

論文の内容の要旨

応用生命工学 専攻
平成20年度博士課程 進学
氏名 盛威
指導教員名 太田 明德

論文題目 二形性酵母 *Yarrowia lipolytica* におけるキチン合成酵素をコードする遺伝子の機能解析

真菌の細胞壁は細胞の生命活動において様々な役割を果たしており、自然環境から受けるストレスに対し細胞自身を守ることをはじめとして、細胞形態の維持、外界からの栄養の摂取、外界との物質交換等に関わっている。細胞壁は細胞の生育、外界の環境変化等においてその構成成分の変化、構造変化等により形を換えるダイナミックな構造体である。キチンはセルロースにつぎ地球上で二番目に多く存在するバイオマスであり、*N*-アセチルグルコサミンが β -1,4 結合でつながった直鎖状のポリマーであり、それらが整列し結晶化することで非常に硬い構造となることが知られているが、昆虫など節足動物の外骨格すなわち外皮、軟体動物の殻の表面といった多くの無脊椎動物の体表や、糸状菌、酵母、キノコなど菌類の細胞壁などの重要な構成成分をなす。

キチンはキチン合成酵素による合成され、酵母 *Saccharomyces cerevisiae*、*Candida albicans* の細胞壁の全乾重量の 1~2% を占める一方、糸状菌においては細胞壁全乾重量の 10~30% を占める。菌類のキチン合成酵素はそのアミノ酸配列により 3 つの division、さらに 7 つのクラスに分類される。子囊菌類に属する *S. cerevisiae*、*C. albicans* は 3 つのクラスのキチン合成酵素しか持たないが、子囊菌類の糸状菌はすべてのクラスのキチン合成酵素を持つ。このうちクラス V に属するキチン合成酵素、一部のクラス VI に属するキチン合成酵素の N 側末端にはミオシン様ドメイン (MMD) が存在する。さらに構

造類似性からクラス I~III のキチン合成酵素は division 1、クラス IV~VI のキチン合成酵素は division 2、クラス VII のキチン合成酵素は division 3 に分類される。

Yarrowia lipolytica は子囊菌類に属するアルカン質化性二形性酵母である。アルカンを単一の炭素源として生育が可能であり、その生育形態として酵母型、偽菌糸型、菌糸型となることから *Y. lipolytica* は細胞形態変化の研究材料としても利用されてきた。これまでの研究より、*Y. lipolytica* 細胞壁のキチン含量は 10% 程度であることが示されており、やはり同じ子囊菌類に属する酵母である *S. cerevisiae*、および *C. albicans* の細胞壁のキチン含量と比べると 5 倍程度である。本研究では *Y. lipolytica* のゲノム情報から *S. cerevisiae*、*Schizosaccharomyces pombe*、および *C. albicans* には存在しないクラスに属するキチン合成酵素をコードする遺伝子が見出されたことから、*Y. lipolytica* におけるキチン合成酵素遺伝子の総合的機能解明を目的とした

第 1 章 キチン合成酵素遺伝子 (*CHS*) 単独欠失株の作製と解析

Y. lipolytica のゲノム情報から、菌類のキチン合成酵素との相同性を持つタンパク質をコードするオープン・リーディング・フレーム (ORF) 7 つを見出した。それらがコードするキチン合成酵素の予想されるアミノ酸配列からそれら ORF がコードするタンパク質はキチン合成酵素のクラス I~VI に属することが明らかとなった。そこでその 7 つの遺伝子を *CHS1*、*CHS2*、*CHS3*、*CHS4*、*CSM1*、*CSM2*、*CSM3* と命名した (それぞれの遺伝子産物については 1 文字目のみ大文字でイタリックにせず示した)。Chs1~4 および Csm1 はそれぞれクラス I~V に属するが、Csm2 と Csm3 はクラス VI に属し、Csm1、Csm2、Csm3 はタンパク質の N 末端側に MMD を有するキチン合成酵素であった。*Y. lipolytica* における *CHS* 機能を解析するために、すべての *CHS* について単独欠失株を作製しそれぞれ *chs1Δ* 株、*chs2Δ* 株、*chs3Δ* 株、*chs4Δ* 株、*csm1Δ* 株、*csm2Δ* 株、*csm3Δ* 株と命名した。

これらの株の生育について検討したところ、*chs2Δ* 株と *chs4Δ* 株の生育が野生型株より遅かった。さらに各欠失株の細胞形態について検討したところ、野生型株と比較して、*chs3Δ* 株と *csm2Δ* 株においては酵母型細胞の割合が増加し、フィラメント状細胞の割合が減少した。*chs2Δ* 株においてはフィラメント状細胞の割合が減少した。*chs2Δ* 株と *chs4Δ* 株では野生型株と比較して、細胞の短軸が 5 μm 以上ある巨大細胞の割合の増加もみられた。キチンと結合する薬剤である Calcofluor white (CFW) および Congo red (CR) に対しては、*chs2Δ* 株、*csm1Δ* 株、*csm2Δ* 株が感受性を示す一方、*chs4Δ* 株は CFW に耐性を示した。また、*chs2Δ* 株は TOR シグナル伝達系の阻害物質である Caffeine に感受性を示した。これら遺伝子欠失株においてキチン含量を測定したところ *chs1Δ* 株および *chs2Δ* 株のキチン含量は野生株のそれぞれ 1.3 倍、1.5 倍であったのに対し、*chs4Δ* 株の

