2013年度

東洋大学審査学位論文

アカパンカビの細胞壁構築を制御するシグナル伝達経路に関する研究

生命科学研究科 生命科学専攻 博士後期課程

第3学年　4910110002

亀井 誠之

アカパンカビの細胞壁構築を制御する
シグナル伝達経路に関する研究

生命科学研究科 生命科学専攻 博士後期課程
4910110002　亀井 誠之

目次

序論 3

第1章　MAPキナーゼMAK-1とMAK-2の細胞壁構築への関与

1-1. 緒言 9

1-2. 材料と方法 13

1-3. 結果と考察

1-3-1. MAPキナーゼ破壊株の細胞壁ストレス感受性 29

1-3-2. MAK-1とMAK-2のリン酸化解析 34

1-3-3. 細胞壁合成酵素遺伝子の発現解析 38

1-3-4. MAK-1とMAK-2により制御される遺伝子の同定 41

1-3-5. MAK-1とMAK-2の細胞内局在解析 43

第2章　浸透圧応答経路のMAPキナーゼOS-2による細胞壁関連遺伝子の発現制御

2-1. 緒言 49

2-2. 材料と方法 52

2-3. 結果と考察

2-3-1. fludioxonil処理により誘導されるCWI関連遺伝子のアレイ解析 55

2-3-2. OS経路で制御されるCWI関連遺伝子の同定 56

2-3-3. beta-1,3-glucanosyltransferase *gel* 遺伝子の探索と相同性解析 57

2-3-4. *gel* 破壊株の形質解析 60

2-3-5. *gel* 破壊株の細胞壁損傷剤に対する感受性 62

2-3-6. *gel* 遺伝子の基礎発現量の比較 63

2-3-7. *gel* 破壊株における細胞壁合成遺伝子の発現解析 64

2-3-8. *gel* のfludioxonil誘導性とOS経路依存性 65

2-3-9. *gel* のmicafungin誘導性とMAK-1及びMAK-2依存性 67

第3章　MAPキナーゼMAK-1が制御する転写調節因子の同定

3-1. 緒言 69

3-2. 材料と方法 71

3-3. 結果と考察

3-3-1. 破壊株を利用したMAK-1制御転写調節因子のスクリーニング 73

3-3-2. *msn-1*及び*rlm-1*破壊株の細胞壁損傷に対する感受性 79

3-3-3. 転写調節因子MSN-1が制御する遺伝子の同定 80

3-3-4. 転写調節因子RLM-1が制御する遺伝子の同定 83

総合考察及び結論 85

参考文献 94

謝辞 116

序論

糸状菌の細胞は強固な細胞壁を有する。糸状菌の細胞壁は、alpha-1,3-グルカン、beta-1,3-グルカン、キチンやマンナンなどの多糖類と糖タンパク質などが複雑に入り組んで構成された構造体である (Fig. 1) (Klis, 1994; Klis *et al.*, 2010; Hartland *et al.*, 1994; Bowman *et al.*, 2006; Latge, 2007; Free, 2013)。真核生物の細胞壁は、細胞の保護や細胞形態の維持の役割だけでなく、細胞外の栄養環境、浸透圧や細胞壁損傷などの環境ストレスによる刺激を感知し、細胞内へ情報を伝達することにも寄与する(Sengar *et al.*, 1997; Levin, 2005)。細胞壁は動物には存在しない構造体であり、糸状菌の細胞壁はセルロースやリグニンを主成分とする植物の細胞壁とは異なることから、病原糸状菌に対する農薬や抗真菌剤の新たな創薬標的として注目されている。

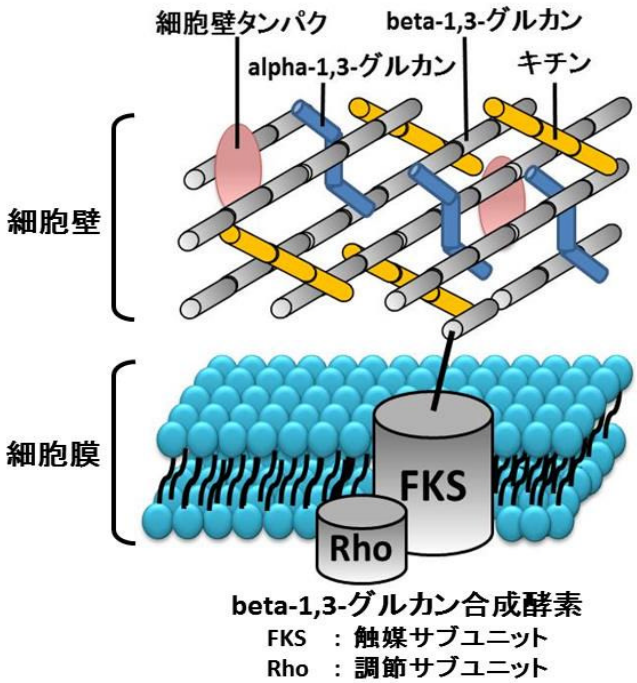


Fig. 1. Cell wall structure of filamentous fungus.

糸状菌類は、出芽や分裂による増殖を繰り返す酵母類とは大きく異なり、無性胞子の発芽管形成、菌糸の伸長・分岐・融合、気中菌糸形成、子嚢胞子形成などの多岐に亘る多様な形態形成を伴う生活環を有する (Fu *et al.*, 2011; Borkovich *et al.*, 2004; Borkovich, Ebbole., 2010)。このような形態形成過程において、糸状菌は細胞壁の多糖構造を部分分解と生合成によって再構築する必要があり、その調節は厳密に制御されていると考えられる。本研究では、アカパンカビを材料として、細胞壁の合成と再構築の制御機構の解明を目的として、MAPキナーゼおよび細胞壁関連遺伝子の発現解析を中心に研究を展開した。

細胞壁の再構築には、MAPキナーゼが重要な役割を果たすことが出芽酵母で報告されていることから、まず、MAPキナーゼとそのシグナル伝達経路について概説する。

生物は多種多様なストレス環境に曝されるが、外環境からの刺激に適応するために、細胞外ストレスの認識とそれに対応した反応をつなぐ制御系として、様々な細胞内シグナル伝達経路を有する。mitogen-activated protein kinase (MAPK, MAPキナーゼ)は、哺乳類から植物や真菌類に至るまで、真核生物において広く保存されたセリン/スレオニンキナーゼである。MAPキナーゼは、MAPKKキナーゼ及びMAPKキナーゼと共にMAPキナーゼカスケードを構成しており(Kosako *et al.*, 1992; Matsuda *et al.*, 1992)、そのリン酸化(活性化)は厳密に調節されている。細胞は栄養環境や細胞外からの様々な刺激あるいは環境変化からくるストレスなどのシグナルを受容すると、MAPキナーゼがリン酸化されて細胞核へと移行し、転写調節因子を活性化して、外環境の変化に応じた様々な遺伝子の発現を制御する。このように、MAPキナーゼを構成要素とするシグナル伝達経路は、細胞の恒常性維持、ストレス応答、細胞増殖や細胞分化の制御において重要な役割を果たしている(Ray *et al.*, 1987; Posada *et al.*, 1992)。

真菌類のMAPキナーゼに関する研究は、出芽増殖を繰り返すシンプルな形態

形成を示す酵母細胞を用いた研究が最も進んでおり、MAPキナーゼが酸化ストレスや浸透圧ストレスなどのストレス応答に深く関与することが知られている(Millar 1999; Staleva *et al.*, 2004; Robertson *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2007; Correia *et al.*, 2010)。また、細胞の分化に伴う細胞壁構造の変動や物理的あるいは化学的分解による細胞壁構造の変化を生育環境や損傷に応じた適切な構造体へと保持する「細胞壁の完全性」(cell wall integrity:CWI)の維持も、MAPキナーゼが深く関与している(Rispail *et al.*, 2009; Garcia *et al.*, 2009; Levin, 2011)。

出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)では、栄養成長、低浸透圧、高温環境や細胞壁の損傷によってCWIが損なわれると、CWI 経路と呼ばれるMAPキナーゼカスケードをコアとしたシグナル伝達経路が、細胞壁生合成と再構築を亢進させることによって、CWIを厳密に制御している(Fig. 2)。

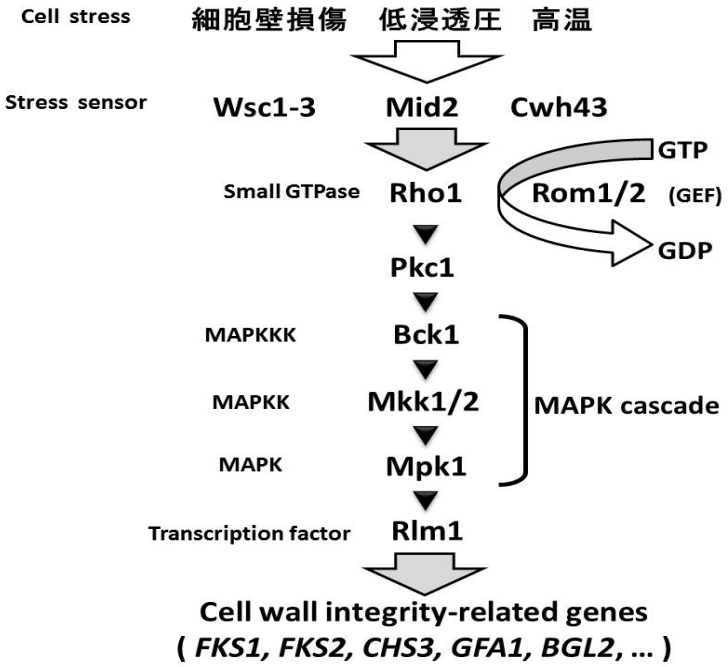


Fig. 2.　Cell wall integrity pathway in *S. cerevisiae*.

出芽酵母のCWI 経路では、細胞壁に異常が生じると、細胞膜に存在するストレスセンサー (Wsc1-3, Mid2, Cwh43)がこれを感知して、細胞内下流のRho1 (small G-protein)を介してProtein kinase C (PKC)が活性化される。活性型PKCは、

下流のBck1 (MAPKKキナーゼ)、Mkk1/2 (MAPKキナーゼ)とMpk1 (MAPキナーゼ)からなるMpk1 MAPキナーゼカスケードに細胞壁損傷シグナルを入力する。リン酸化されたMpk1は活性型となり、転写調節因子Rlm1を活性化する。活性型Rlm1は細胞核内へと移行して、細胞壁関連遺伝子群(beta-1,3-glucan synthase *FKS1*, *FKS2*; chitin synthase *CHS3*; endo-type beta-1,3-glucanase *BGL2*; alpha-mannosidase *DFG5*など)の発現を制御する。発現誘導された細胞壁の生合成に関与する酵素や補強を担う細胞壁糖タンパクによって、細胞壁の損傷に応答した細胞壁構築がなされることで、CWI が厳密に維持されている(Jung *et al.*, 1999; Levin., 2005, 2011)。このように、出芽酵母では、Mpk1 MAPキナーゼをコアとするの CWI経路で細胞壁ストレス応答がほぼ完全に説明できると考えられている。

糸状菌類のCWIに関しては、*Aspergillus nidulans* のMpkA MAPキナーゼ (出芽酵母のCWI経路のMpk1 MAPキナーゼオルソログ)が糸状菌特有のalpha-1,3-グルカン合成酵素遺伝子(*agsA*, *agsB*)の発現を制御していることが明らかになっている(Fujioka *et al.*, 2007)。しかし、*A. nidulans* のMpkA MAPキナーゼは、酵母のCWI経路で制御されている細胞壁合成の主要酵素であるキチン合成酵素やbeta-1,3-グルカン合成酵素などの遺伝子群の発現制御には関与しないと報告されている(Fujioka *et al.*, 2007)。糸状菌での研究報告は限られているが、糸状菌のCWIの制御機構は出芽酵母のCWI経路とは異なっている可能性が示唆されている。一方で、病原糸状菌の研究では、医真菌*Aspergillus fumigatus* のMkkA (出芽酵母のCWI経路のMkk1/2 オルソログ)の破壊株が病原性を低下させること (Dirr *et al.*, 2010) や、植物病原菌 *Fusarium oxysporum* の beta-1,3-glucanosyltransferaseの遺伝子破壊が病原性の消失を招くこと(Caracuel *et al.*, 2005)などが報告されている。このように糸状菌のCWIに関与する因子や細胞壁合成に関与する酵素をコードする遺伝子のオルソログの欠損が病原性低

下や基礎生育の減衰を引き起こす事象が報告されている。しかし、糸状菌のCWIを制御するシグナル伝達の全体像については、ほとんど解明されていない。

そこで本研究では、糸状菌の細胞壁構築を制御するシグナル伝達経路を明らかにすることを目的とした。研究材料として、糸状菌のモデル生物であるアカパンカビ(*Neurospora crassa*)を使用した。アカパンカビは同じ子嚢菌類に属する出芽酵母や糸状菌*Aspergillus*属と比べて、植物病原菌と進化的により近縁な関係にある。遺伝解析が可能であるアカパンカビは、植物病原菌で困難な多重遺伝子破壊株の作製が単一破壊株同士間の交配によって作製することができ、古くから遺伝学や生化学的研究が盛んに行われてきたアカパンカビには、形態形成やストレスに対して高い感受性を示す変異株が存在する。さらに、ゲノム情報が公開されていることから、遺伝子の検索や比較解析を容易に行うことができる(Galagan *et al.*, 2003)。また、網羅的破壊株作製プロジェクトによって、シグナル伝達経路の構成因子や転写調節因子を始めとする遺伝子破壊株の作出が行われている。この網羅的な遺伝子破壊株の作製には、Inoue H.らの研究(Ninomiya *et al.*, 2004)によって見出された*ku* 変異株を親株として用いる高頻度の相同組み換え法の寄与するところが非常に大きい。これらの変異株や破壊株はFungal Genetics Stock Center (FGSC, Kansas City, MO, USA)から入手することが可能である。これらの観点から、植物病原菌の病原性や形態形成に関与する因子の研究には、出芽酵母や*Aspergillus*と同様にアカパンカビを研究材料とすることの有用性が高い。

これらの状況を踏まえ、本研究は糸状菌の細胞壁構築を制御するシグナル伝達経路を解明するため、アカパンカビのMAPキナーゼを中心に解析を進めた。第1章では、ゲノムに存在する3種類のMAPキナーゼの細胞壁ストレスに対する応答を解析し、MAK-1とMAK-2がCWIに関与することを明らかにした。さらに、それらの下流で制御されている遺伝子の同定を行った。第2章では、高浸透圧が

細胞壁に与える影響に着目し、浸透圧応答を担うOS経路のMAPキナーゼOS-2もまた、MAK-1とMAK-2とは独立にCWIに貢献していることを明らかにした。第3章では、糸状菌ではこれまで報告がない、MAK-1が制御する転写調節因子のスクリーニングを行い、MSN-1を同定した。

アカパンカビを用いた本研究は、糸状菌が共通にもつ3種類のMAPキナーゼのCWIへの貢献と細胞壁関連酵素遺伝子の調節機構を明らかにしたものであり、植物病原菌を始めとする糸状菌特有のCWI経路による細胞壁構築の制御機構の解明や病原性に関与する因子の探索に寄与するものであると考えられる。

第1章　MAPキナーゼMAK-1とMAK-2の細胞壁構築への関与

1-1. 緒言

出芽酵母のcell wall integrity (CWI) 経路においては、細胞壁の損傷によってMpk1 (MAPキナーゼ)がリン酸化されて活性型となり、転写調節因子Rlm1を活性化する。活性型Rlm1が細胞壁関連遺伝子群の発現を誘導して、細胞壁損傷に応答した細胞壁の生合成と再構築がなされることにより、CWIは厳密に制御されている(Jung *et al.*, 1999; Levin, 2011)。

これをもとに、すでに様々な糸状菌でCWIに関するMpk1-like MAPキナーゼの遺伝子破壊株が作出され、解析が行われている。例えば、イネいもち病菌(*Magnaporthe grisea*)では、Mpk1-like MAPキナーゼである*MPS1*の破壊株は植物への侵入が出来なくなり、感染能を消失する(Xu *et al.*, 1998)。また、赤かび病菌(*Fusarium graminearum*)のMpk1-like MAPキナーゼは、トリコテセン系かび毒のdeoxynivalenolの蓄積に関与している(Hou *et al.*, 2002)。動物への感染能を有する*Aspergillus fumigatus*では、*mpkA* (*S. cerevisiae MPK1* ホモログ) の欠損は、生育遅延や形態形成の劇的な変化だけでなく、細胞壁損傷剤に対する感受性を高めることが示されている(Valiante *et al.*, 2008)。これらの病原菌の研究は、CWI経路が病原性あるいは二次代謝制御に強く影響することを示しているが、CWI経路の機構の解明には至っていない。糸状菌のCWI経路の解明を目指した研究として、東北大学（阿部敬悦研究室）を中心とした*Aspergillus nidulans*を用いた研究がある。*A. nidulans* のMpk1-like MAPキナーゼであるMpkAは、その欠損によって分生子発芽率や極性生長が減衰する (Bussink *et al.*, 1999)。さらに、MpkAはその下流の転写調節因子RlmA (*S. cerevisiae* Rlm1ホモログ)を介して、糸状菌特有のalpha-1,3-グルカン合成酵素遺伝子(*agsA*, *agsB*)の発現を制御している。一方で、細胞壁合成に主要なキチン合成酵素遺伝子(*chsC*)やbeta-1,3-

グルカン合成酵素遺伝子(*fksA*)などの細胞壁合成遺伝子の発現には関与していない(Fig. 3) (Fujioka *et al.*, 2007)。このことは、出芽酵母と*A. nidulans*では、Mpk1-like MAPキナーゼの制御する遺伝子やその制御機構に大きな違いが存在することを示唆しているが、その全容については不明の点が多く残されている。

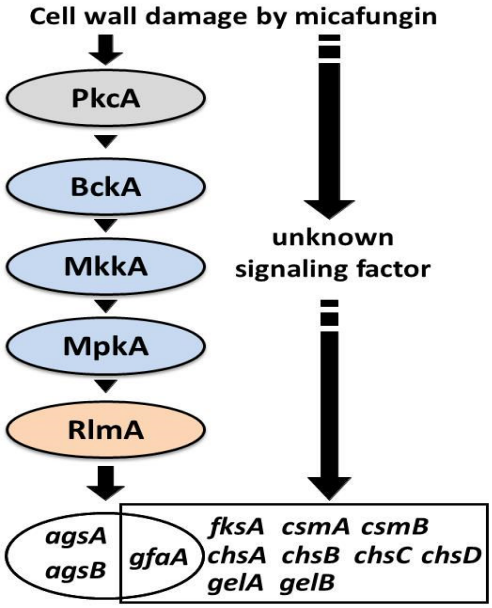


Fig. 3. Cell wall integrity pathway in *A. nidulans*.

モデル糸状菌であるアカパンカビは、出芽酵母との比較ゲノム解析から、3種類のMAPキナーゼ経路（OS、MAK-1、MAK-2経路）をもつことが明らかになっている(Fig. 4) (Galagan *et al.*, 2003; Borkovich *et al.*, 2004; Kamei *et al.*, 2013a)。

アカパンカビのMAPキナーゼ経路の各構成因子は、出芽酵母の各MAPキナーゼ経路と高い相同性を示し、真菌類において高度に保存されている。OS経路はOS-4 (MAPKKK)−OS-5 (MAPKK)−OS-2 (MAPK) から構成されており、出芽酵母の高浸透圧応答経路Ssk2/22−Pbs2−Hog1 MAPKカスケードのホモログである。同様に、アカパンカビのMAK-2経路のNRC-1−MEK-2−MAK-2 は、出芽酵母において交配能や形態形成を制御する Ste11−Ste7−Fus3/Kss1 と高い相同性を示す。また、アカパンカビのMAK-1経路のMIK-1−MEK-1−MAK-1 は、出芽酵母のCWI経路のBck1−Mkk1/2−Mpk1 とそれぞれ高い相同性を有する。以下に、3種類の

MAPキナーゼ経路についてのこれまでの研究を概説するとともに、細胞壁との関係について述べる。

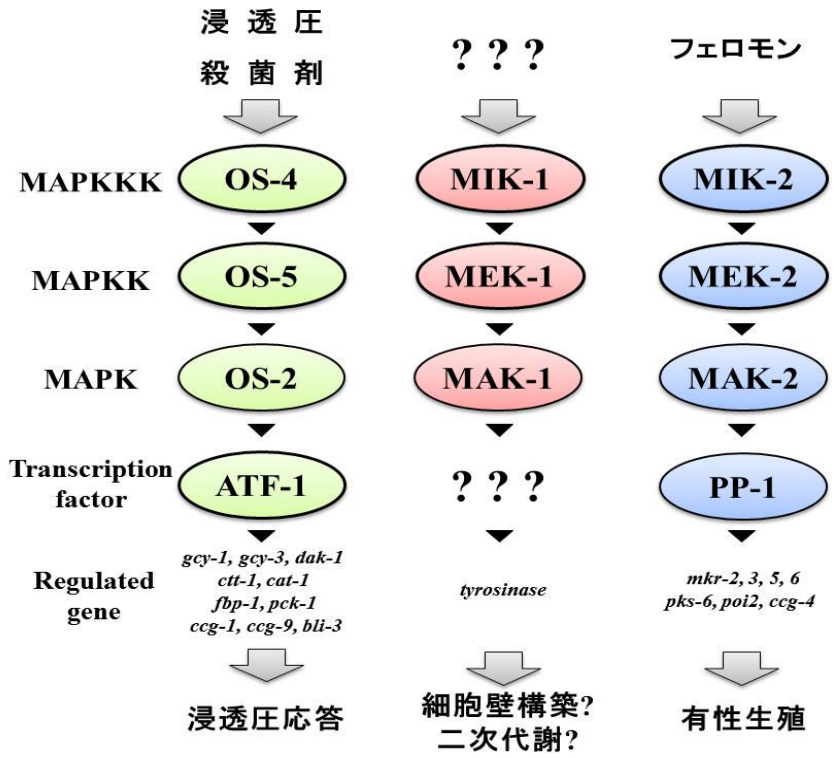


Fig. 4. Three MAPK cascades in *N. crassa*.

アカパンカビのOS-2 MAPキナーゼ経路は、3種類のMAPキナーゼ経路の中で最も研究が進んでおり、浸透圧ストレス応答において重要な役割を担うことが明らかになっている(Zhang *et al*., 2002; Fujimura *et al*., 2003)。OS経路の3種類の変異株(*Δos-4*, *Δos-5*, *Δos-2*)は浸透圧に高い感受性を示し、ジカルボキシイミドやフェニルピロール系殺菌剤に対して耐性を示す。OS経路は様々な遺伝子群を発現制御することにより浸透圧応答や概日リズムの出力経路としての一端を担っている(Noguchi *et al*., 2007; Vitalini *et al*., 2007; Watanabe *et al*., 2007; Yamashita *et al*., 2007; Kamei *et al*., 2013b)。OS経路がCWIに関与するという報告はこれまでないが、浸透圧ストレスに応答して膨圧を制御しており、細胞壁に物理的ストレスを生じる可能性が考えられる。

アカパンカビのMAK-2経路は、*mak-2*の遺伝子破壊株が雌性不稔かつ子嚢胞

子が発芽不能であることから、交配能を制御している(Pandey *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2005)。このことは、本経路が基本的に出芽酵母と同様、有性生殖過程に関与することを示している。アカパンカビにはconidial anastomosis tubes (CATs)と呼ばれる発芽した分生子の先端間が融合する現象が知られている(Roca *et al.*, 2005)。これは、受精のような異なる交配型遺伝子をもつ細胞間の融合ではなく、無性増殖過程において、同じ遺伝的背景をもつ細胞同士が融合する現象であり、多核の糸状菌では一般に認められる現象である。CATs先端間の細胞融合部位では細胞間でシグナル交換が行われており、MAK-2はこの役割を担うことが示されている(Fleissner *et al.*, 2009)。細胞壁をもつ菌糸が融合するためには、融合部位における細胞壁の部分分解と再合成が必要であり、CWIへの関与の可能性が考えられる。

一方、MAK-1は、出芽酵母との比較ゲノム解析からCWIを制御することが推定されているが、CWIへの関連性については、これまで明らかになっていない。アカパンカビのMAK-1は*tyrosinase*遺伝子を負に発現調節することによって二次代謝系を制御すること、そして概日リズムの出力経路としての役割を担うことが見出されている(Park *et al.*, 2008; Bennett *et al.*, 2013)。しかし、これらは細胞壁構築とは異なる現象であると考えられる。また、MAK-1下流の転写調節因子とその制御遺伝子についても同定されていない。従って、アカパンカビのMAK-1が出芽酵母のようにCWIを制御しているかについては不明である。そこで、本章においては、アカパンカビの3種類のMAPキナーゼの各遺伝子破壊株の評価、MAPキナーゼのリン酸化解析、遺伝子発現解析により、3種類のMAPキナーゼのCWIへの関連性について検証を行った。

1-2. 材料と方法

アカパンカビの菌株、培地及び感受性試験

本章で使用したアカパンカビの菌株をTable 1に記した。野生株としてC1-T10-37株(Tamaru *et al*., 1989)を使用し、各破壊株は、網羅的遺伝子破壊株作成プロジェクトにより作出された破壊株ライブラリーから入手した(Fungal Genetics Stock Center (FGSC, Kansas City, MO, USA))。

Table 1. The *Neurospora crassa* strains used in this study.

Strain	Genotype	Reference or sourse
C1-T10-37 A	*mat A*	Tamaru *et al*., 1989
C1-T10-19 a	*mat a*	Tamaru *et al*., 1989
FGSC #11326	*mat A*; *mik-1::Hyg*^{r}	FGSC[a]
FGSC #11327	*mat a*; *mik-1::Hyg*^{r}	FGSC[a]
FGSC #11318	*mat a*; *mek-1::Hyg*^{r}	FGSC[a]
FGSC #11319	*mat A*; *mek-1::Hyg*^{r}	FGSC[a]
FGSC #11320	*mat A*; *mak-1::Hyg*^{r}	FGSC[a]
FGSC #11321	*mat a*; *mak-1::Hyg*^{r}	FGSC[a]
FGSC #18202	*mat a*; *os-4::Hyg*; *mus-51::Bar*^{r}	FGSC[a]
FGSC #18203	*mat a*; *os-5::Hyg*; *mus-51::Bar*^{r}	FGSC[a]
FGSC #6041	*mat a*; *os-4* (Y256M223)	FGSC[b]
FGSC #4576	*mat a*; *os-5* (NM216o)	FGSC[b]
FGSC #17933	*mat A*; *os-2::Hyg*^{r}	FGSC[a]
FGSC #1509	*mat A*; *os-2* (ALS10)	FGSC[c]
FGSC #18162	*mat a*; *nrc-1::Hyg*; *mus-51::Bar*^{r}	FGSC[a]
FGSC #11524	*mat a*; *mek-2::Hyg*; *mus-51::Bar*^{r}	FGSC[a]
FGSC #11482	*mat a*; *mak-2::Hyg*^{r}; *mus-51::Bar*^{r}	FGSC[a]
FGSC #6103	*mat A*; *his-3*	FGSC

[a)] *Neurospora* knockout strains from the functional genomics program (Colot *et al*., 2006) were obtained from Fungal Genetics Stock Center.

[b, c)] *Neurospora* mutant strains that were characterized by Perkins D.D. (1974) were obtained from Fungal Genetics Stock Center.

