

## 論文の内容の要旨

応用生命工学 専攻  
平成 23 年度博士課程 進学  
氏 名 片山 琢也  
指導教員名 堀内 裕之

### 論文題目

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

糸状菌は高いタンパク質分泌能から産業分野で広く利用される一方で動植物への感染により人間の生活にとって有害なものも多数存在する。糸状菌のこれらの性質は菌糸状の形態と密接に関連することが示唆されている。また、豊富な二次代謝産物生産能を有することから新規生理活性物質探索の有望な対象である一方で、有害物質の生産により害をもたらすものも存在する。このように糸状菌の形態形成や二次代謝産物生産のメカニズムを明らかにすることは糸状菌と人間生活の関わりを考える上で非常に重要である。

プロテインキナーゼ C (PKC) は真核生物に広く保存されたセリン/スレオニンキナーゼである。高等真核生物は 10 種程度の PKC アイソザイムを有し、これらは様々なシグナル伝達経路において重要な機能をもつことで、根源的な細胞機能の調節から多細胞生物特有の生理現象まで幅広く関与している。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の PKC である Pkc1p は、細胞壁の完全性維持に関わるシグナル伝達経路 (cell wall integrity (CWI) 経路) において中心的な役割を担うだけでなくその他の様々な現象に関与することが示唆されているが、CWI 経路以外については未解明な部分が多い。糸状菌の PKC

については *Aspergillus nidulans* において生育に必須であること、細胞壁の完全性維持や菌糸の極性生長、ペニシリン合成に関与することが示唆されており、糸状菌において PKC が菌糸生長、形態形成、二次代謝産物の生産等糸状菌特有の性質に関与することが考えられる。しかし、これまでに糸状菌の PKC の機能について詳細な解析がなされた例は少なく、PKC の働く分子機構はほとんど未解明である。そこで、本研究では糸状菌における PKC の機能を解明するため、*A. nidulans* の PKC である PkcA についてその機能解析を行った。

## 1. PkcA の細胞壁合成酵素遺伝子群の転写制御に関わる機能の解析

前述のように PkcA は細胞壁の完全性維持に関与することが示唆されていたが、これまでに PkcA の細胞壁完全性維持に関わる機能を詳細に解析した例はない。そこで、発現制御可能なプロモーター下で活性化型 PkcA (PkcA(R429A)) を生産する株 (R429A 株) を作製し、PkcA(R429A)抑制条件下で培養した菌体を誘導条件に移して 1 時間培養した場合の細胞壁合成酵素遺伝子群 (キチン合成酵素遺伝子 *chsA*、*chsB*、*chsC*、*chsD*、*chsF*、*chsG*、*csmA*、*csmB*、 $\beta$ -1,3-グルカン合成酵素遺伝子 *fksA*、 $\alpha$ -1,3-グルカン合成酵素遺伝子 *agsA*、*agsB*) の RT-PCR による転写解析を行った。さらに、CWI 経路で PkcA の下流で機能することが予想される転写因子をコードする *rlmA* を欠失し、かつ PkcA(R429A)の発現を制御可能な株を作製し、同様の培養条件における転写解析を行った。その結果、PkcA が RlmA を介して *chsB*、*chsC*、*chsD*、*chsF*、*csmA*、*csmB*、*agsB* の転写制御に関与することが示唆された。次に、PkcA(R429A)誘導条件下で 20 時間培養した場合の解析を行ったところ、RlmA 依存的に *chsD*、*csmA*、*agsB* の mRNA が増加し、RlmA には依存せず *chsB*、*chsC*、*chsF*、*csmB*、*fksA* の mRNA が増加することが示唆された。このように *chsB*、*chsF*、*csmB* は、PkcA(R429A) 誘導条件で短時間培養した場合には RlmA 依存的に mRNA が増加するのに対し、PkcA(R429A)誘導条件下で長時間培養した場合には RlmA に依存せず mRNA が増加することから、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これらの遺伝子の mRNA が増加したことが示唆された。

## 2. PkcA の高温条件における機能の解析

*pkcA* は前述のように生育に必須な遺伝子であるが、当研究室では既に *pkcA* 温度感受性株 (*pkcA-ts* 株) が作製されており、この株は 42°C で生育できな