キチン含量は野生株の 50% 程度に減少した。透過型電子顕微鏡により *chs2Δ* 株、*chs4Δ* 株、*csm1Δ* 株の細胞構造を観察したところ、*chs2Δ* 株の隔壁部分は野生型株と比較して肥厚し、変形していることが観察されたが、*chs4Δ* 株、*csm1Δ* 株については構造的には大きな変化は見られなかった。*chs2Δ* 株、*chs4Δ* 株における各 *CHS* 遺伝子の発現量を検討したところ、*chs2Δ* 株、*chs4Δ* 株とも *CHS3* 遺伝子の転写量の上昇が見られた一方、*chs2Δ* 株において *CSM2* 遺伝子の転写量の低下が示された。

以上のことから、*Y. lipolytica* においては *Chs2* が細胞隔壁の形成において主に働いていること、*Chs4* が細胞壁キチンの合成に主に関与しており、*Chs3* が修復的役割を持つ可能性が示唆された。また *Chs2*、*Chs3*、*Chs4*、*Csm2* は形態の制御に関与し、*Csm1*、*Csm2* が細胞壁の完全性の維持に関与することが示唆された。

第 2 章 *CHS* 多重遺伝子欠失株の作製とその解析

先にも述べたが、*Y. lipolytica* には *MMD* を有するキチン合成酵素をコードする遺伝子が 3 種類存在する。これまで糸状菌以外の菌類において *MMD* を有するキチン合成酵素の機能重複を解析した例はなく、同じ *division 2* に含まれる *Chs4* も含めた 4 種の遺伝子について多重欠失株 (*csm1,2Δ* 株、*csm1,3Δ* 株、*csm2,3Δ* 株、*csm1,2,3Δ* 株、*csm1,2,3Δchs4Δ* 株) を作製し解析した。細胞形態の観察を行ったところ、*csm2,3Δ* 株、*csm1,2,3Δ* 株では酵母型細胞の割合が野生型株と比較して上昇する傾向がみられ、また菌糸型細胞において隔壁の間隔に近いものの割合が高かった。*csm1,2Δ* 株、*csm1,3Δ* 株、*csm2,3Δ* 株、*csm1,2,3Δ* 株は *CFW* に対して野生型株、各単独遺伝子欠失株と比較して感受性である。一方、*csm1,2,3Δchs4Δ* 株では *CFW*、*CR* に対する感受性が野生型株並みに回復した。また *csm1,2,3Δchs4Δ* 株は酸化ストレス薬剤に対して野生型株各単独、二重、三重欠失株と比較して感受性を示した。各二重欠失株、三重欠失株の細胞壁キチン含量は野生型株と大きな差は見られなかったが、*csm1,2,3Δchs4Δ* 株においては大きく減少した。以上のことから、*MMD* を持つキチン合成酵素は *Y. lipolytica* の生育において必須のものではないこと、また細胞壁の完全性の維持において *Csm2* と *Csm3* がある程度重複した機能を持つが、*Csm1* が主要な役割を担っていることが示唆された。また *Chs4* との四重欠失株も生育可能であることから、*Y. lipolytica* において *division 2* のキチン合成酵素は生育に必須のものではないことも示された。そこで、これら欠失株に対し *division 1* のキチン合成酵素遺伝子の欠失も行い、*CHS* 五重欠失株を作製した (*csm1,2,3Δchs1,4Δ* 株、*csm1,2,3Δchs2,4Δ* 株、*csm1,2,3Δchs1,3Δ* 株、*csm1,2,3Δchs2,3Δ* 株)。しかし、これら五重欠失株からさらに六重欠失株の取得ができず *MMD* を持たないキチン合成酵素のうちいずれかの 2 種は *Y. lipolytica* の生育にとって必須である可能性が示唆された。

第3章 *Y. lipolytica* の二形性と関わる遺伝子による *CHS* 転写制御の検討

Y. lipolytica の形態制御におけるキチン合成酵素遺伝子の関与を検討するためこれまで報告された *Y. lipolytica* の細胞形態制御と関わる遺伝子 *MHY1*、*TPK1*、*TUP1* と新たに単離した遺伝子 *REN1* の欠失株における各 *CHS* 遺伝子の転写制御の検討を行った。これまでの研究により *MHY1* の欠失株細胞は大部分が酵母型細胞となり、*TPK1* の欠失株はほぼ菌糸型細胞となる。*TUP1* 欠失株は野生型株と比較して細胞が形態変化を引き起こし、*REN1* の欠失株において菌糸型細胞の割合が増加する。これらの欠失株のうち *TUP1* 欠失株において *CHS1* および *CHS3* の転写量が上昇することが示された。*TUP1* はグローバルな転写抑制遺伝子のオルソログであり、*CHS1*、*CHS3* の発現は *TUP1* の制御を受けることが示唆された。

本論文によって *Y. lipolytica* の持つ7つのキチン合成酵素のうち細胞壁にあるキチンを主に産生するのはクラス IV キチン合成酵素であり、正常な細胞隔壁形成を行う上でクラス II キチン合成酵素が重要な役割を果たすことを明らかにした。また MMD を持つキチン合成酵素を含めた division 2 に属するキチン合成酵素は生育にとって必須でないこと、MMD を持つキチン合成酵素主に細胞壁の完全性の維持に働くことも示唆した。今回得られた知見並びに作製した株が今後真菌におけるキチン合成の仕組みを *Y. lipolytica* のさらなる有効利用に役立つことを期待している。