アカパンカビの菌株の維持と継代培養には、Vogel's medium N 最少(VM)培地(1.2 w/v% sucrose, 1×Vogel's solution)を使用した(Vogel., 1956)。分生子(無性胞子)形成は、グリセロール完全培地(1.0 v/v% glycerol, 1×Vogel's solution, 1.0 v/v% vitamin solution, 2.5 g/l yeast extract, 1 g/l casamino acid, 5 g/l malt extract)を用いて、植菌後10日間培養し、形成された分生子を滅菌水に懸濁後、茶こしを使用して菌糸を除いた。さらに滅菌水で数回繰り返して洗浄後、再度、滅菌水に懸濁したものを分生子溶液とした。また、菌糸体は上述の方法で調製した分生子を、6.6×10^5 cells/ml となるようにVM液体培地に植菌し、室温で18時間培養後、生育した菌体を吸引濾過により回収した。集菌した菌体は、液体窒素により凍結し、使用するまで-80℃で凍結保存した。

感受性試験に用いた細胞壁損傷剤は、beta-1,3-グルカン合成酵素阻害剤micafungin (Astellas Pharma, Tokyo, Japan)、キチン合成阻害剤polyoxin D (Kaken Pharmaceutical Co., Ltd, Tokyo, Japan)、キチン合成阻害剤Calcofluor White (CFW) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO)、グルカン合成阻害剤Congo Red (CR) (Sigma Aldrich)、細胞壁損傷剤SDS (sodium dodecyl sulphate) (Wako Pure Chemical, Osaka, Japan)の作用の異なる5種類の薬剤を使用した。なお、micafungin及びpolyoxin Dはそれぞれグルカンやキチンの生合成阻害剤であり、CRとCFWはキチンやグルカンにそれぞれ結合することによって細胞壁損傷を与える剤である。また、SDS は界面活性剤であり、細胞壁成分の溶解により損傷を引き起こす。VM培地を用いた菌糸生育阻害試験は、前培養した菌糸の先端をコルクボーラーでくり抜き、その菌糸ディスクを薬剤含有培地上に接種し、28℃、18時間培養した。感受性の判定は、薬剤含有培地上での生育菌糸長を、無処理の菌糸生育長と比較して生育阻害率を算出した。また、胞子希釈法による感受性試験は、sorbose含有VM平板培地(0.2 w/v% sucrose, 1.0 w/v% sorbose, 1×Vogel's solution)上に、10^6個の分生子から1/10倍ごとに段階希釈した胞子液を5 μlずつスポット

し、28℃、48時間培養した。

タンパク質の抽出及び定量

0.5 mm径ガラスビーズを加えた2 mlスクリューチューブに、total cell extraction buffer (50 mM HEPES buffer (pH7.6), 10% glycerol, 137 mM NaCl, 25 mM NaF, 10 mM $Na_4P_2O_7$, 2 mM Na_3VO_4, complete protease inhibitor cocktail 1 tablet / 50 ml (Roche))を700～1000μl 加えて、アカパンカビの凍結サンプル(無性胞子あるいは菌糸体) を添加した。ビーズビーター(MP Biomedicals, Japan, FastPrep^{TM} FP120/BIO101; 設定条件－Speed:6.0 m/s, Time:20秒)にセットして菌体を破砕した。菌体破砕サンプルは、遠心分離(13,000g, 10分間, 4℃)を行い、得られた上清を再度遠心分離し、その上清をtotal cell extractとした。タンパク質濃度は、Bradford試薬 (Protein Assay Kit I/BIO-RAD Laboratories, Hercules, CA)を用いて定量した。

ウェスタンブロッティング解析

菌体由来のtotal cell extract 50 μgを2×sample buffer (0.1 M Tris-HCl (pH6.8), 4% SDS, 1.692 M 2-mercaptoethanol, 1% sucrose, 0.01% BPB)を用いて95℃, 5分間の熱処理によりタンパク質を変性させ、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)用サンプルとした。同サンプルを10% ポリアクリルアミドゲルにより分離(電気泳動条件：25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS, 定電圧200V)後、nitrocellulose membrane (Advantech Co., Ltd., Tokyo, Japan)上にブロッティングした(ブロッティング条件：25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% methanol, 定電圧100V, 電流上限350 mA, 60分間)。メンブレンをwash buffer (TBS-T: 1×TBS, 0.2% Tween-20)で5分間洗浄後、blocking buffer (wash buffer, 10% BSA)を用いて室温で60分間、または4℃, オーバーナイトで振盪し、ブロッキング処理を行った。

ウェスタンブロッティング法におけるMAPキナーゼの免疫染色は、ブロッキング終了後のメンブレンを一次抗体溶液(各種一次抗体, 1×wash buffer)に浸し、室温で2時間あるいは、4℃でオーバーナイト処理した。一次抗体として、total MAK-2の検出にはanti-MAP kinase (ERK1, ERK-2) antibody produced in rabbit (Sigma Aldrich, M5670)を20000倍希釈し、リン酸化MAK-1及びMAK-2の検出にはphospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) antibody (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, #9101)を1000倍希釈して使用した。同様に、total OS-2の検出にはHog1 antibody (Santa Cruz Biotechnology Inc, y-215, 2500倍希釈)、リン酸化OS-2の検出にはphospho-p38 MAPK antibody (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, #9211, 1000倍希釈)をそれぞれ一次抗体として使用した。一次抗体反応処理後、wash buffer で3回洗浄し、二次抗体処理(anti-rabbit IgG AP conjugate antibody (Promega, Fitchburg, WI, S3731) 7500倍希釈, 1×wash buffer)を室温1時間行った。二次抗体処理後のメンブレンをwash bufferで3回洗浄し、メンブレンのpHを約9.5とするため、AP発色buffer (100 mM Tris-HCl (pH9.5), 100 mM NaCl, 50 mM $MgCl_2$・$6H_2O$)で置換後、遮光条件下でAP発色液(AP発色buffer, 0.34 mg/ml NBT (nitro-blue tetrazolium chloride), 0.18 mg/ml BCIP (5-bromo-4-chloro-3'-indolylphosphatase *p*-toluidine salt) による発色によって各タンパク質を検出した。適切な発色が得られた後、氷冷したイオン交換水で十分に洗浄し、発色反応を停止した。

アカパンカビのRNA抽出及び調製

2 mlスクリューチューブに0.5 mm径ガラスビーズを200 µl入れ、RNApro solution (MP Biomedicals, Japan)を1 ml加えた。アカパンカビの分生子や菌糸体などの凍結菌体サンプルを加え、ビーズビーター(MP Biomedicals, Japan, FastPrep^{TM} FP120/BIO101; 設定条件－Speed:6.0 m/s, Time:40秒)で菌体サンプル

を破砕した。菌体破砕サンプルは13,000gで5分間（4℃）遠心分離し、上層を新しいマイクロチューブへ移した。さらに、室温で5分間インキュベートした後、クロロホルム300 µlを添加してボルテックスで10秒間混合した。再度、室温で5分間インキュベートし、遠心分離(13,000g, 5分間, 4℃)後の上清を新しいマイクロチューブに移した。

この操作を再度繰り返したRNAを含む溶液に、99.5%エタノールを2.5倍量添加した。5回転倒混和後、-20℃下に30分間以上静置し、13,000gで15分間（4℃）遠心分離した。デカンテーションで上清を除去後、80%エタノールでリンスした。遠心分離(13,000g、2分間、4℃)後、ピペットマンを用いて上清を捨て、残存するエタノールを除去後、チューブのフタを空けて室温で風乾した。Nuclease-Free Water (Qiagen,129115)でRNAを溶解し、Recombinant DNase I (Takara-Bio, 2270A)によるゲノムDNAの消化を37℃, 30分間行った。3 M酢酸ナトリウム、エタ沈メイト(Wako Pure Chemical, 312-01791)をそれぞれ加えて、エタノール沈殿を行い、精製RNAサンプルとした。RNAの純度、濃度測定は微量分光光度計(NanoDrop2000/Thermo Scientific Japan)を用いて行った。

cDNA合成（定量RT-PCR用)

定量RT-PCRに用いるcDNAは、PrimeScript RT Reagent kit (Takara-Bio, RR037)を使用し、total RNA 1 µgからmRNAの特異的な逆転写反応(37℃、15分間)によって取得した。逆転写酵素の失活は85℃で5秒間の熱処理により行った。

定量RT-PCR

遺伝子転写量の解析はLightCycler System (Roche Diagnostics)を用いて行った。このシステムはPCR産物の増幅を蛍光シグナルでモニタリングすることにより、定量的かつリアルタイムに検出することが可能である。本研究における遺伝子

発現量の解析では、Universal ProbeLibrary (Roche Diagnostics)由来のTaqManプローブと称される加水分解プローブを使用した。このプローブは、5'末側に蛍光レポーター色素、3'末側にクエンチャーがそれぞれラベルされている(Fig. 5)。

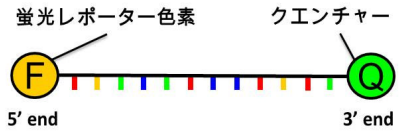


Fig. 5. TaqMan probe.

5'末側の蛍光レポーター色素による蛍光シグナルは、完全状態では3'末側のクエンチャーによりほぼ完全に抑制されており、蛍光シグナルは皆無に等しい。しかし、*Taq*DNAポリメラーゼの5'→3'エキソヌクレアーゼ活性により分解されると、蛍光色素がクエンチングされなくなる。これにより、PCRサイクル中に、5'末側から切断された蛍光色素が蓄積され、蛍光シグナルが増大する(Fig. 6)。

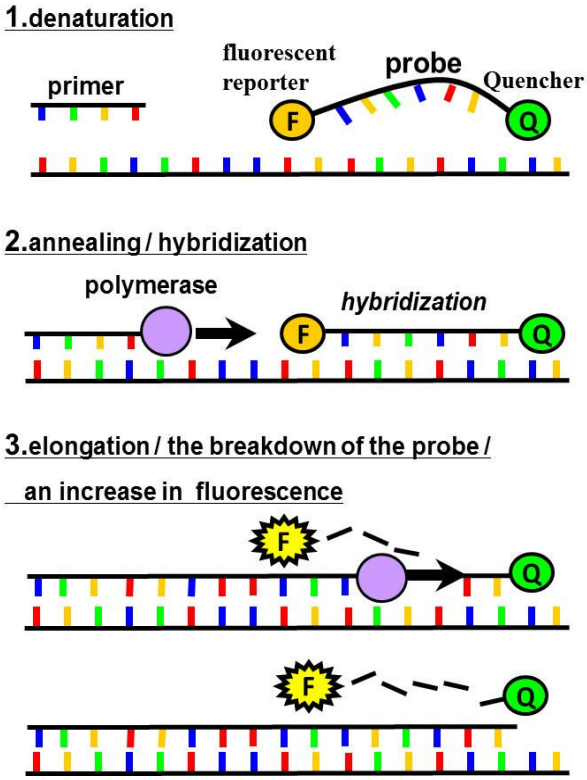


Fig. 6. TaqManプローブを用いたリアルタイム定量PCR法の概略.

蛍光強度が検知されたPCRの蛍光増殖曲線の立ち上がり点(Cycle数)がCrossing

Point (CP)として示される。CP値は、鋳型となるDNAの初期濃度に依存しているため、CP値の差異が遺伝子転写量の差として求めることができる(Fig. 7)。

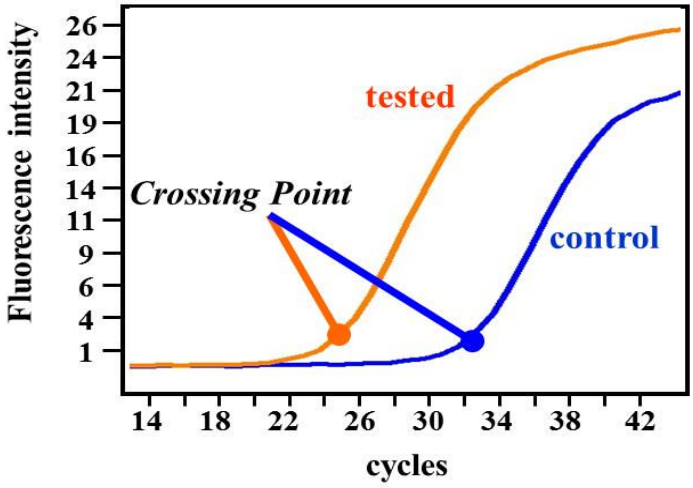


Fig. 7. PCR amplification curve in real-time PCR.

定量RT-PCR反応には、LightCycler 480 (Roche Diagnostics)を使用した。PCR反応液には、Light Cycler Probes Master (Roche Diagnostics)を使用し、1反応あたり、以下の組成で行った; 1×LC480 probes Master Mix, 0.5 μM Primer L, 0.5 μM Primer R, 0.1 μM TaqMan probe, cDNA 1 μl。リアルタイム定量PCRの反応条件は、Pre-incubation (×1 cycle): 95℃, 10分間; Amplification (×45 cycles): 95℃, 10秒間－60℃, 30秒間－72℃, 1秒間で行った。

また、*Taq*Manプローブの選択及びプライマーの設計は、Roche Assay Design Center (http://www.universalprobelibrary.com)を利用した。本章において使用したプライマー及び*Taq*Manプローブのリストを Table 2に示した。なお、内部標準遺伝子として*actin*遺伝子を使用した。

Table 2. List of primer sets and probes used for quantitative real-time RT-PCR in this study.

Target gene	NCU locus	Forward primer (5′→3′)	Reverse primer (5′→3′)	Probe #
ags-1	NCU02478	GGGTTGAGATGTGGAACCAG	GGCCAGTATTAGGGTTGACG	9
ags-2	NCU08132	CCGTCCTCTCCAGGTGTCT	CGACGCCCTGGATGTTAT	5
fks-1	NCU06871	TACGGCATGGACTACGGTAA	GGGATACGGTTCCTTGGAG	4
gel-1	NCU01162	TCGGGAGGTCTTATGTACGAG	GAGCTTGGCAATTCCGTATC	25
gel-2	NCU06781	CTCCGTCCCCGTCTTCTACT	GTGAACATACGGGGCTTCA	46
gel-4	NCU07253	AGAGATTCTACGTTCGCGGTA	GATCGAGGTTGGCAGAAGAA	64
gfa-1	NCU11350	TCGACTGCCTTCAGGGTATC	CCAACCAATAGGCGATCAAC	6
chs-1	NCU05239	AGTATTTCAAGGGCGAGACG	ACATGTTCGCCGTAAACACA	44
chs-2	NCU03611	TCAGGATCAGCAGGTGTCAT	GCCAAGAAGTAAAGGCCGTA	49
chs-3	NCU04251	CACCAGCAAGGCTTCGATA	TAGCGCATCTCCAGGACTGT	81
chs-4	NCU09324	TCGATTGCAATGACGGACTA	ACCATCGCAAATAACGAGGA	5
chs-5	NCU04352	TCGACGAGGTCAGCGAGT	CTTGTTCCGATCCCTTGCT	3
chs-7	NCU04350	GTGGTTTGGGATTCCAAGAAG	GAACCACGGGTGATTCCA	4
mak-1	NCU09842	CATTGTCTGGTACGTCCACCT	CAAAAGCACAAGCGGCTAA	15
mak-2	NCU02393	GCATCACGGTCGAAGAGG	ATCATCCGGGTCGTGGTA	1
phiA	NCU00399	CTCGCAGCACCTCACCTT	ATGCGGTACGAGGAGTCG	43
ncw-1	NCU05137	CCTGGCTCAACCAGATCG	GGATTAGACCGAGGGGAGAA	25
egl-1	NCU09175	GGCTTCAACTCGGGTAACAC	GCACCCAGTCCTTCTTGAAC	28
ncw-3	NCU07817	GGTGGTGGCTTCGTCAAT	CTGAGGAGGGCAAGCAAC	45
gh76-5	NCU09937	ATTTGCAACACGGACATGC	ATCTTGGAGGCGTAGACGAA	7
tdt-1	NCU07517	TTGTGTTGGGCAACCATGT	CCCTCCCCGGATAACAAATA	77
dga-1	NCU00035	CTTTTCTCGGCATGTTCCTT	TCTTTTCCAAAGGCTTGGTG	34
actin	NCU04173	GCTGAGCGTGGTTACACCTT	TCCTTGATGTCACGAACGAT	77

マイクロアレイ

マイクロアレイ解析に使用するアカパンカビのmRNAの抽出には、mRNA Direct Kit (Invitrogen)を使用し、プロトコルを一部改変して行った。まず、2 ml スクリューチューブに0.5 mm径ガラスビーズ 200 µl, lysis/binding buffer (100 mM Tris-HCl, 500 mM LiCl, 10 mM EDTA, pH8.0, 1% LiDS, 5 mM DTT) 1mlを用意し、菌体サンプル(分生子or菌糸体)を加えた。ビーズビーター（MP Biomedicals, Japan, FastPrep^{TM} FP120/BIO101; 設定条件－Speed:6.0 m/s, Time:40秒）で菌体を破砕後、遠心分離(13,000g, 4℃, 5分間)した。新しいマイクロチューブにDynabeads 200 µlを用意し、同チューブをマグネットにセット後、約30秒経過後、

溶液がクリアになったところで上清を除去した。同チューブをマグネットから外して、lysis/binding bufferでDynabeadsを洗浄した。前述の破砕菌体サンプルの上清750 µlをwash済Dynabeads入りマイクロチューブに加え、転倒混和後、Roller Mixerを使用して、室温、5分インキュベートした。磁気分離後、上清を捨て、washing buffer A (10 mM Tris-HCl, 150 mM LiCl, 1 mM EDTA, pH8.0, 0.1% LiDS)及びwasing buffer B (10 mM Tris-HCl, 150 mM LiCl, 1 mM EDTA, pH8.0)でBeads/mRNA complexを室温でそれぞれ2回ずつ洗浄した。洗浄後のBeadsからmRNAを遊離・溶解するため、elution buffer (10 mM Tris-HCl, pH7.5) 20 µlを加えて80℃、2分インキュベートし、磁気分離後の上清を新しいマイクロチューブに移し、mRNAサンプルとした。

解析に使用したマイクロアレイスライドは、Fungal Genetics Stock Centerから購入した。購入したアレイスライドのGALファイル及び遺伝子リストの情報は、http://web.uconn.edu/townsend/Links/ffdatabase/downloads.htmlから取得した。アレイスライドは、UVクロスリンク(600 mJ)によるDNAプローブの固定を行ってから使用した。マイクロアレイ解析に用いたmRNAは、野生株を1 µg/ml micafunginで2時間処理した菌体から抽出し、調製したmRNA 1 µgをマイクロアレイ解析に用いた。

マイクロアレイ解析は、3DNA Array 50 Kit (Genisphere, Hatfield, PA) のプロトコルを一部改変して行った。cDNA合成時に、Cy3蛍光色素及びCy5蛍光色素がそれぞれ特異的に結合するプライマーと、逆転写酵素としてSuperScript II (Invitrogen) を使用した。野生株無処理のmRNAサンプルをCy3、野生株micafungin処理のmRNAサンプルをCy5標識した。cDNA濃縮には、Microcon YM-30 (Millipore) を用いた。ハイブリダイゼーションのバッファーには、2× SDS-Based Hybridization Bufferを使用し、cDNAハイブリダイゼーションを60℃でオーバーナイト、3DNAハイブリダイゼーションを55℃で3時間行った。各ハ

イブリライゼーション後のアレイスライドのwashには、予め42℃に加温した2×SSC, 0.2% SDS wash bufferを用いた。なお、ここに記載した実験方法は、マイクロアレイと定量PCRの発現差が、最も高い相関 (R^2=0.99)を示すことが山下和宏博士(2010年度 東洋大学大学院 生命科学研究科生命科学専攻 博士学位論文)により示されている。蛍光シグナルはDual-Laser DNA Microarray Scanner (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, G2565AA)で検出した。次に、Feature Extraction Software version 8.5 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA)を使用して、アレイスポットのシグナル強度とバックグラウンドに有意に差があるかを判定し、ノイズレベルのスポットを除いて数値化した。

アカパンカビのゲノムDNA抽出及び調製

2 mlスクリューチューブに200 µlのガラスビーズ(0.5 mm径)を加え、抽出バッファー (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 mM EDTA, pH8.0, 0.5% SDS) 500 µlを加えた。菌体サンプル(分生子や菌糸)を滅菌済み竹串で採取し、抽出バッファー中に懸濁した。細胞をビーズビーターで破砕した(MP Biomedicals, Japan, FastPrep^{TM} FP120/BIO101; 設定条件－Speed:6.0 m/s, Time:40秒)。菌体由来のDNaseを失活させるため、直ちにウォーターバスに移して65℃、7分間インキュベートし、7.5M酢酸アンモニウムを300 µl加えて、十分に転倒混和後、氷上で10分間以上静置した。遠心分離(13,000g、5分間、4℃)後の上清を新しいマイクロチューブに移し、等量のPCI (phenol:chloroform:isoamylalchol=25:24:1)を加えて、ボルテックスを用いて混合した。遠心分離(13,000g、5分間、4℃)後、水層(上層)のみを新しいチューブに移し、99.5%エタノールを上清の2.5倍量添加し、軽度に転倒攪拌した。再度、同条件での遠心分離後、上清を捨て、70%エタノールでリンスした。遠心分離（13,000g、2分間、4℃）した後、上清を除去し、MicroVac (TOMY)を用いて真空乾燥させた。TE buffer (pH8.0) 50 µlに溶解後、

RNase処理を行い(1mg/ml RNase, 1 μl)、精製ゲノムDNAサンプルとした。

大腸菌からのプラスミド調製

基本的な操作、手順はアルカリ-SDS法による方法に準じてプラスミドの調製を行った。LB培地で8時間～一晩培養した大腸菌の培養液を10,000g, 1分間、遠心分離して大腸菌を沈殿させ、培地(上清)を除去後、Solution I (50 mM グルコース, 25 mM Tris-HCl (pH8.0), 10 mM EDTA (pH8.0)) を添加して細胞をボルテックスを用いて懸濁した。Solution II (0.2M NaOH, 1% SDS) を加えて3回転倒混和後、4分間氷冷後、Solution III (3M 酢酸カリウム, 5M 酢酸)を添加して3回転倒混和後、5分間氷冷した。遠心分離(13,000g、5分間、4℃)後の上清をマイクロチューブに移し、等量のPCI (Phenol:Chloroform:Isoamylalcohol=25:24:1)を加えて、ボルテックスを用いて混合した。遠心分離(13,000g、5分間、4℃)後、水層(上層)のみを新しいチューブに移し、99.5%エタノールを上清の2.5倍量添加し、軽度に転倒攪拌した。再度、同条件での遠心分離後、上清を捨て、70%エタノールでリンスした。遠心分離(13,000g、2分間、4℃)した後、上清を可能な限り除去し、MicroVac (TOMY)を用いて真空乾燥させた。TE buffer (pH8.0) 50 μlに溶解した後、RNase処理を行い(1mg/ml RNase, 1 μl)、精製プラスミドサンプルとした。

pMAK-1-sGFPの構築

pMAK-1-sGFP (Fig. 8)の構築に使用したプライマーをTable 3に記した。また、アカパンカビ用発現ベクターはFGSCから入手したpMF272(FGSC#609, GenBank:AY598428, Fig. 8, Freitag *et al.*, 2004)を使用した。pMF272には、*ccg-1* promoterが含まれており、構成的に下流の遺伝子を発現させることが出来る。クローニング反応においては、In-Fusion Cloning enzyme (Takara/Clontech)を使

用した。この酵素は3’→5’ endonuclease活性を有しており、それぞれ異なるDNA断片の3’末端から15塩基以下を分解する。その結果生じた相同な突出した5’末端間が核酸間の相互作用によってハイブリダイゼーションすることにより、クローニング可能となる。本研究では、*mak-1*をpMF272上のマルチクローニングサイトの*Sma*Iサイト(CCC/GGG)の切断箇所内にクローニングするため、アカパンカビの野生株のゲノムDNAから*mak-1*をPCR増幅する際に*Sma*Iサイト内のそれぞれ一部(3塩基:CCC or GGG)とpMF272に特異的な配列を付加したプライマーペアを使用した。得られた*mak-1*のPCR産物をWizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) を使用してアガロースゲルから抽出し、*Sma*I処理したpMF272と混合してIn-Fusion Cloning反応(50℃、20分)を行うことによってクローニングし、pMAK-1-sGFPを構築した。

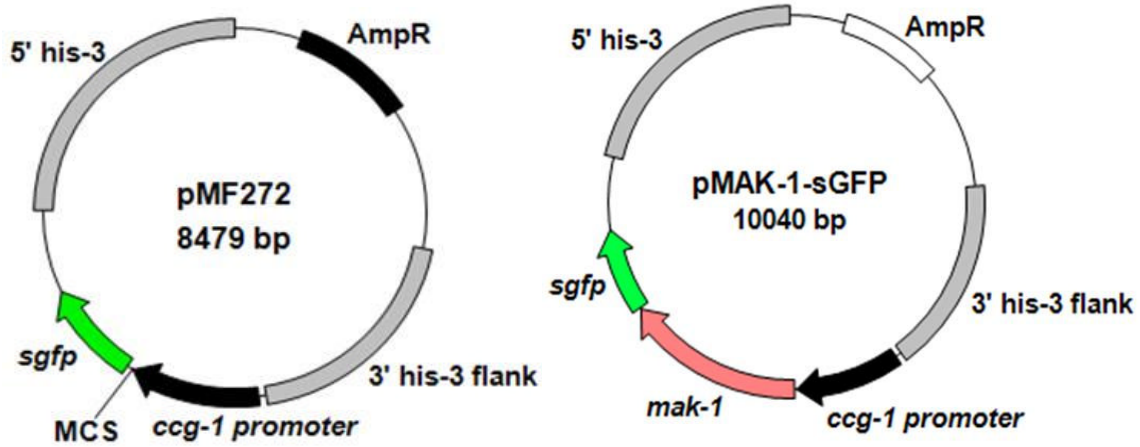


Fig. 8. Map of pMF272 and pMAK-1-sGFP

MCS in map of pMF272 indicates multi cloning site containing *Sma*I-site

Table 3. Primers for pMAK-1-sGFP construction

Primer name	Primer sequence (5′→3′)
mak-1-gfp F2	aactagtggatccccATGGCTGATCTCGTGGGTCG
mak-1-gfp R2	catgttaattaacccCATGCCACCAAGCTCGGCCT
pMF272 gfp F1	acgtaaacggccacaagttc
pMF272 gfp R1	ttctcgttggggtctttgct

mak-1 sequence from wild-type genome DNA were amplified with the 2 primers, mak-1-gfp F2 and mak-1-gfp R2, using PCR. The underlined sequences are 15 bp overlaps required for recombination (pMF272 specific sequence and partial *Sma*I-site) that were added to allow for the directional insertion of the PCR products into the pMF272 vectors using In-Fusion HD Cloning reaction. pMF272 gfp F1 and pMF272 gfp R1 were used to confirm *N. crassa* transformant.

pMAK-2-YFPの構築

pMAK-2-YFP(Fig. 9)の構築に使用したプライマーをTable 4に記した。また、発現ベクターはFGSCから入手したpYFP(FGSC#675, GenBank:EF661030, Fig. 9)を使用した。pYFPもpMF272と同様に、*ccg-1* promoterが含まれている。*mak-2*をpYFP上のマルチクローニングサイトの*Sma*Iサイト(CCC/GGG)の切断箇所内にクローニングするため、アカパンカビの野生株のゲノムDNAから*mak-2*をPCR増幅する際に*Sma*Iサイト内のそれぞれ一部(3塩基:CCC or GGG)とpYFPに特異的な配列を付加したプライマーペアを使用した。得られた*mak-2*のPCR産物をWizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) を使用してアガロースゲルから抽出後、*Sma*I処理したpYFPと混合し、In-Fusion Cloning反応(50℃、20分)によりクローニングした。

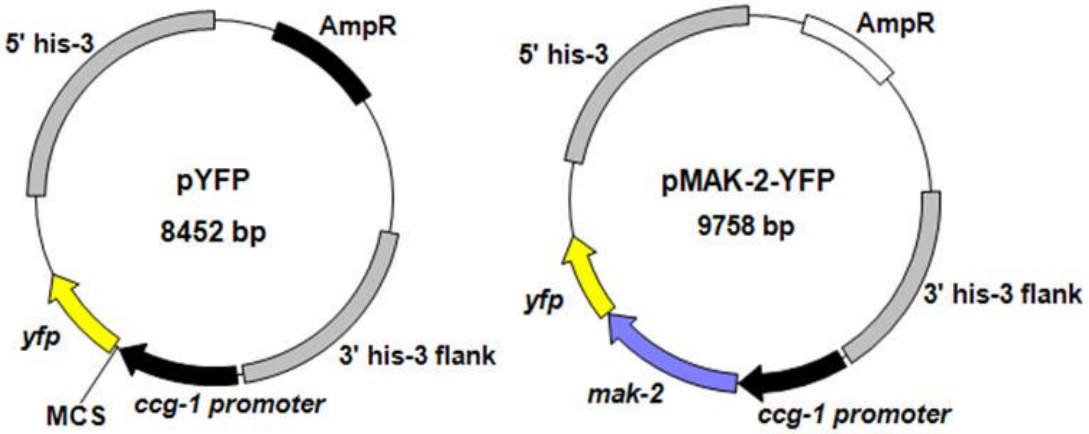


Fig. 9. Map of pYFP and pMAK-2-YFP

MCS in map of pYFP indicates multi cloning site containing *Sma*I-site

Table 4. Primers for pMAK-2-YFP construction

Primer name	Primer sequence (5′→3′)
mak-2-yfp F2	aactagtggatccccATGAGCAGCGCACAA
mak-2-yfp R2	catgttaattaacccCCTCATAATCTCCTG
pYFP F1	acgtaaacggccacaagttc
pYFP R1	ttctcgttggggtctttgct

mak-2 sequence from wild-type genome DNA were amplified with the 2 primers, mak-2-yfp F2 and mak-2-yfp R2, using PCR.
The underlined sequences are 15 bp overlaps required for recombination (pYFP specific sequence and partial *Sma*I-site) that were added to allow for the directional insertion of the PCR products into the pYFP vectors using In-Fusion HD Cloning reaction.
pYFP F1 and pYFP R1 were used to confirm *N. crassa* transformant.

アカパンカビの形質転換法

形質転換においてはGene Pulser II Electroporation System (BIO-RAD Laboratories, Hercules, CA)を用いたエレクトロポレーション法により、遺伝子断片を導入した。まず、アカパンカビの*his-3*株(FGSC #6103)を0.2 mg/mlヒスチジン含有グリセロール完全培地で室温条件下、10日間培養し、大量の分生子を回収した。1M ソルビトールで3回洗浄後、1M ソルビトール500 µl に懸濁し、マイクロチューブに移し、遠心分離(10,000g, 4℃, 1分間)した。沈殿した分生子と上清の比が2:1となるように上清を捨て、再度、十分にボルテックスで混合し、濃度の高い分生子懸濁液を準備した。その胞子液から40 µlの胞子液を新しいマイクロチューブに採取して、遺伝子導入断片(*Dra*I処理により線状化したプラスミド)を300 ng (添加量:3～5 µl)加えて混合した後、5分間氷冷した。Gene Pulserのエレクトロポレーション条件をCAPACITANCE:50 µF, RESOSTANCE: 200 ohmns, SET VOLTS:7.5 kV/cmに設定し、胞子液40 µlと遺伝子導入断片の混合物をエレクトロポレーション専用キュベットに全量加えて、エレクトロポレーションを行った。氷冷1M ソルビトール960 µlを同キュベットに加えて穏やかにピペッティングで混合して1M ソルビトールが入っていたマイクロチューブに全量を回収して10分間氷冷した。このうち、250 µl～1 mlをTop agar (2% Sorbose, 1M Sorbitol, 1×Vogel's Solution, 1.5 w/v% Agar)に混ぜて、ソルボース含有Vogel's 寒天培地上に展開し、30℃で3日間培養した。パスツールピペットを使用して、生育してきたコロニーをVM寒天培地にピックアップし、1週間程度培養した。本章で使用したpMF272, pYFPはアカパンカビの*his-3*座に2箇所の相同組み換えにより組み込まれるよう、*his-3*座が一部改変されたゲノム配列が使用されている(Margolin *et al.*, 1997)。これにより、ヒスチジン要求株のヒスチジン要求性が回復するため、ヒスチジン無添加の培地中から形質転換体を選抜することが可能である。得られた形質転換体の候補株は、遺伝子診断により*his-3*

遺伝子座への導入断片の挿入を確認後、Synthetic cross (SC)培地(0.1 w/v% Glucose, 1×SC solution) (Westergaard *et al.*, 1947) 上で野生株と交配することによりホモカリオン化し、目的の形質転換体を取得した。

GFP or YFP融合タンパク質発現株の観察方法

観察には共焦点レーザースキャン顕微鏡(Carl Zeiss LSM-510)を使用した。菌糸の観察ではVM固体培地(3 w/v%寒天)上にGFP融合タンパク質発現株の分生子を接種し、28℃、14～18時間、前培養した。伸長した菌糸先端をスパーテルやメス刃を用いて培地ごと切り取り、滅菌水を10 μl滴下したスライドガラス(MATSUNAMI NEO, 25×60mm)上に、菌体面が下向きになるように乗せてキムワイプで余分な水分を除いた。GFP蛍光の検出は、励起光及び蛍光フィルターをそれぞれExcitation 488 nm / Emission 530 nm に設定して観察した。YFP蛍光の検出は、励起光及び蛍光フィルターExcitation 514 nm / Emission 527 nm に設定して観察した。

細胞核染色

細胞核の染色には、DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole-HCl)を使用した。上述と同様に、培地ごと切り出した菌糸を固定液(3.7% パラホルムアルデヒド, 0.1 M PBS (pH7.4))に30秒間浸し、PBSで15秒間洗浄後、0.5～1 μg/ml DAPIで2分間、遮光条件下で染色した。新たに準備したPBSで2回洗浄した。DAPI蛍光の検出は、共焦点レーザースキャン顕微鏡(Carl Zeiss LSM-510)を使用し、励起光及び蛍光フィルターExcitation 364 nm / Emission 454 nm に設定して観察した。

細胞壁染色

細胞壁の染色にはCalcofluor White (CFW)を使用した。上述と同様に、伸長し

た菌糸先端をスパーテルやメス刃を用いて培地ごと切り取り、スライドガラス(MATSUNAMI NEO, 25×60 mm)上に0.1～1.0 mg/ml CFWを10 µl滴下し、そこに菌体面が下向きになるようスライドガラス上に乗せてキムワイプで余分な水分を除いた。CFW蛍光の検出は、共焦点レーザースキャン顕微鏡(Carl Zeiss LSM-510)を使用し、励起光及び蛍光フィルターをそれぞれExcitation 405 nm / Emission 475 nm に設定して観察した。

Polymerase chain reaction (PCR)

ベクター構築においては、Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (NEB)を使用した。遺伝子破壊株の遺伝子破壊の検出においては、KAPA Taq EXtra DNA Polymerase (日本ジェネティクス)を使用した。これらのDNA polymeraseを使用したPCR反応は、各付属のマニュアルに従って、PCR反応液を調製し、PCR反応装置(iCycler/BIO-RAD Laboratories, Hercules, CA)を使用した。

1-3. 結果と考察

1-3-1. MAPキナーゼ破壊株の細胞壁ストレス感受性

アカパンカビは3種類のMAPキナーゼ（MAPK,MAK-1, MAK-2, OS-2）をもっている。まず、これらの各遺伝子破壊株(*Δmak-1*, *Δmak-2*, *Δos-2*)の示す形質をVogel's 最少寒天培地で生育させて野生株と比較した。なお、菌糸形態の異常と生育遅延が認められた破壊株が存在したため、菌糸形態は各菌株が培養シャーレに十分に生育した状態で比較し、生育遅延は野生株の24時間培養後の菌糸生育長に対する各破壊株の菌糸生育比率で示した(Fig. 10)。

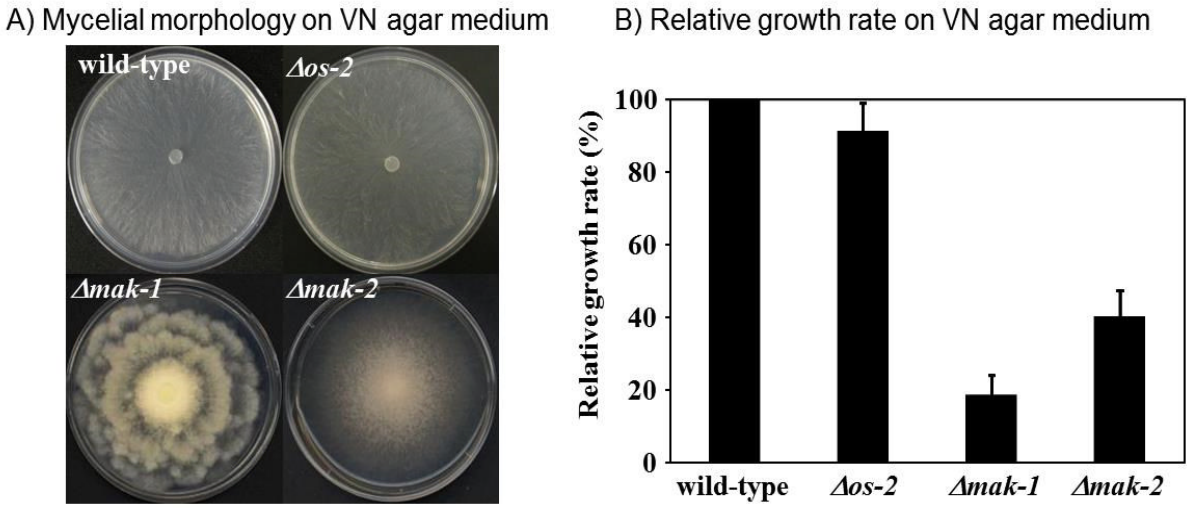


Fig. 10. Comparison of morphology of wild-type, *Δmak-1*, *Δmak-2*, and *Δos-2*.

