p* はキチンの合成経路における律速酵素であり、キチンの合成量の決定に重要であることが示されている (Merzendorfer, 2011)。 これらのことから、 *PkcA* はこれらの遺伝子の発現を誘導することで GlcNAc の合成を促進し、キチン合成を誘導する可能性が考えられる。 *nagA* は *N*-アセチルグルコサミニダーゼをコードし、GlcNAc の二量体を単量体 GlcNAc に分解する (de Groot *et al.*, 2009)。 このことから、 *PkcA* は *nagA* の発現を誘導することでも GlcNAc の供給を促進する可能性が考えられる。

3-4-1-2. 脂質代謝関連遺伝子

網羅的転写解析の結果、 *PkcA* 活性化条件において mRNA 量が減少する遺伝

子には *S. cerevisiae* においてエルゴステロール合成に関わる遺伝子のオルソログ (AN8907、AN7211、AN7146、AN1901、AN0451) が含まれていた (Table 3-4)。しかし、PkcA 失活条件においても、野生型株と比較して 1/2 以下には減少しないものの、複数の *S. cerevisiae* においてエルゴステロール合成に関わる遺伝子のオルソログの mRNA 量が減少していた。このことから、PkcA 活性化条件におけるこれらの遺伝子の mRNA の減少は、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る。また、*S. cerevisiae* においてエルゴステロールの合成に関わる遺伝子のうちのいくつかは、高浸透圧ストレス時や塩ストレス時に高浸透圧に応答するシグナル伝達経路 (HOG 経路) の MAP キナーゼである Hog1p 依存的に転写が抑制されることが示唆されている (Montanes *et al.*, 2011)。3-4-2 で詳述するが、PkcA 失活条件では HOG 経路が活性化している可能性が考えられることから、PkcA 失活条件では *A. nidulans* における Hog1p のオルソログである HogA や MpkC が活性化し、エルゴステロール合成に関わる遺伝子の mRNA 量が減少した可能性が考えられる。

3-4-1-3. 二次代謝産物生産関連遺伝子

PkcA 活性化条件ではポリケチド化合物である F9775 合成に関わる AN7914、*orsA*、*orsB*、*orsC* や Terrequinone A 合成に関わる *tdiA*、*tdiB*、*tdiC*、*tdiD*、*tdiE* の mRNA が著しく増加していた (Table 3-3)。また本章における解析から PkcA は ST 合成に関わる遺伝子の転写を負に制御することが示唆された (Table 3-7、Fig. 3-13)。さらにこれまでに *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が示されている (Herrmann *et al.*, 2006)。この結果と一致し、PkcA 活性化条件ではペニシリン合成に関わる *ipnA*、*aatA*、*aatB* の mRNA は減少し、PkcA 失活条件では *ipnA*、*aatA*、*acvA* の mRNA は増加していた (Table 3-4、6)。これらのことから PkcA は様々な二次代謝産物生産を転写レベルで正または負に制御することが示唆される。

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

PkcA 活性化条件では細胞内シグナル伝達経路の構成因子をコードする *mkkA*、*rlmA* の mRNA 量が増加していた (Table 3-3)。*mkkA*、*rlmA* は CWI 経路において PkcA 下流で機能するタンパク質をコードすることから、PkcA の活性化によ

って CWI 経路がさらに活性化する機構が存在する可能性が考えられる。*S. cerevisiae* においては Rlm1p が *SLT2* や *RLM1* の転写を誘導することが示唆されているが (Fuchs and Mylonakis, 2009、Hu *et al.*, 2007)、Pkc1p による転写誘導については報告がない。

PkcA 活性化条件では *S. cerevisiae* において HOG 経路の構成因子をコードする *SLN1*、*SKN7* のオルソログである *tcsB*、*srrA* の mRNA 量が増加していた (Table 3-3) (Furukawa *et al.*, 2002、Hagiwara *et al.*, 2011)。一方、PkcA 失活条件では *S. cerevisiae* において HOG 経路の構成因子をコードする *HOG1*、*SSK1*、*PBS2* のオルソログである *mpkC*、*sskA*、*pbsA* (Ma and Li, 2013) の mRNA 量が増加していた (Table 3-6、Fig. 3-20)。これらのことから PkcA が HOG 経路の活性に何らかの影響を与える可能性が考えられる。これまでに *A. nidulans* において、ソルビトールの添加による高浸透圧条件での網羅的転写解析がなされている (Hagiwara *et al.*, 2009)。高浸透圧条件において mRNA 量が 5 倍以上に増加する 116 遺伝子の PkcA 活性化条件、PkcA 失活条件における mRNA 量について調べたところ、PkcA 失活条件下ではこれらのうち 69 遺伝子の mRNA 量が野生型株と比較して有意に増加していたことから (Table 3-8)、PkcA 失活条件下では HOG 経路が活性化している可能性が考えられる。*S. cerevisiae* では Zymolyase 処理時に HOG 経路の MAP キナーゼである Hog1p がリン酸化されて活性化するが、CWI 経路の MAP キナーゼをコードする *slt2* の欠失株では Zymolyase 処理時の Hog1p の活性がより亢進することが示唆されている (Rodriguez-Pena *et al.*, 2010)。また、低浸透圧ストレス時に起こる Hog1p の脱リン酸化が Slt2p 依存的事であることも示唆されている (Rodriguez-Pena *et al.*, 2010)。これらのことから、*S. cerevisiae* では Slt2p が Hog1p を負に制御することが示唆されている。*A. nidulans* においても PkcA が MpkA を介して Hog1p のオルソログである MpkC の発現、機能を負に制御する可能性が考えられる。また、PkcA、MpkA は *A. nidulans* におけるもう一つの Hog1p のオルソログである HogA の機能も負に制御する可能性も考えられる。

PkcA 失活条件ではカルシウム応答シグナル伝達経路の転写因子をコードする *crzA*、カルモジュリン依存性キナーゼをコードする *cmkA* の mRNA 量が増加していた (Table 3-6)。これまでに *A. nidulans* においてカルシウムに応答してカルシウム応答シグナル伝達経路の転写因子である CrzA 依存的に転写が誘導される 25 の遺伝子が同定されている (Hagiwara *et al.*, 2008)。これら 25 遺伝

子の PkcA 活性化条件、PkcA 失活条件における mRNA 量について調べたところ、PkcA 失活条件においてこれらの遺伝子のほとんどの mRNA 量が増加していた (Table 3-9)。これらのことから、PkcA 失活条件においてカルシウム応答シグナル伝達経路が活性化していることが示唆される。哺乳類において PKC はカルシニューリンをリン酸化することで部分的に不活性化することが示唆されており (Hashimoto and Sonderling, 1989)、*A. nidulans* においても PkcA がカルシニューリン CnaA をリン酸化して不活性化する機能を持つ可能性が考えられる。一方、*S. cerevisiae* では小胞体ストレス時に Pkc1p が Sit2p を介して形質膜に局在するカルシウムイオンチャネルである Cch1p-Mid1p を活性化することでカルシウム応答シグナル伝達経路が活性化することが示されている (Bonilla and Cunningham, 2003)。このことから、*S. cerevisiae* と *A. nidulans* とでは、PKC によるカルシウム応答シグナル伝達経路の制御機構が異なる可能性が考えられる。

3-4-3. PkcA の ST 合成制御に関わる機能

先にも述べたように PkcA が ST 合成を負に制御することが示され、PkcA による ST 合成制御は *aflR* や *stc* 遺伝子群の転写制御を介して行われることが示唆された。さらに、PkcA が AnBH1 非依存的に ST 合成を負に制御す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. 3-21 に示した。

AnBH1 は転写因子である HAP 複合体の結合する CCAAT 配列と重複する配列に結合することで HAP 複合体による転写誘導を妨げる働きをもつことが示唆されている (Caruso *et al.*, 2002)。しかし、*aflR*、*stcU* のプロモーター領域には CCAAT 配列が存在しないことから、AnBH1 はこれらの転写を直接阻害しない可能性も考えられる。

本章の序でも述べたが、*A. nidulans* では *S. cerevisiae* の TUP1 のオルソログである *rcoA*、転写因子をコードする *mtfA*、*sltA*、*rsmA* が *aflR* や *stcU* の転写制御に関与することが示唆されている (Hicks *et al.*, 2001、Ramamoorthy *et al.*, 2013、Shantappa *et al.*, 2013、Yin *et al.*, 2012)。また、*aflR* や *stc* 遺伝子群はエピジェネティック制御を受けることが示唆されている (Bok and Keller, 2004、Palmer *et al.*, 2013、Shwab *et al.*, 2007、Reyes-Dominguez *et al.*, 2010)。PkcA 活性化条件、失活条件における網羅的転写解析の結果では、*rcoA*、*mtfA*、*sltA*、*rsmA* の mRNA 量や、*aflR* や *stc* 遺伝子群のエピジェネティック制御に関与する

ことが示唆されている *laeA*、*llmF*、*hdaA*、*clrD*、*hepA* の mRNA 量が野生型株と同等であったことから、PkcA による ST 合成制御は少なくともこれらの遺伝子の転写制御を介さない可能性が示唆された。PkcA がこれらの遺伝子産物の翻訳後の制御に関わる可能性が考えられることから、今後 ST 合成の正の制御に関わる *rcoA*、*mtfA*、*sltA*、*rsmA*、*laeA*、*llmF* を欠失した *pkcA-ts* 株や、ST 合成の負の制御に関わる *hdaA*、*clrD*、*hepA* を欠失した R429A 株を用い、PkcA 部分的失活条件、PkcA 活性化条件における ST 生産量の測定や *afilR*、*stcU* の転写解析を行う必要がある。

網羅的転写解析の結果、PkcA 失活条件下では HOG 経路、カルシウム応答シグナル伝達経路が活性化している可能性が考えられたことから、PkcA がこれらのシグナル伝達経路を介して ST 合成を制御する可能性が考えられる。これについては、これらのシグナル伝達経路の構成因子をコードする遺伝子を欠失した *pkcA-ts* 株を用い、PkcA 部分的失活条件における ST 生産量の測定や *afilR*、*stcU* の転写解析を行うことによって明らかになると思われる。

本研究では PkcA 活性化条件における *afilR*、*stc* 遺伝子、細胞壁合成酵素遺伝子の転写開始点付近のヌクレオソームの位置とそれらの遺伝子の転写量との相関についても検討したが、これらの相関は低いと考えられた。本章で行った解析ではあらゆる遺伝子についてヌクレオソームの位置と転写量との相関について検討するために、網羅的転写解析を行った培養条件と同じ条件でヌクレオソームの位置を決定した。しかし、R429A 株の際に用いた *pkcA*(R429A)の誘導条件で 20 時間という長い培養条件では PkcA 活性化後の時間が長いため、転写レベルではそれほど大きな変化ではないものの、長時間の培養により mRNA の蓄積または減少が起こった可能性があり、そのような場合、ヌクレオソーム構造の変化との相関性を検討するには適さない条件であった可能性がある。*pkcA-ts* 株を用いた実験では 42°C シフト後 1.5 時間で検討しているが、この場合、野生型株、*pkcA-ts* 株ともヌクレオソームの構造がほとんど見られない。このことは 42°C へのシフトでヌクレオソーム構造に大きな変化が起こる可能性を示唆するが、それについてはさらなる検討が必要と思われる。また、これらの遺伝子の転写開始点付近におけるヌクレオソームの位置だけでなく、アセチル化またはメチル化されたヒストンに対する抗体を用いたクロマチン免疫沈降法によって、ヒストンがどのような修飾を受けているかについても検討する必要があると考えられる。

Table 3-1 本章で使用した *A. nidulans* 菌株

| Strain | Genotype | Source |
|--------------------------|---|-------------------------------|
| FGSC A1149 | <i>pyrG89 pyrA4 nkuA::argB veA1</i> | FGSC* |
| A1149/pyroA | <i>pyrG89 pyrA4::pyroA nkuA::argB veA1</i> | 山崎 未発表 |
| pkcA-ts-2 | <i>pyrG89 pyrA4 riboB2 nkuA::argB veA1</i> <i>pkcA::riboB-pkcA(P959L)</i> | Katayama <i>et al.</i> , 2012 |
| R429A-1 | <i>pyrG89 pyrA4 riboB2::riboB-alcA(p)-pkcA(R429A)</i> <i>nkuA::argB veA1</i> | 本論文 (第 1 章) |
| Δ rlmA-1 | <i>pyrG89 pyrA4 nkuA::argB veA1 rlmA::pyroA</i> | 本論文 (第 1 章) |
| R429A Δ rlmA-1,-2 | <i>pyrG89 pyrA4 riboB2::riboB-alcA(p)-pkcA(R429A)</i> <i>nkuA::argB veA1 rlmA::pyroA</i> | 本論文 (第 1 章) |
| R429ApyroA-1,-2 | <i>pyrG89 pyrA4::pyroA</i> <i>riboB2::riboB-alcA(p)-pkcA(R429A) nkuA::argB veA1</i> | 本論文 |

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

Table 3-2 本章で使用したオリゴヌクレオチド

| プライマー | 配列 |
|-------------|---------------------------------|
| NotI-AnBH1F | TTGCGGCCGCGAGAAGGCGAAG |
| SpeI-AnBH1 | GGACTAGTGGTGAGTGGTCTAGGCGC |
| PstI-AnBH1F | GGGCTGCAGATGGCTGATACACAACAACCTT |
| AnBH1-4 | CCCTGAGCTCAGCTTTAAT |
| AnBH1-1 | CCAGACAACCTACCAAACAGC |

Table 3-3. PkcA活性化条件においてmRNA量が2倍以上に増加する遺伝子
本論文で触れた遺伝子については枠で囲った。

| Locus | 遺伝子の特徴 | 遺伝子名 | Wldt-type | R429A | 発現比 |
|--------|--|-----------------|-----------|---------|---------|
| AN7914 | Putative alcohol dehydrogenase | | 1.68 | 4008.92 | 2381.26 |
| AN7912 | Putative tyrosinase | <i>orsC</i> | 0.10 | 202.76 | 1937.12 |
| AN7909 | Polyketide synthase | <i>orsA</i> | 0.08 | 107.65 | 1322.52 |
| AN8333 | Protein required for normal phialide development | <i>phiA</i> | 1.04 | 1051.77 | 1015.00 |
| AN8516 | Putative aminotransferase | <i>tdiD</i> | 0.07 | 65.79 | 1001.27 |
| AN7911 | Putative amidohydrolase | <i>orsB</i> | 0.11 | 101.46 | 945.81 |
| AN8513 | Putative single-module nonribosomal peptide synthetase | <i>tdiA</i> | 0.24 | 105.79 | 436.93 |
| AN3310 | Predicted GPI-anchored protein | | 1.81 | 368.67 | 203.85 |
| AN8514 | Asterriquinone prenyltransferase | <i>tdiB</i> | 1.70 | 329.63 | 193.55 |
| AN0533 | Putative transcription factor | | 0.03 | 5.82 | 182.95 |
| AN7876 | Putative branched chain amino acid aminotransferase | | 0.12 | 20.34 | 176.19 |
| AN3046 | Putative beta-1,4-endoglucanase | | 0.14 | 24.10 | 172.22 |
| AN2951 | Putative UDP-glucose 4-epimerase | | 4.10 | 383.77 | 93.62 |
| AN1160 | Predicted GPI-anchored protein | | 13.64 | 1222.46 | 89.64 |
| AN9365 | Protein with endo-1,4-beta-xylanase activity | <i>xlnB</i> | 0.23 | 19.27 | 84.94 |
| AN2025 | Putative transcription factor | | 0.06 | 4.80 | 74.68 |
| AN8518 | Similar to NADPH-dependent quinone reductases | <i>tdiC</i> | 1.87 | 129.62 | 69.40 |
| AN8453 | Protein with pectate lyase activity | <i>plyH</i> | 0.28 | 15.08 | 54.02 |
| AN3307 | Alpha-1,3glucan synthase | <i>agsB</i> | 1.99 | 90.60 | 45.44 |
| AN3337 | Protein with pectate lyase activity | <i>plyE</i> | 0.20 | 8.70 | 44.06 |
| AN9210 | Putative cytochrome P450 | <i>CYP662A1</i> | 0.18 | 7.53 | 43.04 |
| AN7823 | Putative peroxidase | <i>stcC</i> | 0.13 | 5.70 | 42.70 |
| AN7880 | Putative fatty-acyl-CoA synthase | | 0.11 | 4.59 | 42.16 |
| AN3308 | Putative alpha-amylase | <i>amyD</i> | 1.89 | 71.78 | 38.02 |
| AN7222 | NACHT domain-containing protein | | 0.37 | 13.97 | 37.76 |
| AN1899 | Putative 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase | <i>hpdA</i> | 0.75 | 20.61 | 27.32 |
| AN8520 | Protein required for ferriquinone A biosynthesis | <i>tdiE</i> | 1.87 | 50.31 | 26.97 |
| AN2534 | Putative arabinan endo-1,5-alpha-L-arabinosidase | <i>abrA</i> | 1.56 | 36.57 | 23.45 |
| AN1599 | Zn(II)/Cys(6)-type transcription factor | <i>pbcR</i> | 1.54 | 34.73 | 22.49 |
| AN0482 | Putative ubiquitin-conjugating enzyme | | 0.76 | 16.71 | 21.97 |
| AN6455 | Predicted GPI-anchored protein | | 0.49 | 10.69 | 21.76 |
| AN7895 | Putative oxidoreductase | <i>cipB</i> | 1.35 | 28.50 | 21.06 |
| AN9180 | Putative transketolase | | 0.89 | 15.66 | 17.62 |
| AN1818 | Protein with endo-1,4-beta-xylanase activity | <i>xlnC</i> | 1.71 | 28.26 | 16.49 |
| AN2388 | Putative beta-1,4-endoglucanase | | 7.12 | 107.65 | 15.13 |
| AN3524 | Putative galactose 1-dehydrogenase | | 4.11 | 58.48 | 14.24 |
| AN8421 | Putative endo-mannanase GH76 family protein | <i>dfgB</i> | 2.55 | 35.86 | 14.04 |
| AN0773 | Putative transcription factor | | 0.34 | 4.64 | 13.49 |
| AN8637 | Conidia-specific catalase | <i>catA</i> | 0.50 | 6.68 | 13.48 |
| AN3079 | Secreted thaumatin-like protein | <i>catA</i> | 22.62 | 295.04 | 13.04 |
| AN1967 | Putative fatty acid dioxygenase | <i>ppoA</i> | 27.10 | 321.14 | 11.85 |
| AN3344 | Putative GNAT-type acetyltransferase | <i>rgn27</i> | 3.87 | 43.56 | 11.26 |
| AN7773 | Putative cytochrome P450 | <i>CYP573A3</i> | 7.27 | 79.23 | 10.90 |
| AN9007 | Putative cytochrome P450 | <i>CYP548D1</i> | 8.41 | 88.73 | 10.55 |
| AN8638 | Transcript enriched in dormant conidia | <i>cetJ</i> | 0.76 | 7.81 | 10.23 |
| AN5214 | Putative beta-1,4-endoglucanase | | 3.04 | 30.29 | 9.97 |
| AN9380 | Putative chitin deacetylase | | 8.22 | 80.56 | 9.80 |
| AN6943 | Putative glycerate kinase | | 0.63 | 6.09 | 9.72 |
| AN9011 | Putative aryl-alcohol oxidase-related protein | | 0.78 | 7.59 | 9.70 |
| AN7950 | Putative glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase | <i>eglC</i> | 112.25 | 999.13 | 8.90 |
| AN8754 | Putative asparagine synthase | | 0.93 | 7.65 | 8.20 |
| AN3361 | Bacterial rhodopsin family G-protein coupled receptor-like | <i>nopA</i> | 8.04 | 63.93 | 7.95 |
| AN9204 | Putative GNAT-type acetyltransferase | <i>rgn6</i> | 0.71 | 5.60 | 7.87 |
| AN4372 | Protein with polygalacturonase activity | <i>pgaB</i> | 4.33 | 33.06 | 7.64 |
| AN3129 | Poly(ADP-ribose) polymerase(PARP) | <i>prpA</i> | 18.02 | 134.65 | 7.47 |
| AN2436 | Putative ATP citrate synthase | <i>aciB</i> | 13.18 | 97.31 | 7.39 |
| AN8737 | Putative sugar transporter | <i>msfA</i> | 3.56 | 25.93 | 7.28 |
| AN2157 | Putative aspartic endopeptidase | <i>pepAa</i> | 37.42 | 269.41 | 7.20 |
| AN7908 | Protein with alpha-arabinofuranosidase activity | <i>axhA</i> | 2.27 | 16.30 | 7.18 |
| AN7683 | Protein associated with the nonclassical protein Nce102p | | 2.37 | 16.90 | 7.14 |
| AN3730 | Putative 1,3-beta-transglucosidase | <i>gelC</i> | 14.60 | 102.88 | 7.04 |
| AN2251 | Putative bestrophin-like protein | <i>BEST1</i> | 31.62 | 222.24 | 7.03 |
| AN3141 | Predicted GPI-anchored protein | | 57.38 | 399.80 | 6.97 |
| AN7792 | Putative lysophospholipase A | | 7.18 | 49.86 | 6.95 |
| AN3162 | Putative GNAT-type acetyltransferase | <i>rgn4</i> | 5.30 | 36.58 | 6.89 |
| AN2435 | Putative ATP citrate synthase | <i>aciA</i> | 20.79 | 139.24 | 6.70 |
| AN1800 | Transmembrane histidine kinase | <i>tcsB</i> | 14.51 | 96.15 | 6.63 |
| AN1041 | Putative beta-1,4-endoglucanase | | 7.45 | 48.28 | 6.48 |
| AN2546 | Predicted GPI-anchored protein | | 1.08 | 6.73 | 6.20 |
| AN3161 | Short-chain dehydrogenase/reductase family oxidoreductase | | 2.69 | 16.22 | 6.03 |
| AN3309 | Putative alpha-amylase | <i>amyG</i> | 6.02 | 34.91 | 5.80 |
| AN5665 | Putative cytochrome P450 | <i>CYP531D2</i> | 1.21 | 6.97 | 5.77 |
| AN5046 | Anisin-1; secreted defensin-like peptide | | 1150.07 | 6664.16 | 5.71 |
| AN3209 | Putative high affinity copper transporter | | 7.04 | 39.95 | 5.68 |
| AN6985 | Putative ribulokinase | | 9.82 | 53.63 | 5.46 |
| AN7230 | Putative cellobiose dehydrogenase | | 2.35 | 12.71 | 5.40 |
| AN7590 | Putative reductase | | 18.11 | 95.10 | 5.25 |
| AN5324 | Dehydrin-like protein | <i>dipA</i> | 8.38 | 43.10 | 5.14 |
| AN7619 | Secreted thaumatin-like protein | <i>catA</i> | 133.13 | 678.20 | 5.09 |
| AN8489 | Putative plasma membrane ABC transporter | <i>atrB</i> | 20.11 | 101.48 | 5.05 |
| AN5655 | Putative 5-nucleotidase | | 15.42 | 74.16 | 4.81 |
| AN0209 | High-affinity ammonium transporter | <i>mepB</i> | 2.34 | 11.11 | 4.74 |
| AN7646 | Protein with pectate lyase activity | <i>plyA</i> | 6.20 | 28.56 | 4.60 |
| AN1884 | Putative cytochrome P450 | <i>CYP617D1</i> | 1.90 | 8.54 | 4.49 |
| AN6230 | Protein involved in regulation of conidiophore | <i>medA</i> | 22.14 | 97.47 | 4.40 |
| AN0279 | Putative transcription factor | <i>flbD</i> | 52.29 | 228.15 | 4.36 |
| AN2276 | Alcohol dehydrogenase III | <i>alcC</i> | 10.10 | 42.68 | 4.22 |
| AN0779 | Putative glucan 1,3-beta-glucosidase | | 32.96 | 138.79 | 4.21 |
| AN5480 | Putative RNA binding protein | | 12.82 | 53.75 | 4.19 |
| AN5056 | Homologous to ccg-1 from N.crassa | | 10.72 | 44.28 | 4.13 |
| AN7327 | Predicted GPI-anchored protein | | 2.29 | 9.25 | 4.03 |
| AN8540 | Siderophore iron transporter | <i>mirB</i> | 9.08 | 36.62 | 4.03 |
| AN2581 | Putative histidine-containing phosphotransfer protein | | 17.72 | 70.83 | 4.00 |
| AN7654 | Predicted GPI-anchored protein | | 5.77 | 22.76 | 3.94 |
| AN4299 | Unknown function | | 20.46 | 80.59 | 3.94 |
| AN4893 | Unknown function | <i>smsA</i> | 4.41 | 17.36 | 3.89 |
| AN6487 | Putative aspartyl protease | | 16.05 | 62.43 | 3.89 |
| AN1152 | Putative 1,3-beta-transglucosidase | <i>gelD</i> | 3.11 | 12.04 | 3.87 |

