

糖質加水分解酵素を利用した真菌細胞壁多糖の検出法開発

山中大輔

(東京薬科大学 薬学部)

真菌の細胞壁にはキチン、マンナン、 β -グルカンなどの多糖類が存在し、外部環境ストレスから身を守っている。細胞壁は最外層に位置するため、菌体の接着や凝集、宿主免疫系による認識の回避など、生育に関わる様々な状況において重要な役割を果たしている。菌種ごとに異なる構造の多糖を有しており、その構造の違いが病原性にも関わることから、細胞壁多糖の理解は感染症の原因となる病原性真菌の制御に繋がる。

多くの真菌に共通する多糖構造として、グルコースが β -1,3-結合で連結した β -1,3-グルカンが知られている。この構造はヒトが合成しないため、免疫応答を開始するための多糖抗原として働き、その合成系は抗真菌薬（ミカファンギンなど）の標的となり、さらに、真菌感染症発症時には血中バイオマーカーとしても利用される。一方、 β -1,3-グルカンに β -1,6-グルカン分岐を有する真菌も多く存在しており、例えば出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) や *Candida albicans* などがある。真菌感染症における β -1,6-グルカンの役割は現在でも不明な点が多く残されているが、そもそも β -1,6-グルカンの特異的検出や定量も困難であった。

私たちは β -1,6-グルカンの定量法を開発する目的で、アカパンカビ (*Neurospora crassa*) 由来エンド型 β -1,6-グルカナーゼ (Neg1) の基質特異性に着目し、 β -1,6-グルカン分解に関わるグルタミン酸を置換したところ、その分解活性が消失する一方で、基質に強力に結合することを見出した。このNeg1 改変体を用いたサンドイッチELISAでは、*Candida* 菌が放出した可溶性 β -1,6-グルカンの高感度定量が可能となり、生体内での多糖の挙動を追跡することも容易となった。大腸菌発現可能な糖質加水分解酵素改変体は、機能性分子との融合により応用の幅を広げ、蛍光タンパク質やルシフェラーゼとの融合体を用いた新たな多糖解析法の開発を加速させる。現在、 β -1,6-グルカン以外の各多糖構造に特異的に結合するタンパク質プローブの開発に注力すると共に、あらゆる真菌の細胞壁多糖の特徴を理解するための解析プラットフォームの構築を進めている。本発表では、多糖結合プローブの開発経緯や、これらを応用した研究で得られた結果について紹介させていただきたい。

麹菌の特性に関わる細胞形質

竹下典男

(筑波大学 生命環境系 微生物サステイナビリティ研究センター)

麹菌は糖質・タンパク質などの分解酵素の生産・分泌能が高く、醸造発酵や酵素生産などのバイオ産業で広く利用される。そのため、麹菌 *Aspergillus oryzae* のゲノム・遺伝子発現解析が勢力的に進められてきた。しかし、なぜ麹菌が高いアミラーゼ・プロテアーゼ活性を持つのか、異種発現の優れた宿主であるのかについての明確な答えは出ていない。

私たちは培養時間の経過に伴って *A. oryzae* (RIB40) の核の数が著しく増加する現象を発見した。菌糸先端の細胞あたり 10~20 の核から 200 以上の核に増加した。核数の増加により転写・翻訳量の増加が予想され、実際に核数と酵素活性との相関が見られた。この表現型は、醤油醸造に利用される *Aspergillus sojae* でも見られたが、モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* や近縁種でカビ毒を生産する *Aspergillus flavus* などでは見られなかった。*A. oryzae* においても株により表現型が異なることが判明した。同一クレード内で表現型の異なる株のゲノム比較により核増加に関与すると予想される遺伝子を選出した。また、核が増加した菌糸とそうでない菌糸における形態や生長速度を比較した。ライブイメージングにより、分岐により核の増加した菌糸が出現しコロニー周辺で優占することが示された。さらに、レーザーマイクロダイセクションにより核が増加した菌糸とそうでない菌糸を回収し、遺伝子発現変化解析を行った。核が増加した菌糸において、細胞骨格や細胞壁などの形態形成、核・細胞の分裂、 Ca^{2+} イオンの輸送などに関与する遺伝子の発現が特異的に上昇した。現在、核が増加する分子機構を解析している。*A. oryzae* は栄養豊富な環境で長年にわたり育種選抜されてきた。麹菌が高い酵素活性を持つのは、このように核が増加する形質が選択されてきたからではないかと考察している。