野生株をVogel's 最少寒天培地上で生育させると、接種源から円形状に菌糸が生育し、培養シャーレに菌糸がいっぱいになるまで(約24時間)は、栄養成長を続け、無性生殖にあたる分生子形成はほどんど認められない。これに対して、出芽酵母のCWI経路のMpk1のオルソログであるMAK-1の破壊株*Δmak-1*は、Fig. 10A に示したように、分生子形成と菌糸伸長が高頻度で繰り返され、その菌叢は特徴的な形態を示した。また、24時間後の野生株の生育度を100%とすると、*Δmak-1*の生育度は20%以下であり、3種類の破壊株の中で最も著しい生育遅延が

認められた (Fig. 10B)。出芽酵母において交配能を制御することで知られるFus3/Kss1のオルソログMAK-2の破壊株*Δmak-2*は、培養開始直後(培地上への接種地点)から分生子形成を伴いながら菌糸を伸長し、菌糸生育は、*Δmak-1*よりは早い生育度を示したが、野生株の40%程度の生育遅延を示した(Fig. 10A, B)。最後に、出芽酵母の浸透圧応答経路のHog1 MAPキナーゼのオルソログであるOS-2の破壊株*Δos-2*は、最少寒天培地上での菌糸生育や形態形成は、野生株と顕著な差は認められなかった(Fig. 10A, B)。

各MAPキナーゼ破壊株の分生子形成を調べるために、分生子形成培地（グリセロール完全培地)に接種後､10日間培養後に形成された分生子数を比較した。

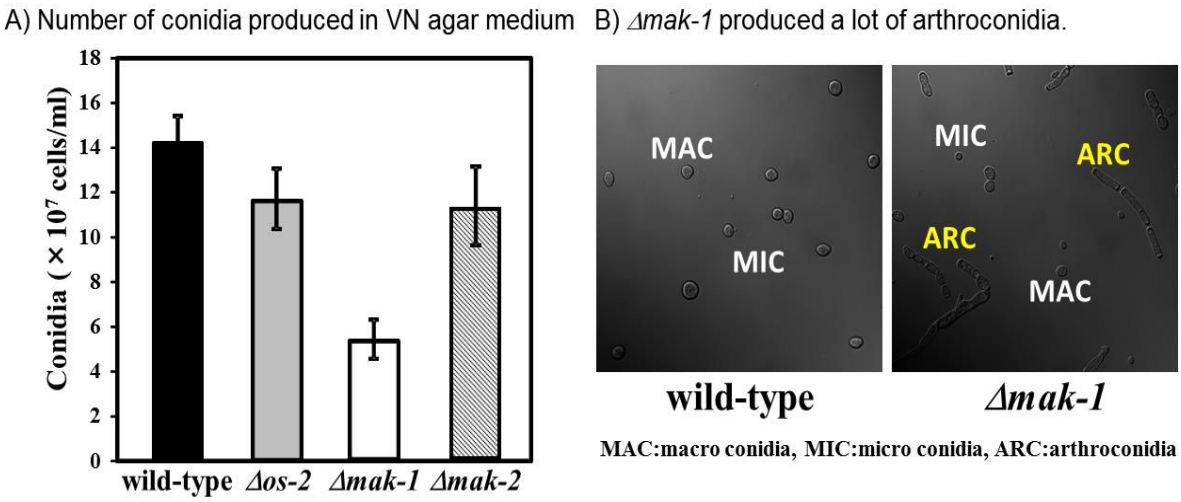


Fig. 11. Conidial morphology in *Δmak-1*.

野生株では、培養あたり約1.4×10^8個/mlの分生子が回収されたが、*Δos-2*及び*Δmak-2*では、野生株よりもやや分生子形成が抑制されていたものの、1.0×10^8個/ml 以上の分生子が回収された。一方、*Δmak-1*は3種類の破壊株の中で最も顕著に分生子形成が抑制され、野生株の半数以下であった(Fig. 11A)。そこで、*Δmak-1*の分生子を顕微鏡で観察した。野生株、*Δos-2*及び *Δmak-2*では、菌糸から直接形成される小型分生子(micro conidia)と分生子柄上に形成される大型分生子(macro conidia)が認められた。一方、*Δmak-1*は正常な2種類の分生子に加えて、一般にはほとんど見られない菌糸様分生子arthroconidiaが数多く形成され

ていた (Fig. 11B)。これらのことから、MAK-1は菌糸生育や分生子形成に必須ではないものの、3種類のMAKキナーゼのうち基礎生育に最も影響の大きいMAPキナーゼであると考えられた。

次に、3種類のMAPキナーゼが細胞壁損傷の修復にどの程度関与しているかを検証するために、各遺伝子破壊株の細胞壁損傷剤に対する感受性を調べた。まず、酵母や*A.nidulans*の研究でCWI経路の活性化を促すことが知られているbeta-1,3-グルカン合成酵素阻害剤に着目し、本研究では、細胞壁を損傷させる薬剤としてアカパンカビに高い抗菌活性を示したmicafunginを採用した。

Micafunginに対する感受性の評価は1/10に段階的に希釈した分生子懸濁液を、薬剤含有培地にスポットしてコロニー形成の有無を観察した(Fig. 12)。その結果、3種類の遺伝子破壊株のうち、*Δos-2*は、野生株と同等の感受性を示した。一方、*Δmak-1*と *Δmak-2*は、beta-1,3-グルカン合成酵素阻害剤micafunginに対して、野生株よりも高い感受性を示すことが明らかになった。両者の比較では、当初CWI経路に最も関与していると予測していた*Δmak-1*よりも有性生殖に関与する*Δmak-2*の方がより顕著なmicafungin感受性を示した(Fig. 12)。

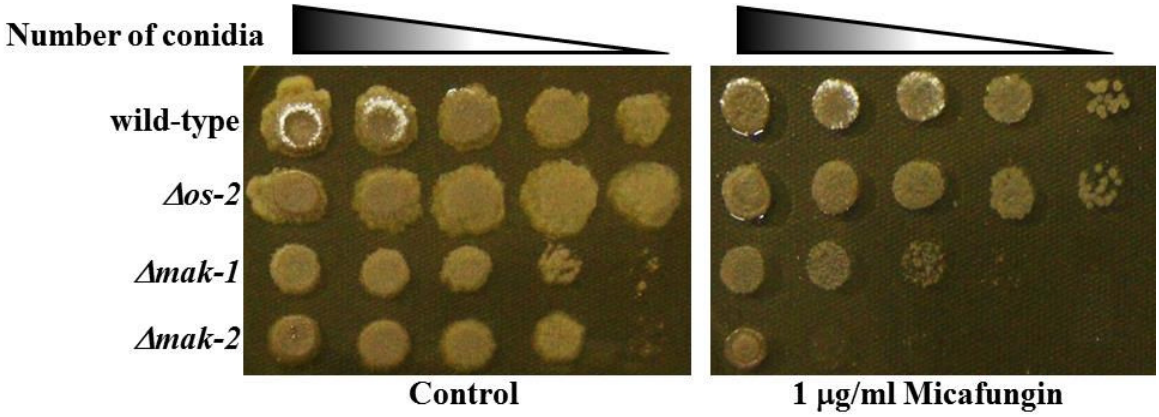


Fig. 12. Sensitivity of 3 MAPK disruptants to micafungin.

MAPキナーゼはMAPKKキナーゼとMAPKキナーゼからなるMAPキナーゼカスケードを形成する。MAPキナーゼの活性化にはこの上流にあたるMAPKKキナ

ーゼとMAPKキナーゼが必要である。このことから、MAK-1カスケードの破壊株である*Δmik-1*（MAPKKキナーゼ）、*Δmek-1*（MAPKキナーゼ）についてもmicafungin感受性試験を行ったところ、*Δmak-1*と同レベルの感受性を示すことが明らかになった。さらに、MAK-2カスケードの破壊株である*Δnrc-1*（MAPKKキナーゼ）、*Δmek-2*（MAPKキナーゼ）も、*Δmak-2*と同レベルの顕著なmicafungin感受性が認められた(Fig. 13)。

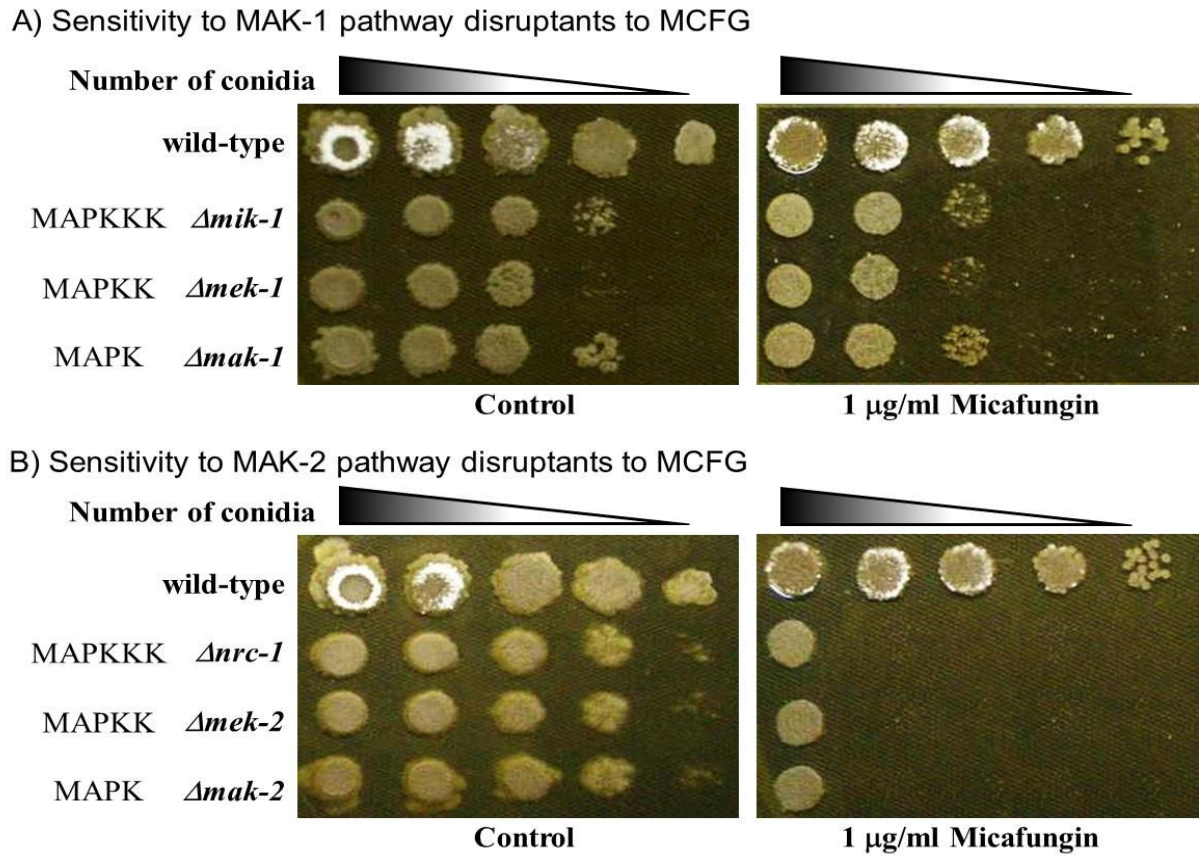


Fig. 13. Sensitivity of MAK-1 or MAK-2 pathway disruptants to micafungin.

micafungin以外の細胞壁損傷剤について、*Δmak-1*及び *Δmak-2*が感受性を示すかについて検討した。その結果、界面活性剤であるSDS (sodium dodecyl sulphate)に対しても*Δmak-1*及び *Δmak-2*は高感受性を示すことが明らかになった(Fig. 14)。キチン生合成阻害剤であるpolyoxin Dにも*Δmak-1*が感受性を示した。しかし、興味深いことに、*Δmak-2*はpolyoxin Dにはほとんど感受性を示さなか

った。キチンやグルカンに結合して生育を阻害するタイプの薬剤である Calcofluor White (CFW)やCongo Red (CR)に対しては、*Δmak-1*と *Δmak-2*のいずれも感受性を示さなかった。ただし、アカパンカビは他の糸状菌類と比べて、CFW やCR に対して強い耐性を示しており、薬剤の溶解限界の高濃度でも野生株の生育にほとんど影響が認められなかったことから、これらの剤に対する破壊株の影響を正当に評価できていない可能性もある。なお、*Δos-2*は、いずれの細胞壁損傷剤に対しても野生株と同程度の感受性を示し(data not shown)、細胞壁損傷剤に対する応答にOS-2は関与していないと考えられた。

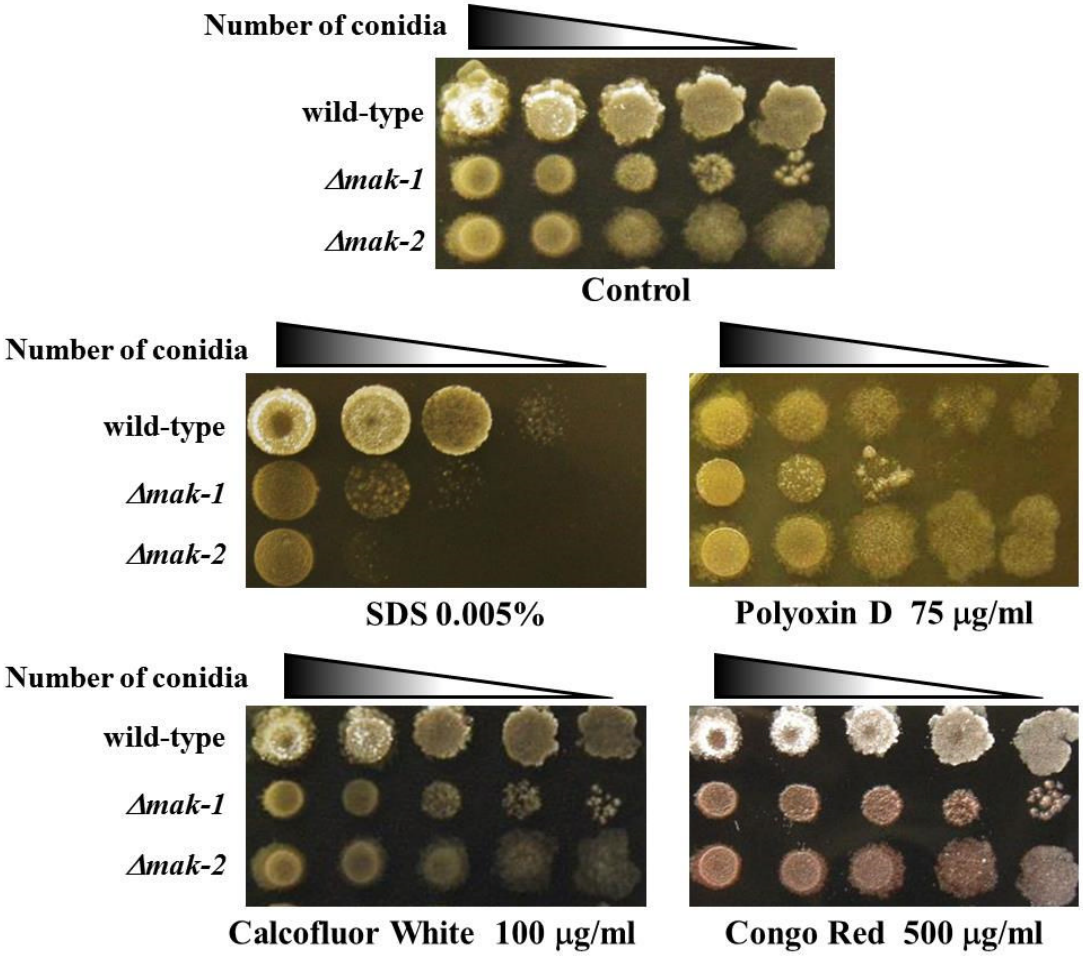


Fig. 14. Sensitivity of *Δmak-1* and *Δmak-2* to cell wall damaging agents.

以上をまとめると、3種類のMAPキナーゼの遺伝子破壊株のうち、*mak-1*欠損が菌糸生育や分生子形成に比較的大きな影響を与える。一方、細胞壁損傷剤に

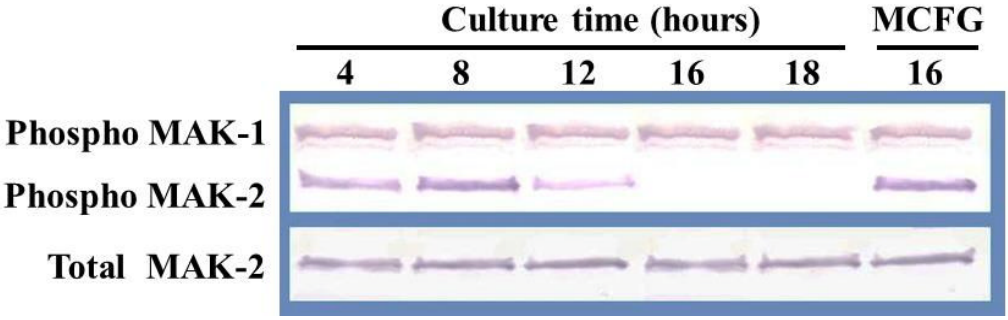
対する感受性は、*Δmak-1*と*Δmak-2*の両者が、少なくともmicafunginやSDSに対して感受性となった。特に、*Δmak-1*よりも*Δmak-2*の方がより強い感受性を示すという意外な結果が得られた。さらに、*Δmak-1*はpolyoxin Dに対しても高感受性であった。このことは、MAK-1とMAK-2がCWIに何らかの役割を果たしている可能性を示唆している。何故、polyoxin Dに対しては、*Δmak-1*のみが感受性を示したかについては現時点では推測の域をでないが、MAK-1はキチン合成不全に応答する可能性も考えられる。なお、細胞壁損傷剤に対する感受性試験からは、OS-2は細胞壁損傷に対する応答への貢献度は低いものと考えられた。

1-3-2. MAK-1とMAK-2 のリン酸化解析

MAPキナーゼは特定のアミノ酸がリン酸化されて活性化される。そこで、MAK-1およびMAK-2が細胞壁損傷剤micafunginによりリン酸化を受けるかを検討した。まず、MAK-1とMAK-2をウェスタンブロッティング法により検出するための抗体(材料と方法参照)の特異性を野生株、*Δmak-1*および*Δmak-2*から調製したタンパク質を使用して検証した。リン酸化の有無に関わらず、MAK-1及びMAK-2を検出できる一次抗体について、市販されている動物のMAPキナーゼERK-1やERK-2を認識する抗体を用いて調べた。その結果、Anti-MAP kinase (ERK1, ERK-2) antibody produced in rabbit (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, M5670)を用いるとMAK-2を特異的に検出できることが確認された。一方、入手可能ないずれの抗体もMAK-1を検出することはできなかった。現段階では、リン酸化されたMAK-1は検出できるが、MAK-1タンパク量を見積もることはできない。これらの抗体を使用してウェスタンブロッティング法により、micafungin処理条件下におけるMAK-1とMAK-2のリン酸化レベルを解析した。

分生子の発芽から菌糸生長過程におけるMAK-1及びMAK-2のリン酸化レベルを明らかにするため、まず、野生株をVM培地にて室温で振盪培養し、培養開

始から4時間ごとに回収した菌体からタンパク質を調製して、MAK-1及びMAK-2のリン酸化レベルを検出した(Fig. 15)。その結果、MAK-1は、分生子の発芽4時間から18時間の菌糸生育において、顕著なリン酸化が認められた。Total MAK-1を検出できる抗体がないため、MAK-1量の変動との関係は不明であるが、少なくともこの栄養増殖期間でのリン酸化に変動は認められなかった。一方、MAK-2も培養4時間 (胞子発芽)から8時間までは顕著なリン酸化が検出されたが、12時間でやや減少し、16～18時間ではMAK-2のリン酸化は、ほぼ完全に消失した(Fig. 15)。なお、Total MAK-2量に変動は認められなかった。



*MCFG：1μg/ml micafungin

Fig. 15. Phosphorylation level of MAK-1 and MAK-2 from conidial germination to hyphal development in wild-type strain.

このことから、MAK-1は栄養成長において構成的に活性化されており、一方、MAK-2のリン酸化は生育過程による影響を受けることが明らかになった。出芽酵母のMpk1 MAPキナーゼは細胞壁の損傷によってリン酸化(活性化)し、下流の細胞壁合成酵素遺伝子群の発現誘導により、CWI経路が活性化される(Jung *et al.*, 1999; Levin, 2005, 2011)。そこで、アカパンカビにおいてもMAK-1が細胞壁の損傷によってリン酸化するのかを検証した。野生株, *Δmak-1*株, *Δmak-2*株を16時間培養した菌糸体に1 μg/ml micafunginを2時間処理し、無処理のリン酸化状態と比較解析した。MAK-1は野生株の菌糸生長過程において無処理でも顕著に活性化されており、micafungin処理によりMAK-1のリン酸化シグナルが強くなることはなかった。ただし、Park *et al.*, (2008)は、MAK-1のリン酸化レベルは、

micafunginと同様の作用機作を示すaculeacin A (beta-1,3-グルカン合成酵素阻害剤)処理によって上昇することを報告している。回数を重ねて試験を行ったが、本研究では野生株の無処理条件のリン酸化レベルが強く、micafungin処理によるリン酸化レベルの増加は認められなかった。一方、Fig. 15に示した通り、MAK-2のリン酸化は、培養16時間後の菌糸にmicafungin処理を2時間行ったところ、顕著なリン酸化が認められた (Fig. 15)。次に、MAK-1カスケードの各破壊株(*Δmik-1*, *Δmek-1*, *Δmak-1*)とMAK-2カスケードの各破壊株(*Δnrc-1*, *Δmek-2*, *Δmak-2*)を用いてMAK-1とMAK-2のリン酸化レベルを検証した(Fig. 16)。

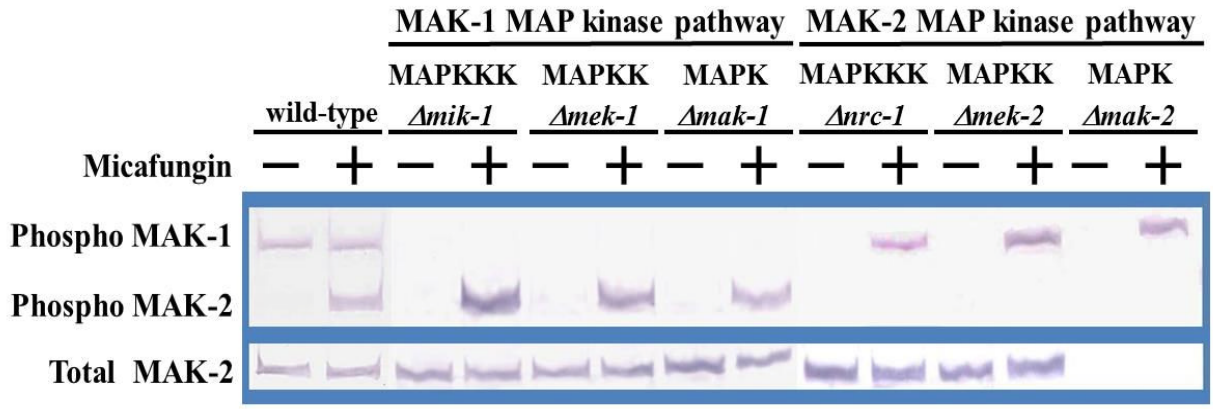


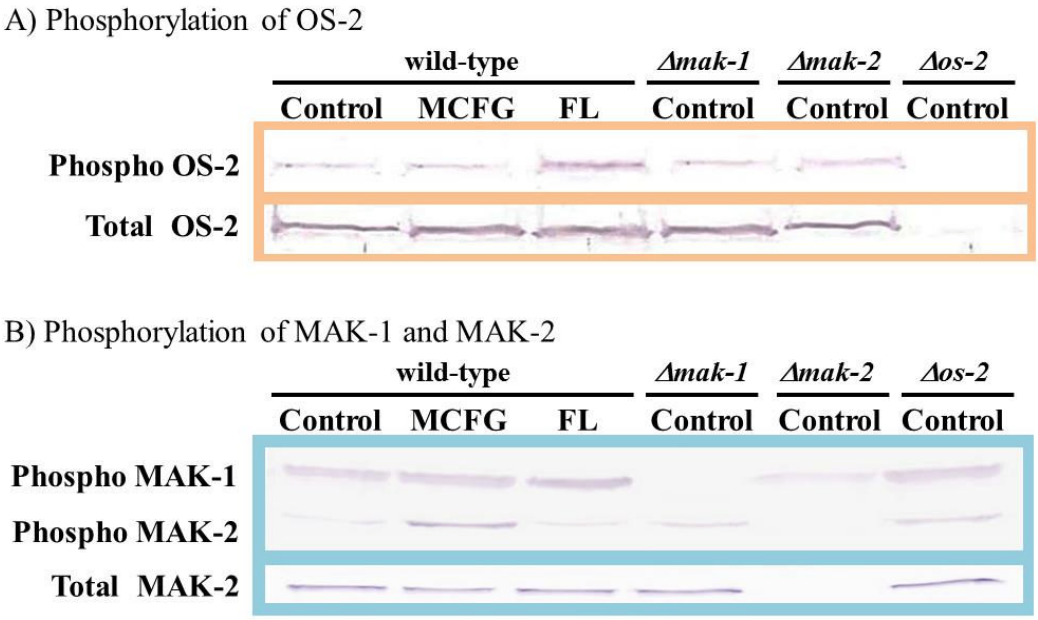
Fig. 16. Phosphorylation level of MAK-1 and MAK-2 in wild-type, *Δmik-1*, *Δmek-1*, *Δmak-1*, *Δnrc-1*, *Δmek-2*, and *Δmak-2*.

MAK-2は野生株の菌糸では活性化されていなかったが、micafungin処理によってリン酸化が誘導された。同様の現象は、MAK-1カスケードの各破壊株(*Δmik-1*, *Δmek-1*, *Δmak-1*)においても認められ、micafungin処理によってMAK-2は顕著にリン酸化された。このMAK-2のリン酸化は、*Δmak-2*のみならず、MAK-2カスケードの破壊株(*Δnrc-1*, *Δmek-2*)でも完全に消失した。以上のことから、MAK-2はmicafunginによる細胞壁の損傷に応答してリン酸化されるが、そのリン酸化は、MAK-2カスケードのMAPKKK (NRC-1), MAPKK (MEK-2)に依存的していることが明らかになった。

一方、MAK-1は野生株の菌糸では無処理でもリン酸化されていたが、そのリ

ン酸化は*Δmak-1*のみならず、*Δmik-1*と*Δmek-1*でも完全に消失した。MAK-1カスケードの各破壊株にmicafunginを処理してもMAK-1のリン酸化は認められなかった。このことから、MAK-1のリン酸化はMAK-2の場合と同様に、同一カスケード内のMAPKKK (MIK-1)とMAPKK (MEK-1)が必須であることが明らかになった。興味深いことに、野生株の菌糸で認められたMAK-1の恒常的なリン酸化が、MAK-2カスケードの3種類の破壊株(*Δnrc-1, Δmek-2, Δmak-2*)ではほぼ完全に消失した。さらに、これらの破壊株にmicafunginを処理すると、顕著にリン酸化されたMAK-1を示すバンドが検出された。

次に、浸透圧応答に関与するOS-2の細胞壁の損傷に応答するのかについても検証した。その結果、OS-2のリン酸化は、OS-2活性化剤である殺菌剤fludioxonilにより誘導されたが、micafungin処理ではリン酸化されなかった(Fig. 17A)。また、MAK-1及びMAK-2のリン酸化レベルのfludioxonil処理による変動は認められなかった(Fig. 17B)。このことから、MAK-1やMAK-2は殺菌剤や浸透圧への応答にほとんど関与していないことが考えられる。



*MCFG : 1μg/ml micafungin, 2hrs, FL : 1μg/ml fludioxonil, 30min

Fig. 17. Effect of fludioxonil on phosphorylation status of 3 MAPKs.