Table 3-3. PkcA活性化条件においてmRNA量が2倍以上に増加する遺伝子 (続き)
本論文で触れた遺伝子については枠で囲った。

| Locus | 遺伝子の特徴 | 遺伝子名 | Wild-type | R429A | 発現比 |
|---------|--|--------------|-----------|---------|------|
| AN5775 | Predicted sequence-specific DNA binding transcription | | 8.28 | 31.52 | 3.81 |
| AN1015 | Putative phosphorylase | | 23.95 | 90.93 | 3.80 |
| AN3200 | Putative beta-glucuronidase | | 5.71 | 21.07 | 3.69 |
| AN2977 | Putative transporter | | 50.19 | 185.13 | 3.69 |
| AN6430 | Putative transcription factor | | 2.41 | 8.86 | 3.67 |
| AN7657 | Putative 1,3-beta-transglycosidase | <i>gelA</i> | 467.29 | 1610.04 | 3.45 |
| AN2029 | Putative F-box protein | | 33.38 | 114.92 | 3.44 |
| AN1677 | Short-chain dehydrogenase | | 37.23 | 127.15 | 3.42 |
| AN3214 | Putative histidine-containing phosphotransfer protein | | 3.78 | 12.51 | 3.31 |
| AN2549 | Putative acyl-CoA ligase | <i>easD</i> | 11.11 | 36.30 | 3.27 |
| AN0771 | Putative ABC multi drug transporter | | 17.29 | 53.85 | 3.11 |
| AN3619 | Protein with similarity to Rad50 | <i>sidI</i> | 8.95 | 27.75 | 3.10 |
| AN1446 | Cystathionine gamma-lyase | <i>mecB</i> | 45.43 | 139.95 | 3.08 |
| AN4552 | Ortholog of Ku80 | <i>nkuB</i> | 22.64 | 69.72 | 3.08 |
| AN10442 | Predicted guanine nucleotide exchange factor | | 13.37 | 40.76 | 3.05 |
| AN0709 | Putative zinc-finger protein | | 12.14 | 36.84 | 3.03 |
| AN6024 | Protein with glutathione S-transferase | <i>gstB</i> | 17.85 | 53.87 | 3.02 |
| AN1330 | Predicted GPI-anchored protein | | 25.60 | 76.02 | 2.97 |
| AN2290 | STE-like transcription factor | <i>steA</i> | 98.91 | 292.82 | 2.96 |
| AN2659 | Predicted GPI-anchored protein | | 67.99 | 201.04 | 2.96 |
| AN2385 | Protein with licheninase activity | <i>xgeA</i> | 63.73 | 186.46 | 2.93 |
| AN4700 | Protein with endo-beta-(1,3)-glucanase activity | <i>bigC</i> | 32.05 | 93.49 | 2.92 |
| AN8559 | Putative branched chain alpha-keto acid dehydrogenase E1 | | 35.64 | 102.25 | 2.87 |
| AN5231 | Putative exo-arabinanase | | 30.33 | 86.84 | 2.86 |
| AN5823 | L-ornithine N5-monoxygenase | <i>sidA</i> | 21.31 | 60.72 | 2.83 |
| AN9397 | Putative basic leucine zipper (bZIP) transcription | <i>haca</i> | 248.99 | 705.66 | 2.83 |
| AN3688 | Response regulator | <i>srrA</i> | 26.91 | 75.72 | 2.81 |
| AN2367 | Putative Zn(II)2Cys6 transcription factor | | 4.57 | 12.80 | 2.80 |
| AN11994 | Predicted Rho GTPase activating protein | | 25.24 | 70.49 | 2.79 |
| AN7451 | Putative NAD-glutamate dehydrogenase | | 174.44 | 482.55 | 2.77 |
| AN10496 | Putative regulator of mannose phosphorylation | | 39.35 | 108.14 | 2.75 |
| AN4578 | Unknown function | <i>usgS</i> | 16.93 | 45.96 | 2.71 |
| AN10082 | Serine/threonine kinase domain protein | | 9.04 | 24.28 | 2.68 |
| AN6318 | Class V chitin synthase | <i>csmA</i> | 65.11 | 174.25 | 2.68 |
| AN3049 | Putative endo-mannanase GH76 family protein | <i>dfgD</i> | 32.79 | 86.95 | 2.65 |
| AN2300 | Putative ATP-binding cassette (ABC) transporter | <i>atrD</i> | 27.49 | 72.39 | 2.63 |
| AN10982 | Putative P-type ATPase sodium pump | <i>enaC</i> | 20.21 | 53.20 | 2.63 |
| AN10709 | Putative glutamine-fructose-6-phosphate transaminase | <i>gfaA</i> | 417.54 | 1092.08 | 2.62 |
| AN9470 | Urate oxidase | <i>uaz</i> | 17.04 | 44.42 | 2.61 |
| AN3113 | UDP-galactofuranose transporter | <i>ugfA</i> | 96.41 | 251.16 | 2.61 |
| AN2269 | Protein with similarity to S. cerevisiae (MAPKK) | <i>steC</i> | 32.56 | 84.69 | 2.60 |
| AN3566 | Putative alpha-mannosidase | <i>mns1C</i> | 8.04 | 20.63 | 2.57 |
| AN0785 | Putative manganese superoxide dismutase | <i>sodM</i> | 13.65 | 34.62 | 2.54 |
| AN5591 | Putative aminotransferase | | 32.69 | 82.82 | 2.53 |
| AN6236 | Putative nonribosomal peptide synthetase | | 9.26 | 23.28 | 2.51 |
| AN4953 | Putative Rho-like GTPase | | 42.87 | 107.56 | 2.51 |
| AN6927 | Putative plasma membrane sensor | <i>wscB</i> | 29.05 | 72.81 | 2.51 |
| AN0933 | Putative transglycosidase | <i>chfC</i> | 229.24 | 572.91 | 2.50 |
| AN3639 | Putative diacylglycerol pyrophosphate phosphatase | | 69.09 | 172.24 | 2.49 |
| AN1671 | Putative diacylglycerol pyrophosphate phosphatase | | 53.36 | 132.60 | 2.49 |
| AN2687 | Putative Rho-like GTPase | <i>rho4</i> | 25.32 | 62.44 | 2.47 |
| AN1726 | Putative 3-methyl-2-oxobutanoate dehydrogenase | | 48.11 | 118.07 | 2.45 |
| AN10060 | Putative alpha-amylase | | 21.68 | 52.82 | 2.44 |
| AN4535 | Putative F-box protein | | 30.19 | 73.25 | 2.43 |
| AN6317 | Class VI chitin synthase | <i>csmB</i> | 64.02 | 153.92 | 2.40 |
| AN2366 | Putative trypsin-like protease | | 501.95 | 1180.50 | 2.35 |
| AN7500 | Putative NADH dehydrogenase | <i>ndeA</i> | 11.89 | 27.72 | 2.33 |
| AN1502 | Extracellular N-acetyl-beta-glucosaminidase | <i>nagA</i> | 15.52 | 36.15 | 2.33 |
| AN1675 | Putative lysophospholipase (phospholipaseB) | | 113.89 | 263.05 | 2.31 |
| AN2161 | Putative GNAT-type acetyltransferase | <i>ngn1</i> | 43.74 | 100.39 | 2.30 |
| AN4407 | Unknown function | <i>radC</i> | 13.89 | 31.70 | 2.28 |
| AN4380 | Putative ribonucleotide reductase large chain pathways | | 84.17 | 190.62 | 2.26 |
| AN4843 | Putative alpha-glucosidase | <i>agdG</i> | 43.88 | 99.34 | 2.26 |
| AN10533 | Putative trehalose-6-phosphate synthase | | 29.71 | 66.28 | 2.23 |
| AN3729 | Putative 1,3-beta-glucan synthase | <i>flsA</i> | 140.81 | 312.97 | 2.22 |
| AN9094 | PutativeUDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase | <i>unga</i> | 279.12 | 616.60 | 2.21 |
| AN3914 | Putative transglycosidase | <i>crhA</i> | 19.15 | 42.23 | 2.21 |
| AN2523 | Class III chitin synthase | <i>chsB</i> | 161.10 | 354.80 | 2.20 |
| AN9148 | PutativeUTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase | <i>galF</i> | 176.53 | 388.02 | 2.20 |
| AN0034 | Putative glycerone kinase | | 89.26 | 195.27 | 2.19 |
| AN2505 | Putative F-box protein | <i>fbx15</i> | 16.14 | 35.31 | 2.19 |
| AN1237 | Unknown function | <i>lvsC</i> | 43.42 | 94.78 | 2.18 |
| AN4291 | Predicted mariner transposon-related ORF | | 12.79 | 27.87 | 2.18 |
| AN4189 | Putative mitogen-activated protein kinase kinase (MAPKK) | <i>mkkA</i> | 42.16 | 91.78 | 2.18 |
| AN1025 | Predicted GTPase activating protein | | 46.92 | 101.56 | 2.16 |
| AN4566 | Class I chitin synthase | <i>chsC</i> | 35.26 | 75.68 | 2.15 |
| AN3044 | Putative arabinan endo-1,5-alpha-L-arabinosidase | <i>abnD</i> | 10.78 | 23.08 | 2.14 |
| AN3916 | Putative glycerol kinase | | 8.63 | 18.41 | 2.13 |
| AN3793 | Protein phosphatase | | 58.44 | 124.36 | 2.13 |
| AN8677 | Galactofuranosyl transferase | <i>gfsA</i> | 92.99 | 198.03 | 2.13 |
| AN0826 | Predicted DDE1 transposon-related ORF | | 18.55 | 39.35 | 2.12 |
| AN3873 | Putative zinc-binding oxidoreductase | | 16.27 | 34.48 | 2.12 |
| AN3014 | Putative aspartyl-tRNA synthetase | | 24.96 | 52.77 | 2.11 |
| AN1573 | Putative aspartic-type protease | | 25.75 | 54.25 | 2.11 |
| AN2943 | Putative regulator of secondary metabolism | <i>rfeA</i> | 29.77 | 62.43 | 2.10 |
| AN8751 | Septation initiation network (SIN) component | <i>sidB</i> | 24.82 | 51.55 | 2.08 |
| AN3372 | Putative DNA repair protein | <i>scaA</i> | 12.41 | 25.75 | 2.07 |
| AN3112 | UDP-galactopyranose mutase | <i>ugmA</i> | 155.12 | 321.67 | 2.07 |
| AN5509 | Putative F-box protein | | 45.31 | 93.91 | 2.07 |
| AN4878 | Putative transcription factor | | 22.51 | 46.61 | 2.07 |
| AN6470 | Protein with lysozyme activity | | 279.70 | 576.77 | 2.06 |
| AN2984 | Putative MADS-box family transcription factor | <i>trmA</i> | 28.28 | 57.98 | 2.05 |
| AN3048 | Predicted mariner transposon-related ORF | | 15.72 | 31.60 | 2.01 |
| AN0260 | Putative DNA primase | | 28.82 | 57.70 | 2.00 |
| AN7932 | Putative cytochrome P450 | CYP682A1 | 15.41 | 30.82 | 2.00 |
| AN2936 | Putative Class 2C alpha-mannosidase | | 31.25 | 62.50 | 2.00 |

Table 3-4 PkcA活性化条件においてmRNA量が1/2以下に減少する遺伝子
本論文で触れた遺伝子については枠で囲った。

| Locus | 遺伝子の特徴 | 遺伝子名 | Wild-type | R429A | 発現比 |
|---------|---|------------------|-----------|--------|------|
| AN1839 | Protein with homology to GPR1/FUN34/YaaH family members | | 147.83 | 3.20 | 0.02 |
| AN7317 | Protein with homology to GPR1/FUN35/YaaH family members | | 754.17 | 23.17 | 0.03 |
| AN7316 | Putative zinc-dependent hydrolase | | 984.05 | 36.60 | 0.04 |
| AN2834 | Putative rhamnogalacturonan acetyl esterase | | 12.56 | 0.49 | 0.04 |
| AN10344 | CobW domain-containing protein | | 5.52 | 0.25 | 0.05 |
| AN8907 | Putative C-4 sterol methyl oxidase | | 63.64 | 3.27 | 0.05 |
| AN5558 | Broad specificity thermo stable alkalineprotease | <i>prtA</i> | 180.71 | 11.26 | 0.06 |
| AN7539 | Putative hydrophobin | | 74.83 | 5.21 | 0.07 |
| AN7315 | Putative succinate-semialdehydedehydrogenase | | 463.77 | 33.97 | 0.07 |
| AN2395 | Putative beta-glucuronidase | | 119.25 | 9.06 | 0.08 |
| AN4126 | Putative dehydrogenase | | 11.31 | 1.06 | 0.09 |
| AN2622 | Isopenicillin-N synthase | <i>ipnA</i> | 90.70 | 9.31 | 0.10 |
| AN8777 | Acetamidase | <i>amdS</i> | 387.10 | 41.09 | 0.11 |
| AN8390 | GPR1/FUN34/YaaH family member | | 901.15 | 105.54 | 0.12 |
| AN6786 | Putative beta-1,4-endoglucanase | | 15.98 | 1.89 | 0.12 |
| AN4055 | Putative acid phosphatase | | 227.75 | 28.39 | 0.12 |
| AN1832 | N-glycosylated membrane protein | <i>aspnd1</i> | 48.19 | 6.68 | 0.14 |
| AN8998 | Putative dioxygenase | | 15.35 | 2.15 | 0.14 |
| AN5833 | Putative acetyl-CoA synthase | <i>pcsA</i> | 209.62 | 29.38 | 0.14 |
| AN1006 | Nitrate reductase | <i>niaD</i> | 7.57 | 1.07 | 0.14 |
| AN7359 | Putative cytochrome P450 | <i>CYP5078A3</i> | 61.31 | 8.93 | 0.15 |
| AN8406 | Putative alcohol dehydrogenase | | 303.50 | 47.26 | 0.16 |
| AN7691 | Putative phospholipase | <i>plcB</i> | 52.21 | 8.54 | 0.16 |
| AN3880 | Putative acyl-coA dehydrogenase | | 12.12 | 2.01 | 0.17 |
| AN1732 | Proline transporter | <i>prnB</i> | 10.93 | 1.82 | 0.17 |
| AN3205 | Putative aldehyde dehydrogenase | | 78.10 | 13.48 | 0.17 |
| AN2229 | Putative O-acetyltransferase | <i>metE</i> | 291.59 | 50.42 | 0.17 |
| AN7142 | Putative secreted acid phosphatase | <i>pacA</i> | 42.99 | 7.59 | 0.18 |
| AN8761 | Protein with polygalacturonase activity | <i>pgxA</i> | 18.41 | 3.31 | 0.18 |
| AN4135 | Putative delta-9-stearic acid desaturase | <i>sdeB</i> | 9.98 | 1.94 | 0.19 |
| AN0180 | Putative enoyl-coA hydratase | | 54.99 | 11.45 | 0.21 |
| AN8913 | Predicted GPI-anchored protein | | 53.68 | 11.68 | 0.22 |
| AN6093 | Protein with acetylxylan esterase activity | <i>axeA</i> | 30.88 | 6.80 | 0.22 |
| AN2623 | Isopenicillin-N N-acyltransferase | <i>aatA</i> | 56.83 | 12.59 | 0.22 |
| AN7594 | DUF636 domain-containing protein | | 4113.52 | 964.13 | 0.23 |
| AN7208 | SET domain protein | | 657.50 | 157.38 | 0.24 |
| AN5762 | Predicted GPI-anchored protein | | 106.91 | 25.62 | 0.24 |
| AN3226 | HAS domain protein | | 52.85 | 12.76 | 0.24 |
| AN7541 | Protein with cutinase activity | <i>cut2</i> | 74.52 | 18.73 | 0.25 |
| AN6775 | Protein involved in penicillin biosynthesis | <i>aatB</i> | 69.58 | 17.61 | 0.25 |
| AN0886 | Protein with a predicted role in nitrogen metabolism | <i>lamB</i> | 339.79 | 87.37 | 0.26 |
| AN8971 | Putative integral membrane protein | | 13.78 | 3.55 | 0.26 |
| AN6525 | Putative formate dehydrogenase | <i>aciA</i> | 1962.80 | 551.14 | 0.28 |
| AN6177 | Putative flotillin ortholog | <i>floA</i> | 13.34 | 3.77 | 0.28 |
| AN1059 | Carnitine acetyltransferase | <i>facC</i> | 1087.05 | 308.25 | 0.28 |
| AN7211 | Putative C-8,7 sterol isomerase | | 32.50 | 9.36 | 0.29 |
| AN3418 | Protein with cellulase activity | <i>eglB</i> | 14.57 | 4.28 | 0.29 |
| AN7287 | Putative mitochondrial succinate/fumarate antiporter | <i>acuL</i> | 601.51 | 177.66 | 0.30 |
| AN7169 | NirA-dependent flavohemoprotein | <i>fhbA</i> | 45.41 | 13.58 | 0.30 |
| AN1619 | Putative 2-methylcitrate dehydratase | <i>mcdA</i> | 22.98 | 6.88 | 0.30 |
| AN2525 | Putative L-serine dehydratase | | 58.91 | 17.65 | 0.30 |
| AN10169 | Short-chain dehydrogenase | | 40.57 | 12.16 | 0.30 |
| AN8782 | Putative S-formylglutathione hydrolase | | 765.36 | 229.77 | 0.30 |
| AN7146 | Putative S-adenosyl-methioninedelta-24-sterol-C-methyltransferase | | 651.39 | 195.65 | 0.30 |
| AN5226 | Acetate permease | <i>acpA</i> | 3182.43 | 961.03 | 0.30 |
| AN5410 | Predicted GPI-anchored protein | | 80.94 | 24.68 | 0.30 |
| AN3957 | Amidase | <i>gmdA</i> | 40.43 | 12.89 | 0.32 |
| AN8444 | Protein with similarity to cellulose synthase | <i>celA</i> | 36.65 | 11.72 | 0.32 |
| AN4148 | Sugar transporter | | 106.59 | 34.09 | 0.32 |
| AN10520 | Putative alpha/beta hydrolase | | 45.30 | 14.54 | 0.32 |
| AN6279 | Carnitine acetyltransferase | <i>acuJ</i> | 316.94 | 102.89 | 0.32 |
| AN7795 | Putative heterotrimeric G-protein coupled receptor | <i>gprK</i> | 247.81 | 80.61 | 0.33 |
| AN7320 | Putative acyl-coA dehydrogenase | | 14.24 | 4.67 | 0.33 |
| AN1772 | Type B feruloyl esterase | | 83.59 | 27.45 | 0.33 |
| AN7193 | Putative NADPH-dependent glycerol dehydrogenase | | 222.25 | 73.36 | 0.33 |
| AN8604 | Putative GNAT-type acetyltransferase | <i>ngn23</i> | 144.19 | 47.77 | 0.33 |
| AN1901 | Putative sterol 14 alpha-demethylase | <i>pdmA</i> | 90.07 | 30.05 | 0.33 |
| AN1561 | Predicted GPI-anchored protein | | 38.03 | 12.85 | 0.34 |
| AN8163 | Putative short-chain dehydrogenase/reductase | | 241.47 | 82.39 | 0.34 |
| AN6649 | Putative fatty acyl-CoA synthetase | <i>fatC</i> | 14.11 | 4.84 | 0.34 |

Table 3-4 PkcA活性化条件においてmRNA量が1/2以下に減少する遺伝子 (続き)

| Locus | 遺伝子の特徴 | 遺伝子名 | Wild-type | R429A | 発現比 |
|---------|--|-----------------|-----------|---------|------|
| AN7382 | Putative salicylate 1-monoxygenase | | 29.84 | 10.36 | 0.35 |
| AN5626 | Acetyl-CoA synthase | <i>facA</i> | 2602.24 | 909.85 | 0.35 |
| AN0887 | Putative urea amidolyase | <i>lamA</i> | 31.46 | 11.05 | 0.35 |
| AN5701 | Putative 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate acid biosynthesis | <i>aroF</i> | 251.67 | 89.13 | 0.35 |
| AN7233 | Putative epoxide hydrolase | | 274.83 | 97.99 | 0.36 |
| AN9240 | Putative C2H2 transcription factor | | 187.14 | 67.06 | 0.36 |
| AN7204 | Putative oleoyl-delta12 desaturase | <i>an2</i> | 133.75 | 49.02 | 0.37 |
| AN7632 | Putative dehydrogenase | | 510.61 | 189.66 | 0.37 |
| AN6909 | Putative bestrophin-like protein | <i>BEST2</i> | 48.10 | 17.94 | 0.37 |
| AN1338 | Predicted GPI-anchored protein | | 20.03 | 7.54 | 0.38 |
| AN0717 | Putative histidinol-phosphate aminotransferase | | 136.06 | 51.77 | 0.38 |
| AN7388 | Putative catalase-peroxidase | <i>cpeA</i> | 113.64 | 43.92 | 0.39 |
| AN3928 | Putative thiazole synthase | <i>thiF</i> | 2089.07 | 809.17 | 0.39 |
| AN4820 | Putative succinate-semialdehyde dehydrogenase | | 135.74 | 52.83 | 0.39 |
| AN12335 | Protein with an acyl-CoA dehydrogenase domain | <i>acdA</i> | 155.89 | 60.74 | 0.39 |
| AN3598 | Putative peptidyl-prolyl cis-transisomerase | <i>fprA</i> | 1403.62 | 547.25 | 0.39 |
| AN8866 | Putative phosphoglycerate dehydrogenase | | 576.80 | 226.38 | 0.39 |
| AN11048 | Predicted GPI-anchored protein | | 128.50 | 51.66 | 0.40 |
| AN4583 | Putative peptidyl-prolyl cis-transisomerase D | <i>cyp7</i> | 179.56 | 72.52 | 0.40 |
| AN1115 | Putative purine nucleosidase | | 54.80 | 22.19 | 0.40 |
| AN6078 | Adenine deaminase | <i>nadA</i> | 106.35 | 43.26 | 0.41 |
| AN11778 | Putative exoinulinase | | 53.92 | 22.10 | 0.41 |
| AN1730 | Protein of the prn gene cluster | <i>prnX</i> | 50.48 | 20.73 | 0.41 |
| AN9143 | Putative molybdopterin synthase small subunit | <i>cnxG</i> | 39.42 | 16.25 | 0.41 |
| AN5067 | Putative transporter | | 546.12 | 225.29 | 0.41 |
| AN6787 | Putative cytochrome P450 | <i>CYP682C1</i> | 174.50 | 72.10 | 0.41 |
| AN0451 | Putative C-8 sterol isomerase | | 129.38 | 53.46 | 0.41 |
| AN11810 | Putative GNAT-type acetyltransferase | <i>ngn14</i> | 73.47 | 30.89 | 0.42 |
| AN10761 | Predicted PIN domain-containing RNA-binding protein | | 907.66 | 385.36 | 0.42 |
| AN8606 | Putative glucose 1-dehydrogenase | <i>gudA</i> | 36.72 | 15.62 | 0.43 |
| AN10223 | Putative 1-Cys peroxiredoxin | | 1617.54 | 689.86 | 0.43 |
| AN8130 | Putative NAD/NADP transhydrogenase beta subunit | | 75.56 | 32.27 | 0.43 |
| AN4050 | Putative salicylaldehyde dehydrogenase | | 188.25 | 80.97 | 0.43 |
| AN1246 | Putative phosphoglycerate kinase | <i>pgkA</i> | 442.42 | 191.70 | 0.43 |
| AN0423 | Putative D-xylose reductase | | 80.56 | 35.13 | 0.44 |
| AN8063 | Putative acid phosphatase | | 83.70 | 36.50 | 0.44 |
| AN8277 | Putative bifunctional enzyme | <i>cysD</i> | 284.19 | 124.03 | 0.44 |
| AN4422 | Putative aspartic-type endopeptidase | <i>pepAd</i> | 186.79 | 82.08 | 0.44 |
| AN8400 | Sugar transporter | | 44.24 | 19.46 | 0.44 |
| AN5356 | Putative carnitine transporter | <i>acuH</i> | 230.79 | 101.77 | 0.44 |
| AN3312 | Putative L-xylulose reductase | | 66.63 | 29.79 | 0.45 |
| AN6048 | Putative aspartate transaminase | | 1155.27 | 519.27 | 0.45 |
| AN0050 | Putative picolinic acid decarboxylase | | 26.85 | 12.11 | 0.45 |
| AN6563 | Putative translation elongation factor EF-1 gamma | | 1224.96 | 553.21 | 0.45 |
| AN2684 | Putative oxidoreductase | | 81.56 | 36.87 | 0.45 |
| AN1812 | bZIP transcription factor | <i>jlbA</i> | 1214.23 | 549.08 | 0.45 |
| AN6630 | Putative nascent polypeptide-associated complex | | 718.03 | 326.73 | 0.46 |
| AN0969 | Putative GNAT-type acetyltransferase | <i>ngn17</i> | 38.95 | 17.95 | 0.46 |
| AN4532 | Putative catechol oxygenase | | 57.15 | 26.37 | 0.46 |
| AN3206 | Putative aryl-alcoholoxidase-related protein | | 659.41 | 304.61 | 0.46 |
| AN2968 | Putative inorganic diphosphatase | <i>ippA</i> | 1000.78 | 463.55 | 0.46 |
| AN5634 | Isocitrate lyase | <i>acuD</i> | 887.47 | 411.48 | 0.46 |
| AN6632 | Putative 40S ribosomal protein S28 | | 1231.54 | 573.10 | 0.47 |
| AN6231 | Tryptophan synthase | <i>trpB</i> | 164.89 | 76.80 | 0.47 |
| AN4401 | Putative asparagine synthase | | 274.04 | 128.22 | 0.47 |
| AN4739 | Putative phosphoribosylaminoimidazole succinocarboxamide | | 67.43 | 31.84 | 0.47 |
| AN4872 | Fusion protein consisting of N-terminal ubiquitin | <i>ubi1</i> | 3798.84 | 1804.94 | 0.48 |
| AN10718 | 6,7-mimethyl-8-ribityl-lumazine synthase | <i>riboG</i> | 322.12 | 153.38 | 0.48 |
| AN4812 | Predicted GPI-anchored protein | | 47.92 | 22.92 | 0.48 |
| AN2334 | Putative ketose-1,6-bisphosphate aldolase | | 29.00 | 13.95 | 0.48 |
| AN3432 | Aldose 1-epimerase | | 56.33 | 27.11 | 0.48 |
| AN6499 | Putative malate dehydrogenase | <i>mdhC</i> | 993.13 | 478.25 | 0.48 |
| AN4073 | Putative cytosolic small ribosomal subunit protein | | 1703.68 | 823.45 | 0.48 |
| AN7479 | Putative asparaginyl-tRNA synthetase | | 233.61 | 114.19 | 0.49 |
| AN2120 | Putative karyopherin (importin) beta 3 | <i>kapJ</i> | 108.60 | 53.60 | 0.49 |
| AN0054 | Putative adenylate-forming enzyme | | 181.75 | 89.82 | 0.49 |
| AN1794 | Putative cytochrome P450 | <i>CYP682D1</i> | 42.53 | 21.05 | 0.49 |
| AN4464 | Putative bifunctional enzyme | <i>purH</i> | 173.85 | 86.14 | 0.50 |
| AN1990 | Putative homocitrate synthase | | 558.50 | 277.32 | 0.50 |
| AN4822 | Putative tartrate dehydrogenase | | 40.55 | 20.17 | 0.50 |
| AN8953 | Putative alpha-glucosidase | <i>agdB</i> | 185.90 | 92.91 | 0.50 |