有性生殖の過程で細胞核はどのようにして融合するのか

西川周一

(新潟大学 理学部)

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* では、接合型の異なる 1 倍体細胞同士が会おうと、接合（有性生殖）によって 2 倍体が形成する。この過程は、1 倍体細胞の融合による接合子形成と、接合子中での 1 倍体核の融合の過程に分けられる。接合子中での核融合（カリオガミー）のメカニズムは、この過程に欠損を示す *kar* (*karyogamy*) 変異株の分離と解析によって、微小管依存の核の接近と核膜融合に分けられることが示されてきた。

核膜は核外膜と核内膜という 2 枚の生体膜から構成され、核の内部とサイトゾルを隔てている。核膜融合過程に欠損を示す変異株の解析によって、核膜融合には Kar5 や Mps3/Nep98 といった核膜タンパク質と、小胞体の分子シャペロン Hsp70 である BiP/Kar2 とその制御因子である小胞体 J タンパク質が関与することが示された。また核膜融合過程は、2 個の 1 倍体核の間で核外膜の融合と、核内膜の融合といった 2 回の連続した核膜融合の結果完了することが示された。

出芽酵母を用いて明らかにされた有性生殖過程の核膜融合機構は、酵母特有のものではない。われわれは、被子植物シロイヌナズナにおいても有性生殖過程の核融合に BiP と小胞体 J タンパク質が必要であること、核融合過程は核外膜の融合と核内膜の融合が連続して起こることによって達成することを示した。また、Kar5 のシロイヌナズナホモログである GEX1 と、Mps3/Nep98 のホモログである SUN タンパク質が、シロイヌナズナ有性生殖過程の核融合に必要なことを示している。これらの結果は、有性生殖過程の核膜融合機構は、進化的に広く保存されていることを示唆している。

これまでに同定された核膜融合因子の中で、Kar5/GEX1 ファミリーは有性生殖過程特異的に発現する核膜タンパク質であることから、有性生殖過程の核融合で鍵となるタンパク質と考えられる。本発表では、有性生殖過程の核融合のメカニズムについて、酵母と植物の研究成果を比較しながら議論したい。

酵母におけるステロールの機能と細胞内輸送

福田良一

(東京大学大学院農学生命科学研究科)

真核細胞の細胞膜やオルガネラ膜を形成する生体膜は、リン脂質、スフィンゴ脂質、ステロールなどの脂質から構成される。ステロールの分子種は生物種によって異なっており、動物ではコレステロールが主要ステロールとなっているのに対して、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を含む菌類ではエルゴステロールが主要ステロールとなっている。ステロールは生育に必須の脂質であり、膜の流動性や透過性、さらには脂質マイクロドメインを形成して様々なプロセスに関与していると考えられているが、詳細については未解明な部分が多い。

S. cerevisiae において、エルゴステロールは小胞体で合成された後に、細胞膜や他のオルガネラへ輸送される。ステロールの細胞内輸送には小胞輸送に依存しない機構が存在することが古くから知られているが、我々は *S. cerevisiae* から単離した膜画分を用いてステロールのオルガネラ間輸送を試験管内で再構成することに成功し、小胞体からミトコンドリアへのステロールの輸送が真核生物で広く保存されているオキシステロール結合タンパク質関連タンパク質のホモログである Osh タンパク質により行われることを明らかにした。

一方、エルゴステロールやコレステロールはアセチル CoA から 20 あるいは 21 段階の反応を経て合成されるが、真核生物がこのように合成に多段階の反応を必要とする脂質を生体膜の構成成分として持つようになった理由は興味深い問題である。*S. cerevisiae* において、エルゴステロールは全ステロールの 80% を占めるが、合成中間体である他のステロール分子種の機能については不明な点が多い。本講演ではそれらのステロール合成中間体の役割についても議論したい。