以上のことから、MAK-1とMAK-2は、共に、micafungin処理による細胞壁ス

トレスに応答して活性化（リン酸化）されることが明らかになった。両MAPキナーゼの破壊株が、micafungin感受性を示したことを考え併せると、この2つの経路は、CWIの制御に関与していることを強く示していると考えられる。一方、OS-2はmicafungin感受性試験およびリン酸化解析からmicafunginによる細胞壁ストレス応答には関与しないと考えられた。さらに、本研究により、栄養生長におけるMAK-1の恒常的なリン酸化に、MAK-2カスケードが必要であることを見出した。このことは、MAK-1経路とMAK-2経路との間にクロストークが存在することを示唆している。どのように両経路がクロストークしているのかについては、MAK-1およびMAK-2のリン酸化にはそれぞれのカスケードの因子が必須であったことから、両カスケード間での直接的なのクロストークとは考えられず、今後の研究を待たなければならない。しかし、今回の結果は両経路間にクロストークが存在することを生化学的に立証した初めての報告である。なお、micafungin（beta-1,3-グルカン合成酵素阻害剤）による細胞壁の損傷シグナルはOS-2の活性化にほとんど影響を与えなかったことから、細胞壁損傷への応答に対するOS-2の貢献度は低いと推定された。

1-3-3. 細胞壁合成酵素遺伝子の発現解析

前節までの結果から、MAK-1とMAK-2が細胞壁の損傷ストレスに応答し、CWIに関与する可能性が示唆された。そこで、MAK-1とMAK-2が細胞壁合成酵素遺伝子群の発現制御に関与しているかを調べた。まず、細胞壁合成に重要であると考えられる12種類の酵素遺伝子を選抜して、野生株、*Δmak-1*及び*Δmak-2*における遺伝子発現量を定量RT-PCRにより比較した。なお、選抜した12種類の細胞壁合成遺伝子は、糸状菌*A. nidulans* において、グルカンやキチン合成に関わる酵素であることが報告されている遺伝子のホモログである(Table 5)。

Table 5.　List of selected cell wall synthase genes in this study

N. crassa			Homologous to *A. nidulans*	
Genes	NCU locus[a]	Putative gene product	Genes	ANID[b]
ags-1	NCU02478	alpha-1,3-glucan synthase Ags2	*agsA*	ANID_05885
ags-2	NCU08132	alpha-1,3-glucan synthase Ags2	*agsB*	ANID_03307
fks-1	NCU06871	1,3-beta-glucan synthase component GLS1	*fksA*	ANID_03729
gel-1	NCU01162	glycolipid-anchored surface protein 5	*gelA*	ANID_07657
gel-2	NCU06781	1,3-beta-glucanosyltransferase Gel2	*gelB*	ANID_00558
gfa-1	NCU11350	glucosamine-fructose-6-phosphate aminotransferase	*gfaA*	ANID_10709
chs-1	NCU05239	chitin synthase A	*chsA*	ANID_07032
chs-2	NCU03611	chitin synthase-1	*chsB*	ANID_02523
chs-3	NCU04251	chitin synthase-3	*chsC*	ANID_04566
chs-4	NCU09324	chitin synthase-4	*chsD*	ANID_01555
chs-5	NCU04352	chitin synthase-5	*csmA*	ANID_06318
chs-7	NCU04350	chitin synthase-7	*csmB*	ANID_06317

[a)] Gene locus ID in *Neurospora crassa* database (Broad Institute)

[b)] Gene locus ID in *Aspergillus* database (Broad Institute)

発現解析の結果をTable 6に示した。表中の数値は、定量RT-PCR解析のCP値を示しており、各プライマーのPCR効率に大きな差がなかったため、基本的に数値が小さいほど高い発現量であることを示している。これまでの経験から、本研究で使用した条件では、CP値が30サイクルを超えるとほどんど発現していないことが考えられる。まず、野生株の分生子を培養し、16時間後の菌糸体における各遺伝子の発現量を解析した。無処理での発現量は、*gel-1* を除く11種類の遺伝子のCP値は30サイクル以下であることから、比較的高発現していることが明らかになった。次に、micafungin処理によりこれらの12種類の細胞壁合成酵素遺伝子の転写量に与える影響を調べた。いずれの遺伝子も無処理とmicafungin処理のCP値の差（*Δ*CP値）は2サイクル以内であり、発現量の変化が4倍を超える遺伝子はなかった。しかし、micafungin処理によって*ags-1, fks-1, gfa-1, chs-2,* 及び*chs-3*の転写量が2～3倍、そして*chs-4, chs-5,* 及び *chs-7* の転写量が2倍未満ではあるがわずかに上昇した。

*Δmak-1*および*Δmak-2*においても同様に12遺伝子の発現解析を行った。両破壊株の無処理における発現量は、野生株と良く一致しており、MAK-1とMAK-2は

これらの遺伝子の基礎発現には関与していないことが明らかになった。しかし、micafungin処理をした*Δmak-1*においては、野生株で認められた*ags-1, fks-1, gfa-1, chs-2, chs-3, chs-4, chs-5, chs-7*の発現誘導が、減少あるいは消失した。一方、*Δmak-2*では、野生株でmicafungin処理により2倍以上の発現が誘導された5遺伝子*ags-1, fks-1, gfa-1, chs-2, chs-3*のうち*chs-3*以外の誘導は野生株と同様に認められたため、これらの遺伝子の誘導にMAK-2は関与していないと結論された。

Table 6. Expression analysis of 12 cell wall biogenesis-related genes by quantitative real-time RT-PCR (CP values [a]).

	Wild-type			*Δmak-1*			*Δmak-2*		
Genes	Control	Micafungin[b]	ΔCP[c]	Control	Micafungin[b]	ΔCP[c]	Control	Micafungin[b]	ΔCP[c]
ags-1	26.2 (0.1)	24.8 (0.1)	1.4 (0.2)	27.0 (0.1)	26.5 (0.4)	0.5 (0.5)	27.0 (0.4)	25.7 (0.8)	1.3 (0.5)
ags-2	26.8 (0.1)	26.5 (0.2)	0.3 (0.2)	27.0 (0.1)	27.1 (0.0)	-0.1 (0.1)	26.9 (0.3)	26.8 (0.4)	0.1 (0.4)
fks-1	23.5 (0.2)	22.4 (0.2)	1.1 (0.2)	23.9 (0.2)	23.7 (0.5)	0.2 (0.3)	24.0 (0.3)	23.0 (0.3)	1.0 (0.6)
gel-1	32.3 (0.2)	31.4 (0.5)	0.9 (0.4)	32.6 (0.7)	31.9 (0.8)	0.7 (1.3)	32.7 (0.3)	32.5 (0.4)	0.2 (0.7)
gel-2	25.5 (0.3)	25.4 (0.1)	0.1 (0.2)	25.5 (0.2)	26.1 (0.7)	-0.6 (0.5)	25.8 (0.4)	25.7 (0.2)	0.1 (0.6)
gfa-1	24.0 (0.1)	22.8 (0.2)	1.2 (0.1)	24.8 (0.1)	24.6 (0.3)	0.2 (0.3)	24.0 (0.7)	23.0 (1.0)	1.0 (0.5)
chs-1	28.9 (0.2)	28.6 (0.1)	0.3 (0.2)	28.9 (0.1)	28.9 (0.3)	0.0 (0.2)	29.3 (0.4)	29.1 (0.6)	0.2 (0.6)
chs-2	25.7 (0.1)	24.4 (0.1)	1.3 (0.1)	25.8 (0.1)	25.4 (0.3)	0.4 (0.4)	26.7 (0.6)	25.7 (0.9)	1.0 (1.1)
chs-3	25.8 (0.2)	24.8 (0.3)	1.0 (0.2)	25.8 (0.2)	25.2 (0.3)	0.6 (0.3)	26.6 (0.7)	26.4 (0.8)	0.2 (0.7)
chs-4	24.9 (0.1)	24.2 (0.2)	0.7 (0.1)	24.9 (0.2)	25.1 (0.3)	-0.2 (0.3)	25.8 (0.7)	25.6 (1.0)	0.2 (0.9)
chs-5	26.3 (0.3)	25.7 (0.1)	0.6 (0.1)	26.6 (0.2)	27.0 (0.5)	-0.4 (0.4)	27.1 (0.5)	26.6 (0.9)	0.5 (0.7)
chs-7	23.6 (0.2)	22.8 (0.2)	0.8 (0.2)	23.7 (0.1)	24.1 (0.2)	-0.4 (0.2)	24.5 (0.6)	24.2 (0.9)	0.3 (0.7)
mak-1	32.5 (0.1)	32.6 (0.3)	-0.1 (0.3)	ND[d]	ND[d]	ND[d]	32.6 (0.1)	32.5 (0.2)	0.1(0.3)
mak-2	22.4 (0.2)	22.3 (0.1)	0.1 (0.2)	22.7 (0.1)	22.5 (0.3)	0.2 (0.3)	ND[d]	ND[d]	ND[d]
actin[e]	20.8 (0.3)	20.4 (0.2)	0.4 (0.3)	20.9 (0.1)	21.0 (0.3)	-0.1 (0.3)	20.8 (0.2)	20.9 (0.3)	-0.1(0.3)

The values given in parentheses indicate standard deviation.

[a] The average crossing point values (CP) in quantitative real-time RT-PCR analysis in three replicated experiments.

RNA samples (total RNA 50 ng) of untreated control in the indicated strains were subject toone-step PCR amplification.

[b] Micafungin : 1 μg/ml micafungin treatment for 2 hours

[c] ΔCP : CP value (control) – CP value (the treated sample)

[d] ND : not detected

[e] *actin* : Relative expression of *actin* gene was shown as reference.

以上のことから、主要な細胞壁合成酵素遺伝子は、micafungin処理によって弱いながら誘導され、その発現誘導の幅が小さいことから各遺伝子の誘導の有無には信頼性にやや問題があるものの、全体的な傾向は明確であり、MAK-1が細胞壁の損傷に応答して、これらの細胞壁合成遺伝子群の発現制御に関与すると考えられる。ただし、これらの遺伝子の多くは恒常的に高発現しており、その基礎発現はMAK-1の制御を受けないことが明らかになった。

1-3-4. MAK-1, MAK-2により制御される遺伝子の同定

細胞壁合成関連遺伝子として選抜した12遺伝子は、必ずしもmicafungin処理による誘導が顕著でなかったことから、マイクロアレイ法を用いて、細胞壁の損傷に応答する遺伝子群を探索した。前項と同様に、野生株の菌糸体にmicafungin処理してRNAを調製し、無処理と比べて発現量が変動する遺伝子群を網羅的に解析した。遺伝子発現プロファイルではノイズスポットをできるだけ除外するため、micafungin 処理時の菌糸体由来のmRNA シグナル(Cy5 signal)数値が600以上、かつlog (Cy5/Cy3) signal (treated vs. untreated) ≧0.40の遺伝子をmicafungin誘導遺伝子群とし、23種類の遺伝子を選抜した(Table 7)。

Table 7. Microarray analysis of genes up-regulated by micafungin treatment in wild-type strain

NCU locus	Genes	LogRatio Cy5/Cy3	Cy3 Signal Control	Cy5 Signal Micafungin	qRT-PCR	Putative function of protein
NCU00035	*dga-1*	1.04	138	1560	－	diacylglycerol O-acyltransferase
NCU07817	*ncw-3*	1.00	119	1186	+	non-anchored cell wall protein-3
NCU07517	*tdt-1*	0.93	1123	6850	+	related to C4-dicarboxylate transport protein
NCU00399	*phiA*	0.90	390	3893	+	cell wall protein phiA
NCU06114		0.86	530	3808	NT	hypothetical protein
NCU02164		0.78	423	2434	NT	hypothetical protein
NCU09937	*gh76-5*	0.77	243	1320	+	glycosylhydrolase family 76-5
NCU09263	*acw-4*	0.75	438	2760	NT	anchored cell wall protein-4
NCU07253	*gel-4*	0.63	551	2802	+	1,3-beta-glucanosyltransferase gel1
NCU07920	*lcc2*	0.57	470	1527	NT	related to laccase 2
NCU09175	*egl-1*	0.52	2436	8743	+	GPI-anchored cell wall beta-1,3-endoglucanase
NCU05395		0.51	1293	4656	NT	hypothetical protein
NCU03992		0.48	1875	5788	NT	fimbrin
NCU03605		0.47	496	1440	NT	amidohydrolase
NCU09024		0.45	467	979	NT	hypothetical protein
NCU03611	*chs-2*	0.44	430	1106	+	chitin synthase-1
NCU08897		0.43	2026	5222	NT	protein transporter SEC61 subunit alpha
NCU05137	*ncw-1*	0.42	493	1554	+	non anchored cell wall protein-1
NCU08607		0.42	682	1770	NT	ER-Golgi intermediate compartment protein 3
NCU06773		0.41	464	1190	NT	hypothetical protein
NCU07569		0.41	408	1194	NT	hypothetical protein
NCU00811		0.40	4485	11208	NT	hypothetical protein
NCU06327		0.40	581	1631	NT	benzoate 4-monooxygenase cytochrome P450

These genes were selected by the following condition; ≧0.4 LogRatio of micafungin treated/untreated signal intensity (Cy5 signal/Cy3signal) and ≧900 treated signal intensity. +: up-regulation confirmed by qRT-PCR, －: up-regulation not detected by qRT-PCR, NT: not tested

これらの遺伝子群の中には、前項（Table 6）でmicafungin処理によって発現量が約2倍上昇することを確認した*chs-2* (chitin synthase-2) が含まれていた。この23種類の遺伝子群の中から、そのアミノ酸配列がCWI に関連する可能性が高いと考えられる遺伝子群に着目し、*chs-2* を除き、さらに8種類の遺伝子(*dga-1, ncw-3, tdt-1, phiA, gh76-5, gel-4, egl-1, ncw-1*)に着目した。これら8種類の遺伝子発現量を定量RT-PCRにより確認するとともに、各遺伝子の発現誘導がMAK-1とMAK-2の制御を受けているのかを検証した(Fig. 18)。

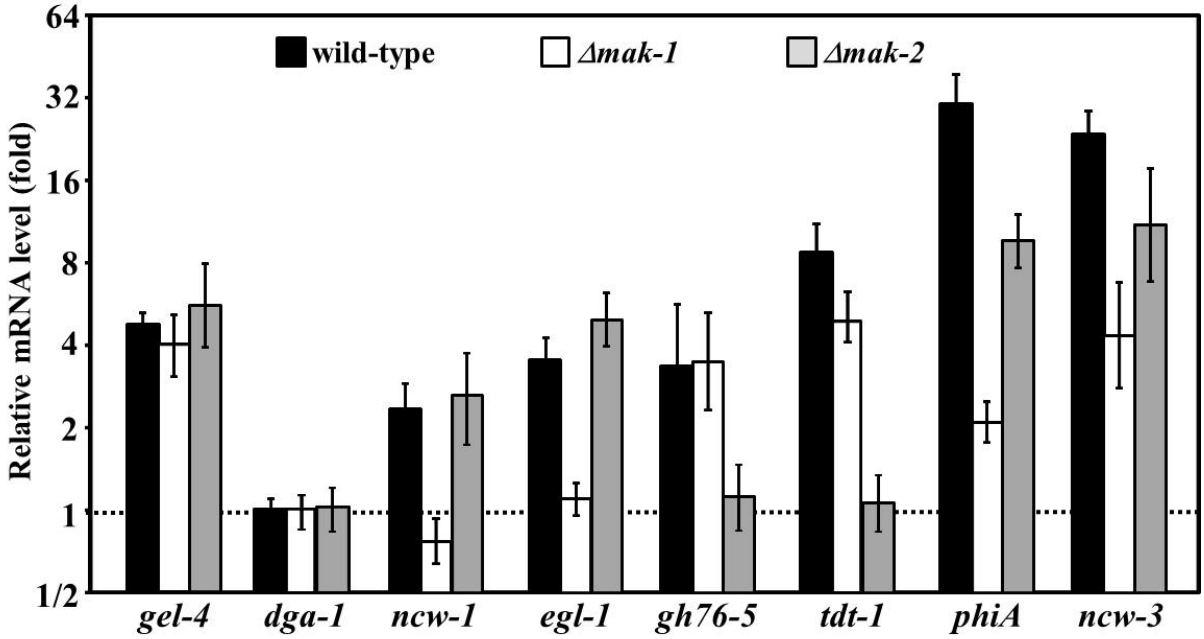


Fig. 18. Micafungin誘導遺伝子のMAK-1, MAK-2依存性

縦軸：無処理条件の発現量に対する micafungin 処理条件下の相対的発現量

その結果、*dga-1*を除く7種類の遺伝子が野生株において、micafungin処理により発現量が少なくとも2倍以上、上昇した。細胞壁合成においてbeta-1,3-glucanの側鎖の伸長に必要となるbeta-1,3-glucanosyltransferaseをコードする*gel-4*は、micafungin処理によって発現量が少なくとも4倍以上上昇した。この誘導は、*Δmak-1*や*Δmak-2*でも認められたことから、MAK-1とMAK-2の制御を受けいていない誘導であることが明らかになった。一方、*ncw-1* (non-anchored cell wall

protein-1)と*egl-1* (GPI-anchored endo-glucanase)は、micafungin処理によって転写量が2倍上昇し、この発現誘導は野生株のみでなく*Δmak-2*でも同様に認められたが、*Δmak-1*においては完全に消失した。従って、*ncw-1*と*egl-1*の2遺伝子の発現誘導は、MAK-1依存的に制御されていることが明らかになった。対照的に、*gh76-5* (alpha-1,6-mannanase)と*tdt-1* (putative C4-dicarboxylate transporter/malic acid transport protein) の発現量は、野生株と*Δmak-1*においては、micafungin処理によって4倍以上上昇したが、*Δmak-2* ではmicafungin処理条件下でも転写量の増加は認められなかった。このことから、*gh76-5, tdt-1*の発現誘導はMAK-2に依存的であることが判明した。また、micafungin処理によって、cell wall protein phiAをコードする*phiA*とnon-anchored cell wall protein-3をコードする*ncw-3*の発現量が20倍以上上昇した。これら2種類の遺伝子(*phiA, ncw-3*)のmicafungin処理による発現誘導は、*Δmak-1*や*Δmak-2* においても認められたが、野生株における誘導に比べて、*Δmak-1*や*Δmak-2*の両方で顕著に低下していた。この遺伝子は、MAK-1とMAK-2の両方に制御されている可能性が考えられた。*mak-1*と*mak-2*の二重変異株で両遺伝子の誘導が完全に消失するかに興味が持たれるが、*Δmak-2*が有性不稔であることから二重変異株の作製が容易ではなく未達であるが、MAK-1経路とMAK-2経路との間にクロストークが存在することとの関連からも興味深い。

1-3-5. MAK-1, MAK-2の細胞内局在解析

糸状菌の栄養成長では、菌糸の分岐を伴いながら菌糸先端で伸長生長する。このことから、細胞壁合成制御をともなうCWIの研究には、細胞学的な知見が求められる。アカパンカビでもGFPやYFPに代表される蛍光タンパク質と目的のタンパク質との融合タンパク質を産生する形質転換体が作出され、蛍光顕微鏡を用いた細胞学的解析が進められている。特にアカパンカビは糸状菌の中で

も、このような手法による特定タンパクの局在解析が最も進んでおり、シグナル伝達経路の構成因子の局在解析も例外ではない。アカパンカビの3種類のMAPキナーゼのうち、MAK-2はCATsと呼ばれる発芽管先端間の細胞間相互作用において、その先端部に局在し、先端間の融合において化学的シグナルの授受に関与していることがGFPを用いた細胞学的解析により明らかになっている(Fleissner *et al.*, 2009; Fu *et al.*, 2011; Dettmann *et al.*, 2013)。また、3種類のMAPキナーゼは、protoperitheciaの形成過程ではその中央部分に多く局在することが示されている(Lichius *et al.*, 2012)。MAPキナーゼは、90年代の哺乳類培養細胞を用いた研究によって、細胞を増殖因子による刺激によって活性化したとき、MAPキナーゼが一過的に細胞質から細胞核へと局在を変化させることが明らかにされている(Chen *et al.*, 1992; Lenormand *et al.*, 1993)。そこで、MAK-1とMAK-2の局在性がどう変化するのかを調べるため、まず、*mak-1*および*mak-2*遺伝子の下流にそれぞれ*sgfp*（改良型GFP）および*yfp*遺伝子を連結したキメラ遺伝子をもつプラスミドを構築した。各プラスミドをアカパンカビの*his-3*座に組み込んだ形質転換体(MAK-1-sGFP株、MAK-2-YFP株)を作出し、MAK-1とMAK-2の細胞内局在性を共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

その結果、MAK-1-sGFPの蛍光はVM培地上に生育した菌糸では細胞内にスポット状に点在しており、局在化が認められた。糸状菌は、多核の生物であり細胞内に多数の核を有する。また、MAKキナーゼは活性化されると核に局在化することが良く知られていることから、MAK-1を示すGFP蛍光が核に存在しているかを検証した。核染色に使用されるDAPIとの二重染色を行った結果、GFP蛍光（緑）とDAPI蛍光(青)のパターンが一致した(Fig. 19)。このことから、MAK-1は、通常の生育条件下の菌糸では、細胞核に局在化していることが明らかになった。micafungin処理によって細胞壁に損傷を引き起こした場合、菌糸先端の顕著な形態異常が認められたが、このMAK-1の核局在に変化は見られなかった

(Fig. 20)。また、菌糸先端部や隔壁孔などの部位や他のオルガネラなどへの局在は見られなかった。これらのことから、MAK-1は少なくともVM培地条件下の栄養増殖期には核への局在性が高いことが明らかになった。このことは、ウェスタン解析においてMAK-1が構成的にリン酸化されていたことと考え合わせると、活性化されたMAK-1は核に局在すると考えられる。

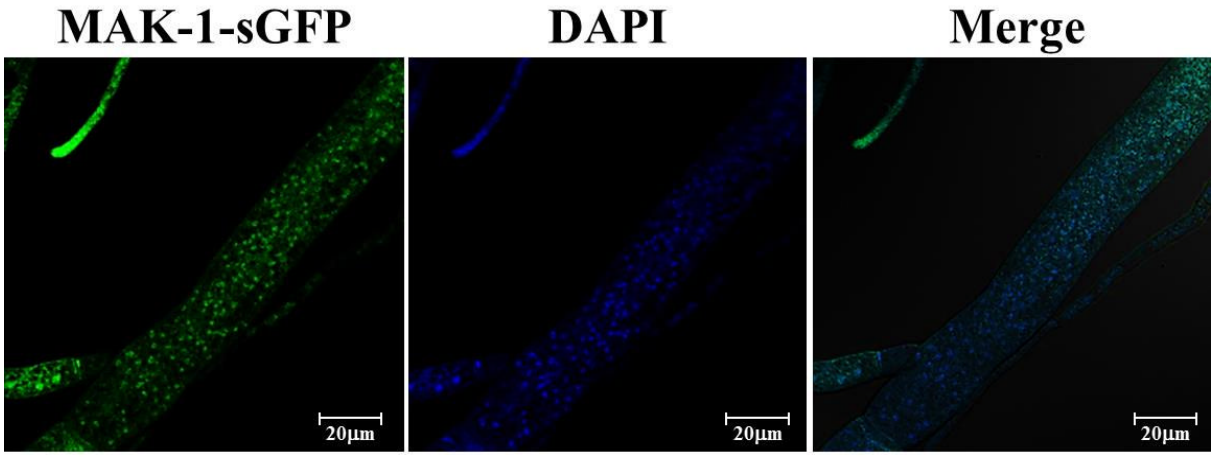


Fig. 19. MAK-1 localization on Vogel's agar medium.

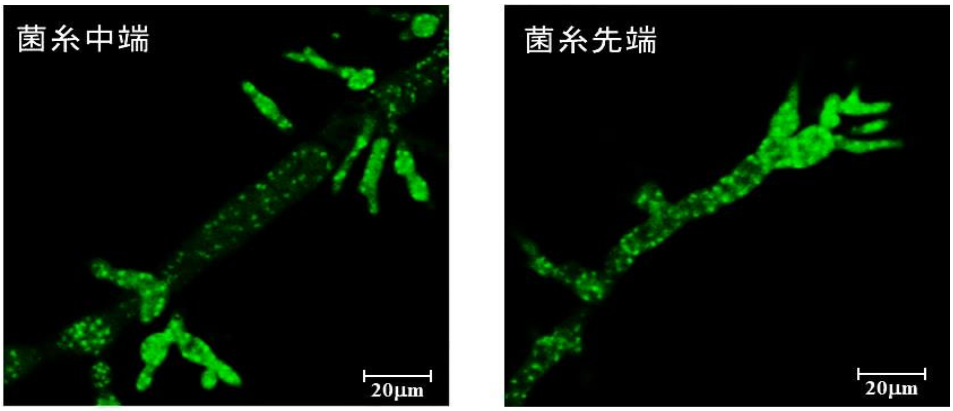


Fig. 20. MAK-1 localization in micafungin-treated mycelia.

次に、MAK-2-YFP株を用いて、MAK-2の局在性について解析した。VM培地上では、MAK-1と異なり、菌糸の先端部や隔壁といった特定箇所への局在は認められず、液胞を除く細胞質に均一に分布しており、MAK-2-YFP蛍光（黄）は細胞質に散在していた(Fig. 21)。

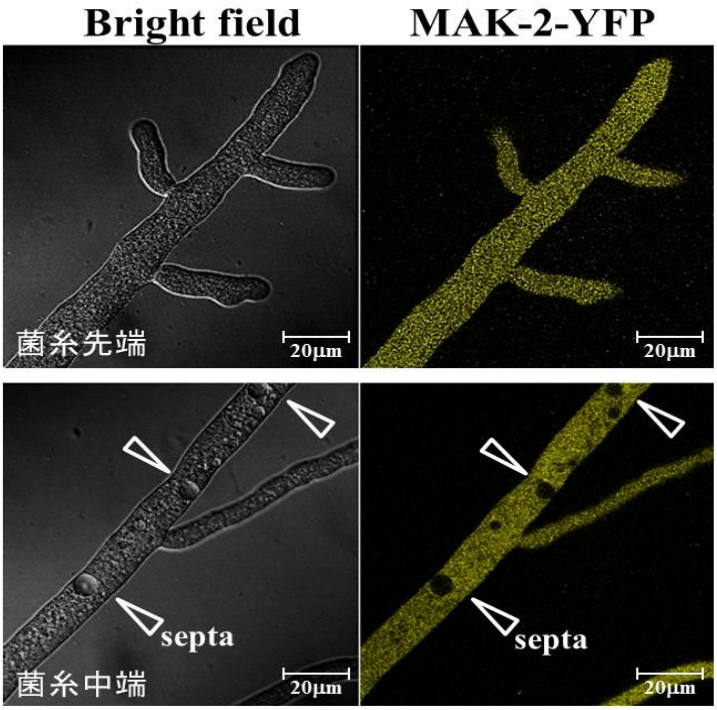


Fig. 21. MAK-2 localization on Vogel's agar medium.

しかし、Fig. 22Aに示す通り、micafunginによる細胞壁の損傷処理によって形態変化の生じた菌糸では、MAK-2-YFPは、細胞核への局在化が認められた。このことから、細胞壁の損傷によってMAK-2-YFPは細胞核へと移行することが明らかになった。また、micafungin処理によって著しく細胞壁が損傷を受けた菌糸では、隔壁が過度に形成されるが、MAK-2-YFPは、Fig. 22Bのようにその隔壁の中央部においても局在が認められた。そのため、細胞壁を染色するCFWとの二重染色を行ったところ、隔壁がCFWによって染色された箇所(青色)とMAK-2-YFPが一致していなかったことから、このMAK-2-YFPの局在箇所は隔壁ではなく隔壁孔であることが明らかになった。さらに、菌糸内容物の漏出が認めらるほどの、細胞壁が顕著に損傷した菌糸においては、細胞核と隔壁孔、両方への局在も認められた(Fig. 22C)。

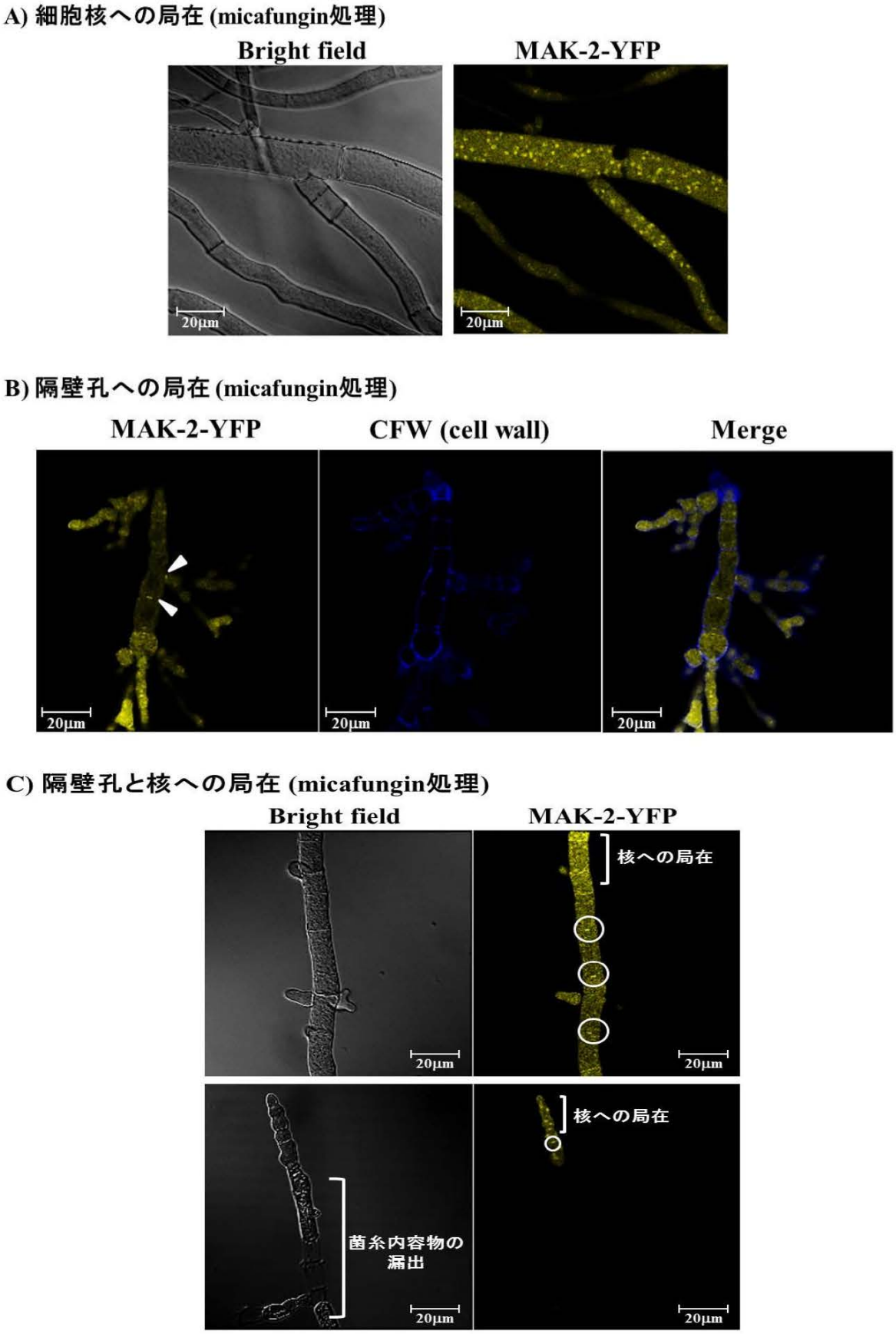


Fig. 22. MAK-2 localization in micafungin-treated hyphae.