Table 3-5 高温かつPkcA失活条件においてmRNA量が1/2以下に減少する遺伝子
本論文で触れた遺伝子については枠で囲った。

| Locus | 遺伝子の特徴 | 遺伝子名 | Wild-type | <i>pkcA</i> -ts | 発現比 |
|---------|---|--------------|-----------|-----------------|------|
| AN8981 | Protein with homology to GPR1/FUN34/YaaH family | <i>alcS</i> | 96.05 | 1.92 | 0.02 |
| AN10344 | CobW domain-containing protein | | 24.16 | 0.69 | 0.03 |
| AN5046 | Anisin-1; secreted defensin-like peptide | | 261.74 | 18.81 | 0.07 |
| AN2336 | Putative phospholipase C | | 8.17 | 0.81 | 0.10 |
| AN10346 | Putative cutinase | | 31.68 | 3.94 | 0.12 |
| AN8979 | Alcohol dehydrogenase | <i>alcA</i> | 138.58 | 18.80 | 0.14 |
| AN8390 | GPR1/FUN34/YaaH family member | | 15.63 | 2.88 | 0.18 |
| AN8609 | Predicted GPI-anchored protein | | 659.65 | 134.31 | 0.20 |
| AN6754 | Predicted GPI-anchored protein | | 63.17 | 13.13 | 0.21 |
| AN7323 | Covalently-bound cell wall protein | | 291.51 | 62.32 | 0.21 |
| AN1752 | Putative sulfite reductase | | 67.77 | 15.44 | 0.23 |
| AN6470 | Protein with lysozyme activity | | 19.94 | 4.59 | 0.23 |
| AN7625 | Putative myo-inositol-1-phosphate synthase | | 1443.82 | 380.15 | 0.26 |
| AN2628 | Predicted mariner transposon-related ORF | | 12.52 | 3.30 | 0.26 |
| AN1265 | Putative transcription factor | <i>zapA</i> | 54.16 | 14.81 | 0.27 |
| AN7722 | Putative N-acetyltransferase | | 159.08 | 55.12 | 0.35 |
| AN8777 | Acetamidase | <i>amdS</i> | 20.05 | 7.01 | 0.35 |
| AN7626 | Predicted scaffold protein | | 38.58 | 13.60 | 0.35 |
| AN10223 | Putative 1-Cys peroxiredoxin | | 2076.30 | 740.20 | 0.36 |
| AN8647 | High-affinity nitritetransporter | <i>nitA</i> | 1305.06 | 507.68 | 0.39 |
| AN6471 | Predicted GPI-anchored protein | | 36.04 | 14.06 | 0.39 |
| AN8978 | Transcription factor | <i>alcR</i> | 17.83 | 6.98 | 0.39 |
| AN4769 | ATP sulfurylase | <i>sC</i> | 207.02 | 82.65 | 0.40 |
| AN7937 | Protein responsive to Concanamycin A | <i>cipC</i> | 20.32 | 8.13 | 0.40 |
| AN8913 | Predicted GPI-anchored protein | | 3145.41 | 1259.09 | 0.40 |
| AN12335 | Protein with an acyl-CoA dehydrogenase domain | <i>acdA</i> | 16.87 | 6.82 | 0.40 |
| AN0933 | Putative transglycosidase | <i>crhC</i> | 168.92 | 68.82 | 0.41 |
| AN7594 | DUF636 domain-containing protein | | 780.58 | 318.50 | 0.41 |
| AN3671 | Predicted GPI-anchored protein | | 58.88 | 24.24 | 0.41 |
| AN7051 | Cystathionine beta-lyase | <i>metG</i> | 55.23 | 22.79 | 0.41 |
| AN8063 | Putative acid phosphatase | | 879.52 | 367.12 | 0.42 |
| AN2526 | Putative ketol-acid reductoisomerase | | 287.77 | 123.91 | 0.43 |
| AN3226 | HAS domain protein | | 173.76 | 77.35 | 0.45 |
| AN5226 | Acetate permease | <i>acpA</i> | 596.42 | 266.96 | 0.45 |
| AN4323 | Putative branched chain amino acid aminotransferase | | 118.88 | 54.03 | 0.45 |
| AN1165 | Putative 3-dehydrosphinganine reductase | | 108.40 | 49.74 | 0.46 |
| AN9094 | Putative UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase | <i>ungA</i> | 311.37 | 143.79 | 0.46 |
| AN0977 | Putative peroxin | | 147.38 | 69.08 | 0.47 |
| AN1394 | Putative septin | <i>aspD</i> | 353.11 | 165.97 | 0.47 |
| AN0912 | Putative Beta-isopropylmalate dehydrogenase | | 267.71 | 126.51 | 0.47 |
| AN7539 | Putative hydrophobin | | 11262.05 | 5336.39 | 0.47 |
| AN9504 | Cell-cycle regulated serine/threonine protein | <i>nimA</i> | 27.75 | 13.27 | 0.48 |
| AN4430 | Small subunit of acetolactate synthase | | 463.77 | 225.03 | 0.49 |
| AN7250 | Putative sodium/hydrogen antiporter | <i>nha1</i> | 37.34 | 18.14 | 0.49 |
| AN4770 | Adenosine 3-phosphate 5-phosphosulfate reductase | <i>sA</i> | 167.90 | 81.65 | 0.49 |
| AN0259 | Putative adenylate | | 32.05 | 15.75 | 0.49 |
| AN2243 | Putative carbamoyl-phosphate synthase | <i>cpa</i> | 295.06 | 145.03 | 0.49 |
| AN10311 | Putative hyphal cell wall mannoprotein | <i>mnpA</i> | 1276.10 | 629.24 | 0.49 |
| AN1832 | N-glycosylated membrane protein | <i>aspd1</i> | 2665.62 | 1318.79 | 0.49 |
| AN7541 | Protein with cutinase activity | <i>cut2</i> | 192.97 | 95.80 | 0.50 |

Table 3-6 PkcA失活条件においてmRNA量が2倍以上に増加する遺伝子
本論文で触れた遺伝子については枠で囲った。

| Locus | 遺伝子の特徴 | 遺伝子名 | Wild-type | pkcA-ts | 発現比 |
|---------|---|-----------------|-----------|---------|--------|
| AN7327 | Predicted GPI-anchored protein | | 0.05 | 25.03 | 488.84 |
| AN8999 | Ankyrin repeat containing protein | | 0.17 | 11.51 | 69.66 |
| AN5324 | Dehydrin-like protein | <i>dIpA</i> | 3.27 | 195.38 | 59.73 |
| AN5426 | Putative threonine aldolase | | 0.17 | 8.05 | 47.86 |
| AN7989 | Putative phosphatidylserine decarboxylase | | 0.16 | 6.96 | 43.41 |
| AN7944 | Putative GNAT-type acetyltransferase | <i>ngn3</i> | 0.23 | 7.43 | 32.39 |
| AN9180 | Putative transketolase | | 0.47 | 14.81 | 31.32 |
| AN3566 | Putative alpha-mannosidase | <i>mns1C</i> | 3.80 | 97.39 | 25.65 |
| AN3385 | Putative transcription factor | | 0.89 | 20.88 | 23.57 |
| AN8007 | Protein with arabinan endo-1,5-alpha-L-arabinosidase activity | <i>abnC</i> | 0.39 | 7.87 | 20.10 |
| AN8445 | Putative aminopeptidase Y | | 4.59 | 87.37 | 19.03 |
| AN1967 | Putative fatty acid dioxygenase | <i>ppaA</i> | 4.92 | 87.22 | 17.73 |
| AN5480 | Putative RNA binding protein | | 33.00 | 569.05 | 17.24 |
| AN5090 | Predicted ADP-ribosylation factor (Arf) GTPase | | 0.68 | 11.07 | 16.38 |
| AN3229 | Putative aryl-alcohol oxidase-related protein | | 0.34 | 5.01 | 14.89 |
| AN9340 | Alpha, alpha-trehalase | <i>treA</i> | 11.42 | 132.55 | 11.61 |
| AN2827 | Putative potassium-transporting ATPase | | 1.20 | 13.38 | 11.12 |
| AN6820 | Putative histidine-containing phosphotransfer protein | | 2.74 | 30.41 | 11.09 |
| AN6779 | Putative ABC superfamily | | 0.71 | 7.52 | 10.66 |
| AN10060 | Putative alpha-amylase | | 1.27 | 13.26 | 10.45 |
| AN10782 | Putative mitochondrial phosphate carrier protein | | 0.65 | 6.63 | 10.14 |
| AN9186 | Putative acid phosphatase | | 1.06 | 10.49 | 9.91 |
| AN1601 | Putative cytochrome P450 | <i>CYP20E1</i> | 2.46 | 23.20 | 9.43 |
| AN3163 | Putative stomatin ortholog | <i>stoA</i> | 53.31 | 484.17 | 9.08 |
| AN8639 | Putative alpha, alpha-trehalose-phosphate synthase | | 6.29 | 55.31 | 8.79 |
| AN4920 | Putative calcium-transporting mitochondrial ATPase | <i>pmcB</i> | 13.82 | 120.81 | 8.74 |
| AN2924 | Putative nonribosomal peptide synthetase(NRPS)-like enzyme | | 0.88 | 7.19 | 8.17 |
| AN0901 | Hyphal lipase | <i>tilA</i> | 4.59 | 37.29 | 8.12 |
| AN3415 | Putative ADP-ribosylglycohydrolase family protein | | 4.96 | 40.03 | 8.06 |
| AN5558 | Broad specificity thermostable alkaline protease | <i>prtA</i> | 21.44 | 168.59 | 7.86 |
| AN7683 | Protein associated with the nonclassical protein Nce102p | | 7.69 | 59.98 | 7.80 |
| AN2572 | Putative dipeptidyl-peptidase | | 6.36 | 49.36 | 7.76 |
| AN5611 | Putative carbonic anhydrase | <i>canA</i> | 17.95 | 133.86 | 7.46 |
| AN6932 | High-capacity, high-affinity uricacid-xanthine | <i>uapA</i> | 6.66 | 49.34 | 7.41 |
| AN6669 | Putative sugar transporter | | 21.06 | 151.84 | 7.21 |
| AN6959 | Predicted GPI-anchored protein | | 0.89 | 6.21 | 6.98 |
| AN4913 | Putative phosphotolase | <i>phk</i> | 1.29 | 9.01 | 6.96 |
| AN10234 | Putative GNAT-type acetyltransferase | <i>ngn10</i> | 4.27 | 29.33 | 6.87 |
| AN4113 | Putative histidine-containing phosphotransfer | | 4.08 | 27.59 | 6.77 |
| AN0314 | Putative aspartyl-tRNA synthetase | <i>coaT</i> | 10.58 | 70.50 | 6.66 |
| AN1547 | Acyl-CoA:carboxylate:CoA-transferase | | 5.75 | 37.93 | 6.59 |
| AN3393 | Protein with similarity to neutral metalloprotease II | <i>pepI</i> | 1.17 | 7.68 | 6.55 |
| AN4119 | Putative major facilitator superfamily protein | | 2.28 | 14.74 | 6.46 |
| AN6804 | Predicted transporter | | 11.85 | 76.60 | 6.46 |
| AN7278 | Putative glutamate decarboxylase | | 2.05 | 13.11 | 6.40 |
| AN6057 | Putative cytochrome P450 | <i>CYP52G1</i> | 1.85 | 11.77 | 6.37 |
| AN9296 | Putative cytochrome P450 | <i>CYP535D1</i> | 1.97 | 12.42 | 6.30 |

| Locus | 遺伝子の特徴 | 遺伝子名 | Wild-type | pkcA-ts | 発現比 |
|---------|--|------------------|-----------|---------|------|
| AN8903 | Putative peptide transporter | | 31.57 | 193.57 | 6.13 |
| AN7399 | Putative cytochrome P450 | <i>CYP663A1</i> | 2.22 | 13.32 | 6.00 |
| AN2157 | Putative aspartic endopeptidase | <i>pepAa</i> | 28.28 | 169.16 | 5.98 |
| AN0353 | Putative F-box protein | | 11.11 | 65.61 | 5.91 |
| AN10533 | Putative trehalose-6-phosphate synthase | | 28.82 | 170.13 | 5.90 |
| AN1792 | Putative lysophospholipase A | | 2.16 | 12.66 | 5.87 |
| AN8102 | Putative pepsin-like aspartic protease | <i>pepAc</i> | 54.97 | 319.90 | 5.82 |
| AN5781 | Putative 30 kilodalton heat shock protein | | 262.67 | 1494.65 | 5.69 |
| AN2366 | Putative trypsin-like protease | | 122.79 | 684.46 | 5.57 |
| AN11143 | Putative glucoamylase | <i>gliaA</i> | 1.76 | 9.65 | 5.47 |
| AN1519 | Putative Argonaute protein | <i>rsaA</i> | 1.46 | 7.95 | 5.43 |
| AN6078 | Adenine deaminase | <i>nadA</i> | 1.62 | 8.77 | 5.42 |
| AN3725 | Developmentally regulated protein | <i>awh11</i> | 31.88 | 171.51 | 5.38 |
| AN0471 | Putative vacuolar H ⁺ /Ca ²⁺ exchanger | <i>vcxA</i> | 27.95 | 149.67 | 5.36 |
| AN6249 | Putative calcineurin binding protein | <i>rcnA</i> | 105.07 | 557.39 | 5.30 |
| AN7604 | Putative phospholipase | | 4.00 | 21.00 | 5.25 |
| AN2612 | Putative beta-glucosidase | <i>bgIK</i> | 1.49 | 7.81 | 5.25 |
| AN6712 | Putative phospholipase D | <i>pldA</i> | 5.37 | 26.55 | 4.94 |
| AN2022 | Putative heterokaryon incompatibility protein | | 9.92 | 48.70 | 4.91 |
| AN4871 | Class V chitinase | <i>chiB</i> | 19.77 | 95.53 | 4.83 |
| AN6933 | Putative malate dehydrogenase | <i>meeB</i> | 1.98 | 9.50 | 4.80 |
| AN8004 | Putative cytochrome P450 | <i>CYP547B1</i> | 26.40 | 125.54 | 4.75 |
| AN1731 | Putative proline dehydrogenase | <i>prnD</i> | 1.64 | 7.70 | 4.68 |
| AN10318 | Predicted GPI-anchored protein | | 97.35 | 455.59 | 4.68 |
| AN3349 | Putative cytochrome P450 | <i>CYP659A1</i> | 14.62 | 67.75 | 4.64 |
| AN5478 | Putative cytochrome P450 | <i>CYP539A4P</i> | 2.14 | 9.90 | 4.62 |
| AN0858 | Putative chaperone | <i>hsp104</i> | 159.03 | 733.92 | 4.61 |
| AN2583 | Putative glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase | <i>gpdC</i> | 14.10 | 64.29 | 4.56 |
| AN3873 | Putative zinc-binding oxidoreductase | | 13.67 | 61.11 | 4.47 |
| AN1810 | Ornithine transaminase | <i>otaA</i> | 43.59 | 193.57 | 4.44 |
| AN0709 | Putative zinc-finger protein | | 47.15 | 207.60 | 4.40 |
| AN1699 | Putative acyl-coA dehydrogenase | | 6.61 | 28.51 | 4.31 |
| AN6004 | Protein with an RNA recognition motif | | 87.66 | 370.21 | 4.22 |
| AN5333 | Putative pectate lyase | <i>plyC</i> | 2.38 | 10.02 | 4.22 |
| AN9103 | Putative apoptosis-inducing factor (AIF)-like | <i>aifA</i> | 12.68 | 52.61 | 4.15 |
| AN2505 | Putative F-box protein | <i>fbx15</i> | 11.88 | 48.86 | 4.11 |
| AN0453 | Putative G1/S cyclin | <i>pclA</i> | 8.63 | 35.27 | 4.09 |
| AN2901 | Arginase | <i>agaA</i> | 98.89 | 403.80 | 4.08 |
| AN0607 | Non-ribosomal peptide synthetase | <i>sidC</i> | 6.23 | 25.18 | 4.04 |
| AN3347 | Putative amino acid transporter | | 10.91 | 43.57 | 3.99 |
| AN7892 | Small heat-shock protein | | 551.35 | 2181.69 | 3.96 |
| AN3049 | Putative endo-mannanase GH76 family protein | <i>dfgD</i> | 5.48 | 21.35 | 3.90 |
| AN6642 | Putative potassium-transporting ATPase | <i>enaA</i> | 157.83 | 607.61 | 3.85 |
| AN6058 | DUF833 domain-containing protein | | 26.52 | 101.99 | 3.85 |
| AN4878 | Putative transcription factor | | 16.86 | 64.41 | 3.82 |
| AN8046 | Putative triacylglycerol lipase | | 4.37 | 16.53 | 3.79 |
| AN3265 | Arrestin domains and PY motif-containing protein | <i>apyA</i> | 5.50 | 20.33 | 3.69 |

Table 3-6 PkcA失活条件においてmRNA量が2倍以上に増加する遺伝子 (続き)

| Locus | 遺伝子の特徴 | 遺伝子名 | Wld-type | pkcA-ts | 発現比 |
|---------|--|--------------|----------|---------|------|
| AN0732 | Putative transporter | | 11.73 | 43.20 | 3.68 |
| AN0176 | Predicted GATA transcription factor | <i>sreA</i> | 13.39 | 48.52 | 3.62 |
| AN4255 | Non-catalytic atypical hexokinase | <i>hvkC</i> | 22.65 | 82.09 | 3.62 |
| AN0662 | Putative adenosine deaminase | | 4.91 | 17.63 | 3.59 |
| AN2530 | Heat shock protein 30 | <i>hsp30</i> | 1538.63 | 5470.20 | 3.56 |
| AN4126 | Putative dehydrogenase | | 2.75 | 9.67 | 3.52 |
| AN0330 | NADH:flavin oxidoreductase | | 42.12 | 146.32 | 3.47 |
| AN3555 | Small heat-shock protein | | 600.90 | 2054.99 | 3.42 |
| AN3361 | Bacterial rhodopsin family G-protein coupled receptor-like | <i>nopA</i> | 136.27 | 462.48 | 3.39 |
| AN1573 | Putative aspartic-type protease | | 5.73 | 19.42 | 3.39 |
| AN5564 | Putative phosphatidyl synthase | | 60.17 | 200.71 | 3.34 |
| AN7590 | Putative reductase | | 40.50 | 134.87 | 3.33 |
| AN6550 | Para-aminobenzoic acid synthase | <i>pabaA</i> | 6.79 | 22.53 | 3.32 |
| AN2445 | Predicted GPI-anchored protein | | 3.84 | 12.71 | 3.31 |
| AN7500 | Putative NADH dehydrogenase | <i>ndeA</i> | 11.85 | 38.32 | 3.23 |
| AN1870 | Putative beta-1,4-xylosidase | | 3.43 | 10.98 | 3.20 |
| AN1163 | Putative chaperone | | 143.80 | 460.34 | 3.20 |
| AN5217 | Protein with similarity to sphingolipid long chainine isosome | <i>pilA</i> | 60.27 | 191.51 | 3.18 |
| AN2237 | Putative carboxypeptidase C | | 16.34 | 51.46 | 3.15 |
| AN0273 | Putative transcription factor | | 32.78 | 102.96 | 3.14 |
| AN2621 | Delta-(L-alpha-aminoacidyl)-L-cysteiny-D-valine synthetase | <i>acvA</i> | 4.96 | 15.36 | 3.10 |
| AN2581 | Putative histidine-containing phosphotransfer protein | | 11.24 | 34.57 | 3.08 |
| AN4615 | Transmembrane domain-containing protein | <i>surG</i> | 65.69 | 199.04 | 3.03 |
| AN1959 | Nuclear protein | <i>vosa</i> | 7.19 | 21.78 | 3.03 |
| AN10982 | Putative P-type ATPase sodium pump | <i>enaC</i> | 8.35 | 25.23 | 3.02 |
| AN1675 | Putative lysophospholipase (phosphoholipaseB) | | 45.94 | 138.68 | 3.02 |
| AN7295 | Putative transmembrane transporter | | 13.60 | 40.87 | 3.01 |
| AN1854 | Putative inositol pentakisphosphate 2-kinase | | 16.33 | 48.97 | 3.00 |
| AN3204 | Putative MFS alpha-glucoside transporter | | 5.36 | 15.86 | 2.96 |
| AN2943 | Putative regulator of secondary metabolism | <i>rfeA</i> | 235.76 | 687.62 | 2.92 |
| AN3203 | Putative F-box protein | | 11.85 | 34.31 | 2.90 |
| AN5821 | Putative vacuolar H ⁺ /Ca ⁺⁺ exchanger | | 20.69 | 59.82 | 2.89 |
| AN1015 | Putative phosphorylase | | 16.14 | 45.73 | 2.83 |
| AN5334 | Predicted DDE1 transposon-related ORF | | 5.00 | 13.99 | 2.80 |
| AN3141 | Predicted GPI-anchored protein | | 19.79 | 55.12 | 2.78 |
| AN2546 | Predicted GPI-anchored protein | | 17.06 | 47.43 | 2.78 |
| AN5144 | Putative 6-phosphofructo-2-kinase | <i>pfkZ</i> | 47.00 | 130.35 | 2.77 |
| AN2099 | Putative alternative oxidase | | 63.11 | 174.00 | 2.76 |
| AN10081 | Alpha-ketoglutarate-dependent xanthine dioxygenase | <i>xanA</i> | 10.98 | 30.00 | 2.73 |
| AN2623 | Isopenicillin-N-N-acyltransferase | <i>aatA</i> | 52.51 | 143.37 | 2.73 |
| AN1446 | Cystathionine gamma-lyase | <i>mecB</i> | 27.29 | 74.11 | 2.72 |
| AN5228 | Putative NADH:flavin oxidoreductase/NADHoxidase | | 18.70 | 50.63 | 2.71 |
| AN5028 | Fatty acid oxygenase | <i>ppoC</i> | 139.81 | 378.32 | 2.71 |
| AN4566 | Class I chitin synthase | <i>chsC</i> | 22.83 | 61.74 | 2.70 |
| AN2251 | Putative bestrophin-like protein | <i>BEST1</i> | 81.76 | 220.54 | 2.70 |
| AN8751 | Septation initiation network (SIN) component | <i>sidB</i> | 20.28 | 54.35 | 2.68 |
| AN11094 | Putative zinc-binding oxidoreductase | | 140.99 | 376.40 | 2.67 |
| AN6211 | Putative phospholipase | <i>plpA</i> | 30.58 | 80.46 | 2.63 |
| AN6118 | Dicarboxylic amino acid permease | <i>agtA</i> | 56.00 | 147.21 | 2.63 |
| AN2059 | Velvet family protein | <i>velC</i> | 6.33 | 16.60 | 2.62 |
| AN1330 | Predicted GPI-anchored protein | | 82.39 | 215.25 | 2.61 |
| AN2412 | Calcium/calmodulin-dependent protein kinase A | <i>cmkA</i> | 92.33 | 240.03 | 2.60 |
| AN7619 | Secreted thaumatin-like protein | <i>calA</i> | 417.39 | 1081.15 | 2.59 |
| AN1628 | Putative membrane ATPase | <i>enaB</i> | 165.44 | 419.22 | 2.53 |
| AN2286 | Alcohol dehydrogenase III | <i>alcC</i> | 145.96 | 366.00 | 2.51 |
| AN1659 | Putative amino acid transporter | | 66.09 | 165.40 | 2.50 |
| AN0472 | Putative 1,3-beta-glucosidase | <i>engA</i> | 10.30 | 25.64 | 2.49 |
| AN4668 | Putative mitogen activated proteinkinase (MAPK) | <i>mpkC</i> | 27.16 | 67.45 | 2.48 |
| AN10238 | Putative GNAT-type acetyltransferase | <i>ngn21</i> | 8.98 | 22.08 | 2.46 |
| AN5568 | Putative F-box protein | | 25.80 | 63.05 | 2.44 |
| AN5726 | C2H2-type zinc finger transcription factor | <i>crzA</i> | 22.20 | 53.48 | 2.41 |
| AN9339 | Hyphal catalase | <i>catB</i> | 92.72 | 221.15 | 2.39 |
| AN0664 | Putative 1-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase | <i>plcA</i> | 7.22 | 17.12 | 2.37 |
| AN5447 | Putative glutamate decarboxylase | | 16.92 | 40.07 | 2.37 |
| AN2740 | High-affinity cAMP phosphodiesterase | <i>pdeB</i> | 14.36 | 33.68 | 2.35 |
| AN1935 | Protein with a predicted role in actin filament bundling | | 27.78 | 64.72 | 2.33 |
| AN2548 | Putative acyltransferase | <i>easC</i> | 22.85 | 52.57 | 2.30 |
| AN5523 | Putative alpha, alpha-trehalose-phosphate synthase | <i>tpsA</i> | 77.50 | 176.55 | 2.28 |
| AN4888 | Putative pyruvate decarboxylase | <i>pdca</i> | 576.99 | 1312.55 | 2.27 |
| AN1041 | Putative beta-1,4-endoglucanase | | 18.44 | 41.86 | 2.27 |
| AN4263 | C2H2 zinc finger transcription factor | <i>nsdC</i> | 36.59 | 82.98 | 2.27 |
| AN2704 | Putative aryl-alcohol oxidase-related protein | | 17.75 | 40.17 | 2.26 |
| AN3161 | Short-chain dehydrogenase/reductase family oxidoreductase | | 49.05 | 110.90 | 2.26 |
| AN2547 | Putative polyketide synthase | <i>easB</i> | 16.87 | 38.05 | 2.26 |
| AN0895 | Predicted NAD-dependent oxidoreductase | | 86.92 | 192.78 | 2.22 |
| AN5231 | Putative exo-arabinanase | | 16.07 | 35.27 | 2.19 |
| AN4058 | Putative dihydroxy acid dehydratase | | 10.84 | 23.79 | 2.19 |
| AN8815 | Putative isoflavone reductase family protein | | 209.31 | 453.74 | 2.17 |
| AN6521 | Homococconitate hydratase | <i>lysF</i> | 45.00 | 97.35 | 2.16 |
| AN7697 | Response regulator | <i>sskA</i> | 34.68 | 74.68 | 2.15 |
| AN1292 | Putative diacylglycerolpyrophosphate phosphatase | | 30.34 | 65.02 | 2.14 |
| AN3987 | Tetrapeptide repeat domain-containing protein | | 10.81 | 23.14 | 2.14 |
| AN8010 | Putative glycogen (starch) synthase | | 20.88 | 44.55 | 2.13 |
| AN8068 | Putative beta-1,4-endoglucanase | | 12.05 | 25.67 | 2.13 |
| AN5493 | Putative nucleoside transporter | <i>cntA</i> | 23.46 | 49.92 | 2.13 |
| AN1671 | Putative diacylglycerolpyrophosphate phosphatase | | 25.01 | 53.10 | 2.12 |
| AN0129 | Putative protein tyrosine phosphatase | | 21.15 | 44.81 | 2.12 |
| AN5908 | Putative triose-phosphate isomerase | <i>tpiB</i> | 48.99 | 103.21 | 2.11 |
| AN0628 | Putative D-lactate dehydrogenase | | 39.08 | 81.91 | 2.10 |
| AN4050 | Putative salicylaldehyde dehydrogenase | | 13.46 | 28.00 | 2.08 |
| AN0931 | Mitogen activated protein kinasekinase (MAPKK) | <i>pbsA</i> | 24.36 | 50.20 | 2.06 |
| AN2622 | Isopenicillin-N synthase | <i>ipnA</i> | 119.81 | 242.37 | 2.02 |
| AN2946 | predicted to have a role in pheromone precursor processing | <i>ste13</i> | 34.69 | 70.15 | 2.02 |
| AN6927 | Putative plasma membrane sensor-transducer | <i>wscB</i> | 11.34 | 22.86 | 2.02 |