いことから、高温条件における PkcA の生育に必須な機能の解析を行った。*A. nidulans* の分生子は発芽の際、まず無極性生長により膨張し、その後極性が確立されて発芽管を形成し、菌糸生長をはじめる。*pkcA-ts* 株の分生子を 42°C で培養した場合、培養初期の無極性生長が途中で停止し、発芽管を形成した細胞は見られなかった。この時の核分裂、DNA 複製について解析したところ、核分裂、DNA 複製とも起こらず、DNA 含量が n 未満の細胞数が増加したことから、アポトーシスが誘導されている可能性が考えられた。この条件下の *pkcA-ts* 株ではアポトーシス誘導のマーカーとなる細胞内の活性酸素種の蓄積、DNA の断片化が見られたことから、アポトーシスが誘導されていることが示唆された。これらのことから PkcA は 42°C においてアポトーシスの誘導を抑制する機能を持つことが明らかとなった。

*pkcA-ts* 株を浸透圧安定化剤存在下で培養したところ、42°C においてもアポトーシスの誘導を示す表現型が見られず、多核の膨張した細胞が見られたことから、極性の確立に異常が生じている可能性が考えられた。極性確立の指標となるアクチンの重合体（F-アクチン）を生細胞で観察できる株を作製し解析した結果、*pkcA-ts* 株では分生子発芽時の極性が確立できないことが示唆された。一方、菌糸生長中の菌糸において、高温にシフトした場合の菌糸先端における F-アクチンの動態を観察した結果、野生型株では温度シフト後一時的に菌糸先端の F-アクチンが消失し一定時間後に再出現するのに対し、*pkcA-ts* 株では F-アクチンの消失は見られるがその後の再出現が見られなかった。このことから、PkcA が高温ストレス時に消失した菌糸の極性の再形成にも必要であることが示された。CWI 経路において PkcA の下流で働く MAP キナーゼカスケードの構成因子をコードする *bckA*、*mpkA* の欠失株を用いて解析した結果、PkcA のアポトーシス誘導の抑制にはこのカスケードが必要であり、極性形成には必要でないことが示唆された。

### 3. PkcA の sterigmatocystin 合成制御に関わる機能の解析

糸状菌において PKC が非常に幅広い機能を有す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 の機能の包括的な理解に繋がると考えられた。そこで R429A 株と *pkcA-ts* 株を用い、PkcA 活性化条件、PkcA 失活条件における RNA-seq による網羅的転写解析を行った。その結果、PkcA が細胞壁合成、二次代謝産物生産、多糖類の代謝などに関与する遺伝子の転写制御に関わることが示唆された。

上記の PkcA 失活条件では *A. nidulans* における二次代謝産物であり、

aflatoxin の生合成前駆体である sterigmatocystin (ST) 合成に関わる *stc* 遺伝子群とそれらの転写誘導に関わる転写因子をコードする *aflR* の mRNA が増加しており、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*-ts 株、R429A 株を用い、PkcA の部分的失活条件、PkcA 活性化条件における ST 生産量を測定した結果、PkcA が ST 合成を負に制御することが示された。さらに、PkcA 活性化条件における *aflR* と *stc* 遺伝子群の一つである *stcU* の RT-PCR による転写解析の結果、PkcA がこれらの遺伝子の転写を負に制御することが示された。一方、*rlmA* 欠失株を用いた解析により、RlmA は PkcA による ST 合成の制御には関与しないことが示唆された。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。そこで *anbH1* の発現を抑制できる株を作製し解析した結果、PkcA による ST 合成制御には AnBH1 は関与しないことが示唆された。これらのことから、PkcA は AnBH1 とは独立した経路で *aflR* や *stcU* の転写制御を介して ST 生産を負に制御することが示唆された。

#### 総括

本研究では PkcA が RlmA 依存的に多くの細胞壁合成酵素遺伝子の転写を制御し、RlmA 非依存的にも一部の遺伝子の転写を制御することを示唆した。また、PkcA が CWI 経路の MAP キナーゼカスケードに依存して高温条件におけるアポトーシス誘導の抑制に機能すること、この経路とは独立して高温条件における発芽時の極性形成、高温ストレス時の菌糸の再極性化に関与すること、さらに sterigmatocystin 合成制御に関わることをも示した。また網羅的転写解析の結果、PkcA が細胞壁の合成や分解、ST 以外の二次代謝産物生産、多糖類の代謝などに関わる遺伝子の転写制御にも関与する可能性が考えられた。糸状菌において PKC がこのように多岐の機能を持つことが明らかとなったが、今後、本研究で明らかになった PkcA の種々の機能の完全解明・理解が、より有用な糸状菌の分子レベルでの育種、有害糸状菌の駆除に繋がってゆくことが期待される。

#### 発表論文

Katayama T., Uchida H., Ohta A., and Horiuchi H., *PLOS ONE*, 7, e50503 (2012)