以上のことから、MAK-2は、VM培地上で栄養増殖している菌糸においては、細胞質に散在しているが、micafungin処理により細胞壁が損傷すると、細胞核へと移行することが示された。このことは、ウェスタン解析において、菌糸生育過程ではMAK-2はリン酸化しておらず、micafungin処理によってリン酸化したこととよく一致しており、MAK-2は細胞壁損傷に応答して活性化され、細胞質から核へと移行すると考えられた。MAPキナーゼが活性化されると細胞質から核に移行して様々な遺伝子の制御をすることは一般に知られているが、本研究では、MAK-2は、細胞壁の損傷によって、隔壁孔中心部へと局在することも見出した。糸状菌の菌糸は、細胞と細胞をつなぐ隔壁を持つが、この隔壁には核も通過できる隔壁孔がある。菌糸が物理的に分断されると細胞質の流出が起こるが、隣の細胞の隔壁孔が塞がれて原形質の流出が食い止められる。

更なる検証が必要だが、活性型のMAK-2は、細胞壁の損傷によって生じる細胞内容物の溶出の情報を受け取り、隔壁孔へ誘導され、隔壁孔を塞ぐことに関与するタンパク質をリン酸化して、活性化に関与する可能性がある。アカパンカビでは、近年、隔壁や隔壁孔に局在するタンパク質に関する細胞学的解析手法を用いた研究が行われている。アカパンカビでは、出芽酵母の形態形成に関与するCDC42 (rho type GTPase)－RAC (small GTPase)－CDC24 (rho guanyl nucleotide exchange factor)経路のCDC42オルソログであるCDC-42が隔壁に局在し、この経路の他の構成因子と協調的に機能することで、菌糸の伸長や分岐過程において、菌糸の極性生長とその維持に寄与することが明らかになっている(Araujo-Palomares *et al.*, 2011)。出芽酵母では、このCDC24経路下流にFus3/Kss1 MAPキナーゼ経路が位置する。MAK-2は出芽酵母のFus3/Kss1 MAPKのオルソログであり、本研究で明らかになったMAK-2の隔壁孔への局在はアカパンカビにおいてもCDC24経路下流にMAK-2経路が位置することを示唆するものである。

第 2 章　浸透圧応答経路の MAP キナーゼ OS-2 による細胞壁関連遺伝子の発現制御

2-1. 緒言

アカパンカビのOS-2 MAPキナーゼカスケードは、OS-4 (MAPKKK)－OS-5 (MAPKK)－OS-2 (MAPK)から構成され、浸透圧応答経路(OS経路)のコアとして機能する。OS経路はHis-Aspリン酸リレー系(histidine kinase OS-1－phosphotransfer protein HPT-1－Response regulator RRG-1)と下流のOS-2 MAPキナーゼカスケードから成る(Zhang *et al.*, 2002; Fujimura *et al.*, 2003; Banno *et al.*, 2007)。OS経路の構成因子のうち、HPT-1を除く遺伝子変異株(*os-1*, *rrg-1*, *os-4*, *os-5*, *os-2*)は、NaClやsorbitolによる高浸透圧に対して高い感受性を示す(Ochiai *et al.*, 2001; Miller *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2002; Fujimura *et al.*, 2003)。アカパンカビの野生株はジカルボキシイミド系殺菌剤(iprodione)やフェニルピロール系殺菌剤(fludioxonil)に対して高い感受性を示すが、*os*変異株は、全て耐性を示すことが明らかになっている(Zhang *et al.*, 2002; Fujimura *et al.*, 2003)。

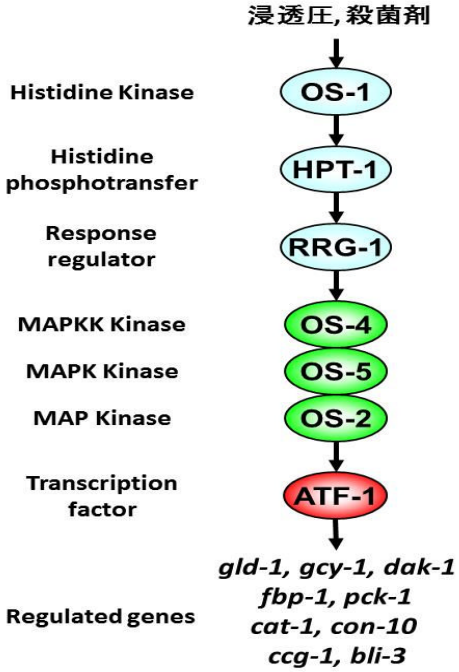


Fig. 23. OS pathway in *Neurospora crassa*.

OS-2 MAPキナーゼは高浸透圧処理や殺菌剤であるfludioxonil処理によってリン酸化(活性化)されることが明らかになっており(Yoshimi *et al.*, 2005; Noguchi *et al.*, 2007)、活性化されたOS-2によって転写調節因子ATF-1が活性化される。活性型ATF-1がグリセロール合成酵素遺伝子(*gcy-1*, *gcy-3*, *dak-1*)、カタラーゼ遺伝子(*ctt-1*, *cat-1*)、clock controlled genes (*ccg-1*)、青色光応答遺伝子(*bli-3*)など、様々な遺伝子の発現を制御する(Fig. 23) (Noguchi *et al.*, 2007; Vitalini *et al.*, 2007; Watanabe *et al.*, 2007; Yamashita *et al.*, 2007)。

第1章において、*os-2*破壊株は細胞壁損傷剤に対する感受性は野生株と同等であり、OS-2のリン酸化はmicafungin処理によって顕著に影響を受けなかったことから、OS-2は、細胞壁損傷に対する応答への関与は小さいと推定された。しかし、Terenziらの研究によって、高浸透圧の生育環境条件から分離されたアカパンカビの*slime* 変異株は、細胞壁がほぼ欠如したスフェロプラスト様の形態を示す(da-Silva *et al.*, 1994; Polizeli Mdel *et al.*, 1995) (Fig. 24A)。この株は、*fz* (fuzzy), *sg* (spontaneous germination), *os-1* (osmotic-1)の3遺伝子における三重変異を有することが明らかになっており、その1つとして、OS経路の浸透圧センサー *os-1* の変異が含まれている。また、これまでの我々の研究から、*os*変異株の分生子が高浸透圧条件下での長時間培養によって、細胞壁の溶解を伴うアメーバ様の形態形成を示すことが見出されている(Fig. 24B)。

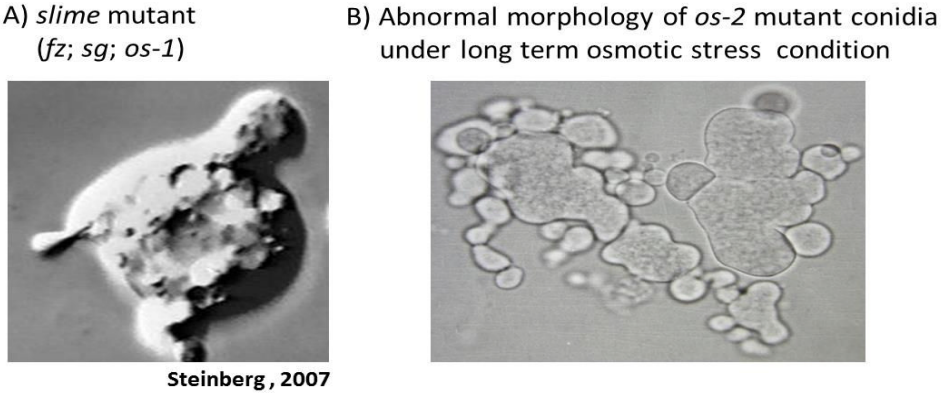


Fig. 24. *os*変異が与える形態形成への影響

これらのことから、OS経路が浸透圧ストレスに伴う膨圧による細胞壁構造の一時的な変化に応答して、CWIに貢献しているのではないかと考えられた。そこで、本章ではOS経路が制御する遺伝子群の網羅的遺伝子発現解析結果からCWIに関連する遺伝子を選抜し、OS経路のCWIへの関与について検証した。

2-2. 材料と方法

アカパンカビの菌株、培地、感受性試験

Table 1の菌株に加えて、本章で新たに使用したアカパンカビの菌株をTable 8に記した。*Δgel-1*, *Δgel-2*, *Δgel-3*, *Δgel-4*, *Δgel-5*は、FGSCの網羅的遺伝子破壊株作成プロジェクトにより作出された破壊株ライブラリーから植えだして使用した。転写調節因子ATF-1の破壊株(*Δatf-1*)は、山下和宏博士(東洋大学大学院)により作製された*atf-1*完全欠損株を使用した(Yamashita *et al.*, 2008)。菌株の保持、培養、感受性試験は、第1章で行った方法に準じた。

Table 8. The *Neurospora* strains used in this study

Strain	Genotype	Reference or sourse
FGSC #12959	*mat a*; *gel-1::Hyg*^{r}	FGSC[a]
FGSC #12960	*mat A*; *gel-1::Hyg*^{r}	FGSC[a]
FGSC #12656	*mat a*; *gel-2::Hyg*^{r}	FGSC[a]
FGSC #12657	*mat A*; *gel-2::Hyg*^{r}	FGSC[a]
FGSC #12976	*mat a*; *gel-3::Hyg*^{r}	FGSC[a]
FGSC #12977	*mat A*; *gel-3::Hyg*^{r}	FGSC[a]
FGSC #12972	*mat a*; *gel-4::Hyg*^{r}	FGSC[a]
FGSC #12973	*mat A*; *gel-4::Hyg*^{r}	FGSC[a]
FGSC #12622	*mat a*; *gel-5::Hyg*^{r}	FGSC[a]
FGSC #12623	*mat A*; *gel-5::Hyg*^{r}	FGSC[a]
Datf1Ba	*mat a*; *atf-1::Bar*; *mus-52::Hyg*^{r}	Yamashita *et al*., 2008

[a] *Neurospora* knockout strain from the functional genomics program (Colot *et al*., 2006) was obtained from Fungal Genetics Stock Center.

感受性試験では、beta-1,3-グルカン合成酵素阻害剤 micafungin (Astellas Pharma, Tokyo, Japan)、OS経路活性化剤であるfludioxonil (Wako Pure Chemical, Osaka, Japan), NaCl, sorbitolを使用した。fludioxonilは、dimethyl sulfoxide (DMSO)に溶解して使用した。そのため、DMSOが生育に与える影響を排除するため、培地容量の1/1000以下の量になるよう培地に添加した。

グルカナーゼ耐性試験

野生株と5種類の*gel* 破壊株(*Δgel-1, Δgel-2, Δgel-3, Δgel-4, Δgel-5*)の分生子を取得するため、グリセロール完全培地で7～14日間培養して分生子形成させ、滅菌水に懸濁した菌体から茶こしで菌糸を除き、滅菌水で数回洗浄後、再度、滅菌水に懸濁することにより分生子を回収した。

細胞壁溶解酵素に対する感受性を調べるため、各株の分生子(10^7 cells/ml)をVM培地で5時間、28℃で振盪培養した。胞子の発芽を顕微鏡下で確認後、滅菌済1M sorbitol で3回洗浄した。洗浄操作は、遠心分離(2,500g, 5分)により分生子を沈殿させ、上清を除去する操作を繰り返すことより行った。5 mg/ml Lysing Enzymes (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, L1412) 含有の1M sorbitol 溶液に移し、28℃で穏やかに振盪した。振盪開始から30, 60, 90, 120分後、スフェロプラスト及びプロトプラストの形成数を血球計算盤を用いてカウントした。

遺伝子発現解析

発芽分生子における遺伝子発現解析では、各株の分生子(6.6×10^5 cells/ml)をVM培地で室温条件下、4時間の振盪培養後、遠心チューブに移して遠心分離により上清(培地)を除き、発芽分生子を回収した。また、菌糸体における遺伝子の発現解析では、各株の分生子(6.6×10^5 cell/ml)をVM培地に植菌してから室温で16時間培養し、1 μg/ml fludioxonil処理を30分間、あるいは1 μg/ml micafungin処理を2時間行い、吸引濾過によって菌糸体を回収した。回収した菌体は、液体窒素を用いて凍結し、使用するまで-80℃で凍結保存した。アカパンカビのRNAの調製とcDNA合成は、第1章と同様の手順で行った。

定量RT-PCR

定量RT-PCRは、第1章に示したプロトコルに準じて行った。定量RT-PCRに使用したプライマー及びTaqMan ProbeをTable 9に記す。

Table 9. List of primer sets and probes used for quantitative real-time RT-PCR

Target gene	NCU locus	Forward primer (5′→3′)	Reverse primer (5′→3′)	Probe #
gel-1	NCU01162	TCGGGAGGTCTTATGTACGAG	GAGCTTGGCAATTCCGTATC	25
gel-2	NCU06781	CTCCGTCCCCGTCTTCTACT	GTGAACATACGGGGCTTCA	46
gel-3	NCU08909	TTCTAACAACGCCACCAACA	TCTTGGAGTCACGGACAGC	29
gel-4	NCU07253	AGAGATTCTACGTTCGCGGTA	GATCGAGGTTGGCAGAAGAA	64
gel-5	NCU06850	GGAGCGGTGCACTCATCTAC	ACGAGATCAAGCCGTAGTGG	63
bli-3	NCU07267	GAACAAGCTGCGGGAGATTA	ACTTAGTGCGACGACCTCCA	15
chs-4	NCU09324	TCGATTGCAATGACGGACTA	ACCATCGCAAATAACGAGGA	5
chs-5	NCU04352	TCGACGAGGTCAGCGAGT	CTTGTTCCGATCCCTTGCT	3
chs-7	NCU04350	GTGGTTTGGGATTCCAAGAAG	GAACCACGGGTGATTCCA	4
fks-1	NCU06871	TACGGCATGGACTACGGTAA	GGGATACGGTTCCTTGGAG	4
rho-1	NCU01484	CCGAGAAGTGGCACTCTGA	CCAACGAGGATGATTGGAAC	29
phiA	NCU00399	CTCGCAGCACCTCACCTT	ATGCGGTACGAGGAGTCG	43
ncw-1	NCU05137	CCTGGCTCAACCAGATCG	GGATTAGACCGAGGGGAGAA	25
dlh-1	NCU02124	AGCACGTCGAGACCTTCAA	CGCTCGTCCTTCAAGTCG	42
cht-1	NCU08394	CAACTGCTGCAAGCCAGA	TACCGCCACGCTTGAATC	32
ogp-1	NCU07569	ACGGTCAGGTTCAAAACGA	CACCGATTTGAGTGACAGGA	69
gox-1	NCU09209	GTCCGCGTCTACCATACCC	CACCGGCGTTCAAGACTC	18
man-1	NCU07318	GAGGGAACGGAGGAATCG	CTCATTGGTGCGAGAGTTGA	9
actin	NCU04173	GCTGAGCGTGGTTACACCTT	TCCTTGATGTCACGAACGAT	77

*Taq*Manプローブの選択及びプライマーの設計には、Roche Assay Design Center (http://www.universalprobelibrary.com)を利用した。

2-3. 結果と考察

2-3-1. fludioxonil処理により誘導されるCWI関連遺伝子のアレイ解析

OS経路は、浸透圧ストレスや殺菌剤fludioxonil処理により活性化(リン酸化)される。当研究室においては、すでに野生株の菌糸にfludioxonil処理による誘導遺伝子のアレイ解析(Cy3 signal:control mRNA ; Cy5 signal:fludioxonil-treated mRNA)データが存在する。そこで、このデータを利用して、まず、fludioxonil 誘導遺伝子を選抜した。遺伝子発現プロファイルでは、ノイズレベルのスポットを除外し、fludioxonil 処理時の菌糸体由来のmRNA シグナル(Cy5 signal)数値が600以上、かつlog (Cy5/Cy3) signal (treated vs. untreated) ≧0.40 の遺伝子をfludioxonil 誘導遺伝子群とした。その結果、fludioxonil 処理によって発現量が2倍以上上昇する305個の遺伝子が存在し、細胞壁の構築や補強に関与する可能性があると思われる9遺伝子を選抜した(Table 10)。

Table 10. Microarray analysis of genes up-regulated by micafungin treatment in wild-type strain

NCU locus	Genes	LogRatio Cy5/Cy3	Cy3 Signal Control	Cy5 Signal Micafungin	qRT-PCR	Putative function of protein
NCU07817	*ncw-3*	1.41	4171	106526	+	non-anchored cell wall protein-3
NCU07569	*ogp-1*	1.16	516	7488	+	putative O-glycosylated protein
NCU00399	*phiA*	0.76	6808	39413	+	cell wall protein phiA
NCU09209	*gox-1*	0.75	424	2388	+	galactose oxidase
NCU01162	*gel-1*	0.61	677	2788	+	glycolipid-anchored surface protein 5
NCU02124	*dlh-1*	0.59	2206	8491	+	dienelactone hydrolase
NCU07318	*man-1*	0.55	576	2063	+	mannitol-1-phosphate 5-dehydrogenase
NCU08394	*cht-1*	0.45	474	1349	+	classIII chitinase
NCU08677		0.42	2314	6108	NT	hypothetical protein

These genes were selected by the following condition; ≧0.4 LogRatio of micafungin treated/untreated signal intensity (Cy5 signal/Cy3signal) and ≧600 treated signal intensity. +: up-regulation confirmed by qRT-PCR, ー: up-regulation not detected by qRT-PCR, NT: not tested

これら9遺伝子のうち、ORF領域が短いため、TaqMAN probeの設計が出来なかったNCU08677を除く8遺伝子が実際にfludioxonil処理により発現量が増加す

るのかを定量RT-PCRを用いて精査した。その結果、全8遺伝子の発現量がfludioxonil処理によって少なくとも2倍以上、上昇した(Table 10中でqRT-PCRの項で「＋」表記した遺伝子)。fludioxonil処理で誘導されたこれらの遺伝子は、4%NaCl (2時間処理)による浸透圧ストレスによっても顕著に発現誘導することも確認された(data not shown)。なお、これら8遺伝子の中の*phiA*と*ncw-3*は第1章で示した通り、micafungin処理により誘導される遺伝子に含まれていた。従って両遺伝子は、細胞壁損傷と浸透圧ストレスの両方により誘導される、あるいはストレス種に関係なく、細胞がストレスに曝されることで誘導するストレス応答性遺伝子である可能性も考えられる。

2-3-2. OS経路で制御されるCWI関連遺伝子の同定

fludioxonilによって細胞壁関連遺伝子が誘導されていた*phiA, ncw-3*以外の6種類の遺伝子について、発現誘導がOS-2とその下流の転写調節因子であるATF-1による制御を受けているかを検証するため、野生株、*Δos-2*、*Δatf-1*におけるfludioxonil処理時の発現量を定量RT-PCRを用いて比較解析した。

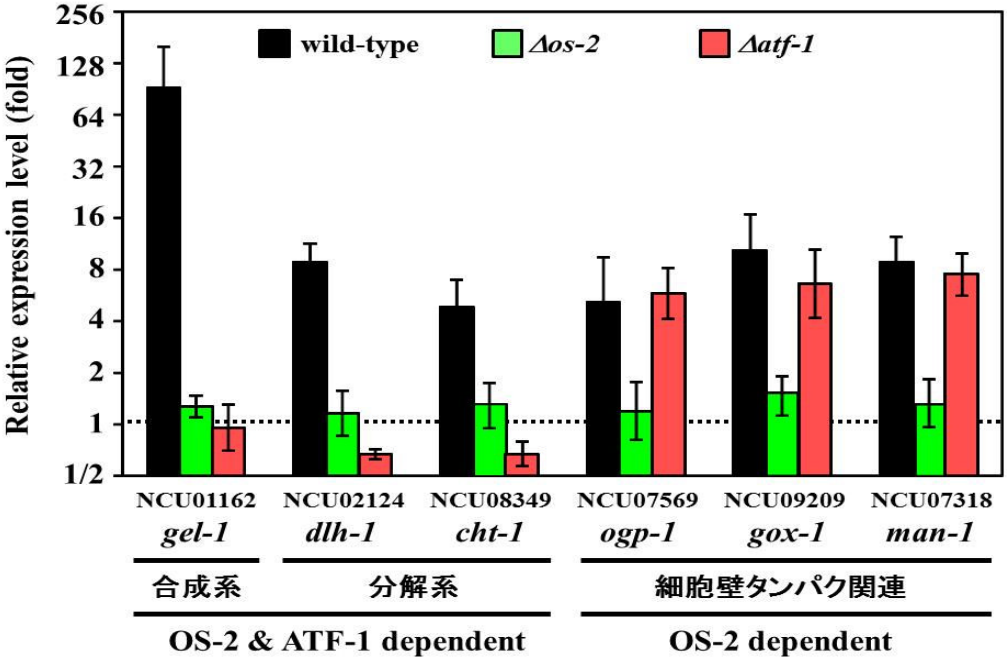


Fig. 25. OS-2, ATF-1依存性遺伝子の特定

その結果、*gel-1*、*dlh-1*, *cht-1*の3種類の遺伝子は、野生株においてはfludioxonil処理により発現量が顕著に上昇したが、*Δos-2*と*Δatf-1*の両株ではその発現上昇は認められなかった。このことから、*gel-1*、*dlh-1*及び*cht-1*の発現は、OS-2－ATF-1依存的に制御されていることが明らかになった。これらのうち、*gel-1*はbeta-1,3-glucanosyltransferase、*cht-1*は細胞壁の分解に関わるclass III chitinase、*dlh-1*はdienelactone hydrolaseドメインをもつ酵素をコードする遺伝子である。*cht-1* と*dlh-1*の機能は不明であるが、細胞壁の分解に関与するという報告がある(Tian *et al.*, 2009; Tzelepis *et al.*, 2012)。

一方、*ogp-1*、*gox-1*、及び*man-1*は、*Δatf-1*ではfludioxonil処理による発現上昇が認められたが、*Δos-2*においては、その発現誘導が完全に消失したことからOS-2 MAPキナーゼ制御下にあるが、ATF-1非依存的であることが明らかになった。*ogp-1*、*gox-1*、及び*man-1*は、それぞれ*O*-glycosylated protein, galactose oxidase, mannitol-1-phosphate 5-dehydrogenaseをコードする遺伝子であり、その機能は解析されていないが、細胞壁の補強に関与する糖タンパク質であると考えられる。

これらのことは、浸透圧応答を担うOS経路が細胞壁に関わる酵素やタンパク質の遺伝子を制御し、CWIの維持に関与することが考えられた。したがって、アカパンカビは高浸透圧条件下で細胞壁の挙動が変化するとOS経路を利用して細胞壁合成や補強に関与する酵素、タンパク質の発現を誘導することによって、高浸透圧に緊急的に応答してCWIを制御することが示唆された。

2-3-3. beta-1,3-glucanosyltransferase *gel*遺伝子の探索と相同性解析

OS-2 MAPキナーゼ－転写因子ATF-1依存的に発現制御されている*gel-1*は、細胞壁合成に関与するbeta-1,3-glucanosyltransferaseをコードする遺伝子である。

糸状菌類の細胞壁の構築では、細胞壁成分のbeta-1,3-グルカンやキチンの単

なる合成だけでなく、構成糖間において複雑に入り組んだ構造体を形成することにより、種々の形態形成やストレス環境に適応可能な細胞壁構造が維持される(Smits *et al.*, 2001; Bowman *et al.*, 2006; Latge, 2007)。細胞壁の構成糖や糖タンパク間のネットワークを形成するにあたり、主要な構成糖であるbeta-1,3-グルカンはその主鎖から側鎖を分岐し、さらに伸長する。この伸長したbeta-1,3-グルカンの側鎖にキチンや糖タンパクが結合することによって、強固な細胞壁が形成される。このときの、分岐したbeta-1,3-グルカン側鎖を伸長する機能を担う酵素がbeta-1,3-glucanosyltransferase (glucan elongation:GEL)である(Fig. 26)。

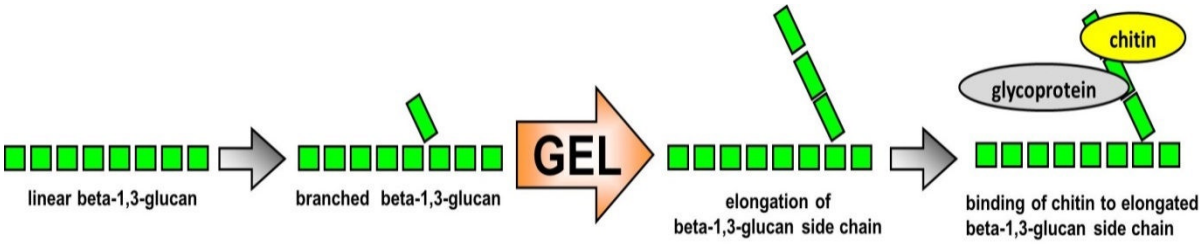


Fig. 26. Function of GEL in cell wall biogenesis.

GELはGlycoside hydrolase (GH) family 72に属する酵素であり、glycosylphosphatidylinositol (GPI)アンカー型タンパクである。GH72 family は酵母や菌類間で高度に保存されており、細胞壁構築において重要な役割を担う(Saporito-Irwin *et al.*, 1995; Mouyna *et al.*, 2000a, 2000b, 2005; Tomishige *et al.*, 2003; Carotti *et al.*, 2004; de Medina-Redondo *et al.*, 2008; Rolli *et al.*, 2011)。

すでに述べたとおり、*gel-1*が浸透圧ストレスによりOS-2依存的に制御され、*gel-4*はMAK-1とMAK-2による制御は受けなかったものの、micafungin処理により誘導された。アカパンカビのゲノムデータベース(*Neurospora crassa* Database at Broad Institute)を検索したところ、*gel-1*と*gel-4*の他に3種類の*gel*遺伝子が存在し、計5種類の*gel* 遺伝子(*gel-1*, *gel-2*, *gel-3*, *gel-4*, *gel-5*) が存在することが明らかになった。まず、これら5種類のGELタンパクのドメイン構造を比較したところ(Fig. 27A)、全てのGELsがその活性に必須の2つのグルタミン酸残基を

GH72ドメイン上に有し、N末端側にはシグナルペプチド、C末端には酸性アミノ酸の多い領域が存在した。また、GELタンパクは、C末端領域にX8ドメインと称される6つのシステイン残基を含む領域の有無でGH72^{+}とGH72^{-}の2つのサブファミリーに分けることが出来る(Ragni *et al.*, 2007; Popolo *et al.*, 2008; Mazan *et al.*, 2011)。X8ドメインは糖結合ドメインである。アカパンカビにおいては、GEL-3だけがX8ドメインを有していたことから、GH72^{+}ファミリーに属し、残りの4種はGH72^{-}ファミリーであった(Fig. 27A)。また、アカパンカビのGELsと、出芽酵母、*Candida albicans*、*A. fumigatus, Fusarium oxysporum*のGEL family (GEL/Gas/Phr)の系統解析を行った(Fig. 27B)。アカパンカビのGEL-1及びGEL-4は*A. fumigatus* Gel1と、GEL-2は*A. fumigatus* Gel2、GEL-3は*F. oxysporum*のGAS1、GEL-5は*A. fumigatus* Gel6とアミノ酸配列の類似率が高く、アカパンカビのGELsは、病原糸状菌のGELと近縁関係にあることが明らかになった。

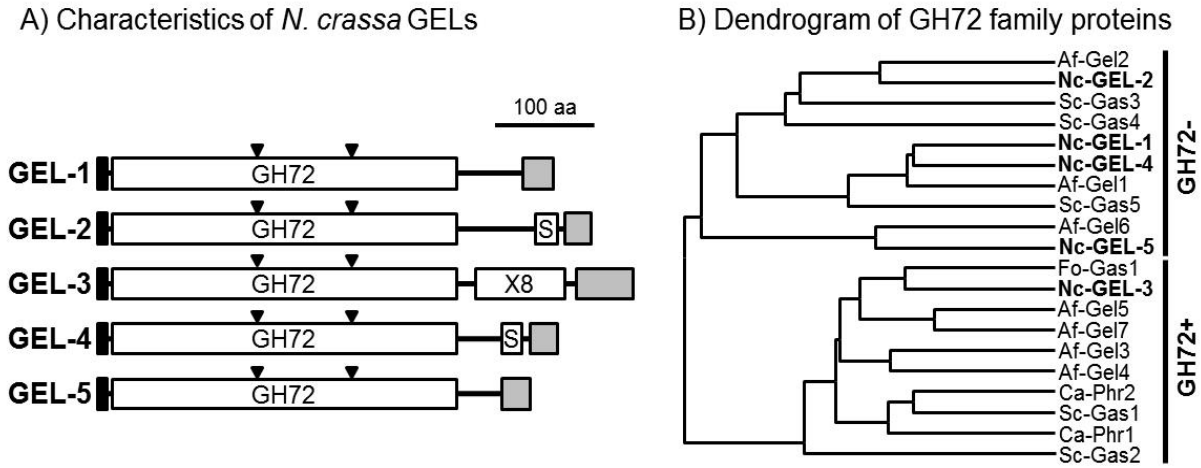


Fig. 27. Domain structure of 5 GELs and phylogeny.

Two glutamic acid residues essential for the catalytic function in GH72 proteins are indicated by block triangles. Black boxes and gray boxes indicate the N-terminal signal sequence and C-terminal hydrophobic region, respectively. X8: X8/CBM43 domain, S: serine rich region.