Table 3-7 PkcA 失活条件における sterigmatocystin 合成酵素遺伝子クラスターの転写レベル

| Locus | 遺伝子の特徴 | 遺伝子名 | Wild-type | <i>pkcA</i> -ts | 発現比 | <i>p</i> -value |
|--------|---|-------------|-----------|-----------------|-------|-----------------|
| AN7804 | Putative FAD-containing monooxygenase | <i>stcW</i> | N.D. | 0.09 | - | 0.7620 |
| AN7805 | Putative norsolorinic acid reductase | <i>stcV</i> | 0.15 | 1.42 | 9.31 | 0.3051 |
| AN7806 | Putative versicolorin reductase | <i>stcU</i> | N.D. | 0.18 | - | 0.6695 |
| AN7807 | Putative translation elongation factor1gamma | <i>stcT</i> | N.D. | 0.02 | - | 0.8901 |
| AN7808 | Putative sterigmatocystin biosynthesis P450 monooxygenase | <i>stcS</i> | N.D. | N.D. | - | - |
| AN7809 | Ortholog of <i>Aspergillus terreus</i> NIH2624 : ATET_01291 | <i>stcR</i> | N.D. | 0.05 | - | 0.8179 |
| AN7810 | Putative aflatoxin biosynthesis protein | <i>stcQ</i> | N.D. | 0.01 | - | 0.9060 |
| AN7811 | Putative sterigmatocystin biosynthesis protein | <i>stcO</i> | 0.02 | 0.36 | 16.08 | 0.5823 |
| AN7812 | Putative versicolorin B synthase | <i>stcN</i> | 0.02 | 0.07 | 3.40 | 0.8665 |
| AN7814 | Putative polyketide synthase/fatty acidsynthase | <i>stcK</i> | 0.66 | 1.67 | 2.51 | 0.5007 |
| AN7815 | Putative polyketide synthase/fatty acid synthase | <i>stcJ</i> | 1.54 | 2.61 | 1.70 | 0.5817 |
| AN7816 | Putative sterigmatocystin biosynthesis lipase/esterase | <i>stcI</i> | 3.81 | 7.30 | 1.92 | 0.2778 |
| AN7817 | Putative protein with a predicted role in sterigmatocystin | <i>stcG</i> | 0.54 | 1.14 | 2.12 | 0.6308 |
| AN7818 | Putative sterigmatocystin biosynthesis P450 monooxygenase | <i>stcF</i> | 0.66 | 1.85 | 2.80 | 0.4416 |
| AN7819 | Ortholog(s) have role in aflatoxin biosynthetic process | <i>aflJ</i> | 1.04 | 2.28 | 2.19 | 0.4829 |
| AN7820 | Transcriptional activator of the sterigmatocystin | <i>aflR</i> | 0.03 | 0.30 | 9.74 | 0.6363 |
| AN7821 | Putative norsolorinic acid reductase | <i>stcE</i> | N.D. | 0.33 | - | 0.5633 |
| AN7822 | Ortholog of <i>Aspergillus clavatus</i> A1163 : AFUB_049240 | <i>stcD</i> | 0.82 | 3.71 | 4.54 | 0.1664 |
| AN7823 | Putative peroxidase | <i>stcC</i> | 0.04 | 0.16 | 3.71 | 0.7895 |
| AN7824 | Putative sterigmatocystin biosynthesis P450 monooxygenase | <i>stcB</i> | 1.42 | 3.28 | 2.31 | 0.3769 |
| AN7825 | Putative polyketide synthase | <i>stcA</i> | 0.31 | 0.76 | 2.47 | 0.6527 |

N.D. : not detected

Table 3-8 高浸透圧ストレス時に5倍以上に転写が誘導される遺伝子のPkcA失活条件におけるmRNA量

| Locus | 遺伝子の特徴と遺伝子名 | Wild-type | <i>pkcA</i> -ts | Fold-change | <i>p</i> -value |
|------------------------------------|--|-----------|-----------------|-------------|-----------------|
| PkcA失活条件においてmRNA量が野生型株と比較して増加する遺伝子 | | | | | |
| AN0294 | Hypothetical protein | 8.26 | 44.22 | 5.35 | 4.53627E-07 |
| AN0600 | Hypothetical protein | 17.91 | 197.36 | 11.02 | 0 |
| AN0693 | Hypothetical protein | 3.27 | 147.35 | 45.03 | 4.44089E-16 |
| AN0742 | Hypothetical protein | 2.25 | 9.84 | 4.38 | 0.026237981 |
| AN0930 | Hypothetical protein | 31.47 | 89.27 | 2.84 | 7.27745E-08 |
| AN0983 | Hypothetical protein | 9.35 | 23.66 | 2.53 | 0.010600821 |
| AN1020 | Hypothetical protein | 1.23 | 19.18 | 15.58 | 5.72578E-05 |
| AN1022 | Ortholog(s) have role in potassium ion transport | 36.12 | 57.92 | 1.60 | 0.018415742 |
| AN10303 | Hypothetical protein | 2.39 | 15.50 | 6.48 | 0.001650229 |
| AN10421 | Hypothetical protein | 1.82 | 9.09 | 4.99 | 0.025167433 |
| AN10422 | Hypothetical protein | 6.26 | 37.53 | 6.00 | 1.57952E-06 |
| AN10581 | Hypothetical protein | 13.50 | 112.36 | 8.32 | 2.22045E-15 |
| AN10634 | Hypothetical protein | 5.11 | 18.78 | 3.68 | 0.004345235 |
| AN11185 | Hypothetical protein | 7.79 | 30.27 | 3.89 | 0.000204271 |
| AN11313 | Hypothetical protein | 0.40 | 5.74 | 14.35 | 0.029065782 |
| AN11314 | Hypothetical protein | 0.64 | 49.31 | 76.75 | 3.26095E-12 |
| AN1607 | Has domain(s) with predicted transferase activity | 2.70 | 13.73 | 5.09 | 0.005640284 |
| AN1699 | Putative acyl-coA dehydrogenase | 6.61 | 28.51 | 4.31 | 0.000168444 |
| AN1754 | Hypothetical protein | 6.11 | 99.27 | 16.25 | 3.77476E-15 |
| AN2477 | Hypothetical protein | 25.28 | 59.53 | 2.36 | 0.000131345 |
| AN2792 | Hypothetical protein | 0.00 | 4.40 | - | 0.033875859 |
| AN2877 | Ortholog(s) have sterol transporter activity | 27.08 | 47.06 | 1.74 | 0.01563915 |
| AN2911 | Basic-region leucine zipper transcription factor, <i>atfA</i> | 83.97 | 137.51 | 1.64 | 0.000166055 |
| AN3101 | Putative histidine-containing phosphotransfer protein, <i>phkB</i> | 17.99 | 34.94 | 1.94 | 0.015863302 |
| AN3148 | Hypothetical protein | 10.18 | 25.67 | 2.52 | 0.007938074 |
| AN3357 | Hypothetical protein | 17.67 | 142.25 | 8.05 | 0 |
| AN3441 | Trehalose 6-phosphate phosphatase, <i>orlA</i> | 62.45 | 102.48 | 1.64 | 0.001106164 |
| AN3679 | Hypothetical protein | 3.33 | 12.44 | 3.74 | 0.019300105 |
| AN4089 | Hypothetical protein | 12.09 | 25.31 | 2.09 | 0.025675842 |
| AN4113 | Putative histidine-containing phosphotransfer | 4.08 | 27.59 | 6.77 | 2.21452E-05 |
| AN4277 | Ortholog(s) have glucose transmembrane transporter activity | 0.23 | 5.66 | 24.92 | 0.023459924 |
| AN4299 | Hypothetical protein | 26.50 | 390.22 | 14.72 | 1.55431E-14 |
| AN4578 | Putative transmembrane-domain protein, <i>usgS</i> | 20.63 | 37.20 | 1.80 | 0.023505309 |
| AN4636 | Hypothetical protein | 4.79 | 16.93 | 3.54 | 0.007850401 |
| AN4711 | Hypothetical protein | 11.02 | 42.39 | 3.85 | 1.21752E-05 |
| AN4878 | Putative transcription factor | 16.86 | 64.41 | 3.82 | 7.56482E-08 |
| AN4911 | Hypothetical protein | 13.91 | 73.63 | 5.29 | 8.66365E-11 |
| AN5021 | Hypothetical protein | 20.87 | 38.02 | 1.82 | 0.020327952 |
| AN5207 | Hypothetical protein | 2.19 | 21.85 | 9.99 | 4.78276E-05 |
| AN5338 | Has domain(s) with predicted oxidoreductase activity | 3.41 | 17.79 | 5.22 | 0.001495073 |
| AN5624 | Hypothetical protein | 0.72 | 13.61 | 18.99 | 0.000561897 |
| AN6009 | Hypothetical protein | 24.36 | 44.48 | 1.83 | 0.011785921 |
| AN6071 | Hypothetical protein | 17.20 | 47.15 | 2.74 | 0.000130886 |
| AN6211 | Putative phospholipase, <i>plaA</i> | 30.58 | 80.46 | 2.63 | 1.22084E-06 |
| AN6277 | Hypothetical protein | 40.71 | 88.62 | 2.18 | 1.4151E-05 |
| AN6367 | Has domain(s) with predicted phosphatidylinositol phosphate kinase | 9.31 | 30.93 | 3.32 | 0.000500661 |
| AN6881 | Hypothetical protein | 0.49 | 16.84 | 34.63 | 7.00328E-05 |
| AN7042 | Has domain(s) with predicted carbonate dehydratase | 9.41 | 22.13 | 2.35 | 0.01990255 |
| AN7335 | Hypothetical protein | 34.61 | 58.20 | 1.68 | 0.010562491 |
| AN7470 | Hypothetical protein | 23.00 | 45.58 | 1.98 | 0.004788122 |
| AN7558 | Hypothetical protein | 5.36 | 42.37 | 7.90 | 5.4889E-08 |
| AN7590 | Putative reductase | 40.50 | 134.87 | 3.33 | 3.45945E-13 |
| AN7604 | Putative phospholipase | 4.00 | 21.00 | 5.25 | 0.000546452 |
| AN8003 | Hypothetical protein | 2.48 | 13.83 | 5.59 | 0.004265574 |

Table 3-8 高浸透圧ストレス時に5倍以上に転写が誘導される遺伝子のPkcA失活条件におけるmRNA量 (続き)

| Locus | 遺伝子の特徴と遺伝子名 | Wild-type | <i>pkcA</i> -ts | Fold-change | <i>p</i> -value |
|------------------------------------|--|-----------|-----------------|-------------|-----------------|
| PkcA失活条件においてmRNA量が野生型株と比較して増加する遺伝子 | | | | | |
| AN8018 | Hypothetical protein | 20.40 | 63.64 | 3.12 | 1.42929E-06 |
| AN8195 | Hypothetical protein | 0.13 | 6.55 | 49.37 | 0.01198245 |
| AN8339 | Hypothetical protein | 24.70 | 52.03 | 2.11 | 0.001289359 |
| AN8591 | Hypothetical protein | 3.28 | 14.57 | 4.44 | 0.006533306 |
| AN8640 | Hypothetical protein | 0.73 | 10.49 | 14.44 | 0.003147169 |
| AN8641 | Hypothetical protein | 54.84 | 276.70 | 5.05 | 0 |
| AN8975 | Hypothetical protein | 0.13 | 13.50 | 107.55 | 0.000247272 |
| AN8990 | Has domain(s) with predicted amino acid transporter activity | 68.57 | 149.19 | 2.18 | 1.8038E-08 |
| AN9168 | Ortholog(s) have solute:hydrogen symporter activity | 12.57 | 101.19 | 8.05 | 8.88178E-16 |
| AN9180 | Putative transketolase | 0.47 | 14.81 | 31.32 | 0.000206135 |
| AN9340 | Alpha,alpha-trehalase, treA | 11.42 | 132.55 | 11.61 | 2.22045E-15 |
| AN9483 | Hypothetical protein | 1.34 | 10.14 | 7.57 | 0.008387075 |
| AN5975 | Putative mannitol-1-phosphate5-dehydrogenase | 363.51 | 540.01 | 1.49 | 5.22056E-10 |
| AN0447 | Hypothetical protein | 59.17 | 81.33 | 1.37 | 0.04513178 |
| PkcA失活条件においてmRNA量が野生型株と同等な遺伝子 | | | | | |
| AN9173 | Sugar transporter | 2.48 | 6.54 | 2.63 | 0.166533254 |
| AN0293 | Ortholog(s) have carboxylesterase activity | 21.36 | 29.26 | 1.37 | 0.233589636 |
| AN0447 | Hypothetical protein | 59.17 | 81.33 | 1.37 | 0.04513178 |
| AN0654 | Ortholog(s) have farnesyltranstransferase activity | 20.60 | 28.49 | 1.38 | 0.228251073 |
| AN0408 | Hypothetical protein | 26.81 | 36.17 | 1.35 | 0.204412468 |
| AN0654 | Ortholog(s) have farnesyltranstransferase activity | 20.60 | 28.49 | 1.38 | 0.228251073 |
| AN0831 | Hypothetical protein | 48.30 | 54.85 | 1.14 | 0.44803375 |
| AN1059 | Carnitine acetyltransferase, facC | 31.99 | 33.83 | 1.06 | 0.750005541 |
| AN10857 | Hypothetical protein | 13.88 | 20.75 | 1.49 | 0.217514203 |
| AN2229 | Putative O-acetyltransferase, metE | 79.47 | 90.16 | 1.13 | 0.333345528 |
| AN3165 | Hypothetical protein | 13.56 | 19.09 | 1.41 | 0.302433073 |
| AN4478 | Ortholog(s) have arginine transmembrane transporter | 11.49 | 15.81 | 1.38 | 0.375884585 |
| AN4549 | Has domain(s) with predicted hydrolase activity | 22.49 | 24.06 | 1.07 | 0.758169829 |
| AN4684 | Putative triacylglycerol lipase | 29.58 | 31.27 | 1.06 | 0.760260391 |
| AN4779 | Hypothetical protein | 36.01 | 44.28 | 1.23 | 0.305980425 |
| AN4781 | Ortholog(s) have ligase activity | 20.51 | 29.66 | 1.45 | 0.170333455 |
| AN4941 | Hypothetical protein | 14.59 | 17.48 | 1.20 | 0.565731185 |
| AN5646 | Putative enzyme with a predicted role in fatty acid degradation | 36.27 | 41.63 | 1.15 | 0.480117831 |
| AN6548 | Ortholog(s) have role in response to purine-containing compound | 36.62 | 53.64 | 1.46 | 0.057733448 |
| AN6635 | Conidial laccase, yA | 8.27 | 11.20 | 1.35 | 0.475276022 |
| AN6817 | Predicted NAD-dependent oxidoreductase | 5.32 | 5.90 | 1.11 | 0.832343795 |
| AN6835 | Putative cytochrome P450, CYP505A8 | 4.64 | 5.50 | 1.19 | 0.759775415 |
| AN6879 | Hypothetical protein | 20.75 | 27.85 | 1.34 | 0.272308389 |
| AN6996 | Hypothetical protein | 14.75 | 24.29 | 1.65 | 0.110441631 |
| AN7524 | Hypothetical protein | 23.25 | 32.19 | 1.38 | 0.198977993 |
| AN8713 | Ortholog(s) have protein heterodimerization activity | 14.42 | 20.65 | 1.43 | 0.262770285 |
| AN0387 | Cryptochrome, cryA | 2.49 | 6.56 | 2.64 | 0.16520049 |
| AN11016 | Ortholog(s) have role in sulfite transport | 0.08 | 2.71 | 33.34 | 0.1111633 |
| AN1625 | Hypothetical protein | 1.77 | 5.63 | 3.18 | 0.146969778 |
| AN3358 | Protein with endo-beta-(1,4)-mannanase activity | 0.68 | 2.20 | 3.24 | 0.360023799 |
| AN4484 | Hypothetical protein | 5.88 | 12.49 | 2.12 | 0.111877639 |
| AN4946 | Hypothetical protein | 2.00 | 5.63 | 2.82 | 0.177975229 |
| AN6792 | Putative NAD+ dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase, gfdB | 1.46 | 6.35 | 4.34 | 0.07501897 |
| AN9369 | Has domain(s) with predicted catalytic activity | 2.42 | 8.51 | 3.52 | 0.060034662 |
| AN6634 | Hypothetical protein | 6.62 | 10.66 | 1.61 | 0.309178637 |
| AN1089 | Ortholog(s) have ubiquitin protein ligase | 15.75 | 26.90 | 1.71 | 0.074951876 |
| AN8720 | Putative phosphoglycerate mutase | 33.42 | 50.26 | 1.50 | 0.051838833 |

Table 3-9 カルシウムに応答し CrzA 依存的に転写が誘導される遺伝子の PkcA 失活条件における mRNA 量

| Locus | 遺伝子の特徴と遺伝子名 | Wild-type | <i>pkcA</i> -ts | 発現比 | <i>p</i> -value |
|---------|--|-----------|-----------------|-------|-----------------|
| AN0419 | Hypothetical protein | 42.33 | 99.46 | 2.35 | 0.00 |
| AN10219 | Hypothetical protein | 351.06 | 1060.01 | 3.02 | 0.00 |
| AN1189 | Putative calcium-transporting vacuolar ATPase, <i>pmcA</i> | 90.34 | 105.14 | 1.16 | 0.22 |
| AN1894 | Hypothetical protein | 23.84 | 21.15 | -1.13 | 0.74 |
| AN2427 | Hypothetical protein | 16.48 | 152.45 | 9.25 | 0.00 |
| AN2826 | C6 zinc domain protein | 1.00 | 28.96 | 28.94 | 0.00 |
| AN3415 | ADP-ribosylglycohydrolase family protein | 4.96 | 40.03 | 8.06 | 0.00 |
| AN3420 | C6 zinc domain protein | 5.53 | 32.77 | 5.92 | 0.00 |
| AN3585 | Hypothetical protein | 4.33 | 100.25 | 23.13 | 0.00 |
| AN3751 | Hypothetical protein | 8.11 | 24.98 | 3.08 | 0.00 |
| AN3998 | Hypothetical protein | 10.14 | 64.36 | 6.34 | 0.00 |
| AN4418 | C2H2-type zinc finger domain protein | 19.58 | 79.26 | 4.05 | 0.00 |
| AN4487 | Hypothetical protein | 10.44 | 30.37 | 2.91 | 0.00 |
| AN4910 | Hypothetical protein | 27.01 | 101.79 | 3.77 | 0.00 |
| AN5302 | Putative efflux transporter | 17.37 | 55.47 | 3.19 | 0.00 |
| AN5364 | von Willebrand factor (vWF) domain protein | 0.58 | 13.28 | 22.90 | 0.00 |
| AN5372 | Hypothetical protein | 10.55 | 35.34 | 3.35 | 0.00 |
| AN5821 | Vacuolar H ⁺ /Ca ²⁺ exchanger | 20.69 | 59.82 | 2.89 | 0.00 |
| AN6535 | Hypothetical protein | 26.59 | 277.80 | 10.45 | 0.00 |
| AN7229 | Sulfatase domain protein | 12.18 | 21.02 | 1.73 | 0.11 |
| AN7549 | BCS-1 like ATPase | 3.22 | 52.19 | 16.21 | 0.00 |
| AN8399 | Putative potassium-transporting ATPase | 0.12 | 2.73 | 21.86 | 0.12 |
| AN8774 | C6 zinc domain protein | 1.38 | 13.39 | 9.73 | 0.00 |
| AN9070 | Hypothetical protein | 14.79 | 32.78 | 2.22 | 0.01 |
| AN9206 | Hypothetical protein | 0.54 | 13.37 | 24.58 | 0.00 |

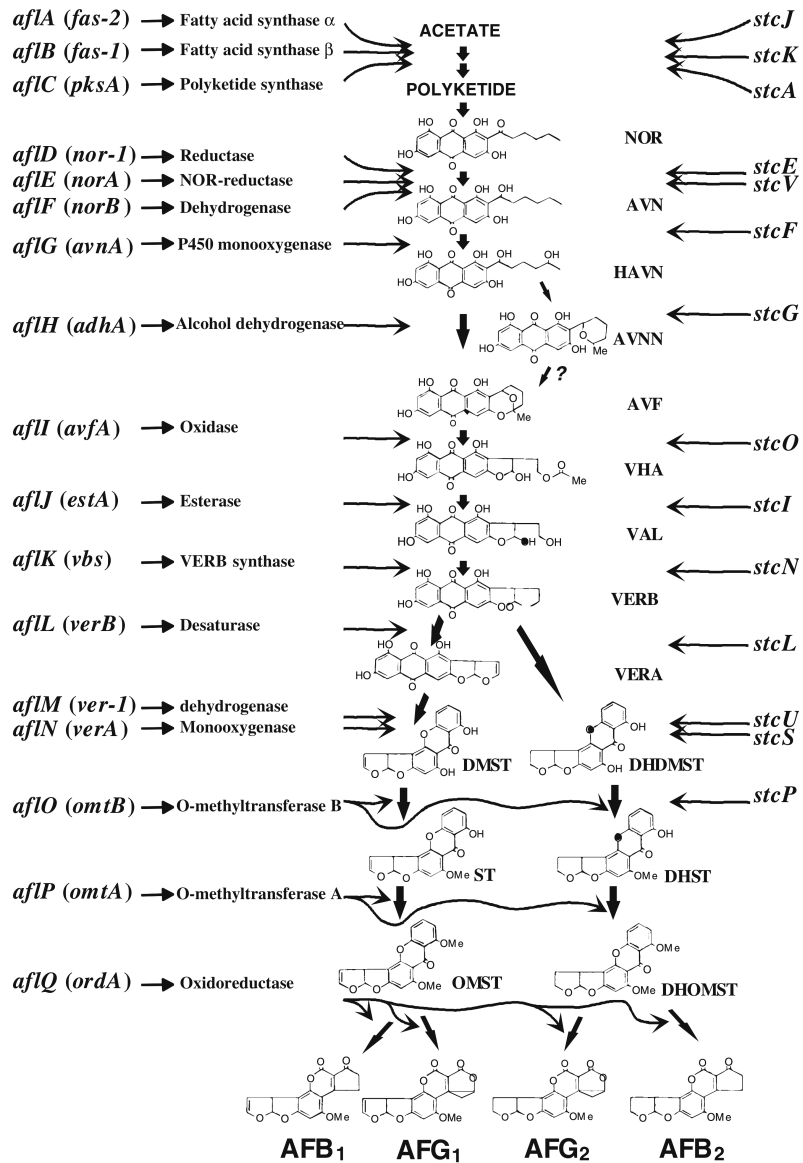


Fig. 3-1 *A. parasiticus*、*A. flavus*のaflatoxin生合成経路と*A. nidulans*のsterigmatocystin生合成経路

左は*A. parasiticus*のaflatoxin生合成遺伝子、括弧内の遺伝子は*A. flavus*のaflatoxin生合成遺伝子を示し、右は*A. nidulans*のsterigmatocystin生合成遺伝子を示す。

(Bhatnagar et al., 2006)

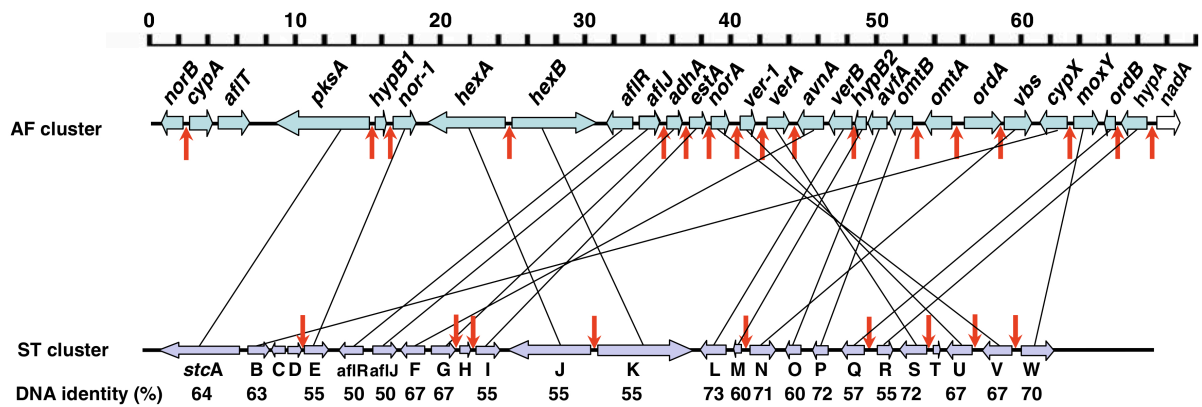


Fig. 3-2 *A. flavus*のaflatoxin生合成遺伝子クラスターと*A. nidulans*のsterigmatocystin生合成遺伝子クラスター

上が*A. flavus*のaflatoxin生合成遺伝子クラスター (AF cluster) であり、下が*A. nidulans*のsterigmatocystin生合成遺伝子クラスター (ST cluster)。矢印はAfIRの結合部位を示す。

(Cary and Ehrlich, 2006)

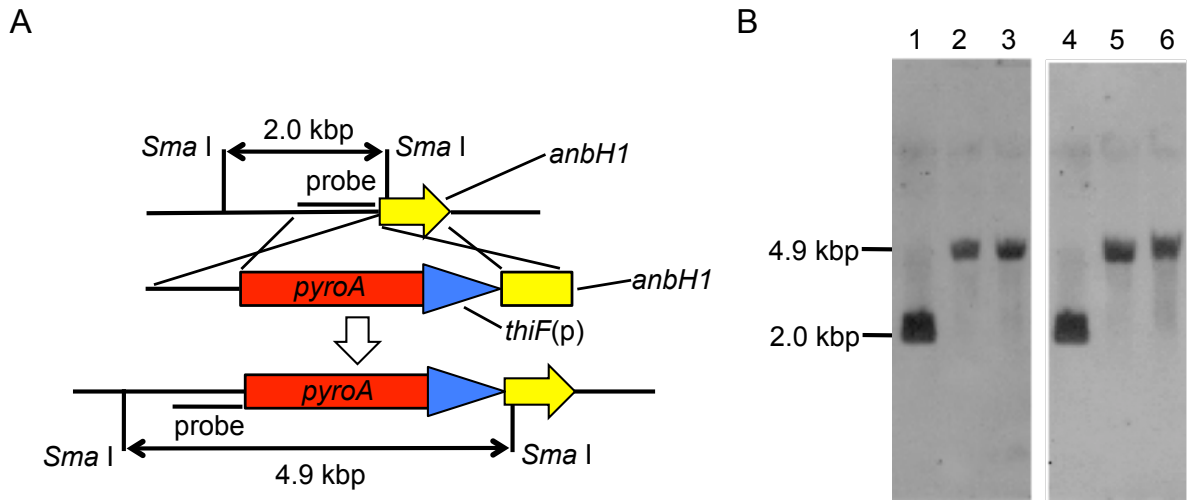


Fig. 3-3 *thiF*プロモーター制御下で*anBH1*を発現する株 (*thiF(p)-anBH1*株) の作製

A. *thiF(p)-anBH1*株を作製するコンストラクト

B. *thiF(p)-anBH1*欠失株のサザン解析による確認

レーン1、4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5、6はR429A-1株由来の形質転換体。

レーン2：TBH-1、レーン3：TBH-2、レーン5：R429ATBH-1、レーン6：R429ATBH-2

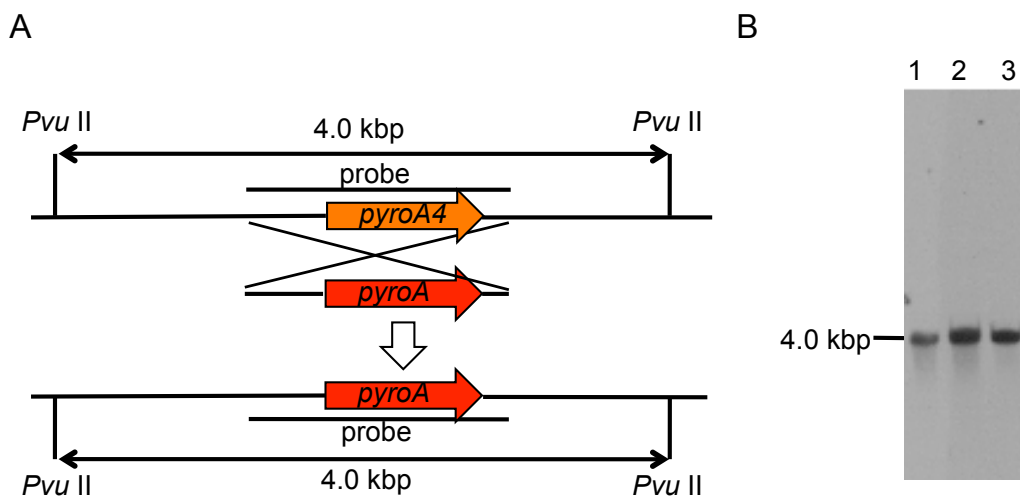


Fig. 3-4 ピリドキシン要求性の回復した活性化型PkcAを高生産できる株 (R429ApyroA株) の作製

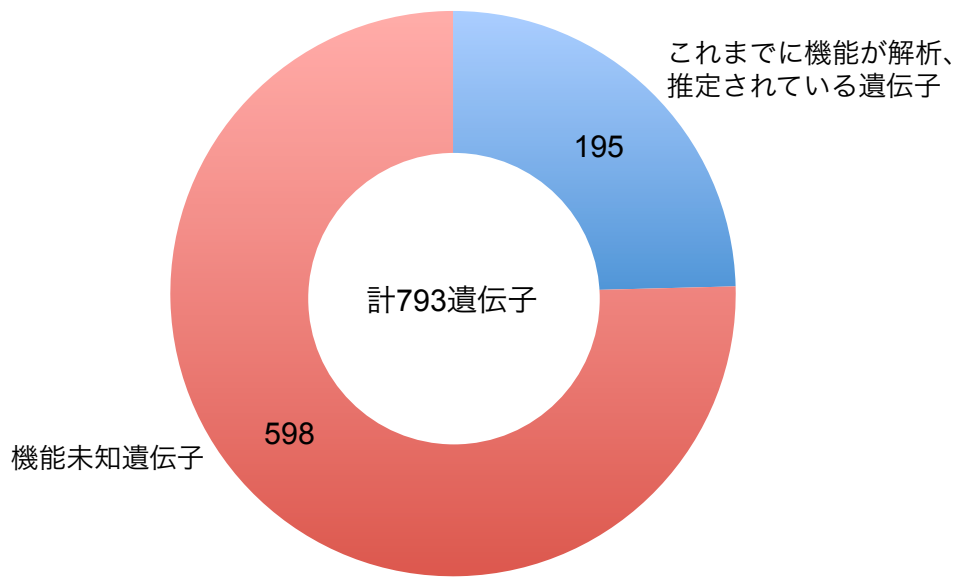
A. R429ApyroA株を作製するコンストラクト

B. R429ApyroA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：R429ApyroA-1、レーン3：R429ApyroA-2

A



B

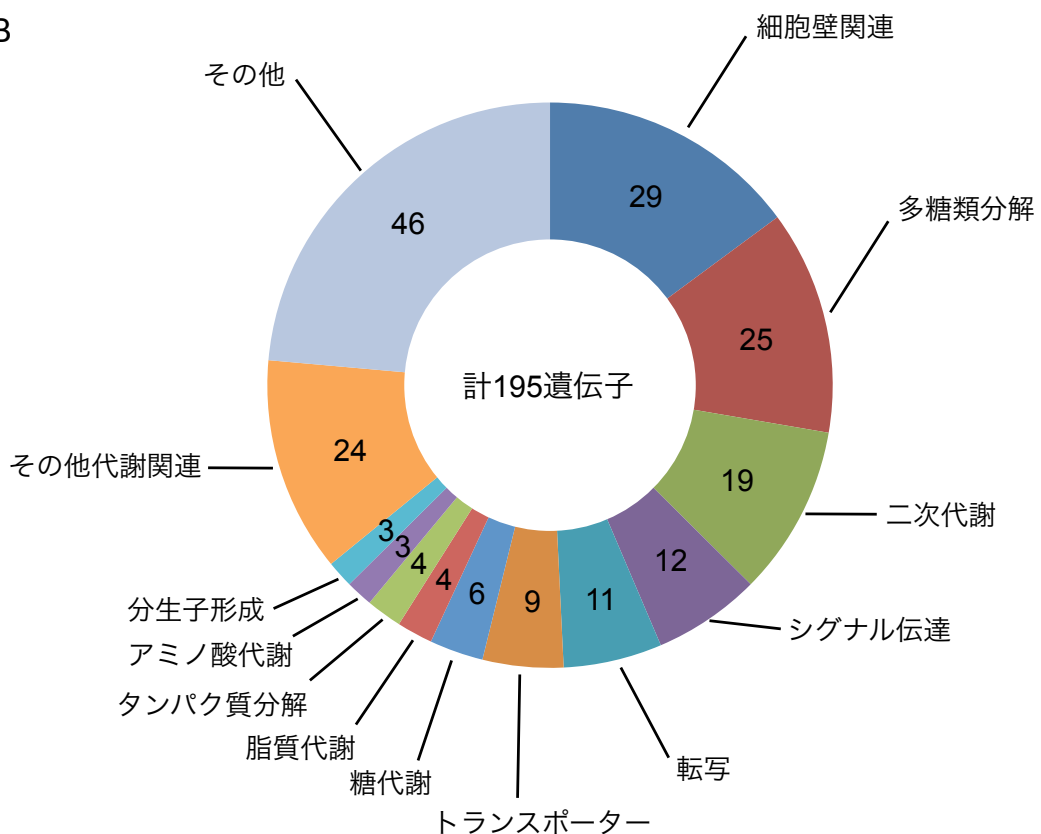
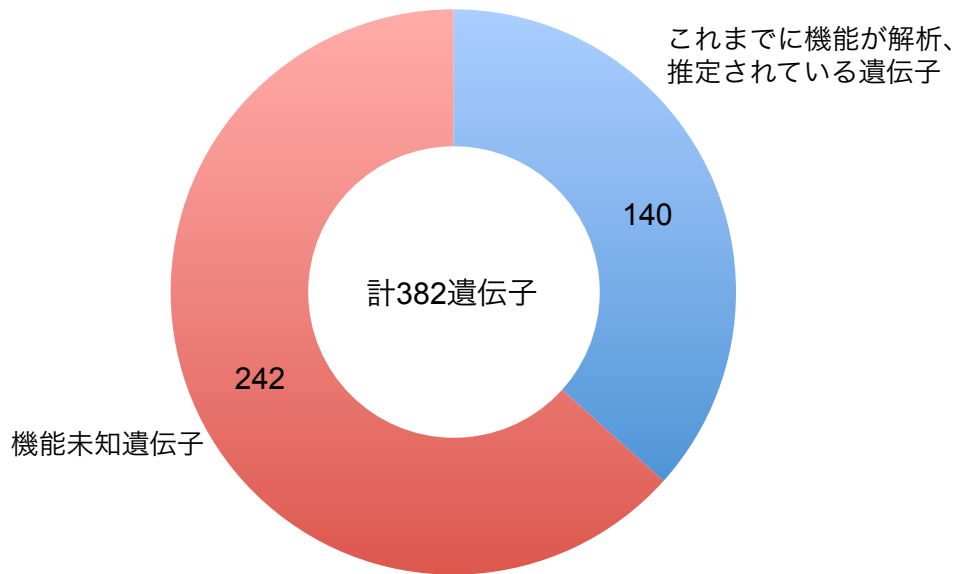


Fig. 3-5 PkcA活性化条件においてmRNAの増加した遺伝子の分類

- A. PkcA活性化条件においてmRNAが増加した遺伝子のうち、これまでに機能が解析、推定されている遺伝子の割合を示した。
- B. PkcA活性化条件においてmRNAが増加した遺伝子のうち、これまでに機能が解析、推定されている195遺伝子の機能について分類した。

A



B

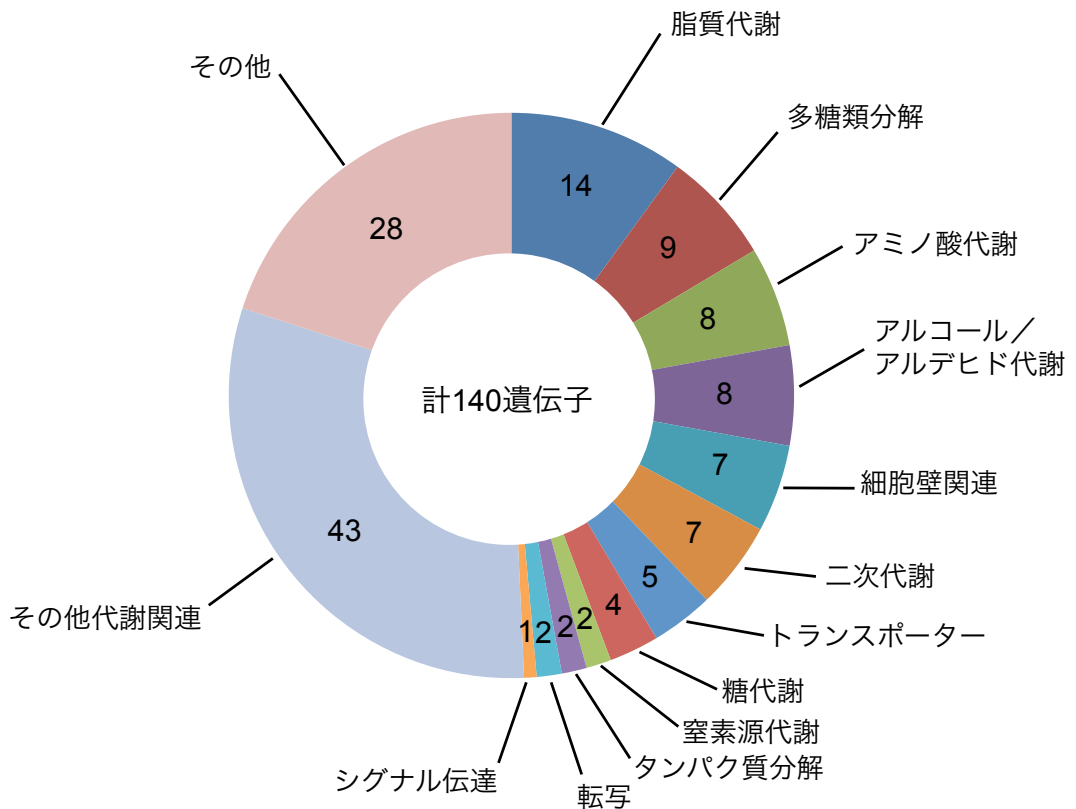
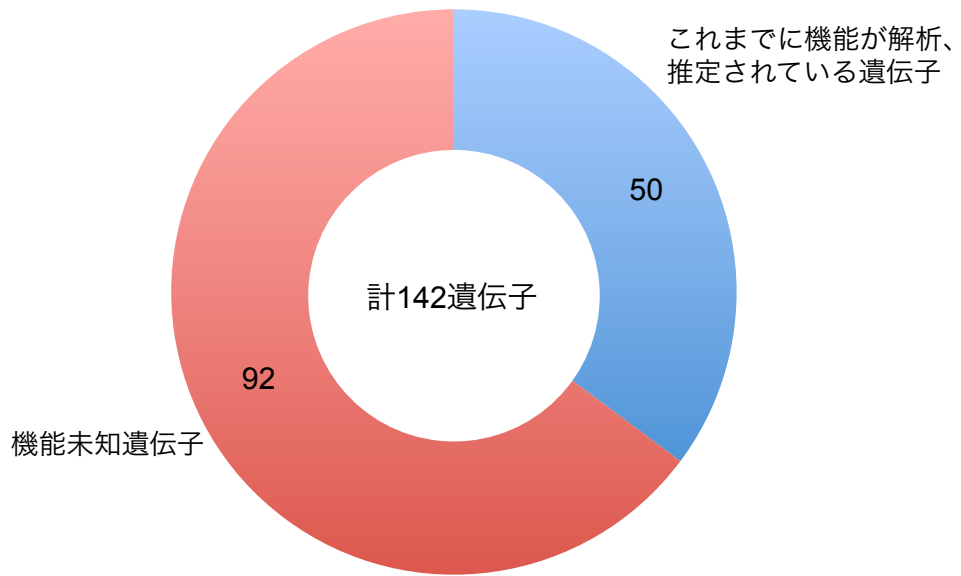


Fig. 3-6 PkcA活性化条件においてmRNAの減少した遺伝子の分類

- A. PkcA活性化条件においてmRNAが減少した遺伝子のうち、これまでに機能が解析、推定されている遺伝子の割合を示した。
- B. PkcA活性化条件においてmRNAが減少した遺伝子のうち、これまでに機能が解析、推定されている140遺伝子の機能について分類した。

A



B

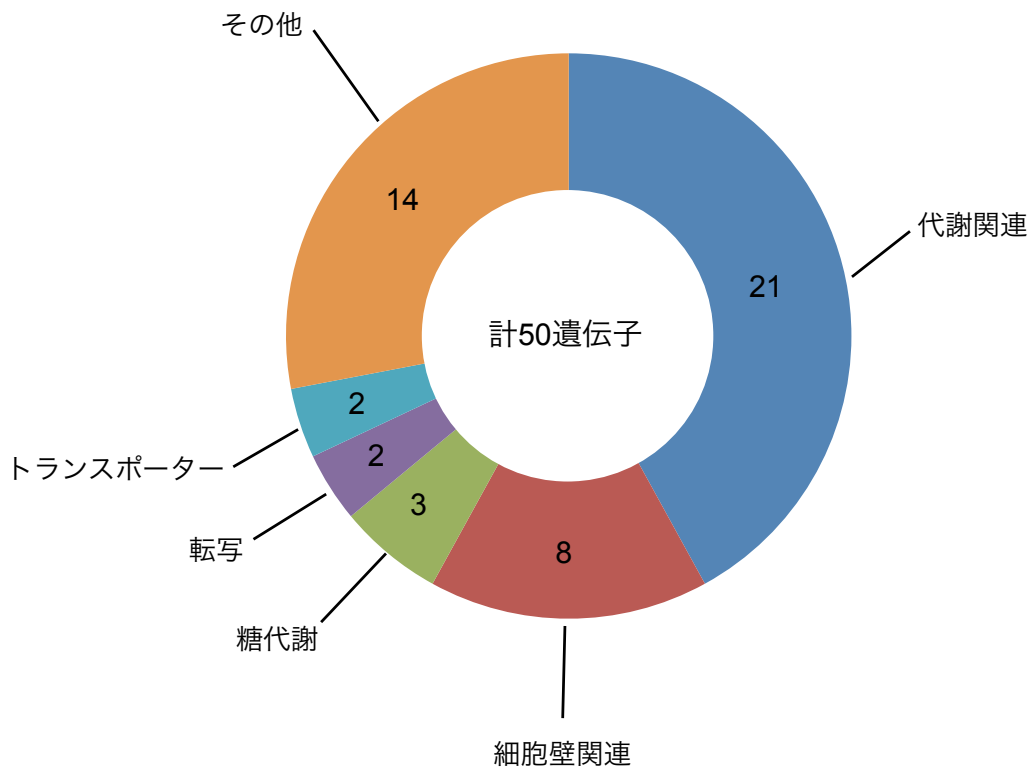
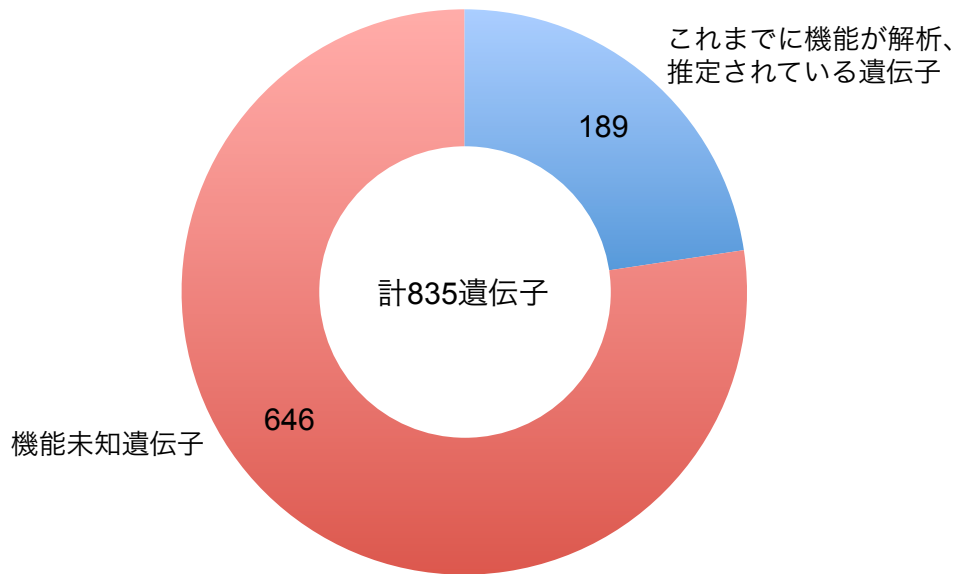


Fig. 3-7 PkcA失活条件においてmRNAの減少した遺伝子の分類

- A. PkcA失活条件においてmRNAが減少した遺伝子のうち、これまで機能解析、推定されている遺伝子の割合を示した。
- B. PkcA失活条件においてmRNAが減少した遺伝子のうち、これまで機能解析、推定されている50遺伝子の機能について分類した。

A



B

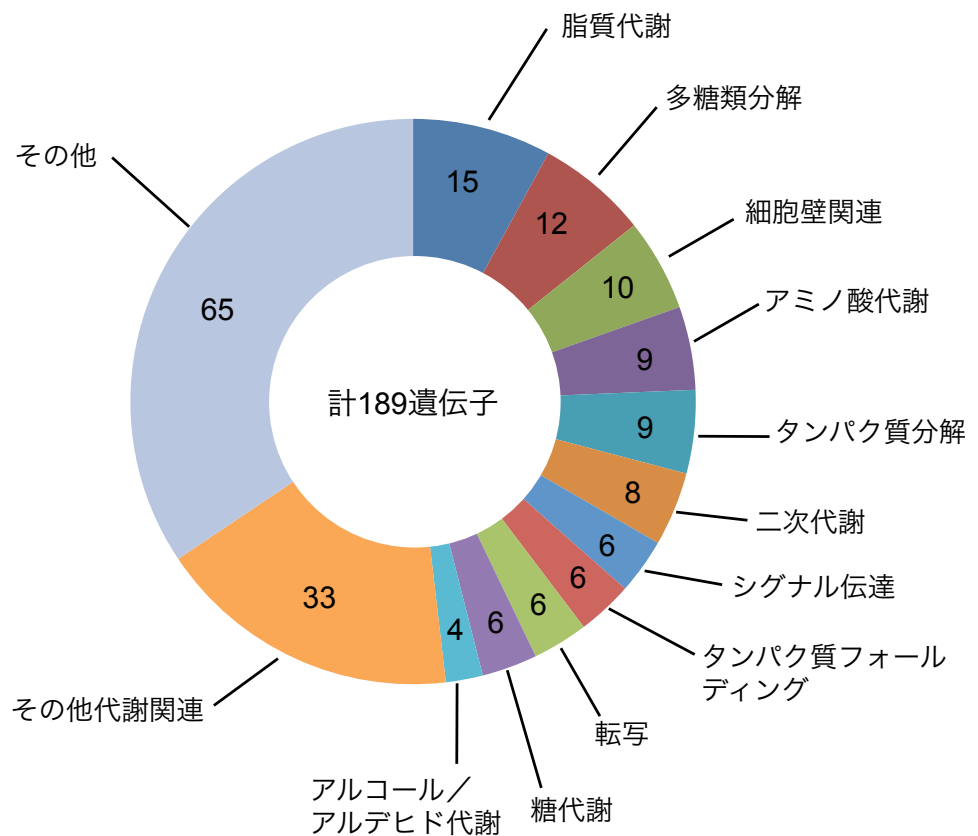


Fig. 3-8 PkcA活性化条件においてmRNAの増加した遺伝子の分類

- A. PkcA失活条件においてmRNAが増加した遺伝子のうち、これまでに機能が解析、推定されている遺伝子の割合を示した。
- B. PkcA失活条件においてmRNAが増加した遺伝子のうち、これまでに機能が解析、推定されている189遺伝子の機能について分類した。

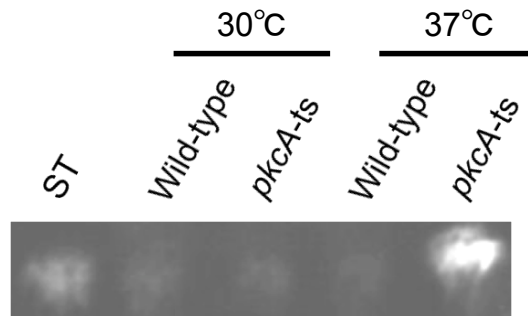


Fig. 3-9 PkcA部分的失活条件におけるST生産量の測定

A1149株 (Wild-type)、*pkcA-ts*-2株 (*pkcA-ts*) を各温度、固体MMGpuu培地で培養後、培地からSTを抽出し、TLCで展開した。スタンダード (ST) には1 μ gのSTを用いた。

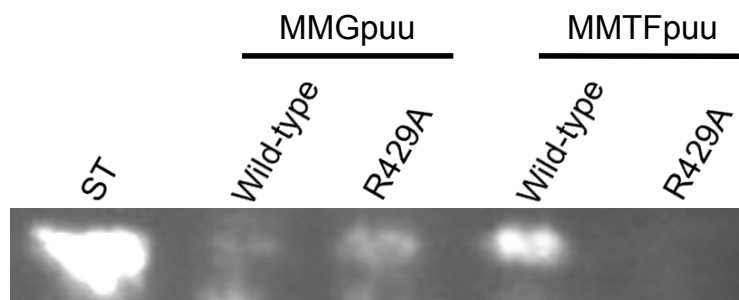


Fig. 3-10 PkcA活性化条件におけるST生産量の測定

A1149株 (Wild-type)、R429A-1株 (R429A) を37°C、各固体培地で培養後、培地からSTを抽出し、TLCで展開した。スタンダード (ST) には1 μ gのSTを用いた。

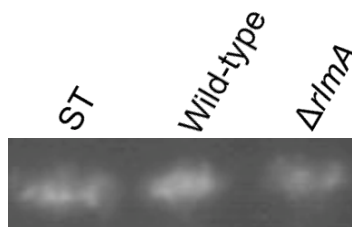


Fig. 3-11 *rlmA*欠失株におけるST生産量の測定

A1149株 (Wild-type)、 Δ *rlmA*-1株 (Δ *rlmA*) を37°C、各固体培地で培養後、培地からSTを抽出し、TLCで展開した。スタンダード (ST) には0.5 μ gのSTを用いた。

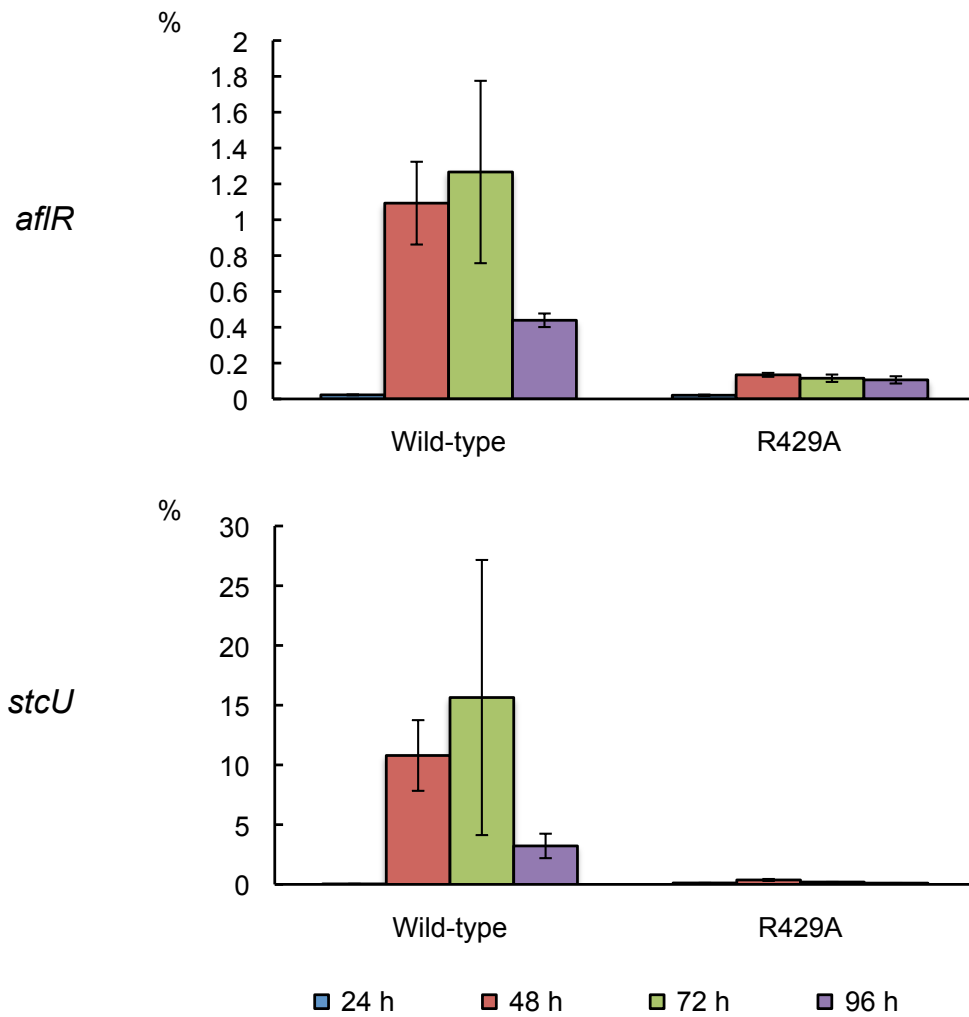


Fig. 3-12 PkcA活性化条件における*afIR*、*stcU*の転写解析

A1149株 (Wild-type)、R429A-1株 (R429A) の分生子 10^6 個を 37°C 、液体MMTFpuu培地で各時間培養後、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。

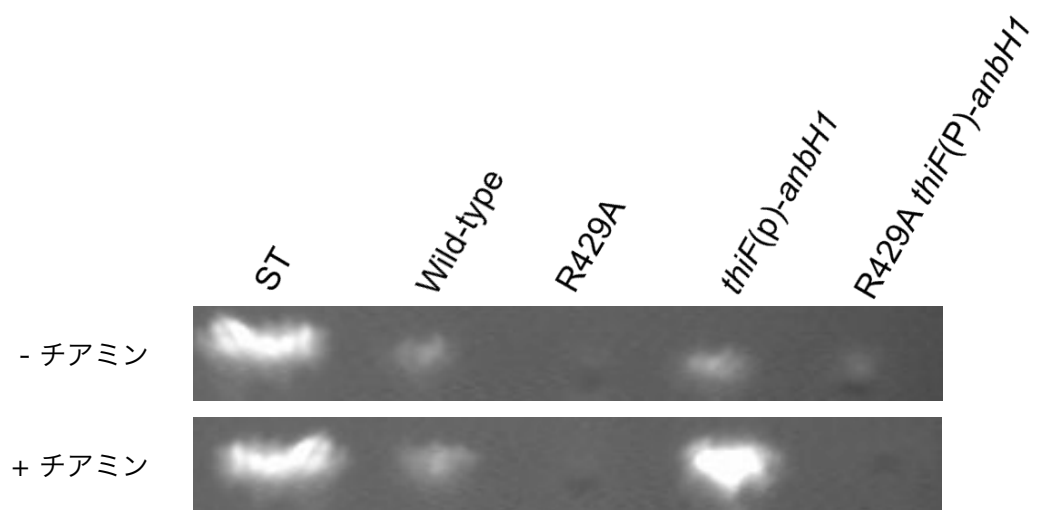


Fig. 3-13 *anbH1*抑制条件におけるST生産量の測定

A1149/pyroA株 (Wild-type)、R429ApyroA-1株 (R429A)、TBH-1株 (*thiF(p)-anbH1*)、R429A (*R429A thiF(p)-anbH1*) を37°C、固体MMTFuu培地または500 μMのチアミンを含む固体MMTFuuで培養後、培地からSTを抽出し、TLCで展開した。スタンダード (ST) には1 μgのSTを用いた。