注目すべき点として、多くの菌類が複数のGH72^{+}ファミリーの遺伝子を有するのに対して、アカパンカビは1種類(GEL-3)しか持たない。また、*gel* 遺伝子

の総数も*A. fumigatus* が7種類有するのに対して、アカパンカビは5種類と比較的少ない。これらのことから、アカパンカビのGELに関する研究は糸状菌におけるGELの機能的な分担を解析するモデルとして優れていると考えられた。

2-3-4. *gel* 破壊株の形質解析

アカパンカビの野生株とFGSCから取得した5種類の*gel* 破壊株(*Δgel-1*, *Δgel-2*, *Δgel-3*, *Δgel-4*, *Δgel-5*)のVM液体培地における分生子形成について比較した。*Δgel-2*, *Δgel-4*, *Δgel-5*の分生子形成には野生株との差異は認められなかった。一方、*Δgel-1*は野生株よりもやや高い気中菌糸を形成し、*Δgel-3*は逆に気中菌糸がやや抑制されて、mud状の形態を示した(Fig. 28A)。主な糖源をsucroseからsorboseに替えたVogel's 寒天培地上に胞子液をスポットすると、アカパンカビの野生株は、菌糸伸長が抑制されて異常分岐が促進されるため、接種した場所周辺でコロニー形成をする。これに対し、*gel* 破壊株をsorbose培地で28℃、2日間培養すると、野生株ではほとんど気中菌糸を伸長させることなく分生子形成を行うが、全ての*gel* 破壊株がコロニー上に気中菌糸を立ち上げた(Fig. 28B)。

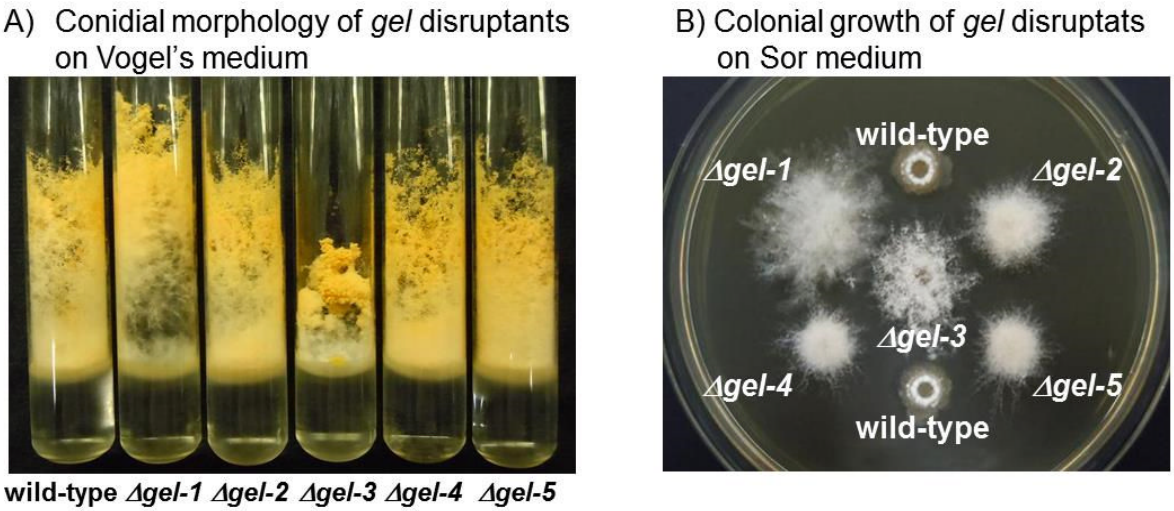


Fig. 28. Comparison of growth and morphology of *gel* disruptants.

sorboseのどのような作用が菌糸の分岐異常を誘導するかは不明な点が多い

が、sorboseが*in vitro*においてbeta-1,3-グルカン合成酵素の活性阻害作用を有することが示されている(Mishra *et al.*, 1972)。全ての*gel*破壊株がsorbose培地上で形態異常を示したことは、細胞壁構造との関連を示唆していると思われる。

さらに、Vogel's 寒天培地上において*gel* 破壊株の菌糸の伸長速度を野生株と比較したところ、唯一のGH72^{+}ファミリーに属する*Δgel-3*が顕著な生育遅延を示し、*Δgel-1* にやや生育の遅延が認められた(Fig. 29)。その他の*Δgel-2, Δgel-4, Δgel-5*は野生株と同等の生育速度であった(data not shown)。植物病原菌*F. oxysporum* のbeta-1,3-glucanosyltransferaseをコードする*Gas1* （GH72^{+}ファミリー）の欠損株も生育遅延を示すが、この生育遅延はsorbitolの添加による培地の浸透圧上昇よって回復することが報告されている(Caracuel *et al.*, 2005)。また、*gel-1* が浸透圧誘導遺伝子であることから、浸透圧応答に不全がある可能性が考えられた。そこで、生育遅延が認められた2株（*Δgel-1, Δgel-3*）について、1.2M sorbitolを含有する培地上での生育を調べたところ、野生株も含めコントロールよりも生育が抑制されたが、それぞれの株の基礎生育速度を反映しており、両株ともに浸透圧ストレス感受性は野生株と同等であると判断された (Fig. 29)。

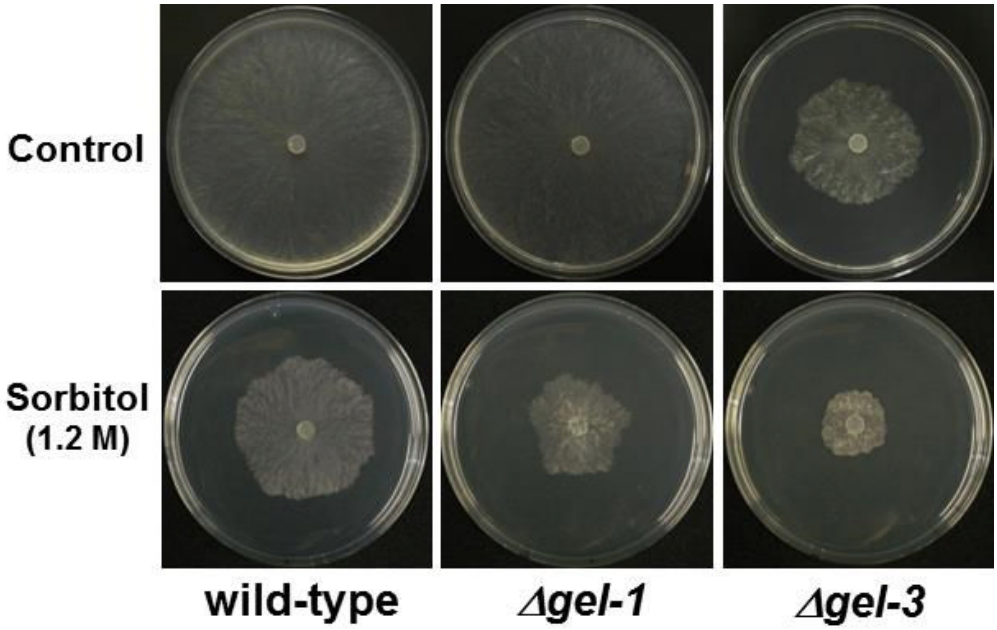


Fig. 29. The mycelial growth of *gel-1* and *gel-3* disruptants on VM medium.

次に、*gel-1*が浸透圧応答を担うOS経路依存的に制御されていたことから、*gel*破壊株の浸透圧(NaCl, fludioxonil)と殺菌剤fludioxonilに対する感受性を調べた。また、GELは細胞壁合成系酵素であることから、細胞壁損傷剤であるmicafunginに対する感受性を菌糸長を測定することにより調べた(Table 11)。

Table 11. Sensitivity to osmotic stress, fludioxonil, and micafungin

	Mycelial growth (mm)	% of growth inhibition			
Strain	Control	4% NaCl	1.2M sorbitol	Fludioxonil[a]	Micafungin[b]
wild-type	42 (3.1)	39 (5.4)	47 (2.6)	75 (1.8)	70.8 (0.8)
Δgel-1	35 (5.5)	41 (4.2)	48 (5.9)	72 (3.5)	37.9 (2.1)
Δgel-2	40 (5.0)	36 (3.8)	45 (4.3)	70 (1.3)	70.1 (0.8)
Δgel-3	26 (2.5)	52 (4.0)	54 (5.2)	61 (4.2)	50.9 (1.3)
Δgel-4	44 (7.1)	36 (3.7)	44 (4.7)	75 (2.2)	73.3 (1.5)
Δgel-5	40 (6.1)	33 (2.4)	49 (4.4)	74 (4.0)	72.9 (2.0)
Δos-2	37 (4.9)	99 (1.2)	100 (0)	13 (2.5)	73.1 (2.3)

[a]0.0080 μg/ml fludioxonil

[b]0.0064 μg/ml micafungin

Standard deviation are shown in parentheses

いずれの*gel* 破壊株も、NaClやsorbitolによる高浸透圧及び殺菌剤fludioxonilに対する感受性は野生株と有意な差は認められなかった。ただし、*Δgel-1*及び*Δgel-3*はmicafunginに対しては、やや耐性を示した。

2-3-5. *gel* 破壊株の細胞壁損傷剤に対する感受性

*F. oxysporum Gas1*欠損株は、グルカナーゼやキチナーゼなど様々な細胞壁溶解酵素の混合物であるLysing enzymes (LE) に対して耐性を示すことが分かっている (Caracuel *et al.*, 2005)。そこで、アカパンカビの5種類の*gel*破壊株のLEに対する感受性を、LE処理後のプロトプラスト形成数により評価した。野生株と5種類の*gel*破壊株は、LE処理時間の経過に伴って、プロトプラスト形成数が次第に増加した。しかし、5種類の*gel*破壊株は、プロトプラストの形成数は、野生株よりも有意に減少した。このことから、*gel*破壊株はいずれも細胞壁溶解

酵素に対して顕著な耐性を示すことが明らかになった(Fig. 30)。このような現象は、*F. oxysporum Gas1*がLE耐性を示すことと良く一致した結果であった。これらの結果は、GELタンパク質が細胞壁の合成を担う酵素であるにも関わらず、その欠損株が通常より強固な細胞壁を有していることを示している。この矛盾は、細胞壁構造の異常によって、それを補強する経路が働き、LEに耐性を示す細胞壁が構成されることが推測される。

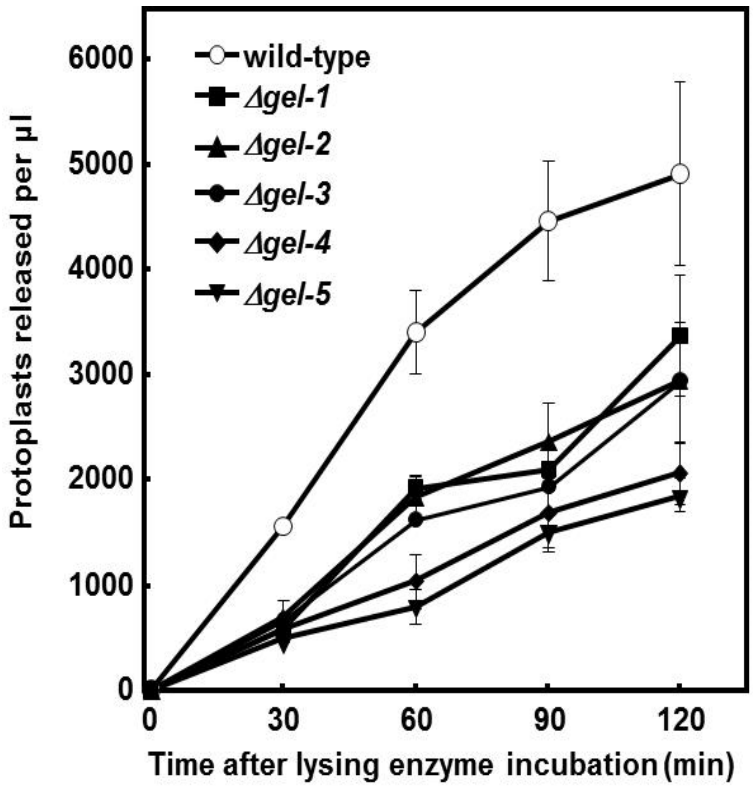


Fig. 30. Sensitivity of 5 *gel* disruptants to Lysing enzymes.

2-3-6. *gel* 遺伝子の基礎発現量の比較

野生株の菌糸体及び発芽胞子における5種類の*gel*遺伝子の基礎発現量を、定量RT-PCRにより解析した。その結果、5種類の*gel*遺伝子の中で、*gel-3*の発現量が、分生子発芽時と菌糸伸長時のいずれにおいても最も高かった(Fig. 31)。対照的に、*gel-1*の発現量は、これらの条件下では最も低かった。*gel-2, gel-4, gel-5*の基礎発現量は*gel-1*と*gel-3*の中間程度であった。*Δgel-3*が最も著しい生育遅延

を示すことも考慮すると、アカパンカビのGEL-3は、胞子発芽や菌糸伸長における生育過程において、主として働くbeta-1,3-glucanosyltransferaseであることを示唆していた。

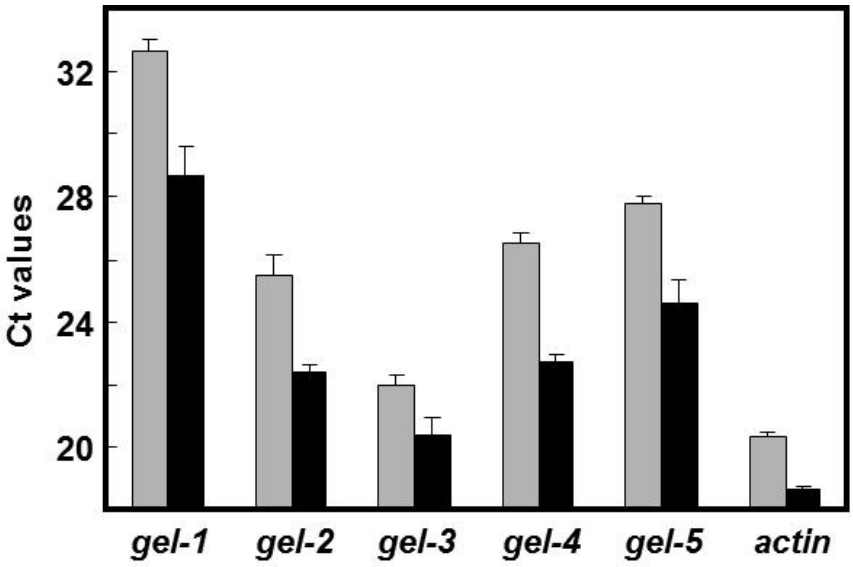


Fig. 31. Relative mRNA level of *gel* genes.

Relative quantification of mRNA of the *gel* genes in germinating conidia (black boxes) and growing hyphae (gray boxes).

2-3-7. *gel* 破壊株における細胞壁合成遺伝子の発現解析

植物病原菌*F. oxysporum*のGELをコードする*Gas1*破壊株は、Lysing enzymes (LE) に対して耐性を示し、これは、*Gas1*の欠損によってキチン合成酵素(*chsV*)やbeta-1,3-グルカンの合成酵素遺伝子(*rho1*)の発現量が上昇していることが原因の1つとして報告されている(Caracuel *et al.*, 2005)。アカパンカビの5種類の*gel*破壊株も全て、Lysing enzymesに対して耐性を示したことから、GELの欠損によって、キチン合成酵素やbeta-1,3-グルカンの合成酵素遺伝子の発現が上昇している可能性が考えられた。

そこで、アカパンカビの5種類の*gel*破壊株におけるキチン合成酵素遺伝子(*chs-5*, *chs-7*)やbeta-1,3-グルカンの合成酵素遺伝子(*fks-1*, *rho-1*)の発現量を定量RT-PCRを用いて解析した。本節では、VM培地で16時間培養した菌糸体から

RNAを抽出し、各株の菌糸生育時における遺伝子発現量を解析した(Fig. 32)。

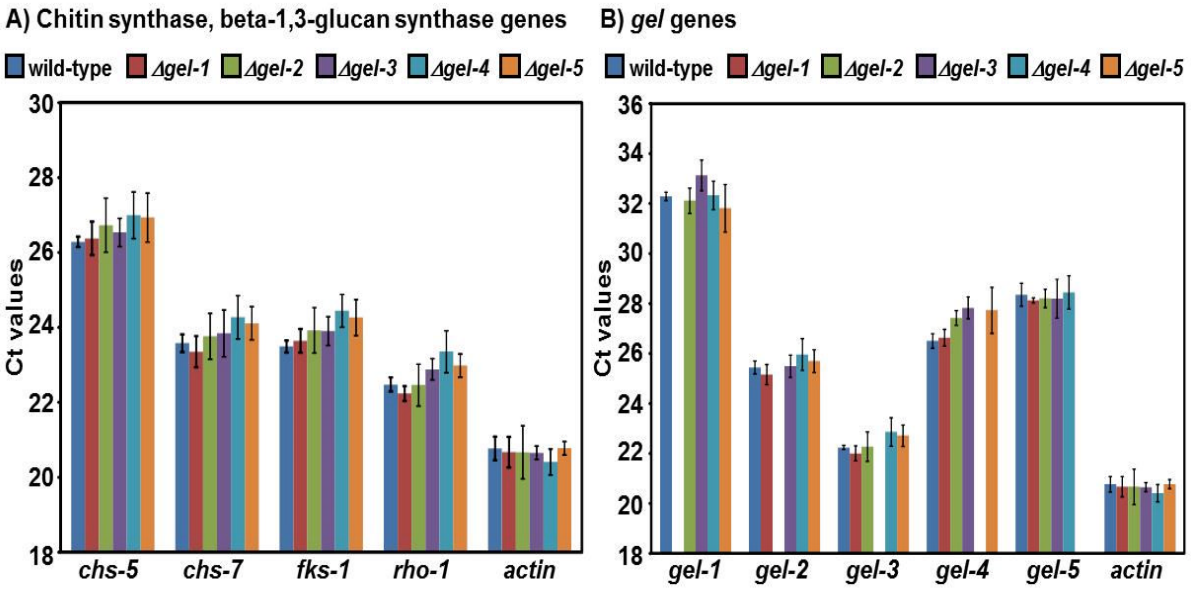


Fig. 32. Expression level of *gel*, *chs-5*, *chs-7*, *fks-1*, *rho-1* in *gel* disruptants.

*F. oxysporum*の*Gas1*欠損株で転写量の上昇しているキチン合成酵素*chsV*と*rho1*のオルソログは、アカパンカビではそれぞれ*chs-5*, *rho-1*である。アカパンカビの*gel*破壊株においては、*chs-5*や*rho-1*の発現量は野生株と比べて、顕著な差は認められなかった (Fig. 32A)。また、他のキチン合成酵素遺伝子（*chs-4*, *chs-7*）やbeta-1,3-グルカン合成酵素*fks-1*についても発現量に変化は認められなかった(Fig. 32A)。また、各*gel*破壊株における*gel*発現量にも顕著な変動は認められなかった(Fig. 32B)。従って、GELの欠損株が示す細胞壁溶解酵素に対する耐性は、少なくともアカパンカビでは、*chs-5*, *rho-1*などの誘導による細胞壁の強化によるものではないと判断された。

2-3-8. *gel* のfludioxonil誘導性とOS経路依存性

2-3-2. において、*gel-1*がOS-2 MAPキナーゼとその下流の転写調節因子ATF-1に依存して制御されていることが明らかにされた。そこで、*gel-2*, *gel-3*, *gel-4*,

*gel-5*のOS経路依存性を解析するため、野生株、*Δos-2*及び*Δatf-1*を使用してfludioxonil処理時の発現量を定量RT-PCRを用いて比較解析した(Fig. 33)。*bli-3*は、fludioxonil処理で発現誘導するOS-2－ATF-1依存的に制御される遺伝子であることが明らかになっている遺伝子であり、本実験におけるpositive control geneとして使用した。

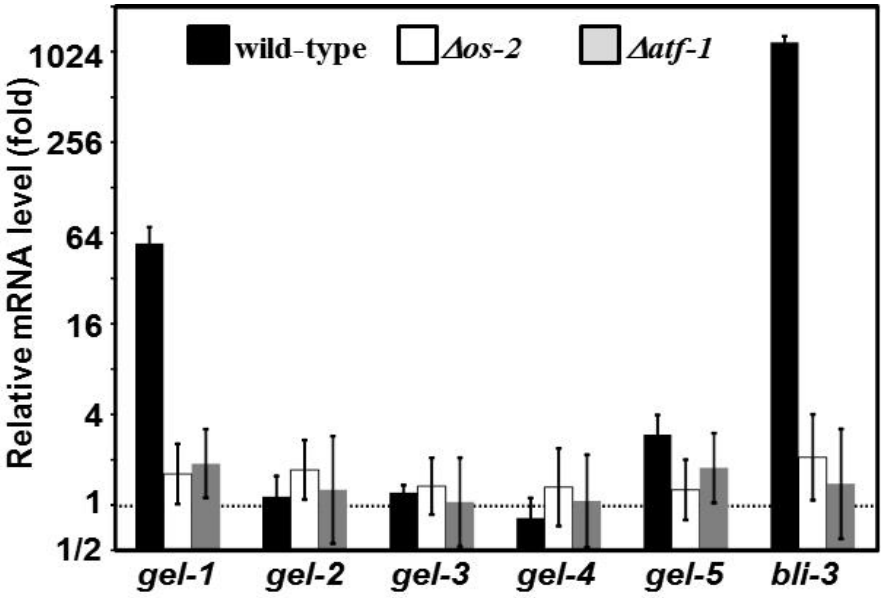


Fig. 33. *gel*遺伝子群のfludioxonil誘導性とOS経路依存性

縦軸：無処理条件の発現量に対するfludioxonil処理条件下の相対的発現量

前述の通り、*gel-1*は野生株においてfludioxonil処理により発現量が上昇し、*Δos-2*、*Δatf-1*ではfludioxonil処理による発現誘導が認められなかったことから、*gel-1*はOS-2－ATF-1依存的に発現制御される遺伝子である。しかし、その他の*gel-2, gel-3, gel-4, gel-5*の発現量は、fludioxonilを野生株、*Δos-2*、*Δatf-1*の菌糸体に処理をしても、それらの転写量にほとんど変動はなかった。従って、これらの遺伝子は、OS経路による発現制御を受けないことが明らかになった。

2-3-9. *gel* のmicafungin誘導性とMAK-1及びMAK-2依存性

第1章において、*gel-4*がmicafungin処理によって発現量が約4倍上昇するが、MAK-1やMAK-2による制御を受けていないことが明らかになった。本節では、*gel-4* 以外の*gel* 遺伝子のmicafungin誘導性と、MAK-1及びMAK-2 MAPキナーゼ依存性を解析するために、野生株、*Δmak-1, Δmak-2*の菌糸に1 μg/ml micafunginを2時間処理したときの発現量を定量RT-PCRを用いて比較解析した(Fig. 34)。

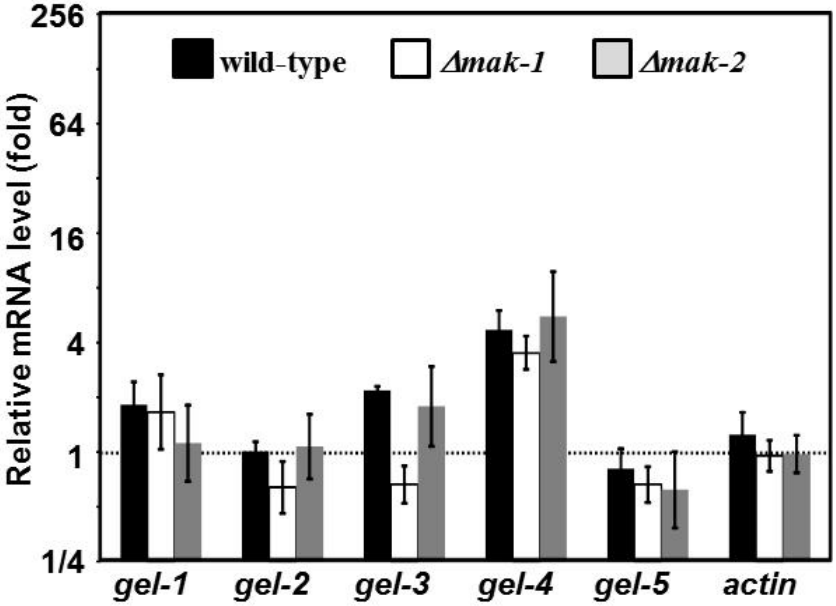


Fig. 34. *gel*遺伝子群のmicafungin誘導性とMAK-1、MAK-2依存性

縦軸：無処理条件の発現量に対する micafungin 処理条件下の相対的発現量

Fig. 34に示した結果より、*gel-1, gel-2, gel-3, gel-5*の発現量は*gel-4*とは異なり、野生株の菌糸にmicafungin処理を行っても上昇しなかったことから、細胞壁損傷による応答性は低いことが分かった。これは、*Δmak-1, Δmak-2*においても同様の結果であったことから、*gel-4*以外の*gel*についてもMAK-1やMAK-2による発現制御を受けていないことが示された。

本研究により、*gel-1*は浸透圧ストレスや殺菌剤ストレスに応答し、かつOS-2－ATF-1依存的な発現制御を受けており、*gel-4*が細胞壁の損傷によって顕著に誘導される遺伝子であることが明らかになった。GEL-1とGEL-4は、系統解析の

結果から進化的に近縁関係にあることが明らかになっている(Fig. 27B)。これらのことは、アカパンカビではGEL-1やGEL-4が浸透圧や細胞壁構造の損傷による細胞壁挙動の変化に対して緊急応答的に発現することによって、細胞壁の再構築に重要な役割を担う可能性が示唆された。また、*gel-3*は恒常的に発現量が高く、遺伝子欠損により明らかな形態異常が認められたことから、アカパンカビの分生子発芽や菌糸生長の細胞壁合成においては、GEL-3が主として機能するGELであることが明らかになった。

第3章　MAPキナーゼMAK-1が制御する転写調節因子の同定

3-1. 緒言

転写調節因子はDNAの特定の配列を認識して結合し、遺伝子発現を制御する。特定の遺伝子の転写を活性化(誘導)あるいは不活性化(抑制)することにより、細胞は環境応答や分化を適切に行うことができる。MAPキナーゼ経路やProtein kinase A (PKA)経路などに代表されるシグナル伝達経路においても、転写調節因子が活性化されて特定の遺伝子群の発現が制御される。多くの場合、転写調節因子は活性型キナーゼによってリン酸化されると活性型となって細胞核へと移行し、遺伝子発現を制御する。

真菌類にも転写調節因子は多数存在しており、モデル糸状菌アカパンカビでは、ゲノム情報の公開によって、182種類の転写調節因子の存在が示唆された(Galagan *et al.*, 2003)。その後、Borkvich *et al.*, 2004らのDNA配列特異的に結合するドメインを有するタンパクの探索から174種類の転写調節因子の存在が推定された。これらの転写調節因子の機能を逆遺伝学的に解析するために、網羅的遺伝子破壊株作成プロジェクトにおいて、ほとんどの転写調節因子の遺伝子破壊株がすでに作成されている。これらの解析から、菌糸生育や有性生殖に関わる転写調節因子の選抜がなされた(Colot *et al.*, 2006)。この他にも、詳細な研究がなされている転写調節因子として、リン欠乏に応答する転写調節因子NUC-1 (Hasunuma *et al.*, 1972; Lehman *et al.*, 1973; Gras *et al.*, 2013)や、CO_2濃度の変化への応答に関与するCHC-1 (Sun *et al.*, 2011)などが挙げられる。しかし、遺伝子破壊株が顕著な形質を示さない限り、各転写調節因子がどのような系で働き、どのような遺伝子群を制御しているかを特定することは容易でなく、ほとんどの転写調節因子の機能は不明のままとなっている。一方、MAPキナーゼ経路などのように、菌類間で共通性が高い場合には、研究が進んでいる酵母の

例が参考にされ、そのオルソログ遺伝子を解析する手法が採用されている。

アカパンカビのMAK-2下流の転写調節因子については、出芽酵母のFus3経路の下流の転写調節因子Ste12オルソログであるPP-1に関する研究が存在する。*pp-1*破壊株は、*Δmak-2*と同様に菌糸融合能が欠損しており、また子嚢胞子が発芽しない。さらに、交配条件(SC培地上)でMAK-2依存的に発現誘導する交配に関与すると推定されている*mkr-2, 3, 5, 6*の発現が*pp-1*破壊株では消失することから、MAK-2 は転写調節因子PP-1を制御していると考えられている (Li *et al.*, 2005)。また、OS-2の下流には 転写調節因子ATF-1が存在してその制御遺伝子についても詳細な研究が行われている。

一方、MAK-1が制御する転写調節因子については、酵母との比較ゲノム解析の結果から、出芽酵母のCWI経路のMpk1下流の転写調節因子Rlm1のオルソログであるアカパンカビのRLM-1の存在が推定される。しかし、この転写調節因子RLM-1が実際にMAK-1下流に位置するのかは明らかにされていない(第1章 Fig. 4参照)。

そこで本章では、MAK-1の制御する転写調節因子としてのRLM-1の可能性の検証、及び転写調節因子遺伝子破壊株ライブラリーを利用した転写調節因子の探索を行った。アカパンカビのCWI経路では、細胞壁損傷に関わる遺伝子が制御されていると考えられる。これまでに、micafungin処理により誘導される遺伝子およびMAPキナーゼにより制御される遺伝子を同定してきたが、必ずしも多くの遺伝子を特定できているわけではない。CWI経路で働く転写調節因子は、*Δmak-1, Δmak-2*と同様にmicafunginなどに感受性になると期待される。そこで、転写因子の破壊株ライブラリーからCWI経路で働く転写因子の探索を行った。

3-2. 材料と方法

アカパンカビの菌株、培地及び感受性試験

網羅的遺伝子破壊株作製プロジェクトによって、現時点で174種類の転写調節因子の破壊株が作出されている(Colot *et al.*, 2006)。174種類の転写調節因子の遺伝子破壊株をVM培地にて培養した。

細胞壁感受性試験は、174種類の転写調節因子遺伝子破壊株のmicafunginとpolyoxin Dに対する感受性を野生株と比較することにより行った。各破壊株の分生子を滅菌水に懸濁し、約3×10^4個/mlの分生子数となるよう濃度調整し、約1500個の分生子をsorbose含有Vogel's 寒天培地上に接種し、28℃で3日間培養した。高感受性株の判定は、野生株を対照としたコロニー形成の有無および生育程度により行った。ファーストスクリーニングで選抜した高感受性株については、細胞壁損傷剤に対する感受性をさらに精査するため、micafungin, polyoxin Dに加えて, SDS, Calcofluor White, 及びCongo Red に対する感受性についても解析した。感受性試験は、各薬剤を含むsorbose含有Vogel's 寒天培地における胞子希釈法により行った。

遺伝子発現解析

分生子における遺伝子発現解析では、各株の分生子(6.6×10^5 cells/ml)をVM培地で室温条件下、4時間の振盪培養後、遠心チューブに移して遠心分離により上清(培地)を除き、分生子を回収した。また、菌糸体における遺伝子の発現解析では、各株の分生子(6.6×10^5 cell/ml)をVM培地に植菌してから16時間培養し、1μg/ml micafungin 処理を2時間行い、吸引濾過により菌糸体を回収した。回収した菌体は液体窒素を用いて凍結し、使用するまで-80℃で凍結保存した。アカパンカビのRNAの調製とcDNA合成は、第1章, 第2章と同様の手順で行った。

定量RT-PCR

定量RT-PCRは、第1章と同様のプロトコルに準て行った。本章で使用した定量RT-PCRに使用したプライマー及びTaqMan Probeは第1章Table 2と同様のものを使用した。

アカパンカビのゲノムDNA抽出及び調製

第1章と同様の方法で行った。

Polymerase chain reaction (PCR)

第1章と同様の方法で行った。

3-3. 結果と考察

3-3-1. 破壊株を利用したMAK-1制御転写調節因子のスクリーニング

CWI経路で働く転写調節因子の遺伝子破壊株は、*Δmak-1*, *Δmak-2*と同様にmicafunginなどに高感受性になると期待される。アカパンカビの網羅的遺伝子破壊株プロジェクトにより作出された174種類の転写調節因子の破壊株をライブラリーから植え出したところ、10種類の破壊株(NCU08726, NCU06799, NCU03975, NCU00385, NCU02853, NCU03552, NCU05285, NCU09576, NCU03184, NCU05970)が死滅しており、試験に供することができなかった、また、*rco-1* (regulator of conidiation-1) 破壊株(NCU06205)は、分生子を必要十分に形成せず、感受性試験から除外した。これら11種類以外の163種類の破壊株をファーストスクリーニングの対象とし、micafungin及びpolyoxin Dに対する感受性を調べた。

micafungin及びpolyoxin Dに対する感受性試験の結果をTable 12に記す。Table 12において、野生株と同程度の感受性を示した株を「＋」、野生株よりも高い感受性を示した株を「－」で示した。NCU02671 (#100), NCU05064 (#151)及びNCU06487 (#154)の3種類の遺伝子破壊株がmicafunginに対して高感受性を示した。また、polyoxin Dに対して高い感受性を示した株は、NCU07788 (#19), NCU06411 (#77), NCU03593 (#87), NCU04731 (#96), NCU02666 (#99), NCU02671 (#100), NCU02713 (#102), NCU02957 (#104), NCU03244 (#107), NCU06503 (#113), NCU07039 (#115), NCU00019 (#125), NCU02094 (#162)の13種類であった。これらの中で、NCU02671の遺伝子破壊株(*Δmsn-1*)は、micafunginだけでなくpolyoxin Dに対して野生株と比べ高い感受性を示す唯一の破壊株であった。一方で、出芽酵母のCWI経路の転写調節因子Rlm1のオルソログである*rlm-1*破壊株(*Δrlm-1*)は、この両剤に対する感受性は野生株と同程度であった。

Table 12. Sensitivity of transcription factor disruptants to micafungin and polyoxin D.