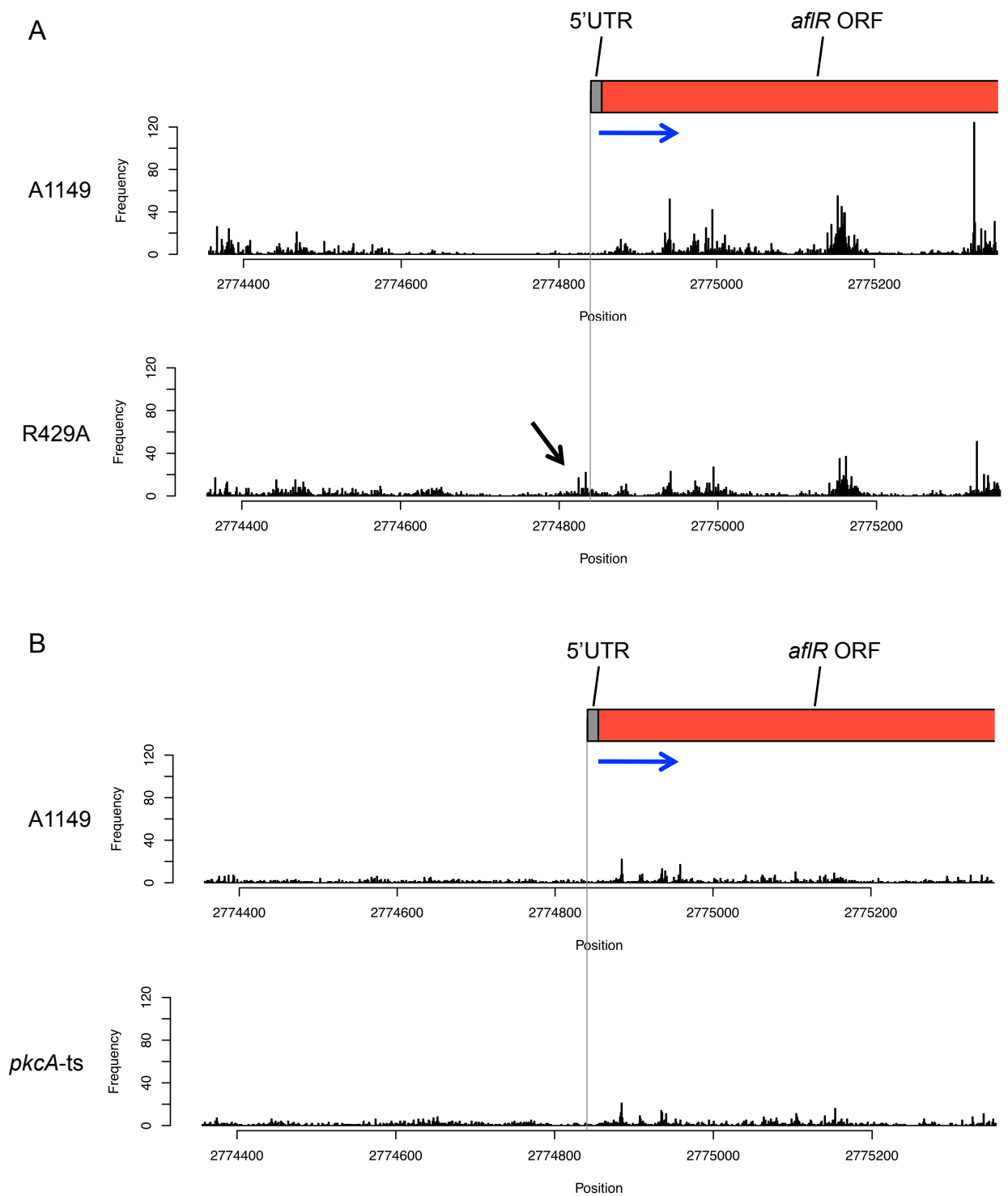


Fig. 3-14 *pkcA*条件変異株における*aflR*転写開始点付近のヌクレオソームの位置

A. PkcA活性化条件におけるヌクレオソームの位置

A1149株 (Wild-type)、R429A株 (R429A) を37°C、固体MMTFuu培地で20時間した場合のヌクレオソームの位置。

B. PkcA失活条件におけるヌクレオソームの位置

A1149株 (Wild-type)、*pkcA-ts*-2株 (*pkcA-ts*) を30°C、固体MMGuu培地で20時間培養後、42°Cに移して1.5時間培養した場合のヌクレオソームの位置。

それぞれ縦軸はヌクレオソームDNAの中点の数を示す。転写開始点を灰色の線、転写される向きを青矢印で示し、野生型株と比べヌクレオソームの位置に違いが見られた部位を矢印で示した。

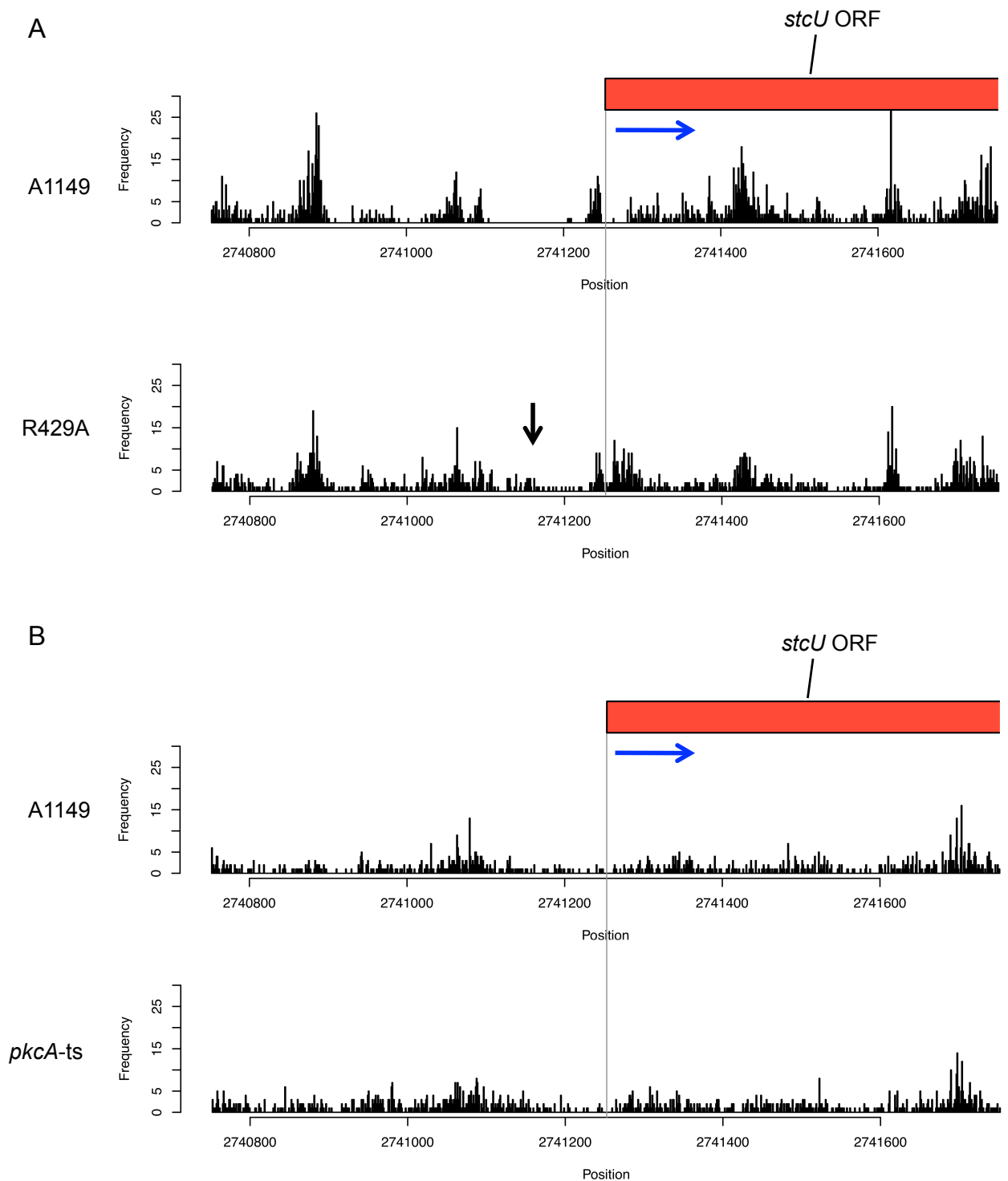


Fig. 3-15 *pkcA*条件変異株における $stcU$ 翻訳開始点付近のヌクレオソームの位置

A. PkcA活性化条件におけるヌクレオソームの位置

A1149株 (Wild-type)、R429A株 (R429A) を37°C、固体MMTFuu培地で20時間した場合のヌクレオソームの位置。

B. PkcA失活条件におけるヌクレオソームの位置

A1149株 (Wild-type)、*pkcA-ts*-2株 (*pkcA-ts*) を30°C、固体MMGuu培地で20時間培養後、42°Cに移して1.5時間培養した場合のヌクレオソームの位置。

それぞれ縦軸はヌクレオソームDNAの中点の数を示す。翻訳開始点を灰色の線、転写される向きを青矢印で示し、野生型株と比べヌクレオソームの位置に違いが見られた部位を矢印で示した。

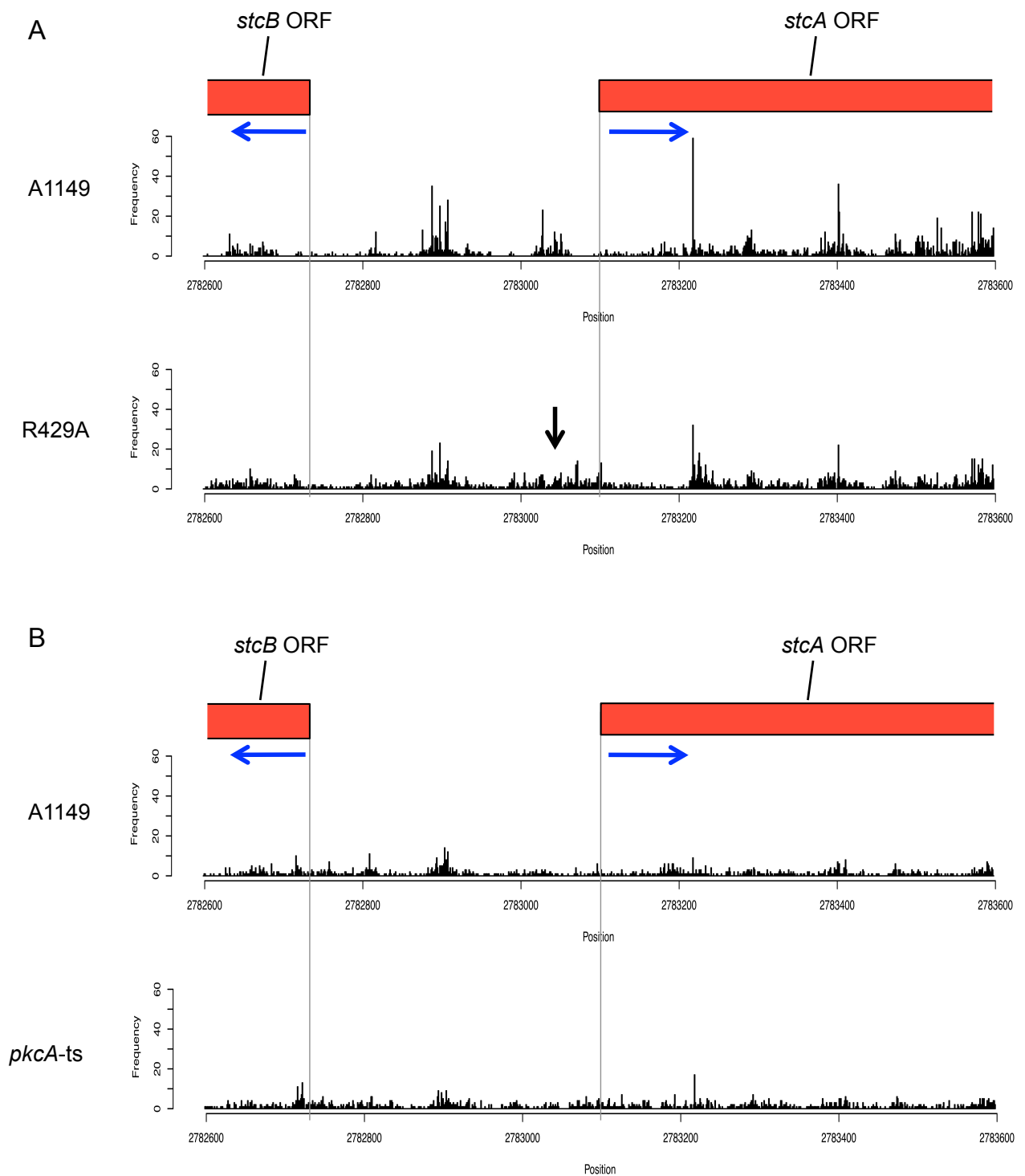


Fig. 3-16 *pkcA*条件変異株における*stcA*、*stcB*翻訳開始点付近のヌクレオソームの位置

A. PkcA活性化条件におけるヌクレオソームの位置

A1149株 (Wild-type)、R429A株 (R429A) を37°C、固体MMTFuu培地で20時間した場合のヌクレオソームの位置。

B. PkcA失活条件におけるヌクレオソームの位置

A1149株 (Wild-type)、*pkcA*-ts-2株 (*pkcA*-ts) を30°C、固体MMGuu培地で20時間培養後、42°Cに移して1.5時間培養した場合のヌクレオソームの位置。

それぞれ縦軸はヌクレオソームDNAの中心の数を示す。翻訳開始点を灰色の線、転写される向きを青矢印で示し、野生型株と比べヌクレオソームの位置に違いが見られた部位を矢印で示した。

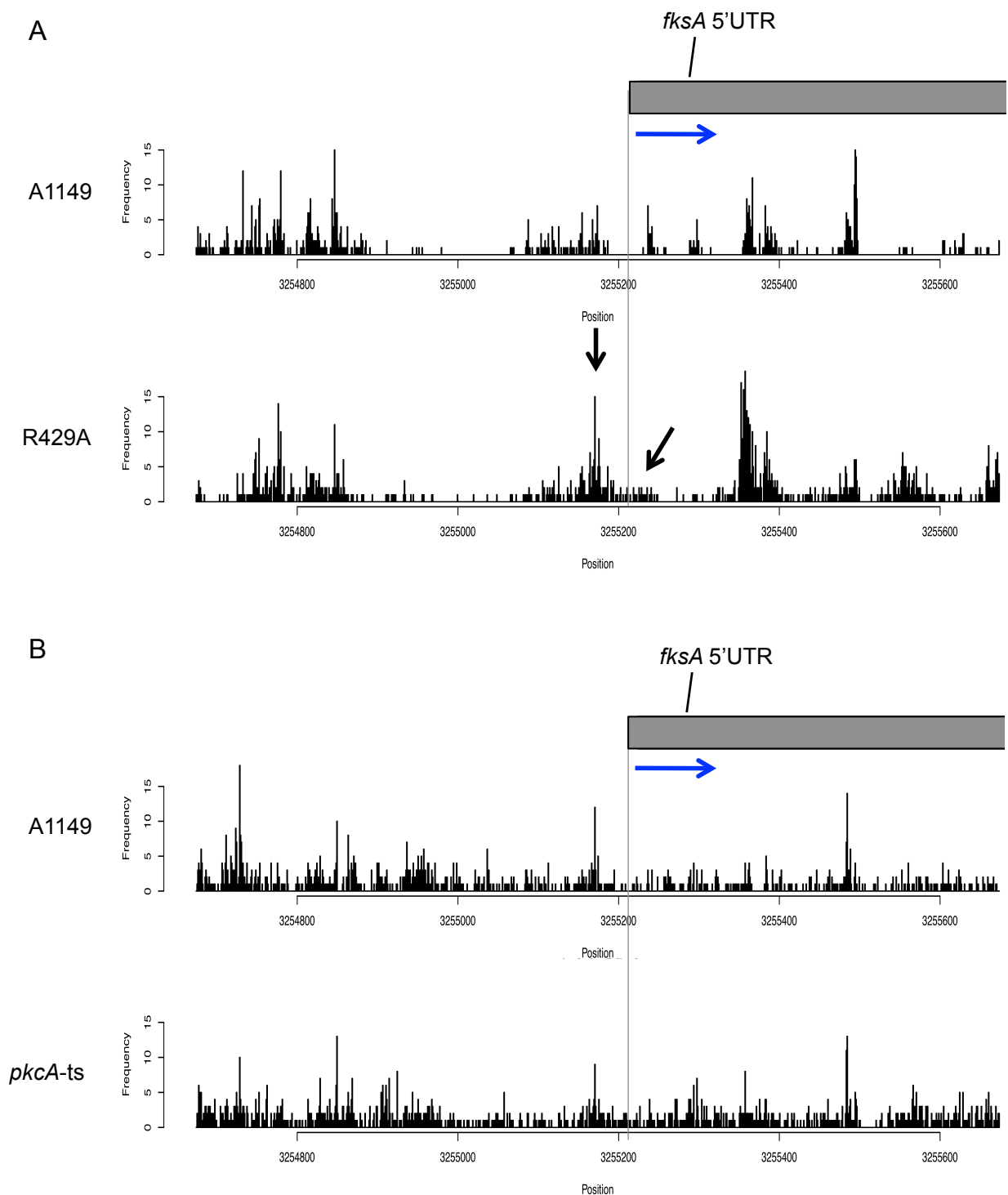


Fig. 3-17 *pkcA*条件変異株における*fksA*転写開始点付近のヌクレオソームの位置

A. PkcA活性化条件におけるヌクレオソームの位置

A1149株 (Wild-type)、R429A株 (R429A) を37°C、固体MMTFuu培地で20時間した場合のヌクレオソームの位置。

B. PkcA失活条件におけるヌクレオソームの位置

A1149株 (Wild-type)、*pkcA-ts*-2株 (*pkcA-ts*) を30°C、固体MMGuu培地で20時間培養後、42°Cに移して1.5時間培養した場合のヌクレオソームの位置。

それぞれ縦軸はヌクレオソームDNAの中点の数を示す。転写開始点を灰色の線、転写される向きを青矢印で示し、野生型株と比べヌクレオソームの位置に違いが見られた部位を矢印で示した。

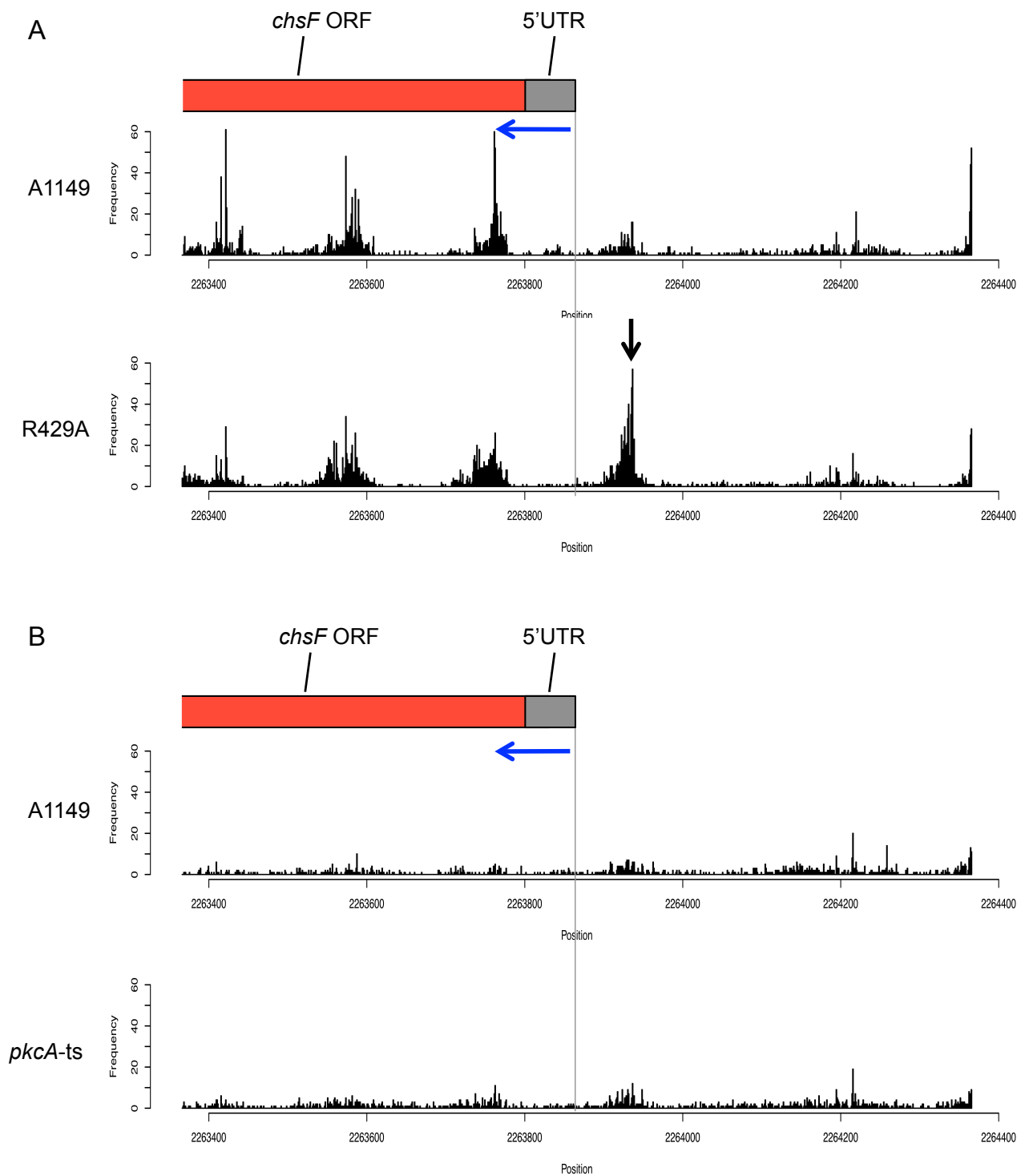


Fig. 3-18 *pkcA*条件変異株における*chsF*転写開始点付近のヌクレオソームの位置

A. PkcA活性化条件におけるヌクレオソームの位置

A1149株 (Wild-type)、R429A株 (R429A) を37°C、固体MMTFuu培地で20時間した場合のヌクレオソームの位置。

B. PkcA失活条件におけるヌクレオソームの位置

A1149株 (Wild-type)、*pkcA-ts*-2株 (*pkcA-ts*) を30°C、固体MMGuu培地で20時間培養後、42°Cに移して1.5時間培養した場合のヌクレオソームの位置。

それぞれ縦軸はヌクレオソームDNAの中点の数を示す。転写開始点を灰色の線、転写される向きを青矢印で示し、野生型株と比べヌクレオソームの位置に違いが見られた部位を矢印で示した。

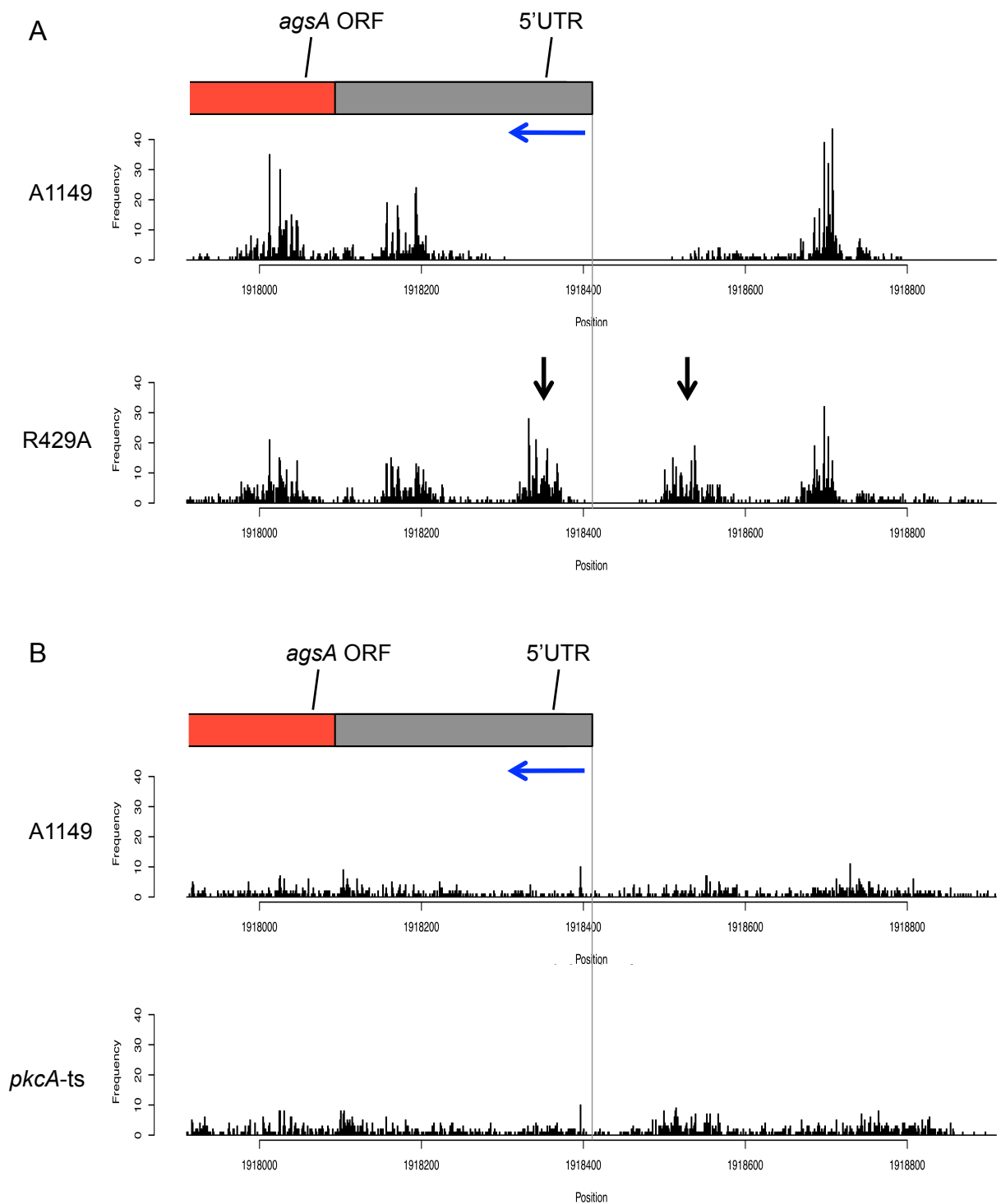


Fig. 3-19 *pkcA*条件変異株における*agsA*転写開始点付近のヌクレオソームの位置

A. PkcA活性化条件におけるヌクレオソームの位置

A1149株 (Wild-type)、R429A株 (R429A) を37°C、固体MMTFuu培地で20時間した場合のヌクレオソームの位置。

B. PkcA失活条件におけるヌクレオソームの位置

A1149株 (Wild-type)、*pkcA-ts*-2株 (*pkcA-ts*) を30°C、固体MMGuu培地で20時間培養後、42°Cに移して1.5時間培養した場合のヌクレオソームの位置。

それぞれ縦軸はヌクレオソームDNAの中点の数を示す。転写開始点を灰色の線、転写される向きを青矢印で示し、野生型株と比べヌクレオソームの位置に違いが見られた部位を矢印で示した。

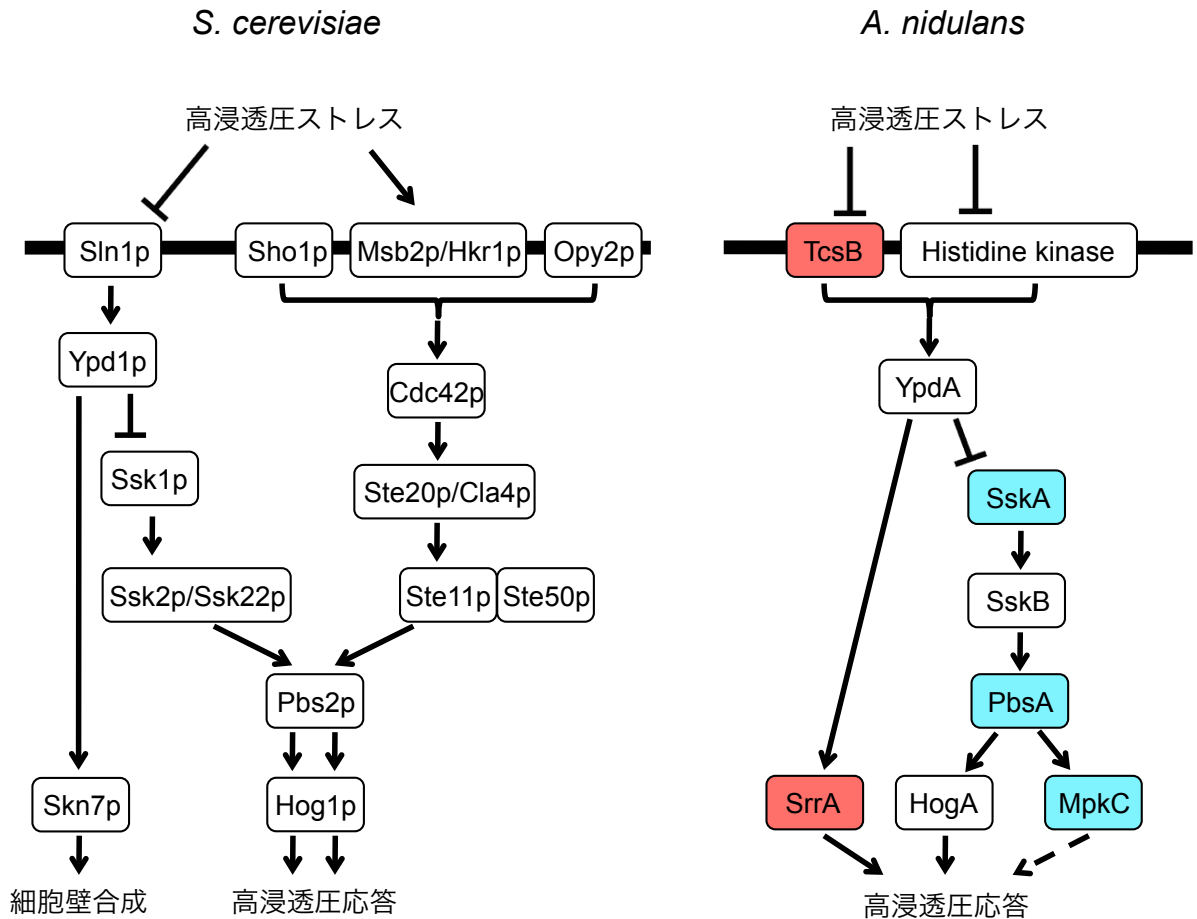


Fig. 3-20 *S. cerevisiae*と*A. nidulans*における高浸透圧ストレス応答シグナル伝達経路のモデル図

S. cerevisiae、*A. nidulans*の高浸透圧ストレス応答シグナル伝達経路はそれぞれSato and Posas, 2012、Miskei et al., 2009を参考に作製した。*A. nidulans*ではSho1pのオルソログを介した経路は高浸透圧ストレス応答には関与しないことが示唆されているため、示していない。*A. nidulans*の経路におけるHistidine kinaseは未知のヒスチジンキナーゼを示す。また、*A. nidulans*におけるHog1pのオルソログであるMpkCが高浸透圧応答に関与するかどうかについては議論の余地があるため破線で示した。PkcA活性化条件においてmRNAが増加した遺伝子の産物を赤、PkcA失活条件においてmRNAが増加する遺伝子の産物を青で示した。

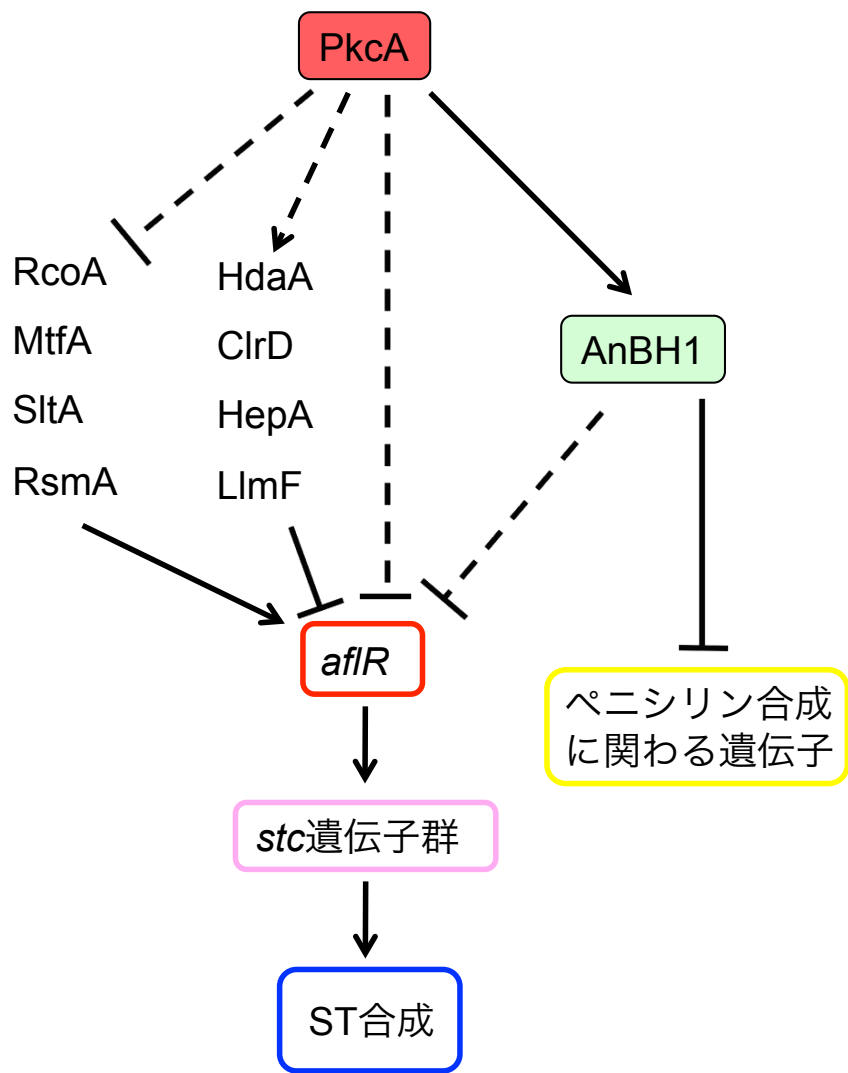


Fig. 3-21 PkcAによるST合成制御機構のモデル図

これまでに示されている制御機構については実線、本研究の結果から可能性の考えられた制御機構については破線で示した。

終章

本研究では糸状菌における PKC の機能の総合的理解を目的とし、*A. nidulans* におけるプロテインキナーゼ C の機能について解析を行った。

本研究では糸状菌の PKC がこれまでに知られていた CWI 経路での機能の他、高温でのアポトーシス誘導の抑制、極性の確立と再形成、二次代謝産物の合成制御に関与することを示し、高浸透圧ストレス応答とカルシウム応答シグナル伝達経路の制御に関与することを示唆した (Fig. 4-1)。

まず PkcA が RlmA 依存的または非依存的に複数のキチン酵素遺伝子の転写制御に関与することを示した。これまでに糸状菌においてキチンは菌糸状の形態形成に非常に重要であることが明らかにされているが、キチン合成酵素遺伝子の詳細な転写制御機構はほとんど明らかにされておらず、本研究における結果は、今後のキチン合成酵素遺伝子の転写制御機構の解明に貢献できると考えられる。

次に PkcA が高温でのアポトーシス誘導の抑制と極性の形成に関わる二つの生育に必須な機能を持つことを示した。*S. cerevisiae* の Pkc1p と同様 *A. nidulans* においても BckA 以外に PkcA により直接リン酸化を受けるタンパク質の存在が考えられるが、現在までに同定されたものはない。今後、リン酸化プロテオーム解析により PkcA 活性化条件、失活条件においてリン酸化レベルの変化するタンパク質の同定を試みる必要があると考えられる。また、PkcA 活性化条件、失活条件で見られる表現型の抑圧変異株の取得と原因遺伝子の同定などによって PkcA の下流で働く遺伝子が単離されれば、PkcA の 37°C における生育に必須な機能の解明にも繋がると考えられる。

これまでに二次代謝産物合成制御に関するシグナル伝達経路について解析がなされた例は少ない。本研究で行った網羅的転写解析の結果、PkcA 活性化条件、失活条件において合成産物の不明な複数のポリケタイド合成酵素や非リボソームペプチド合成酵素をコードすると推定される遺伝子の発現レベルが上昇していた。このことから PkcA が複数の二次代謝関連遺伝子の転写制御に関与する可能性が考えられるため、上記と同様の方法を用いての PkcA によりリン酸化されるタンパク質、下流で働く遺伝子の単離などを行えば、グローバルな二次代謝関連遺伝子の制御機構の解明に繋がる可能性が考えられる。また、近年の様々な糸状菌の全ゲノム配列の解明により、糸状菌は予想されていたよりずっと多くの二次代謝関連遺伝子クラスターを有することが明らかにされつつある。し

かしこれら二次代謝産物の生産に関わる遺伝子クラスターには、通常ほとんど発現していないものが多く、これらの発現を誘導する条件を見つけることが困難であることが二次代謝産物研究の進展を妨げる要因の一つである。今後、PkcA 条件変異株を用いて様々な条件検討を行うことが、様々な新規二次代謝産物の生産系の確立につながることを期待される。

本研究の結果、PkcA 失活条件では高浸透圧応答シグナル伝達経路（HOG 経路）やカルシウム応答シグナル伝達経路が活性化することが示唆された。PkcA 失活条件に移して短時間でこれらの経路の活性化が見られることから、PkcA がこれらの経路を直接制御している可能性が高い。*S. cerevisiae* において HOG 経路は高浸透圧ストレス時にグリセロール合成を誘導することで細胞内の膨圧を上昇させることが知られている。一方、CWI 経路は外界の浸透圧に対して細胞内の膨圧が上昇した場合に活性化することが示唆されている。細胞内の膨圧が過剰に上昇した場合には、細胞が溶菌しやすい状態になることが予想されるため、HOG 経路が活性化した場合に誘導されるグリセロール合成を CWI 経路が停止する役割を担っている可能性が考えられる。これまでに *slt2* 欠失株において細胞内にグリセロールが過剰に蓄積するかどうかは明らかにされていないが、*slt2* 欠失株の calcofluor white に対する感受性が *hog1* の欠失により部分的に抑圧されることが示されていることから (Corcoles-Saez *et al.*, 2012)、この可能性が支持される。

カルシウム応答に関しては本研究における結果とは対照的に、*S. cerevisiae* では Pkc1p は Slt2p を介してカルシウム応答シグナル伝達経路を活性化することが示唆されており、*S. cerevisiae* と *A. nidulans* では PKC や CWI 経路によるカルシウム応答シグナル伝達経路の制御機構が異なる可能性が考えられる。*S. cerevisiae* においてカルシウム応答シグナル伝達経路の構成因子であるカルシニューリン Cna1p や転写因子 Crz1p をコードする遺伝子の欠失株は、通常の培養条件において顕著な表現型の変化を示さないのに対し、*A. fumigatus* におけるこれらのオルソログの欠失株は著しい生育の悪化を示す (Juvvadi *et al.*, 2008、Cramer *et al.*, 2008)。また、*A. nidulans* においてこの経路の構成因子であるカルモジュリンは菌糸先端に局在することが示されており、極性生長に関与することが示唆されていることから (Chen *et al.*, 2010)、カルシウム応答シグナル伝達経路が糸状菌に特有の機能を持つ可能性が考えられる。*S. cerevisiae* と *A. nidulans* の PKC によるカルシウム応答シグナル伝達経路に制御の違いは、この

経路の機能の違いを反映している可能性がある。*A. fumigatus* ではカルシニューリンが隔壁に局在することが示されており、糸状菌におけるカルモジュリンやカルシニューリンの局在は *A. nidulans* で示されている PkcA の局在に類似する。そのため、ストレス条件において PkcA がこれらのタンパク質の機能を抑制することで適切な極性生長や隔壁形成を促す可能性が考えられる。

以上のように PkcA は細胞内の個々の現象に直接関与するだけでなく、他のシグナル伝達経路を制御することで、細胞内において非常に多岐に渡る現象にも関与すると考えられる。このように複雑な機能の全容を総合的に理解することは、以前は技術的に非常に困難を伴ったが、近年のトランスクリプトーム解析、プロテオーム解析、メタボローム解析等の技術の目覚ましい進歩によりそれも可能になりつつある。本論文の序章でも述べたように *A. nidulans* において全キナーゼをコードする遺伝子の欠失株が取得されており、これらはシグナル伝達経路の機能を解明する上で非常に強力なツールとなると考えられる。また、キナーゼ以外の遺伝子についても、そのほとんどの欠失株が取得されていることから、今後それらを用いることによって糸状菌研究が更に進展していくことが期待される。

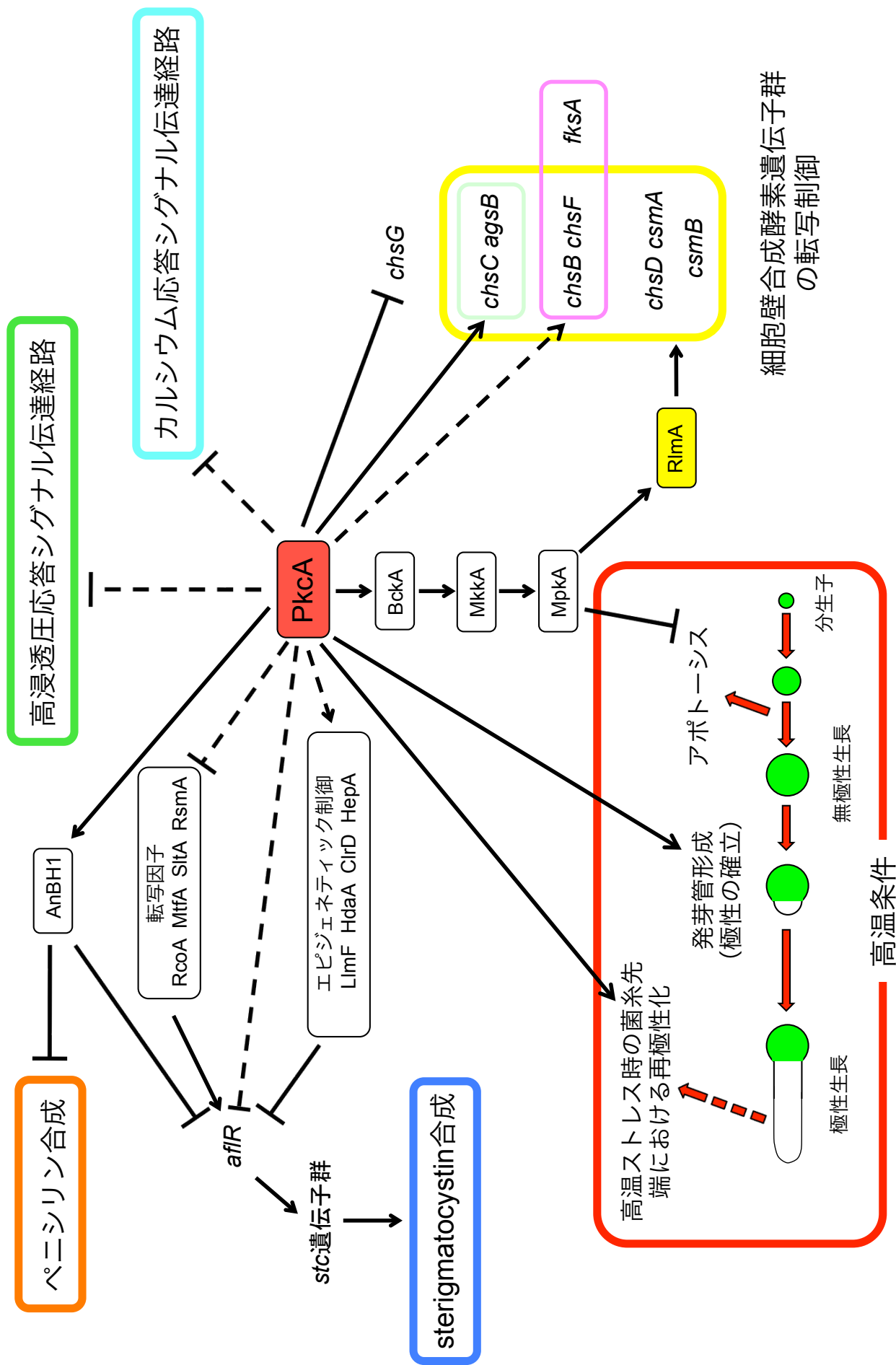


Fig. 4-1 *Aspergillus nidulans*におけるプロテインキナーゼC (PkcA) の機能
 これまでにPkcAの関与が示されている機能と本研究の結果から示された機能については実線、本研究の結果からPkcAの関与が示唆された機能については破線で示した。

参考文献

一宮維幸, 東京大学博士論文, (2004)

内田博教, 東京大学修士論文, (2008)

小野彩, 東京大学修士論文, (2008)

金子純一, 東京大学修士論文, (2005)

越由佳子, 東京大学修士論文, (2006)

星浩臣, 東京大学修士論文, (2013)

堀内裕之 (2009). 化学と生物 47: 794-799

Ambra, R., and Macino, G. (2000) Cloning and characterization of PKC-homologous genes in the truffle species *Tuber borchii* and *Tuber magnatum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **189**: 45-53.

Antonsson, B., Montessuit, S., Friedli, L., Payton, M.A., and Paravicini, G. (1994) Protein kinase C in yeast. Characteristics of the *Saccharomyces cerevisiae* PKC1 gene product. *J. Biol. Chem.* **269**: 16821-16828.

Araujo-Bazan, L., Penalva, M.A., and Espeso, E.A. (2008) Preferential localization of the endocytic internalization machinery to hyphal tips underlies polarization of the actin cytoskeleton in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* **67**: 891-905.

Arpaia, G., Cerri, F., Baima, S., and Macino, G. (1999) Involvement of protein kinase C in the response of *Neurospora crassa* to blue light. *Mol. Gen. Genet.* **262**: 314-322.

Bakker, H., Kleczka, B., Gerardy-Schahn, R., and Routier, F.H. (2005) Identification and partial characterization of two eukaryotic UDP-galactopyranose mutases. *Biol. Chem.* **386**: 657-661.

- Berepiki, A., Lichius, A., Shoji, J.Y., Tilsner, J., and Read, N.D. (2010) F-actin dynamics in *Neurospora crassa*. *Eukaryot. Cell* **9**: 547-557.
- Bhatnagar, D., Cary, J.W., Ehrlich, K., Yu, J., and Cleveland, T.E. (2006) Understanding the genetics of regulation of aflatoxin production and *Aspergillus flavus* development. *Mycopathologia* **162**: 155-166.
- Bok, J.W., and Keller, N.P. (2004) LaeA, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus* spp. *Eukaryot. Cell* **3**: 527-535.
- Bonilla, M., and Cunningham, K.W. (2003) Mitogen-activated protein kinase stimulation of Ca(2+) signaling is required for survival of endoplasmic reticulum stress in yeast. *Mol. Biol. Cell* **14**: 4296-4305.
- Cabib, E., Blanco, N., Grau, C., Rodriguez-Pena, J.M., and Arroyo, J. (2007) Crh1p and Crh2p are required for the cross-linking of chitin to beta(1-6)glucan in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Mol. Microbiol.* **63**: 921-935.
- Calcagno-Pizarelli, A.M., Hervas-Aguilar, A., Galindo, A., Abenza, J.F., Penalva, M.A., and Arst, H.N., Jr. (2011) Rescue of *Aspergillus nidulans* severely debilitating null mutations in ESCRT-0, I, II and III genes by inactivation of a salt-tolerance pathway allows examination of ESCRT gene roles in pH signalling. *J. Cell Sci.* **124**: 4064-4076.
- Carmona-Gutierrez, D., Eisenberg, T., Buttner, S., Meisinger, C., Kroemer, G., and Madeo, F. (2010) Apoptosis in yeast: triggers, pathways, subroutines. *Cell Death Differ.* **17**: 763-773.
- Caruso, M.L., Litzka, O., Martic, G., Lottspeich, F., and Brakhage, A.A. (2002) Novel basic-region helix-loop-helix transcription factor (AnBH1) of *Aspergillus nidulans* counteracts the CCAAT-binding complex AnCF in the promoter of a penicillin biosynthesis gene. *J. Mol. Biol.* **323**: 425-439.
- Cary, J.W., and Ehrlich, K.C. (2006) Aflatoxigenicity in *Aspergillus*: molecular genetics, phylogenetic relationships and evolutionary implications. *Mycopathologia* **162**: 167-177.
- Chaudhary, A., Jain, V., Dwivedi, R.S., and Misra, S. (2006) Invasive aspergillosis causing small bowel infarction in a patient of carcinoma breast undergoing chemotherapy. *J. Carcinog.* **5**: 18.

- Chen, S., Song, Y., Cao, J., Wang, G., Wei, H., Xu, X., and Lu, L. (2010) Localization and function of calmodulin in live-cells of *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol.* **47**: 268-278.
- Choi, M.G., Kurnov, V., Kersting, M.C., Sreenivas, A., and Carman, G.M. (2005) Phosphorylation of the yeast choline kinase by protein kinase C. Identification of Ser25 and Ser30 as major sites of phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **280**: 26105-26112.
- Choi, C.J., Ju, H.J., Park, B.H., Qin, R., Jahng, K.Y., Han, D.M., and Chae, K.S. (2005) Isolation and characterization of the *Aspergillus nidulans* *eglC* gene encoding a putative beta-1,3-endoglucanase. *Fungal. Genet. Biol.* **42**: 590-600.
- Colabardini, A.C., De Castro, P.A., De Gouvea, P.F., Savoldi, M., Malavazi, I., Goldman, M.H., and Goldman, G.H. (2010) Involvement of the *Aspergillus nidulans* protein kinase C with farnesol tolerance is related to the unfolded protein response. *Mol. Microbiol.* **78**: 1259-1279.
- Colot, H.V., Park, G., Turner, G.E., Ringelberg, C., Crew, C.M., Litvinkova, L., Weiss, R.L., Borkovich, K.A., and Dunlap, J.C. (2006) A high-throughput gene knockout procedure for *Neurospora* reveals functions for multiple transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**: 10352-10357.
- Corcoles-Saez, I., Ballester-Tomas, L., de la Torre-Ruiz, M.A., Prieto, J.A., and Randez-Gil, F. (2012) Low temperature highlights the functional role of the cell wall integrity pathway in the regulation of growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* **446**: 477-488.
- Cramer, R.A., Jr., Perfect, B.Z., Pinchai, N., Park, S., Perlin, D.S., Asfaw, Y.G., Heitman, J., Perfect, J.R., and Steinbach, W.J. (2008) Calcineurin target CrzA regulates conidial germination, hyphal growth, and pathogenesis of *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot. Cell* **7**: 1085-1097.
- Cui, J., Kaandorp, J.A., Slood, P.M., Lloyd, C.M., and Filatov, M.V. (2009) Calcium homeostasis and signaling in yeast cells and cardiac myocytes. *FEMS Yeast Res.* **9**: 1137-1147.
- Damveld, R.A., vanKuyk, P.A., Arentshorst, M., Klis, F.M., van den Hondel, C.A., and Ram, A.F. (2005) Expression of *agsA*, one of five 1,3-alpha-D-glucan synthase-encoding genes in *Aspergillus niger*, is induced in response to cell wall stress. *Fungal. Genet. Biol.* **42**: 165-177.

- de Groot, P.W., Brandt, B.W., Horiuchi, H., Ram, A.F., de Koster, C.G., and Klis, F.M. (2009) Comprehensive genomic analysis of cell wall genes in *Aspergillus nidulans*. *Fungal. Genet. Biol.* **46** Suppl 1: S72-81.
- De Souza, C.P., Hashmi, S.B., Osmani, A.H., Andrews, P., Ringelberg, C.S., Dunlap, J.C., and Osmani, S.A. (2013) Functional analysis of the *Aspergillus nidulans* kinome. *PLoS One* **8**: e58008.
- Delgado-Alvarez, D.L., Callejas-Negrete, O.A., Gomez, N., Freitag, M., Roberson, R.W., Smith, L.G., and Mourino-Perez, R.R. (2010) Visualization of F-actin localization and dynamics with live cell markers in *Neurospora crassa*. *Fungal. Genet. Biol.* **47**: 573-586.
- Delley, P.A., and Hall, M.N. (1999) Cell wall stress depolarizes cell growth via hyperactivation of RHO1. *J. Cell Biol.* **147**: 163-174.
- Dichtl, K., Ebel, F., Dirr, F., Routier, F.H., Heesemann, J., and Wagener, J. (2010) Farnesol misplaces tip-localized Rho proteins and inhibits cell wall integrity signalling in *Aspergillus fumigatus*. *Mol. Microbiol.* **76**: 1191-1204.
- Dinamarco, T.M., Pimentel Bde, C., Savoldi, M., Malavazi, I., Soriani, F.M., Uyemura, S.A., Ludovico, P., Goldman, M.H., and Goldman, G.H. (2010) The roles played by *Aspergillus nidulans* apoptosis-inducing factor (AIF)-like mitochondrial oxidoreductase (AifA) and NADH-ubiquinone oxidoreductases (NdeA-B and NdiA) in farnesol resistance. *Fungal. Genet. Biol.* **47**: 1055-1069.
- Dong, Y., Pruyne, D., and Bretscher, A. (2003) Formin-dependent actin assembly is regulated by distinct modes of Rho signaling in yeast. *J. Cell Biol.* **161**: 1081-1092.
- Engel, J., Schmalhorst, P.S., Dork-Bousset, T., Ferrieres, V., and Routier, F.H. (2009) A single UDP-galactofuranose transporter is required for galactofuranosylation in *Aspergillus fumigatus*. *J. Biol. Chem.* **284**: 33859-33868.
- Firon, A., Beauvais, A., Latge, J.P., Couve, E., Grosjean-Cournoyer, M.C., and D'Enfert, C. (2002) Characterization of essential genes by parasexual genetics in the human fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*: impact of genomic rearrangements associated with electroporation of DNA. *Genetics* **161**: 1077-1087.