#[1)]	NCU locus	Type	Gene	Description[2)]	MC[3)]	PD[4)]
1	NCU01478	$Zn(II)_2Cys_6$[5)]		fungal specific[10)]	+	+
2	NCU02934	$Zn(II)_2Cys_6$[5)]		fungal specific[10)]	+	+
3	NCU08000	$Zn(II)_2Cys_6$[5)]	*far-1*	cutinase transcription factor 1 alpha	+	+
4	NCU07007	$Zn(II)_2Cys_6$[5)]		submerged protoperithecia-2	+	+
5	NCU08294	$Zn(II)_2Cys_6$[5)]	*nit-4*	nitrogen assimilation transcription factor nit-4	+	+
6	NCU08652	$Zn(II)_2Cys_6$[5)]		fungal specific[10)]	+	+
7	NCU08651	$Zn(II)_2Cys_6$[5)]	*col-27*	zinc binuclear cluster-type protein	+	+
8	NCU06656	$Zn(II)_2Cys_6$[5)]	*acu-15*	transcription activator protein acu-15	+	+
9	NCU02752	$Zn(II)_2Cys_6$[5)]		C6 transcription factor Prf	+	+
10	NCU07374	$Zn(II)_2Cys_6$[5)]		fungal specific[10)]	+	+
11	NCU06407	$Zn(II)_2Cys_6$[5)]	*vad-3*	zinc finger transcription factor 1	+	+
12	NCU05383	$Zn(II)_2Cys_6$[5)]	*col-24*	fungal specific[10)]	+	+
13	NCU00217	$Zn(II)_2Cys_6$[5)]		fungal specific[10)]	+	+
14	NCU04866	$Zn(II)_2Cys_6$[5)]	*ada-6*	all development alterd-6 / fungal specific[10)]	+	+
15	NCU03110	$Zn(II)_2Cys_6$[5)]		fungal specific[10)]	+	+
16	NCU05994	$Zn(II)_2Cys_6$[5)]		transcription factor TamA	+	+
17	NCU05536	$Zn(II)_2Cys_6$[5)]		fungal specific[10)]	+	+
18	NCU07705	$Zn(II)_2Cys_6$[5)]		C6 finger domain / fungal specific[10)]	+	+
19	NCU07788	$Zn(II)_2Cys_6$[5)]	*col-26*	colonial-26 / fungal specific[10)]	+	—
20	NCU06990	$Zn(II)_2Cys_6$[5)]		fungal specific[10)]	+	+
21	NCU06028	$Zn(II)_2Cys_6$[5)]		quinic acid utilization activator	+	+
22	NCU03120	$Zn(II)_2Cys_6$[5)]		fungal specific[10)]	+	+
23	NCU01097	$Zn(II)_2Cys_6$[5)]		fungal specific[10)]	+	+
24	NCU05411	$Zn(II)_2Cys_6$[5)]		pathway specific nitrogen regulator	+	+
25	NCU07392	$Zn(II)_2Cys_6$[5)]		transcriptional regulatory protein Pro-1	+	+
26	NCU08848	$Zn(II)_2Cys_6$[5)]		fungal specific[10)]	+	+
27	NCU04359	$Zn(II)_2Cys_6$[5)]		predicted protein	+	+
28	NCU08049	$Zn(II)_2Cys_6$[5)]		predicted protein	+	+
29	NCU08899	$Zn(II)_2Cys_6$[5)]		fungal specific[10)]	+	+
30	NCU03643	$Zn(II)_2Cys_6$[5)]		cutinase transcription factor 1 beta	+	+
31	NCU05767	$Zn(II)_2Cys_6$[5)]		PRO1A C6-zinc finger protein	+	+
32	NCU03931	$Zn(II)_2Cys_6$[5)]	*ada-5*	all development alterd-6	+	+
33	NCU02307	$Zn(II)_2Cys_6$[5)]		conserved hypothetical protein	+	+
34	NCU07139	$Zn(II)_2Cys_6$[5)]		fungal specific[10)]	+	+
35	NCU07945	$Zn(II)_2Cys_6$[5)]	*tah-4*	tall aerial hyphae-4 / fungal specific[10)]	+	+
36	NCU03320	$Zn(II)_2Cys_6$[5)]	*ada-4*	all development alterd-4	+	+
37	NCU08658	$Zn(II)_2Cys_6$[5)]		C6 finger domain	+	+
38	NCU08443	$Zn(II)_2Cys_6$[5)]		fungal specific[10)]	+	+
39	NCU09739	$Zn(II)_2Cys_6$[5)]	*ada-7*	all development alterd-7	+	+
40	NCU06068	$Zn(II)_2Cys_6$[5)]	*col-25*	colonial-26 / fungal specific[10)]	+	+

Table 12. Continued.

#[1)]	NCU locus	Type	Gene	Description [2)]	MC[3)]	PD[4)]
41	NCU00945	$Zn(II)_2Cys_6$[5)]	*col-20*	colonial-20 / fungal specific [10)]	+	+
42	NCU09829	$Zn(II)_2Cys_6$[5)]		fungal specific [10)]	+	+
43	NCU06971	$Zn(II)_2Cys_6$[5)]	*xlnR*	transcription factor xlnR	+	+
44	NCU02214	$Zn(II)_2Cys_6$[5)]	*tah-2*	tall aerial hyphae-2 / fungal specific [10)]	+	+
45	NCU02896	$Zn(II)_2Cys_6$[5)]	*ada-3*	all development alterd-3	+	+
46	NCU02142	$Zn(II)_2Cys_6$[5)]		hypothetical protein	+	+
47	NCU02576	$Zn(II)_2Cys_6$[5)]		C6 finger domain	+	+
48	NCU04001	$Zn(II)_2Cys_6$[5)]	*ff-7*	female fertility-7	+	+
49	NCU05294	$Zn(II)_2Cys_6$[5)]		C6 finger domain	+	+
50	NCU00017	$Zn(II)_2Cys_6$[5)]		hypothetical protein	+	+
51	NCU03686	$Zn(II)_2Cys_6$[5)]	*tah-3*	tall aerial hyphae-3	+	+
52	NCU05993	$Zn(II)_2Cys_6$[5)]		hypothetical protein	+	+
53	NCU09804	$Zn(II)_2Cys_6$[5)]		C6 transcription factor	+	+
54	NCU03417	$Zn(II)_2Cys_6$[5)]		hypothetical protein / fungal specific [10)]	+	+
55	NCU09549	$Zn(II)_2Cys_6$[5)]		fungal specific [10)]	+	+
56	NCU00289	$Zn(II)_2Cys_6$[5)]	*tah-1*	tall aerial hyphae-1	+	+
57	NCU08901	$Zn(II)_2Cys_6$[5)]		fungal specific [10)]	+	+
58	NCU04851	$Zn(II)_2Cys_6$[5)]		fungal specific [10)]	+	+
59	NCU02768	$Zn(II)_2Cys_6$[5)]		no domains annotated	+	+
60	NCU08063	$Zn(II)_2Cys_6$[5)]		fungal specific [10)]	+	+
61	NCU07535	$Zn(II)_2Cys_6$[5)]	*sah-3*	short aerial hyphae-3	+	+
62	NCU03489	$Zn(II)_2Cys_6$[5)]	*col-21*	colonial-21	+	+
63	NCU09205	$Zn(II)_2Cys_6$[5)]	*vad-6*	vegetative asexual development-6	+	+
64	NCU05051	$Zn(II)_2Cys_6$[5)]	*col-23*	colonial-23	+	+
65	NCU09529	$Zn(II)_2Cys_6$[5)]		hypothetical protein	+	+
66	NCU08289	$Zn(II)_2Cys_6$[5)]	*dmm-2*	DNA methylation modulator-2	+	+
67	NCU01629	C_2H_2[6)]		hypothetical protein	+	+
68	NCU00694	C_2H_2[6)]		hypothetical protein	+	+
69	NCU05909	C_2H_2[6)]		hypothetical protein	+	+
70	NCU06919	C_2H_2[6)]		hypothetical protein	+	+
71	NCU03073	miscellaneous [7)]		histone like transcription factor	+	+
72	NCU02017	miscellaneous [7)]	*ada-2*	all development alterd-2	+	+
73	NCU03070	miscellaneous [7)]		fungal specific [10)]	+	+
74	NCU00097	miscellaneous [7)]	*bek-1*	beak-1	+	+
75	NCU03962	miscellaneous [7)]		hypothetical protein	+	+
76	NCU07561	miscellaneous [7)]		fungal specific [10)]	+	+
77	NCU06411	miscellaneous [7)]	*vad-4*	vegetative asexual development-4	+	—
78	NCU00233	bZIP [8)]		glysoside hydrolase 16	+	+
79	NCU00285	C_2H_2[6)]		hypothetical protein	+	+
80	NCU00329	bZIP [8)]	*vad-1*	vegetative asexual development-1	+	+

Table 12. Continued.

#[1)]	NCU locus	Type	Gene	Description[2)]	MC[3)]	PD[4)]
81	NCU00499	bZIP[8)]	*ada-1*	all development alterd-1	+	+
82	NCU00808	$Zn(II)_2Cys_6$[5)]		C6-finger domain containing protein	+	+
83	NCU00902	GATA[9)]	*wc-2*	zinc finger white collar protein WC-2	+	+
84	NCU01122	C_2H_2[6)]		hypothetical protein	+	+
85	NCU01154	GATA[9)]	*sub-1*	submerged protoperithecia-1	+	+
86	NCU03356	miscellaneous[7)]		predicted protein	+	+
87	NCU03593	miscellaneous[7)]		hypothetical protein similar to homeoprotein	+	—
88	NCU03699	C_2H_2[6)]		hypothetical protein	+	+
89	NCU03905	bZIP[8)]	*nap-1*	NAP-1	+	+
90	NCU04179	C_2H_2[6)]	*sah-1*	short aerial hyphae-1	+	+
91	NCU04211	bZIP[8)]		hypothetical protein	+	+
92	NCU04390	$Zn(II)_2Cys_6$[5)]	*col-22*	colonial-22 / fungal specific[10)]	+	+
93	NCU04561	C_2H_2[6)]	*mld-1*	melanization defective-1	+	+
94	NCU04619	C_2H_2[6)]		hypothetical protein	+	+
95	NCU04628	C_2H_2[6)]		hypothetical protein	+	+
96	NCU04731	bHLH[9)]	*sah-2*	short aerial hyphae-2	+	—
97	NCU00144	bHLH[9)]		hypothetical protein	+	+
98	NCU01994	bZIP[8)]		bZIP transcription factor	+	+
99	NCU02666	C_2H_2[6)]	*NSDC*	NSDC	+	—
100	NCU02671	C_2H_2[6)]	*msn-1*	MSN1-like	—	—
101	NCU02699	C_2H_2[6)]		hypothetical protein	+	+
102	NCU02713	C_2H_2[6)]	*csp-1*	conidial separation-1	+	—
103	NCU02724	bHLH[9)]		HLH transcription factor	+	+
104	NCU02957	bHLH[9)]		hypothetical protein	+	—
105	NCU02994	C_2H_2[6)]		hypothetical protein	+	+
106	NCU03077	bHLH[9)]		hypothetical protein	+	+
107	NCU03244	miscellaneous[7)]		WD repeat protein	+	—
108	NCU05242	C_2H_2[6)]		C_2H_2 finger domain containing protein	+	+
109	NCU05637	bZIP[8)]		hypothetical protein	+	+
110	NCU06173	miscellaneous[7)]	*csp-1*	hypothetical protein	+	+
111	NCU06186	C_2H_2[6)]		hypothetical protein	+	+
112	NCU06213	miscellaneous[7)]		MIZ zinc finger protein	+	+
113	NCU06503	C_2H_2[6)]		C_2H_2 finger domain containing protein	+	—
114	NCU06744	bHLH[9)]		hypothetical protein	+	+
115	NCU07039	GATA[9)]	*asd-4*	ascus development-4	+	—
116	NCU07379	bZIP[8)]		bZIP-type transcription factor	+	+
117	NCU08634	miscellaneous[7)]		hypothetical protein	+	+
118	NCU08744	bZIP[8)]		hypothetical protein	+	+
119	NCU09033	$Zn(II)_2Cys_6$[5)]		C6 transcription factor	+	+
120	NCU09068	GATA[9)]	*nit-2*	nitrate nonutilizer-2	+	+

Table 12. Continued.

#[1)]	NCU locus	Type	Gene	Description[2)]	MC[3)]	PD[4)]
121	NCU09252	C_2H_2[6)]		hypothetical protein	+	+
122	NCU09333	C_2H_2[6)]		zinc finger transcription factor ace1	+	+
123	NCU10006	C_2H_2[6)]		hypothetical protein	+	+
124	NCU00090	C_2H_2[6)]		pH response transcription factor pacC	+	+
125	NCU00019	miscellaneous[7)]	*FKH1*	FKH1	+	—
126	NCU00749	bHLH[9)]	*chc-1*	hypothetical protein	+	+
127	NCU02173	C_2H_2[6)]		C6 zinc finger protein	+	+
128	NCU05210	miscellaneous[7)]	*uvs-2*	ultraviolet sensitive-2	+	+
129	NCU07900	bZIP[8)]		hypothetical protein	+	+
130	NCU09315	bHLH[9)]	*nuc-1*	nuclease-1	+	+
131	NCU00038	C_2H_2[6)]		C_2H_2 transcription factor	+	+
132	NCU03206	C_2H_2[6)]		C_2H_2 transcription factor	+	+
133	NCU05250	miscellaneous[7)]		hypothetical protein	+	+
134	NCU07952	C_2H_2[6)]	*crz-1*	C_2H_2 transcription factor	+	+
135	NCU09248	miscellaneous[7)]		CCAAT-binding protein subunit HAP3	+	+
136	NCU02356	GATA[9)]	*wc-1*	white color-1	+	+
137	NCU03033	miscellaneous[7)]		CCAAT-binding protein subunit HAP2	+	+
138	NCU00631	miscellaneous[7)]	*crf9-1*	chromatin remodeling factor 9-1	+	+
139	NCU08891	bZIP[8)]		hypothetical protein	+	+
140	NCU00054	$Zn(II)_2Cys_6$[5)]		hypothetical protein	+	+
141	NCU00340	C_2H_2[6)]		hypothetical protein	+	+
142	NCU01345	bZIP[8)]	*atf-1*	ascospore lethal-1	+	+
143	NCU01386	$Zn(II)_2Cys_6$[5)]		hypothetical protein	+	+
144	NCU01459	bZIP[8)]	*ts*	hypothetical protein / asl-2	+	+
145	NCU01871	bHLH[9)]		hypothetical protein	+	+
146	NCU01954	miscellaneous[7)]	*msp-14*	pre-mRNA-splicing factor cwc-24	+	+
147	NCU03266	miscellaneous[7)]		hypothetical protein	+	+
148	NCU03421	C_2H_2[6)]		C_2H_2 transcription factor	+	+
149	NCU04050	bZIP[8)]	*cpc-1*	cross pathway control-1	+	+
150	NCU04827	$Zn(II)_2Cys_6$[5)]		hypothetical protein	+	+
151	NCU05064	C_2H_2[6)]		C_2H_2 transcription factor	—	+
152	NCU05257	miscellaneous[7)]		homeobox and C_2H_2 transcription factor	+	+
153	NCU06399	bZIP[8)]		hypothetical protein	+	+
154	NCU06487	C_2H_2[6)]		hypothetical protein	—	+
155	NCU06907	C_2H_2[6)]		hypothetical protein	+	+
156	NCU07669	$Zn(II)_2Cys_6$[5)]		purine utilization positive regulator	+	+
157	NCU08042	$Zn(II)_2Cys_6$[5)]		fungal specific[10)]	+	+
158	NCU08807	C_2H_2[6)]	*cre-1*	carbon catabolite regulation	+	+
159	NCU09576	C_2H_2[6)]		hypothetical protein	+	+
160	NCU07728	GATA[9)]	*sre*	siderophore regulation	+	+

Table 12. Continued.

#[1)]	NCU locus	Type	Gene	Description[2)]	MC[3)]	PD[4)]
161	NCU08055	bZIP[8)]		bZIP transcription factor IDI4	+	+
162	NCU02094	$Zn(II)_2Cys_6$[5)]	*vad-2*	vegetative asexual development-2	+	—
163	NCU02558	miscellaneous[7)]	*rlm-1*	MADS-box MEF2 type transcription factor	+	+
164	NCU08726	$Zn(II)_2Cys_6$[5)]	*fl*	fluffy	nt[11)]	nt[11)]
165	NCU06799	$Zn(II)_2Cys_6$[5)]	*vad-5*	vegetative asexual development-5	nt[11)]	nt[11)]
166	NCU03975	C_2H_2[6)]		zinc finger protein 58	nt[11)]	nt[11)]
167	NCU00385	C_2H_2[6)]		ATP synthase subunit delta	nt[11)]	nt[11)]
168	NCU02853	C_2H_2[6)]		C_2H_2 transcription factor	nt[11)]	nt[11)]
169	NCU03552	C_2H_2[6)]		hypothetical protein	nt[11)]	nt[11)]
170	NCU05285	C_2H_2[6)]		C_2H_2 transcription factor RfeC	nt[11)]	nt[11)]
171	NCU09576	C_2H_2[6)]		hypothetical protein	nt[11)]	nt[11)]
172	NCU03184	C_2H_2[6)]		conidiation transcription factor FlbC	nt[11)]	nt[11)]
173	NCU05970	bHLH[9)]		hypothetical protein	nt[11)]	nt[11)]
174	NCU06205	miscellaneous[7)]	*rco-1*	regulator of conidiation-1	nt[11)]	nt[11)]

Neurospora knockout strains from the functional genomics program (Colot *et al*., 2006) were obtained from Fungal Genetics Stock Center. The "+" shows that the sensitivity of the indicated strains to micafungin or polyoxin D are almost equal to that of wild-type stain, whereas "-" does high sensitivity to each chemicals, compared to wild-type stain.

1, # : Serial number of transcription factor in this study.

2, Description : *Neurospora crassa* Database at Broad Institute

3, MC : 1 μg/ml micafungin

4, PD : 75 μg/ml Polyoxin D

5, $Zn(II)_2Cys_6$: $Zn(II)_2Cys_6$ type transcription factor

6, C_2H_2 : C_2H_2 type transcription factor

7, miscellaneous : miscellaneous type transcription factor

8, bZIP : bZIP –domain containing transcription factor

9, GATA : GATA –domain containing transcription factor

10, fungal specific : fungal specific transcription factor

11, nt : not tested

3-3-2. *msn-1*及び*rlm-1*破壊株の細胞壁損傷に対する感受性

MAK-1が制御する転写調節因子の第一候補と考えられたRLMの破壊株*Δrlm-1*はmicafunginやpolyoxin Dに対して顕著な感受性を示さなかった。一方、転写調節因子MSN-1の破壊株*Δmsn-1*は、micafunginとpolyoxin Dに対して高い感受性を示した。ファーストスクリーニングで両薬剤に同時に感受性を示した転写調節因子破壊株は、唯一*Δmsn-1*のみであった。そこで、RLM-1とMSN-1に着目し、*Δrlm-1*と*Δmsn-1*の細胞壁損傷剤に対する感受性を詳細に検討した。

Vogel's 寒天培地上において、*Δrlm-1*は野生株と同等の生育速度を示したが、*Δmsn-1*は野生株よりも顕著な生育遅延を示した(Fig. 35)。

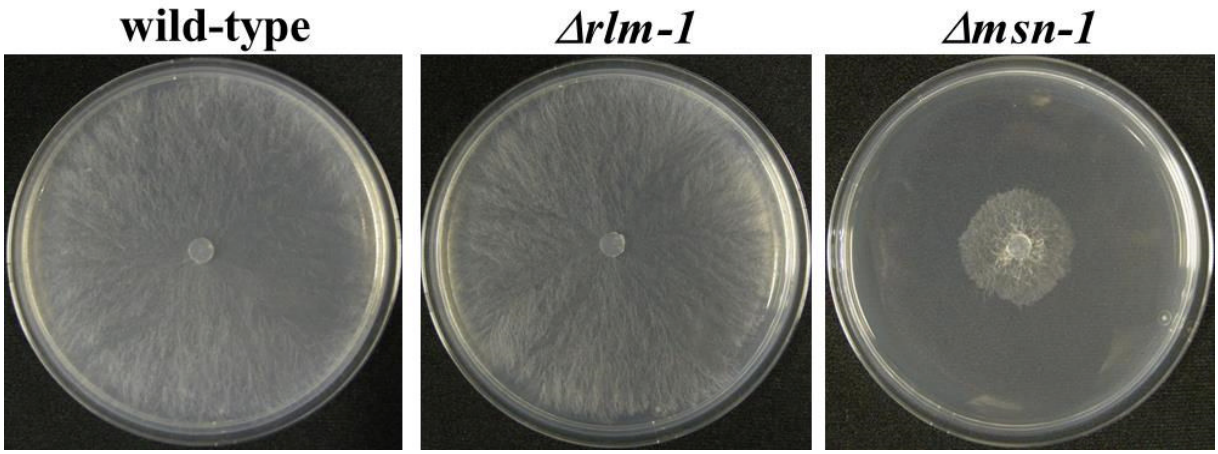


Fig. 35. Comparison of growth and morphology of wild-type, *Δrlm-1*, *Δmsn-1*.

細胞壁損傷剤に対する感受性は、胞子希釈法により調べたところ、*Δrlm-1*は、供試した5種類の細胞壁損傷剤（micafungin, polyoxin D, SDS, CFW, CR）のいずれに対しても野生株と同程度の感受性であった(Fig. 36)。一方、*Δmsn-1*はファーストスクリーニングの結果を良く反映しており、micafungin 及びpolyoxin Dに対しては野生株よりも顕著に高い感受性を示した。また、CFWやCRに対する感受性は野生株と同程度であった。*Δmsn-1*が示すこれらの細胞壁損傷剤に対する感受性のパターンは*Δmak-1*と良く一致していた。この結果から、MSN-1がMAK-1の制御をうける転写調節因子の1つである可能性が強く示唆された。

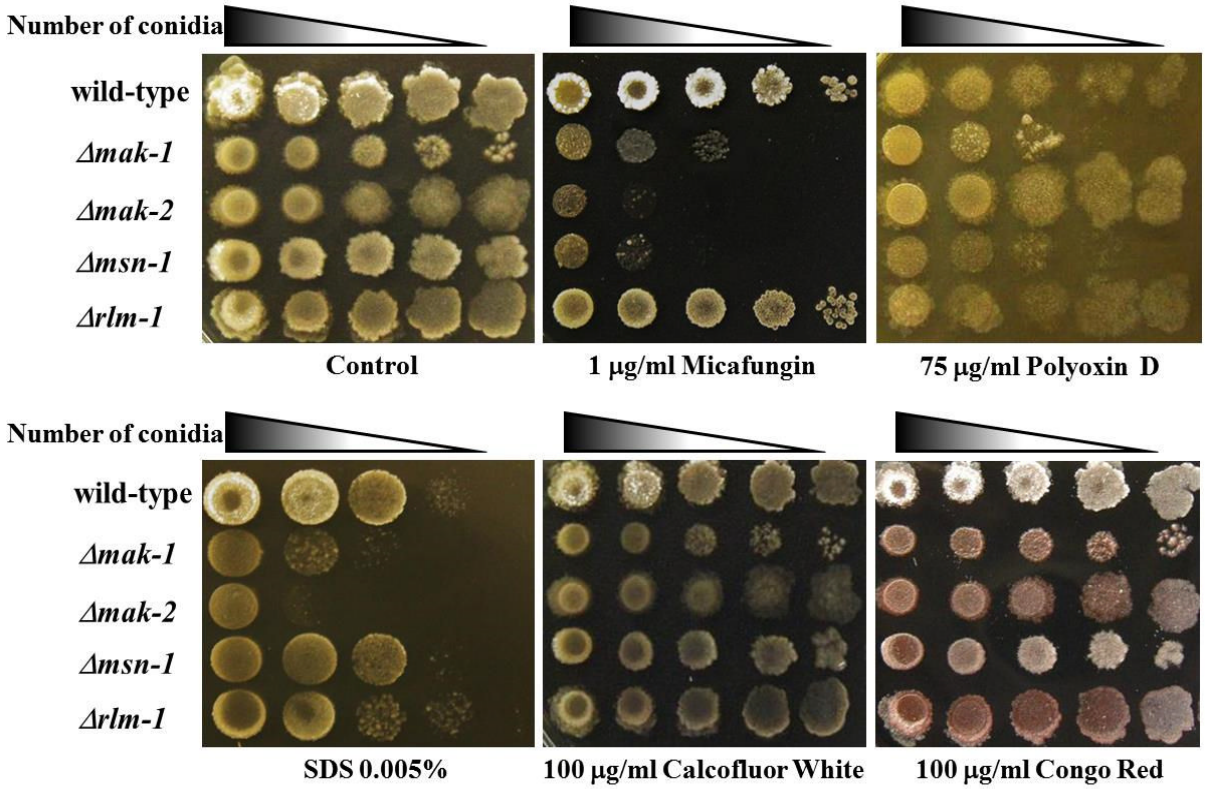


Fig. 36. Sensitivity of*Δrlm-1* and *Δmsn-1* to cell wall damaging agents.

3-3-3. 転写調節因子MSN-1が制御する遺伝子の同定

転写調節因子MSN-1は酵母のMAPキナーゼHog1により制御される転写調節因子Msn2/4のオルソログである。出芽酵母の浸透圧応答経路(Hog1 MAPキナーゼ経路)下流に位置する3種類の転写調節因子として、Sko1, Yap1, Msn2/4が知られている。出芽酵母では、Histidine kinase Sln1が浸透圧ストレスを感知すると、Hog1 MAPキナーゼカスケードにシグナルが伝達され、Hog1 MAPキナーゼ下流に位置する転写調節因子Sko1とMsn2/4が活性型となり、グリセロール合成系やカタラーゼ遺伝子などの発現を制御する。また、酸化ストレスによってHog1が活性化されると、下流に位置するAP-1様転写調節因子Yap1 が*SOD1* (superoxide dismutase), *TRX* (thioredoxin isoenzyme), *GSH1* (gamma glutamylcysteine synthetase)など、活性酸素の除去に関与する酵素遺伝子群の発現調節を行う。

アカパンカビにも出芽酵母のSko1, Yap1, Msn2/4のオルソログが存在してお

り、それぞれATF-1, NAP-1, MSN-1と命名されている(Fig. 37)。

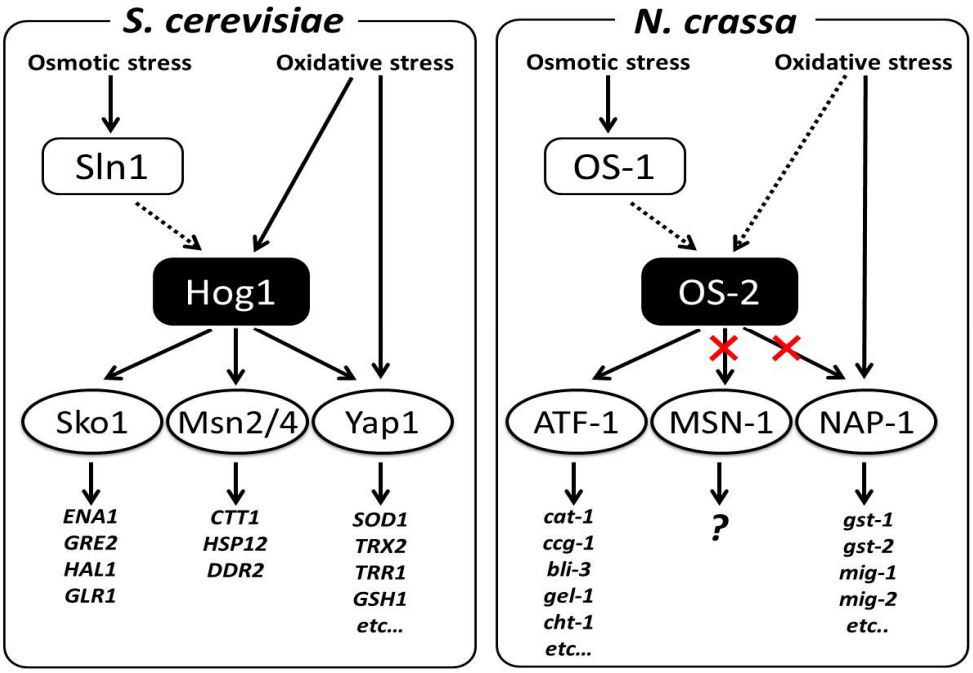


Fig. 37. 出芽酵母のHog1経路とアカパンカビのOS経路の比較

出芽酵母のSko1オルソログであるATF-1は、前章でも述べたとおり、アカパンカビにおいても浸透圧応答を担うOS経路下流に位置し、グリセロール合成や概日リズム、細胞壁構築に関与する遺伝子の発現制御に関与し、浸透圧応答に重要な役割を担う。NAP-1は酵母のYap1オルソログであり、破壊株がメナジオンやH_2O_2に高感受性を示し、酸化ストレスによって発現誘導するglutathione S-transferase (*gst-1*, *gst-2*など)やoxidoreductase遺伝子の発現を制御する。このことから、NAP-1は酸化ストレス応答を司る重要な転写調節因子であることが明らかになっている(Takahashi *et al.*, 2010)。しかし、OS-2依存性遺伝子のうち、ATF-1非依存の遺伝子の発現にNAP-1が関与していないことから、OS-2 MAPキナーゼ下流には存在しないことが示唆されている。

アカパンカビのMSN-1は出芽酵母のMsn2/4のオルソログであり、*Δmsn-1*がH_2O_2やメナジオンに対して耐性を示すことから、MSN-1が酸化ストレス応答関連の遺伝子を負に制御すると推定されたが、*CTT1*や*SOD1* (superoxide dismutase)

などの遺伝子発現には関与していないことが示されている(高橋正和博士，東洋大学大学院，博士学位論文)。また、OS経路依存的に制御される遺伝子群の発現にも関与していないため、NAP-1と同様に、MSN-1もOS-2 MAPキナーゼ下流に位置しないことが示唆されている。従って、MSN-1依存的に発現制御される遺伝子群は未だ特定されておらず、MSN-1の機能についても不明な点が多い。

*Δrlm-1*はmicafunginやpolyoxin Dに高感受性を示さなかったが、*Δmsn-1*はその両剤に高い感受性を示した。*Δmsn-1*の示すその感受性は、*Δmak-1*の示す感受性と同程度である。MSN-1やRLM-1がMAK-1下流の転写調節因子であるとすれば、MAK-1制御遺伝子の発現に関与する可能性を推定した。そこで、第2章で特定したmicafunginにより誘導するMAK-1制御遺伝子*egl-1*と*ncw-1*の発現が、MSN-1に依存しているのかを定量RT-PCRで解析した(Fig. 38)。

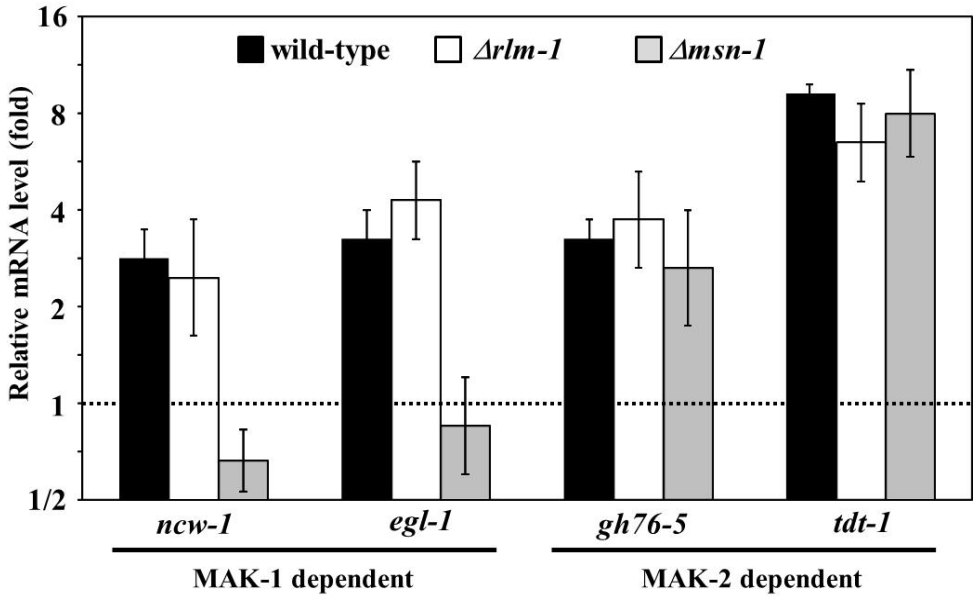


Fig. 38. MAK-1制御遺伝子のMSN-1、RLM-1依存性

縦軸：無処理条件の発現量に対する micafungin 処理条件下の相対的発現量

野生株において、*egl-1, ncw-1*はmicafungin処理によって発現量が顕著に上昇したが、*Δmsn-1*ではmicafungin処理よる発現誘導が完全に消失していた。また、*rlm-1*を欠損してもこの2遺伝子の発現量は野生株と同程度に上昇した。一方、MAK-2依存遺伝子である*gh76-5*や*tdt-1*のmicafunginによる誘導は、野生株同様