- Fortwendel, J.R., Juvvadi, P.R., Perfect, B.Z., Rogg, L.E., Perfect, J.R., and Steinbach, W.J. (2010) Transcriptional regulation of chitin synthases by calcineurin controls paradoxical growth of *Aspergillus fumigatus* in response to caspofungin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**: 1555-1563.
- Franchi, L., Fulci, V., and Macino, G. (2005) Protein kinase C modulates light responses in *Neurospora* by regulating the blue light photoreceptor WC-1. *Mol. Microbiol.* **56**: 334-345.
- Fuchs, B.B., and Mylonakis, E. (2009) Our paths might cross: the role of the fungal cell wall integrity pathway in stress response and cross talk with other stress response pathways. *Eukaryot. Cell* **8**: 1616-1625.
- Fujioka, T., Mizutani, O., Furukawa, K., Sato, N., Yoshimi, A., Yamagata, Y., Nakajima, T., and Abe, K. (2007) MpkA-Dependent and -independent cell wall integrity signaling in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot. Cell* **6**: 1497-1510.
- Fujiwara, M., Ichinomiya, M., Motoyama, T., Horiuchi, H., Ohta, A., and Takagi, M. (2000) Evidence that the *Aspergillus nidulans* class I and class II chitin synthase genes, *chsC* and *chsA*, share critical roles in hyphal wall integrity and conidiophore development. *J. Biochem.* **127**: 359-366.
- Fukuda, K., Yamada, K., Deoka, K., Yamashita, S., Ohta, A., and Horiuchi, H. (2009) Class III chitin synthase ChsB of *Aspergillus nidulans* localizes at the sites of polarized cell wall synthesis and is required for conidial development. *Eukaryot. Cell* **8**: 945-956.
- Furukawa, K., Katsuno, Y., Urao, T., Yabe, T., Yamada-Okabe, T., Yamada-Okabe, H., Yamagata, Y., Abe, K., and Nakajima, T. (2002) Isolation and functional analysis of a gene, *tcsB*, encoding a transmembrane hybrid-type histidine kinase from *Aspergillus nidulans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 5304-5310.
- Futagami, T., Seto, K., Kajiwara, Y., Takashita, H., Omori, T., Takegawa, K., and Goto, M. (2014) The putative stress sensor protein Mtl1 is required for conidia formation, cell wall stress tolerance, and cell wall integrity. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* In press
- Galagan, J.E., Calvo, S.E., Cuomo, C., Ma, L.J., Wortman, J.R., Batzoglou, S., Lee, S.I., Basturkmen, M., Spevak, C.C., Clutterbuck, J., Kapitonov, V., Jurka, J., Scazzocchio, C. *et al.* (2005) Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus*

- and *A. oryzae*. *Nature* **438**: 1105-1115.
- Gonzalez, R., and Scazzocchio, C. (1997) A rapid method for chromatin structure analysis in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3955-3956.
- Guo, S., Shen, X., Yan, G., Ma, D., Bai, X., Li, S., and Jiang, Y. (2009) A MAP kinase dependent feedback mechanism controls Rho1 GTPase and actin distribution in yeast. *PLoS One* **4**: e6089.
- Hagiwara, D., Kondo, A., Fujioka, T., and Abe, K. (2008) Functional analysis of C2H2 zinc finger transcription factor CrzA involved in calcium signaling in *Aspergillus nidulans*. *Curr. Genet.* **54**: 325-338.
- Hagiwara, D., Asano, Y., Marui, J., Yoshimi, A., Mizuno, T., and Abe, K. (2009) Transcriptional profiling for *Aspergillus nidulans* HogA MAPK signaling pathway in response to fludioxonil and osmotic stress. *Fungal. Genet. Biol.* **46**: 868-878.
- Hagiwara, D., Mizuno, T., and Abe, K. (2011) Characterization of the conserved phosphorylation site in the *Aspergillus nidulans* response regulator SrrA. *Curr. Genet.* **57**: 103-114.
- Harris, S.D., Morrell, J.L., and Hamer, J.E. (1994) Identification and characterization of *Aspergillus nidulans* mutants defective in cytokinesis. *Genetics* **136**: 517-532.
- Harris, S.D., Hamer, L., Sharpless, K.E., and Hamer, J.E. (1997) The *Aspergillus nidulans* *sepA* gene encodes an FH1/2 protein involved in cytokinesis and the maintenance of cellular polarity. *Embo J.* **16**: 3474-3483.
- Hashimoto, Y., and Soderling, T.R. (1989) Regulation of calcineurin by phosphorylation. Identification of the regulatory site phosphorylated by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **264**: 16524-16529.
- He, X., Li, S., and Kaminskyj, S.G. (2013) Characterization of *Aspergillus nidulans* alpha-glucan synthesis: roles for two synthases and two amylases. *Mol. Microbiol.* *In press*.
- Herrmann, M., Sprote, P., and Brakhage, A.A. (2006) Protein kinase C (PkcA) of *Aspergillus nidulans* is involved in penicillin production. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 2957-2970.
- Hicks, J., Lockington, R.A., Strauss, J., Dieringer, D., Kubicek, C.P., Kelly, J., and Keller, N.

- (2001) RcoA has pleiotropic effects on *Aspergillus nidulans* cellular development. *Mol. Microbiol.* **39**: 1482-1493.
- Horiuchi, H., Fujiwara, M., Yamashita, S., Ohta, A., and Takagi, M. (1999) Proliferation of intrahyphal hyphae caused by disruption of *csmA*, which encodes a class V chitin synthase with a myosin motor-like domain in *Aspergillus nidulans*. *J. Bacteriol.* **181**: 3721-3729.
- Horiuchi, H. (2009) Functional diversity of chitin synthases of *Aspergillus nidulans* in hyphal growth, conidiophore development and septum formation. *Med. Mycol.* **47** Suppl 1: S47-52.
- Hu, Z., Killion, P.J., and Iyer, V.R. (2007) Genetic reconstruction of a functional transcriptional regulatory network. *Nat. Genet.* **39**: 683-687.
- Hynes, M.J., Corrick, C.M., and King, J.A. (1983) Isolation of genomic clones containing the *amdS* gene of *Aspergillus nidulans* and their use in the analysis of structural and regulatory mutations. *Mol. Cell Biol.* **3**: 1430-1439.
- Ichinomiya, M., Motoyama, T., Fujiwara, M., Takagi, M., Horiuchi, H., and Ohta, A. (2002) Repression of *chsB* expression reveals the functional importance of class IV chitin synthase gene *chsD* in hyphal growth and conidiation of *Aspergillus nidulans*. *Microbiology* **148**: 1335-1347.
- Ichinomiya, M., Yamada, E., Yamashita, S., Ohta, A., and Horiuchi, H. (2005) Class I and class II chitin synthases are involved in septum formation in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot. Cell* **4**: 1125-1136.
- Ichinomiya, M., Uchida, H., Koshi, Y., Ohta, A., and Horiuchi, H. (2007) A protein kinase C-encoding gene, *pkcA*, is essential to the viability of the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**: 2787-2799.
- Jung, U.S., and Levin, D.E. (1999) Genome-wide analysis of gene expression regulated by the yeast cell wall integrity signalling pathway. *Mol. Microbiol.* **34**: 1049-1057.
- Juvvadi, P.R., Maruyama, J., and Kitamoto, K. (2007) Phosphorylation of the *Aspergillus oryzae* Woronin body protein, AoHex1, by protein kinase C: evidence for its role in the multimerization and proper localization of the Woronin body protein. *Biochem. J.* **405**: 533-540.

- Juvvadi, P.R., Fortwendel, J.R., Pinchai, N., Perfect, B.Z., Heitman, J., and Steinbach, W.J. (2008) Calcineurin localizes to the hyphal septum in *Aspergillus fumigatus*: implications for septum formation and conidiophore development. *Eukaryot. Cell* **7**: 1606-1610.
- Katayama, T., Uchida, H., Ohta, A., and Horiuchi, H. (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.
- Khatun, R., and Lakin-Thomas, P. (2010) Activation and localization of protein kinase C in *Neurospora crassa*. *Fungal. Genet. Biol.* **48**: 465-473.
- Komachi, Y., Hatakeyama, S., Motomatsu, H., Futagami, T., Kizjakina, K., Sobrado, P., Ekino, K., Takegawa, K., Goto, M., Nomura, Y., and Oka, T. (2013) *gfsA* encodes a novel galactofuranosyltransferase involved in biosynthesis of galactofuranose antigen of O-glycan in *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus fumigatus*. *Mol. Microbiol.* **90**: 1054-1073.
- Kono, K., Saeki, Y., Yoshida, S., Tanaka, K., and Pellman, D. (2012) Proteasomal degradation resolves competition between cell polarization and cellular wound healing. *Cell* **150**: 151-164.
- Kovacs, Z., Szarka, M., Kovacs, S., Boczonadi, I., Emri, T., Abe, K., Pocsi, I., and Pusztahelyi, T. (2013) Effect of cell wall integrity stress and RlmA transcription factor on asexual development and autolysis in *Aspergillus nidulans*. *Fungal. Genet. Biol.* **54**: 1-14.
- Larsen, S., Weaver, J., de Sa Campos, K., Bulahan, R., Nguyen, J., Grove, H., Huang, A., Low, L., Tran, N., Gomez, S., Yau, J., Ilustrisimo, T., Kawilarang, J., Lau, J., Tranphung, M., Chen, I., Tran, C., Fox, M., Lin-Cereghino, J., and Lin-Cereghino, G.P. (2013) Mutant strains of *Pichia pastoris* with enhanced secretion of recombinant proteins. *Biotechnol. Lett.* **35**: 1925-1935.
- Latge, J.P. (2007) The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Mol. Microbiol.* **66**: 279-290.
- Lendenfeld, T., and Kubicek, C.P. (1998) Characterization and properties of protein kinase C from the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Biochem. J.* **330** (Pt 2): 689-694.
- Lengeler, K.B., Wasserstrom, L., Walther, A., and Wendland, J. (2013) Analysis of the cell wall

- integrity pathway of *Ashbya gossypii*. *Microbiol. Res.* **168**: 607-614.
- Levin, D.E., Fields, F.O., Kunisawa, R., Bishop, J.M., and Thorner, J. (1990) A candidate protein kinase C gene, *PKC1*, is required for the *S. cerevisiae* cell cycle. *Cell* **62**: 213-224.
- Levin, D.E., and Bartlett-Heubusch, E. (1992) Mutants in the *S. cerevisiae* *PKC1* gene display a cell cycle-specific osmotic stability defect. *J. Cell Biol.* **116**: 1221-1229.
- Levin, D.E. (2005) Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **69**: 262-291.
- Levin, D.E. (2011) Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the cell wall integrity signaling pathway. *Genetics* **189**: 1145-1175.
- Li, R., Yu, C., Li, Y., Lam, T.W., Yiu, S.M., Kristiansen, K., and Wang, J. (2009) SOAP2: an improved ultrafast tool for short read alignment. *Bioinformatics* **25**: 1966-1967.
- Ma, D., and Li, R. (2013) Current understanding of HOG-MAPK pathway in *Aspergillus fumigatus*. *Mycopathologia* **175**: 13-23.
- Mazur, P., Morin, N., Baginsky, W., el-Sherbeini, M., Clemas, J.A., Nielsen, J.B., and Foor, F. (1995) Differential expression and function of two homologous subunits of yeast 1,3-beta-D-glucan synthase. *Mol. Cell Biol.* **15**: 5671-5681.
- Mellado, E., Specht, C.A., Robbins, P.W., and Holden, D.W. (1996) Cloning and characterization of *chsD*, a chitin synthase-like gene of *Aspergillus fumigatus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **143**: 69-76.
- Merzendorfer, H. (2011) The cellular basis of chitin synthesis in fungi and insects: common principles and differences. *Eur. J. Cell Biol.* **90**: 759-769.
- Milewski, S., Gabriel, I., and Olchow, J. (2006) Enzymes of UDP-GlcNAc biosynthesis in yeast. *Yeast* **23**: 1-14.
- Montanes, F.M., Pascual-Ahuir, A., and Proft, M. (2011) Repression of ergosterol biosynthesis is essential for stress resistance and is mediated by the Hog1 MAP kinase and the Mot3 and Rox1 transcription factors. *Mol. Microbiol.* **79**: 1008-1023.
- Morawetz, R., Lendenfeld, T., Mischak, H., Muhlbauer, M., Gruber, F., Goodnight, J., de Graaff,

- L.H., Visser, J., Mushinski, J.F., and Kubicek, C.P. (1996) Cloning and characterisation of genes (*pkc1* and *pkcA*) encoding protein kinase C homologues from *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger*. *Mol. Gen. Genet.* **250**: 17-28.
- Motoyama, T., Fujiwara, M., Kojima, N., Horiuchi, H., Ohta, A., and Takagi, M. (1997) The *Aspergillus nidulans* genes *chsA* and *chsD* encode chitin synthases which have redundant functions in conidia formation [corrected and republished article originally appeared in *Mol. Gen. Genet.* 1996 Jun; **251**(4):442-50]. *Mol. Gen. Genet.* **253**: 520-528.
- Mouyna, I., Hartl, L., and Latge, J.P. (2013) beta-1,3-glucan modifying enzymes in *Aspergillus fumigatus*. *Front. Microbiol.* **4**: 81.
- Nonaka, H., Tanaka, K., Hirano, H., Fujiwara, T., Kohno, H., Umikawa, M., Mino, A., and Takai, Y. (1995) A downstream target of RHO1 small GTP-binding protein is PKC1, a homolog of protein kinase C, which leads to activation of the MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J.* **14**: 5931-5938.
- Norberg, E., Orrenius, S., and Zhivotovsky, B. (2010) Mitochondrial regulation of cell death: processing of apoptosis-inducing factor (AIF). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **396**: 95-100.
- Oakley, C.E., Weil, C.F., Kretz, P.L., and Oakley, B.R. (1987) Cloning of the *riboB* locus of *Aspergillus nidulans*. *Gene* **53**: 293-298.
- Oeser, B. (1998) *PKC1*, encoding a protein kinase C, and *FAT1*, encoding a fatty acid transporter protein, are neighbors in *Cochliobolus heterostrophus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **165**: 273-280.
- Ohno, S., and Nishizuka, Y. (2002) Protein kinase C isotypes and their specific functions: prologue. *J. Biochem.* **132**: 509-511.
- Palmer, J.M., Bok, J.W., Lee, S., Dagenais, T.R., Andes, D.R., Kontoyiannis, D.P., and Keller, N.P. (2013) Loss of CclA, required for histone 3 lysine 4 methylation, decreases growth but increases secondary metabolite production in *Aspergillus fumigatus*. *PeerJ* **1**: e4.
- Park, H., and Lennarz, W.J. (2000) Evidence for interaction of yeast protein kinase C with several subunits of oligosaccharyl transferase. *Glycobiology* **10**: 737-744.

- Perez, P., and Calonge, T.M. (2002) Yeast protein kinase C. *J. Biochem.* **132**: 513-517.
- Pinchai, N., Perfect, B.Z., Juvvadi, P.R., Fortwendel, J.R., Cramer, R.A., Jr., Asfaw, Y.G., Heitman, J., Perfect, J.R., and Steinbach, W.J. (2009) *Aspergillus fumigatus* calcipressin CbpA is involved in hyphal growth and calcium homeostasis. *Eukaryot. Cell* **8**: 511-519.
- Pujol, N., Bonet, C., Vilella, F., Petkova, M.I., Mozo-Villarias, A., and de la Torre-Ruiz, M.A. (2009) Two proteins from *Saccharomyces cerevisiae*: Pfy1 and Pkc1, play a dual role in activating actin polymerization and in increasing cell viability in the adaptive response to oxidative stress. *FEMS Yeast Res.* **9**: 1196-1207.
- Ramamoorthy, V., Dhingra, S., Kincaid, A., Shantappa, S., Feng, X., and Calvo, A.M. (2013) The putative C2H2 transcription factor MtfA is a novel regulator of secondary metabolism and morphogenesis in *Aspergillus nidulans*. *PLoS One* **8**: e74122.
- Reinoso-Martin, C., Schuller, C., Schuetzer-Muehlbauer, M., and Kuchler, K. (2003) The yeast protein kinase C cell integrity pathway mediates tolerance to the antifungal drug caspofungin through activation of Slf2p mitogen-activated protein kinase signaling. *Eukaryot. Cell* **2**: 1200-1210.
- Reyes-Dominguez, Y., Bok, J.W., Berger, H., Shwab, E.K., Basheer, A., Gallmetzer, A., Scazzocchio, C., Keller, N., and Strauss, J. (2010) Heterochromatic marks are associated with the repression of secondary metabolism clusters in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* **76**: 1376-1386.
- Riedl, J., Crevenna, A.H., Kessenbrock, K., Yu, J.H., Neukirchen, D., Bista, M., Bradke, F., Jenne, D., Holak, T.A., Werb, Z., Sixt, M., and Wedlich-Soldner, R. (2008) Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nat. Methods* **5**: 605-607.
- Roca, M.G., Kuo, H.C., Lichius, A., Freitag, M., and Read, N.D. (2010) Nuclear dynamics, mitosis, and the cytoskeleton during the early stages of colony initiation in *Neurospora crassa*. *Eukaryot. Cell* **9**: 1171-1183.
- Rodriguez-Pena, J.M., Garcia, R., Nombela, C., and Arroyo, J. (2010) The high-osmolarity glycerol (HOG) and cell wall integrity (CWI) signalling pathways interplay: a yeast dialogue between MAPK routes. *Yeast* **27**: 495-502.

- Ronen, R., Sharon, H., Levdansky, E., Romano, J., Shadkchan, Y., and Osherov, N. (2007) The *Aspergillus nidulans* *pkcA* gene is involved in polarized growth, morphogenesis and maintenance of cell wall integrity. *Curr. Genet.* **51**: 321-329.
- Rowlands, R.T., and Turner, G. (1973) Nuclear and extranuclear inheritance of oligomycin resistance in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet.* **126**: 201-216.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, N. Y.
- Savoldi, M., Malavazi, I., Soriani, F.M., Capellaro, J.L., Kitamoto, K., da Silva Ferreira, M.E., Goldman, M.H., and Goldman, G.H. (2008) Farnesol induces the transcriptional accumulation of the *Aspergillus nidulans* Apoptosis-Inducing Factor (AIF)-like mitochondrial oxidoreductase. *Mol. Microbiol.* **70**: 44-59.
- Schmitz, H.P., Lorberg, A., and Heinisch, J.J. (2002) Regulation of yeast protein kinase C activity by interaction with the small GTPase Rho1p through its amino-terminal HR1 domain. *Mol. Microbiol.* **44**: 829-840.
- Shantappa, S., Dhingra, S., Hernandez-Ortiz, P., Espeso, E.A., and Calvo, A.M. (2013) Role of the zinc finger transcription factor SltA in morphogenesis and sterigmatocystin biosynthesis in the fungus *Aspergillus nidulans*. *PLoS One* **8**: e68492.
- Sharpless, K.E., and Harris, S.D. (2002) Functional characterization and localization of the *Aspergillus nidulans* formin SEPA. *Mol. Biol. Cell* **13**: 469-479.
- Shimizu, K., Hicks, J.K., Huang, T.P., and Keller, N.P. (2003) Pka, Ras and RGS protein interactions regulate activity of AflR, a Zn(II)2Cys6 transcription factor in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **165**: 1095-1104.
- Shwab, E.K., Bok, J.W., Tribus, M., Galehr, J., Graessle, S., and Keller, N.P. (2007) Histone deacetylase activity regulates chemical diversity in *Aspergillus*. *Eukaryot. Cell* **6**: 1656-1664.
- Slaughter, B.D., Smith, S.E., and Li, R. (2009) Symmetry breaking in the life cycle of the budding yeast. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **1**: a003384.
- Sreenivas, A., Villa-Garcia, M.J., Henry, S.A., and Carman, G.M. (2001) Phosphorylation of the yeast phospholipid synthesis regulatory protein Opi1p by protein kinase C. *J. Biol. Chem.*

276: 29915-29923.

- Steinberg, S.F. (2008) Structural basis of protein kinase C isoform function. *Physiol. Rev.* **88**: 1341-1378.
- Steinberg, S.F. (2012) Cardiac actions of protein kinase C isoforms. *Physiology (Bethesda)* **27**: 130-139.
- Szewczyk, E., Nayak, T., Oakley, C.E., Edgerton, H., Xiong, Y., Taheri-Talesh, N., Osmani, S.A., and Oakley, B.R. (2006) Fusion PCR and gene targeting in *Aspergillus nidulans*. *Nat. Protoc.* **1**: 3111-3120.
- Takeshita, N., Ohta, A., and Horiuchi, H. (2002) *csmA*, a gene encoding a class V chitin synthase with a myosin motor-like domain of *Aspergillus nidulans*, is translated as a single polypeptide and regulated in response to osmotic conditions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **298**: 103-109.
- Takeshita, N., Yamashita, S., Ohta, A., and Horiuchi, H. (2006) *Aspergillus nidulans* class V and VI chitin synthases CsmA and CsmB, each with a myosin motor-like domain, perform compensatory functions that are essential for hyphal tip growth. *Mol. Microbiol.* **59**: 1380-1394.
- Teepe, A.G., Loprete, D.M., He, Z., Hoggard, T.A., and Hill, T.W. (2007) The protein kinase C orthologue PkcA plays a role in cell wall integrity and polarized growth in *Aspergillus nidulans*. *Fungal. Genet. Biol.* **44**: 554-562.
- Thompson, J.R., Douglas, C.M., Li, W., Jue, C.K., Pramanik, B., Yuan, X., Rude, T.H., Toffaletti, D.L., Perfect, J.R., and Kurtz, M. (1999) A glucan synthase *FKS1* homolog in *Cryptococcus neoformans* is single copy and encodes an essential function. *J. Bacteriol.* **181**: 444-453.
- Todd, R.B., Davis, M.A., and Hynes, M.J. (2007) Genetic manipulation of *Aspergillus nidulans*: meiotic progeny for genetic analysis and strain construction. *Nat. Protoc.* **2**: 811-821.
- Torralba, S., Raudaskoski, M., Pedregosa, A.M., and Laborda, F. (1998) Effect of cytochalasin A on apical growth, actin cytoskeleton organization and enzyme secretion in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology* **144** (Pt 1): 45-53.
- Upadhyay, S., and Shaw, B.D. (2008) The role of actin, fimbrin and endocytosis in growth of

- hyphae in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* **68**: 690-705.
- Valdivia, R.H., and Schekman, R. (2003) The yeasts Rho1p and Pkc1p regulate the transport of chitin synthase III (Chs3p) from internal stores to the plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 10287-10292.
- Virag, A., Lee, M.P., Si, H., and Harris, S.D. (2007) Regulation of hyphal morphogenesis by *cdc42* and *rac1* homologues in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* **66**: 1579-1596.
- Watanabe, M., Chen, C.Y., and Levin, D.E. (1994) *Saccharomyces cerevisiae* PKC1 encodes a protein kinase C (PKC) homolog with a substrate specificity similar to that of mammalian PKC. *J. Biol. Chem.* **269**: 16829-16836.
- Yamada, E., Ichinomiya, M., Ohta, A., and Horiuchi, H. (2005) The class V chitin synthase gene *csmA* is crucial for the growth of the *chsA chsC* double mutant in *Aspergillus nidulans*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **69**: 87-97.
- Yanai, K., Kojima, N., Takaya, N., Horiuchi, H., Ohta, A., and Takagi, M. (1994) Isolation and characterization of two chitin synthase genes from *Aspergillus nidulans*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **58**: 1828-1835.
- Yin, W.B., Reinke, A.W., Szilagyi, M., Emri, T., Chiang, Y.M., Keating, A.E., Pocs, I., Wang, C.C., and Keller, N.P. (2013) bZIP transcription factors affecting secondary metabolism, sexual development and stress responses in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology* **159**: 77-88.
- Yoshimi, A., Sano, M., Inaba, A., Kokubun, Y., Fujioka, T., Mizutani, O., Hagiwara, D., Fujikawa, T., Nishimura, M., Yano, S., Kasahara, S., Shimizu, K., Yamaguchi, M., Kawakami, K., and Abe, K. (2013) Functional analysis of the alpha-1,3-glucan synthase genes *agsA* and *agsB* in *Aspergillus nidulans*: *agsB* is the major alpha-1,3-glucan synthase in this fungus. *PLoS One* **8**: e54893.
- Zanelli, C.F., and Valentini, S.R. (2005) Pkc1 acts through Zds1 and Gic1 to suppress growth and cell polarity defects of a yeast eIF5A mutant. *Genetics* **171**: 1571-1581.

謝辞

本研究を行う場を与えてくださり、研究内容への的確なご助言、研究における理論的な考え方、研究に取り組む姿勢、本論文の校閲等多くのことをご指導くださいました東京大学大学院准教授 堀内裕之先生に心より感謝致します。様々な実験手法を始め、また普段からの確にご助言、ご指導くださいました東京大学大学院助教 福田良一先生に心より感謝致します。日々の研究において的確なご指導、ご鞭撻を賜りました東京大学名誉教授 太田明德先生に心より感謝致します。

FACStar fluorescence-activated cell sorter を用いた解析についてご指導くださいました東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻免疫制御研究室准教授 八村敏志先生、小川晋平氏に心から感謝致します。

共同研究としてRNA-seq解析を行って下さった東京農業大学応用生物科学部バイオサイエンス学科微生物分子遺伝学研究室教授 吉川博文先生、いわて東北メディカルバンク機構助教 志波優先生に心から感謝致します。

共同研究としてヌクレオソーム DNA の配列の決定、ゲノムへのマッピング、結果の解析を行って下さった富山県立大学工学部生物工学科教授 西田洋巳先生、東京大学大学院新領域創成科学研究科 鈴木穰先生、国立極地研究所 近藤伸二先生に心から感謝致します。

sterigmatocystin の検出系の構築についてご助言下さいました東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻生物有機化学研究室准教授 作田庄平先生に心から感謝致します。

研究に関するご助言を頂き、sterigmatocystin 検出系の構築に携わって下さった高城景子博士に心より感謝致します。研究室配属当初より、研究に関する的確なご助言を頂き、実験の基礎や手法、研究に対する姿勢から研究室での生活に至るまで多くのことをご指導くださいました對崎真楠博士に深く感謝致します。また、研究室での生活を共にし、多くのご支援を頂きました細胞遺伝学研究室の先輩、同期、後輩の皆様に深く感謝致します。