に*Δmsn-1*と*rlm-1*においても認められた。このことから、MSN-1はMAK-1が制御する*egl-1, ncw-1*の誘導には必須であるが、MAK-2が制御する遺伝子には関与しないことが明らかになった。従って、アカパンカビのMSN-1はMAK-1下流に位置する転写調節因子であることが明らかになった。

3-3-4. 転写調節因子RLM-1が制御する遺伝子の同定

出芽酵母のCWI 経路のRLM-1はMpk1 MAPキナーゼ下流に位置し、beta-1,3-グルカン合成酵素遺伝子*FKS1*やキチン合成酵素*CHS3*の発現を制御している。そのオルソログであるアカパンカビの転写調節因子RLM-1の破壊株は、*Δmak-1*が示すmicafunginやpolyoxin D感受性が認められず、MAK-1が制御する*egl-1, ncw-1*の制御にも関与していなかった。しかし、MAK-1は、誘導自体は必ずしも強くないが、細胞壁合成酵素*ags-1, fks-1*や*chs-3*などの誘導を制御していた。そこで、RLM-1が*fks-1*や*chs-3*、および糸状菌に特有な遺伝子であるalpha-1,3-グルカン遺伝子(*ags-1, ags-2*)の発現制御に関与するのかを検証した(Fig. 39)。

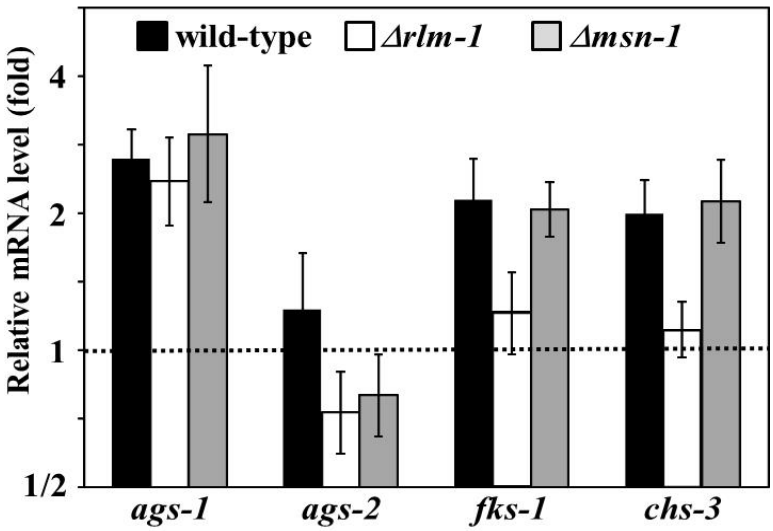


Fig. 39. *ags-1, ags-2, fks-1, chs-3*のRLM-1、MSN-1依存性

縦軸：無処理条件の発現量に対する micafungin 処理条件下の相対的発現量

beta-1,3-グルカン合成酵素遺伝子*fks-1*やキチン合成酵素遺伝子*chs-3*は、

*Δrlm-1*においては、野生株や*Δmsn-1*で認められるmicafungin処理による発現誘導が有意に減少したことから、RLM-1は*fks-1*や*chs-3*の発現に関与することが示された。ただし、その誘導は完全には消失していなかったことから、RLM-1単独による制御ではない可能性も残されている。一方、*ags-1, ags-2*の発現量は、野生株、*Δrlm-1*、*Δmsn-1*株間でほぼ変動しなかったことから、RLM-1やMSN-1は、この発現制御には関与していないと考えられる。

これまでの結果を転写調節因子とその制御遺伝子についてまとめると下記のようになる。アカパンカビにおいてもRLM-1はMAK-1下流に位置しており、*fks-1*と*chs-3*の発現を制御する転写調節因子であることが示された。さらに、MSN-1はOS-2下流に位置していないことが知られていたが、MAK-1経路下流の転写調節因子であることが見出された(Fig. 40)。これらの結果から、細胞壁の損傷に応答して、RLM-1とMSN-1という2種類の転写調節因子がCWIに貢献することが明らかになった。

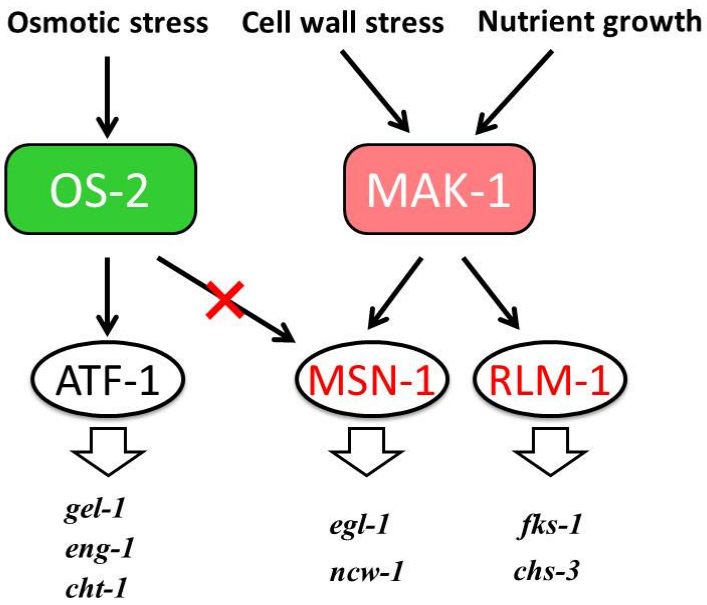


Fig. 40. MAK-1下流に位置する転写調節因子MSN-1とRLM-1

総合考察及び結論

本研究は、糸状菌において未だ明らかにされていない「cell wall integrity : CWI (細胞壁の完全性)を制御するシグナル伝達経路」を解明するため、モデル糸状菌であるアカパンカビを研究材料として使用し、MAPキナーゼを中心に解析を行った研究である。

第1章では、アカパンカビの3種類のMAPキナーゼ (MAK-1, MAK-2, OS-2)のCWIへの貢献度について比較し、MAK-1とMAK-2が細胞壁損傷剤応答することを示した。さらに、遺伝子発現解析によって、MAK-1やMAK-2の下流で制御される細胞壁関連遺伝子群を特定した。また、MAK-1経路とMAK-2経路の間にクロストークが存在する可能性を示唆した。第2章では、OS-2が浸透圧に応答して、細胞壁構築関連遺伝子群の発現制御にも関与することを明らかにした。さらに、細胞壁合成を担う*gel*遺伝子群が、生育過程やストレス種によって発現応答し、CWIの維持において重要な役割を担うことを示した。最後に第3章では、MAK-1下流に位置する転写調節因子がRLM-1とMSN-1であり、これらが糸状菌の細胞壁構築において中心的役割を担う転写因子であることを明らかにした。

出芽酵母は5種類のMAPキナーゼをもつが、そのうちのMpk1が、CWIの中心的な役割をしており、多くの糸状菌研究者もMpk1オルソログを解析しているが、Mpk1様MAPキナーゼが明確にCWIを制御するという報告はこれまでにない。本研究では、アカパンカビに存在する3種類のMAPキナーゼ（OS-2, MAK-1, MAK-2）がCWIに関与するかを検証した。まず、各MAPキナーゼの遺伝子破壊株の細胞壁損傷剤に対する感受性によって評価したところ、MAK-1やMAK-2の関与が示唆された。感受性試験からは、Mpk1オルソログであるMAK-1よりも有性生殖を司るMAK-2がむしろよりCWIへの貢献が大きいことが示唆された。ただし、

MAK-1はグルカン合成阻害剤だけでなく、キチン合成阻害剤にも感受性を示しており、MAK-1もCWIに主要な役割を担うことが考えられた。MAK-1とMAK-2の両方がCWIに関与する可能性は、リン酸化解析でも裏付けられた。MAPキナーゼは上流からのシグナルを受けるとリン酸化されて活性化されるが、菌体をグルカン合成阻害剤で処理すると、両MAPキナーゼがリン酸化されることを明らかにした。一方、浸透圧などのストレス応答に関わるOS-2はグルカン合成阻害剤感受性およびリン酸化解析からは、CWIに貢献していないと推定された。しかし、OS-2は特定の細胞壁関連酵素の遺伝子の発現を制御していた。このことから、糸状菌であるアカパンカビでは、CWIは酵母のように1つのMAPキナーゼがほぼ単独で制御しているというよりも3種のMAPキナーゼがそれぞれに役割分担をしていると考えられる。逆にいうと、このことが様々な糸状菌でCWI経路の研究が行われているにも関わらず、その研究結果が必ずしも明確でない原因と考えることができる。

何故、アカパンカビでは有性生殖を担うMAK-2がCWIに関与するかについては、推論の域をでないが、最近の研究により、MAK-2は、有性生殖のみでなく、菌糸融合を制御することが明らかになっている。これは、有性生殖とは独立しており、、同一の交配型間(交配型A同士あるいはa同士)の発芽管の先端で、相手の細胞を認識して菌糸が融合する現象であり、近接しているが接触していない細胞間で細胞と細胞が相互認識するコミュニケーションにMAK-2が重要な働きをしている。菌糸融合は多核の細胞からなる糸状菌では一般に認められる現象である。異なる細胞間で融合するには、当然、接着部分で細胞壁が溶解され新生される必要があり、その時にもCWIが制御される必要がある。酵母は、アカパンカビと同様に、有性生殖では雌雄の細胞が融合するが、無性世代の細胞同士が融合する現象は認められない。このことが糸状菌では、MAK-2がCWIに関与する原因である可能性が考えられる。本研究では、MAK-2の細胞内局在性

を蛍光タンパク質を利用して解析した。MAK-2は、通常、細胞質に散在するが、グルカン合成阻害剤処理により核に局在するようになった。この局在の変化は、MAK-2が細胞壁損傷で遺伝子発現を誘導することを強く示唆しており、MAK-2のCWIへの関与をさらに補強する証拠と考えることができる。さらに、MAK-2は核のみでなく、損傷を受けた細胞の隔壁孔にも局在することを見出した。このことは、細胞壁が損傷して原形質が流出するのを防ぐために隔壁孔を塞ぐ役割をになっていると考えられる。MAPキナーゼは、活性化されると核に移行して転写調節因子をリン酸化して特定の遺伝子群の発現を制御すると同時に、細胞質にある特定の酵素をリン酸化して酵素活性の制御を行うことが知られている。MAK-2が隔壁孔でどの酵素をリン酸化しているのかは不明であるが、隔壁孔にはさまざまな酵素が局在することが明らかになってきており、MAK-2の新しい役割として今後の研究が期待される。

MAK-1は、MAK-2が通常の菌糸では細胞質に分布したのに対して、グルカン合成阻害剤の有無に関わらず核に局在していた。このことは、MAK-1が発芽から菌糸伸長の生長段階で常にリン酸化状態にあることと一致した。MAK-1の破壊は、著しい生育遅延を引き起こすことと考え併せると、MAK-1は菌糸生育に伴う細胞壁の更新に応じたCWIを制御していると思われる。本研究では、MAK-1の恒常的リン酸化が、MAK-2の破壊株で消失することを見出した、このことは、両経路間にクロストークが存在することを示している。このクロストークがどのように起こっているかについては、現時点では不明である。しかし、MAK-1のリン酸化には、MAK-1カスケードの因子であるMAPKKキナーゼとMAPKキナーゼが必須であったことから、カスケード単位では独立して制御されていることは明確である。従って、このクロストークは、MAK-2からのシグナルが何らかの形でMAK-1カスケードの上流に入力されて起こっていると推定している。

OS-2は、グルカン合成阻害剤を用いた解析では、CWIへの関与が明らかにな

らなかった。OS-2は浸透圧ストレス応答の中心的な役割を担うMAPキナーゼであるが、その破壊株は、通常の培地では野生株と生育速度や形態形成に大きな差は認められないが、高浸透圧条件下で培養すると細胞壁合成が不全となりプロトプラスト様の形態で増殖する。さらに、OS-2が細胞壁関連遺伝子を制御していたことから、OS-2も浸透圧ストレスによる膨圧に応答して細胞壁の補正を行っていると考えられ、CWIにMAK-1およびMAK-2とは異なる形で関与していると考えられた。

本研究では、アカパンカビのCWI経路を解明するために、細胞壁関連遺伝子に着目して、MAK-1、MAK-2およびOS-2が制御する遺伝子の同定を行った。グルカン合成阻害剤処理で誘導された遺伝子の内、MAK-1は*egl-1*, *ncw-1*を、MAK-2は*gh76-5*, *tdt-1*をそれぞれ発現制御していることを明らかにした(Fig. 18)。*egl-1*のコードするGPI-anchored endo-glucanaseは正常なGPIアンカーの合成に必要とされる酵素として知られ(Mrsa *et al.*, 1993; Kalebina *et al.*, 2002; Sestak *et al.*, 2004)、酵母のCWI経路によって発現制御されており、アカパンカビと酵母のCWI経路の共通点として挙げられる。また、*gh76-5* (alpha-1,6-mannanase)は酵母のCWI経路による制御を受けており、GH76 familyに属するalpha-1,6-mannanaseは酵母やアカパンカビにおいても細胞壁合成における糖タンパクの細胞壁への付加に必要とされることが明らかになっている(Kitagaki *et al.*, 2002; Maddi *et al.*, 2012b)。アカパンカビでは*gh76-5*はMAK-1ではなくMAK-2による制御を受けていた。今回の研究においては、アレイ解析から細胞壁関連酵素遺伝子に限定し、選抜して解析を行っており、結果として、各MAPキナーゼについて、グルカン合成阻害剤で明確に制御されている遺伝子をそれぞれ2遺伝子同定した。MAPキナーゼは多数の遺伝子を制御していると考えられ、今回同定したものは、その一部でしかない。MAK-1及びMAK-2が制御する遺伝子は、更に様々な遺伝子が含まれていると考えられる。しかし、今回同定

した遺伝子は、薬剤処理2時間後で顕著に誘導されるものであり、MAK-1及びMAK-2により転写調節因子を経由して直接制御されている遺伝子である可能性が高い。これまで、細胞壁損傷に応答してMAK-1及びMAK-2経路で制御される明確な遺伝子は同定されていなかったことを考えると、本研究で同定したこれらの遺伝子は、MAK-1及びMAK-2経路をさらに研究してゆく上でのマーカー遺伝子としての利用価値が高いと考える。

OS-2は、浸透圧ストレスに応答して、細胞壁合成系の*gel-1*、細胞壁分解系の*dlh-1, cht-1*の3種類の遺伝子をOS-2－ATF-1依存的に、そして、細胞壁糖タンパクの合成に関与する*ogp-1, gox-1, man-1* をATF-1非依存的に制御していることを特定した(Fig. 25)。

本研究では細胞壁合成酵素の1つとして重要なbeta-1,3-glucanosyltransferase (GEL)に着目して、その機能分化についても調べた。病原糸状菌*F. oxysporum* や*A. fumigatus*では、GELタンパクの欠損が生育の遅延や病原性の低下の誘因となることから、病原性に関与することが報告されている(Bruneau *et al.*, 2001; Caracuel *et al.*, 2005; Gastebois *et al.*, 2010)。糸状菌の*GEL*遺伝子を制御する因子については不明であったが、本研究によって、アカパンカビの5種類の*gel*遺伝子のうち、*gel-1*がストレス応答を担うOS経路により制御されていることを明らかにした(Kamei *et al.*, 2013b)。さらに、GELの機能を明らかにするため、アカパンカビの5種類の*gel*破壊株の表現型解析を行ったところ、*Δgel-3*が菌糸生長における顕著な生育遅延を示し、分生子が密に凝集する形質異常が認められた。また、分生子の発芽や菌糸生長においては、*gel-3*の基礎発現量が最少培地条件下では5つの*gel*の中で最も高かったことからも、アカパンカビの基礎生育ではGEL-3が主として機能するGELであることが示された。さらに、*gel-4*の発現量はmicafungin処理によって約4倍上昇することから、GEL-4は細胞壁損傷に応答し、細胞壁の再構築に寄与するものと推定される。*gel-2, gel-5*特有の機能

については不明な点が多く残されたが、アカパンカビのGEL-2やGEL-5と近縁関係にある*S. pombe*のgas4 は子嚢胞子の細胞壁形成に必要不可欠であることが知られている(de Medina-Redondo *et al.*, 2008)。これらのことから、アカパンカビのGELは、生育環境や細胞の分化に応じて、それぞれのGELを使い分けることにより、CWI維持の役割を担うことが考えられた。

本研究の主要な成果の一つとしてMAK-1により制御される2種類の転写調節因子を同定したことが挙げられる。出芽酵母のMpk1の下流では転写調節因子Rlm1が制御されているが、アカパンカビを含め糸状菌では、Rlm1オルソログがCWI経路で働く転写調節因子であることを明確に示した報告はこれまでない。まず、MAK-1が制御している転写調節因子の第一候補であるRLM-1について、検証を行った。RLM-1の破壊株は、グルカン合成阻害剤やキチン合成阻害剤に対する感受性は認められず、MAK-1の破壊株の形質とは異なった。マイクロアレイ解析からMAK-1制御遺伝子として同定した*egl-1, ncw-1*のいずれもRLM-1の制御を受けていなかった。しかし、出芽酵母のRlm1が制御している、*fks-1*と*chs-3*の発現調節に関与することが明らかになった。これらの遺伝子は、細胞壁ストレスがない状態でも高発現しており、その基礎発現は、MAK-1の欠損による影響は認められなかった。また、これらの遺伝子は、グルカン合成阻害剤による誘導が必ずしも顕著なものではなかったが、2倍程度の誘導が認められた。このことから、RLM-1がCWI経路の転写調節因子であるかを容易には判断できなかった。しかし、再現試験を繰り返すと、グルカン合成阻害剤による誘導は、完全ではないものの、MAK-1の破壊株で有意に低下した。このことから、アカパンカビでもRLM-1がMAK-1により制御される転写調節因子であると結論するに至った。このことは、酵母とアカパンカビのCWI経路の共通性を示している。しかし、アカパンカビでは、これらの主要な細胞壁合成酵素群は、高い基礎発現をしており、これらを制御する別の因子の存在を示唆しているように思われ、

RLM-1の発現制御における貢献度は必ずしも出芽酵母のように大きくはないことが推定された。このことが、糸状菌のRLM-1様転写因子の機能がこれまで明らかにされてこなかった原因と思われる。本研究では、RLM-1に加えてMSN-1がMAK-1により制御される転写調節因子であることを見出した。MSN-1は、MAK-1が制御する*egl-1, ncw-1*の発現を調節する転写調節因子であることを明確に示すことできた。

転写調節因子MSN-1は出芽酵母の浸透圧応答MAPキナーゼHog1により制御される転写調節因子Msn2/4のオルソログである。出芽酵母のHog1下流の転写調節因子にはSko1, Yap1, Msn2/4の3種類が知られており、Msn2/4は、*CTT1*カタラーゼ遺伝子などの発現制御に関与する。以前の研究から、アカパンカビのOS-2は、MSN-1の制御には関与しないことが示されていた(高橋正和博士, 博士学位論文)。

本研究により、アカパンカビのMSN-1はOS-2ではなくMAK-1の下流で働く転写調節因子であることが明らかになった。MSN-1の破壊株は酸化ストレスに耐性を示すことが明らかになっていたが、新たに、グルカン合成阻害剤とキチン合成阻害剤に感受性を示すことが明らかになった。MSN-1は酸化ストレスに顕著な耐性を示すが､酸化ストレス応答に関わる遺伝子の発現制御が認められず、その機構は現在も不明である(高橋正和博士, 東洋大学大学院, 博士学位論文)。しかし、この細胞壁損傷剤に対する形質は、MAK-1の破壊株と良く一致していた。また、MSN-1はGFPを用いた細胞学的解析によって、最少培地での生育条件下においては、細胞核に局在することが明らかになっている(高橋正和博士, 東洋大学大学院, 博士学位論文)。これはMAK-1が菌糸生育においてリン酸されており細胞核への局在性と一致する。これらことから、MAK-1の破壊株が示す細胞壁損傷剤感受性は、MSN-1に起因すると考えられる。MSN-1がMAK-1により制御されることを示した報告はこれまでないが、MSN-1はMAPキナーゼによ

りリン酸化を受けるが、アカパンカビでは、OS-2の代わりにMAK-1がMSN-1をリン酸化していると考えることができる。

最後に、本研究によって示された糸状菌の細胞壁構築を制御するシグナル伝達経路のモデル図を次ページのFig. 41に示す。アカパンカビのCWI経路と出芽酵母のCWI経路との類似点として、Mpk1 MAPキナーゼのMAK-1がCWIの制御に中心的役割を担うことが挙げられる。ただし、細胞壁の構築を制御するシグナル伝達経路としての観点から、3種類のMAPキナーゼ経路を包括的に考察すると、(1) OS経路は浸透圧ストレスに伴う膨圧などに応答した細胞壁構造の変化に対応する役割を担う、(2) MAK-1経路は菌糸伸長や分岐などのいわゆる栄養増殖にともなう細胞壁の構築や補強に関与する、そして、(3) MAK-2経路は菌糸（細胞）融合や細胞壁の損傷による原形質流出を食い止めるための役割を担うことによって、3種類のMAPキナーゼがそれぞれの機能に応じたCWIの制御に貢献していると考えられる。糸状菌は、酵母よりも複雑で多岐に亘る形態変化に伴って、CWIを制御しなくてはならないため、生活環やストレス種に応じて、異なるMAPキナーゼをCWIの制御機構に利用していると考えられる。あるいは、出芽酵母は進化の過程でシンプルな細胞増殖になったため、単一MAPキナーゼにCWIの制御を収斂させた可能性もある。これまで、病原糸状菌においては、細胞壁合成酵素遺伝子やシグナル伝達経路の構成因子の欠損が病原性低下の原因となることが示されていたが、アカパンカビを研究材料とした本研究において、MAPキナーゼごとの細胞壁損傷に対する応答性、CWI制御に関与する転写調節因子RLM-1, MSN-1の発見、そして3種類のMAPキナーゼが制御するCWI関連遺伝子の特定によって、糸状菌の細胞壁構築を制御するシグナル伝達経路を包括的に検証することが出来た。本研究ではMAPキナーゼとその下流の転写調節因子および制御される遺伝子を中心にCWI経路の機構を解明してきた。糸状菌では、MAPキナーゼの上流に位置する細胞壁損傷を感知するセンサータンパ

ク質やMAPキナーゼにシグナルを伝達する因子についてもほとんど解明がなされていない。本研究により得られた細胞壁損傷により誘導される遺伝子は、これらの研究を行うための極めて有効な分子マーカーとなることが期待される。さらに、本研究によって得られた新たな知見は、CWI経路が病原糸状菌の病原性に深く関与していることから、病原糸状菌に対する新規農薬の創薬における新たなターゲット候補として有用な情報提供に貢献するものと考える。

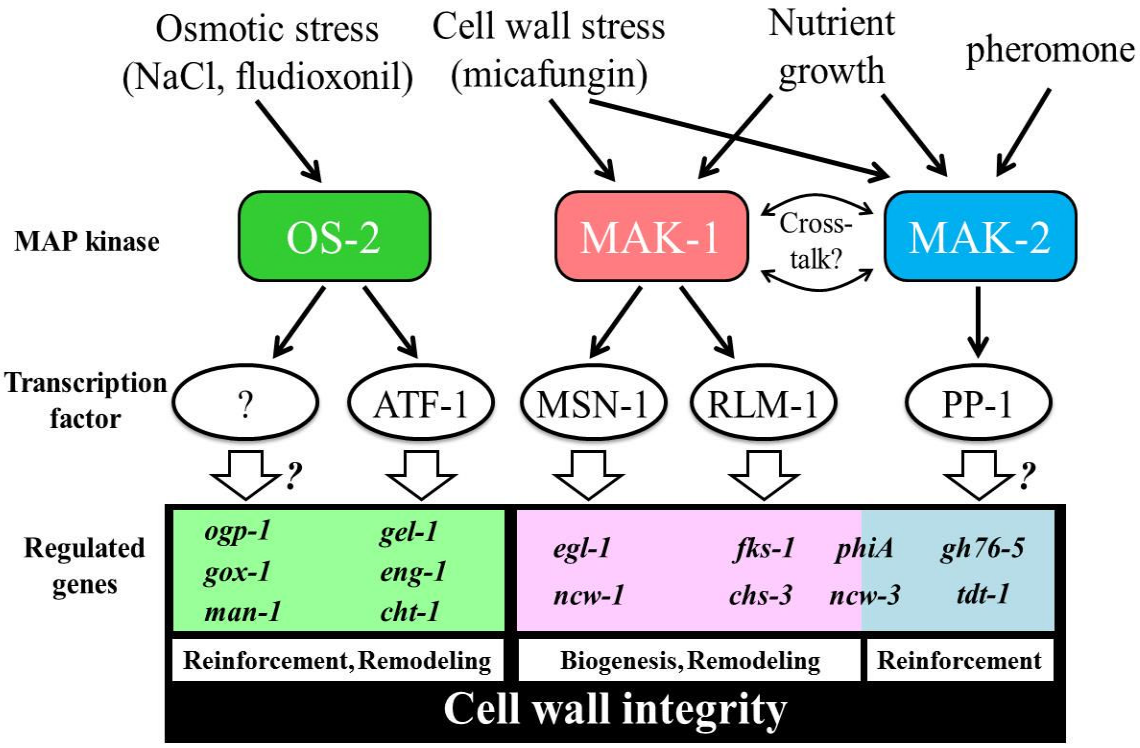


Fig. 41. 糸状菌の細胞壁構築を制御するシグナル伝達のモデル図

参考文献

Araujo-Palomares, C. L., Richthammer, C., Seiler, S., Castro-Longoria, E., 2011. Functional characterization and cellular dynamics of the CDC-42 - RAC - CDC-24 module in *Neurospora crassa*. PLoS One. 6, e27148.

Banno, S., Noguchi, R., Yamashita, K., Fukumori, F., Kimura, M., Yamaguchi, I., Fujimura, M., 2007. Roles of putative His-to-Asp signaling modules HPT-1 and RRG-2, on viability and sensitivity to osmotic and oxidative stresses in *Neurospora crassa*. Curr Genet. 51, 197-208.

Bennett, L. D., Beremand, P., Thomas, T. L., Bell-Pedersen, D., 2013. Circadian activation of the mitogen-activated protein kinase MAK-1 facilitates rhythms in clock-controlled genes in *Neurospora crassa*. Eukaryot Cell. 12, 59-69.

Bermejo, C., Rodriguez, E., Garcia, R., Rodriguez-Pena, J. M., Rodriguez de la Concepcion, M. L., Rivas, C., Arias, P., Nombela, C., Posas, F., Arroyo, J., 2008. The sequential activation of the yeast HOG and SLT2 pathways is required for cell survival to cell wall stress. Mol Biol Cell. 19, 1113-24.

Borkovich, K. A., Alex, L. A., Yarden, O., Freitag, M., Turner, G. E., Read, N. D., Seiler, S., Bell-Pedersen, D., Paietta, J., Plesofsky, N., Plamann, M., Goodrich-Tanrikulu, M., Schulte, U., Mannhaupt, G., Nargang, F. E., Radford, A., Selitrennikoff, C., Galagan, J. E., Dunlap, J. C., Loros, J. J., Catcheside, D., Inoue, H., Aramayo, R., Polymenis, M., Selker, E. U., Sachs, M. S.,

Marzluf, G. A., Paulsen, I., Davis, R., Ebbole, D. J., Zelter, A., Kalkman, E. R., O'Rourke, R., Bowring, F., Yeadon, J., Ishii, C., Suzuki, K., Sakai, W., Pratt, R., 2004. Lessons from the genome sequence of *Neurospora crassa*: tracing the path from genomic blueprint to multicellular organism. Microbiol Mol Biol Rev. 68, 1-108.

Borkovich, K. A., Ebbole, D. J., 2010. Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi

Bowman, S. M., Free, S. J., 2006. The structure and synthesis of the fungal cell wall. Bioessays. 28, 799-808.

Bruneau, J. M., Magnin, T., Tagat, E., Legrand, R., Bernard, M., Diaquin, M., Fudali, C., Latge, J. P., 2001. Proteome analysis of *Aspergillus fumigatus* identifies glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins associated to the cell wall biosynthesis. Electrophoresis. 22, 2812-23.

Bussink, H. J., Osmani, S. A., 1999. A mitogen-activated protein kinase (MPKA) is involved in polarized growth in the filamentous fungus, *Aspergillus nidulans*. FEMS Microbiol Lett. 173, 117-25.

Camarasa, C. B., F. Bony, M. Barre, P. Dequin, S., 2001. Characterization of *Schizosaccharomyces pombe* malate permease by expression in *Saccharomyces cerevisiae*. Appl Environ Microbiol. 67, 4144-51.

Caracuel, Z., Martinez-Rocha, A. L., Di Pietro, A., Madrid, M. P., Roncero, M. I., 2005. *Fusarium oxysporum gas1* encodes a putative beta-1,3-glucanosyltransferase required for virulence on tomato plants. Mol Plant Microbe Interact. 18, 1140-1147.

Carotti, C., Ragni, E., Palomares, O., Fontaine, T., Tedeschi, G., Rodriguez, R., Latge, J. P., Vai, M., Popolo, L., 2004. Characterization of recombinant forms of the yeast Gas1 protein and identification of residues essential for glucanosyltransferase activity and folding. Eur J Biochem. 271, 3635-3645.

Chen, R. E., Thorner, J., 2007. Function and regulation in MAPK signaling pathways: lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Biochim Biophys Acta. 1773, 1311-1340.

Chen, R. H. S., C. Blenis, J., 1992. Nuclear localization and regulation of *erk*- and *rsk*-encoded protein kinases. Mol Cell Biol. 12, 915-27.

Colot, H. V., Park, G., Turner, G. E., Ringelberg, C., Crew, C. M., Litvinkova, L., Weiss, R. L., Borkovich, K. A., Dunlap, J. C., 2006. A high-throughput gene knockout procedure for *Neurospora* reveals functions for multiple transcription factors. Proc Natl Acad Sci U S A. 103, 10352-7.

Correia, I. Alonso-Monge, R., Pla, J., 2010. MAPK cell-cycle regulation in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. Future Microbiol. 5, 1125-41.

da-Silva, M. M., Polizeli, M. L., Jorge, J. A., Terenzi, H. F., 1994. Cell wall deficiency in "*slime*" strains of *Neurospora crassa*: osmotic inhibition of cell wall synthesis and beta-D-glucan synthase activity.
Braz J Med Biol Res. 27, 2843-2857.

de Medina-Redondo, M., Arnaiz-Pita, Y., Fontaine, T., Del Rey, F., Latge, J. P., Vazquez de Aldana, C. R., 2008. The beta-1,3-glucanosyltransferase gas4p is essential for ascospore wall maturation and spore viability in *Schizosaccharomyces pombe*. Mol Microbiol. 68, 1283-1299.

Dettmann, A., Heilig, Y., Ludwig, S., Schmitt, K., Illgen, J., Fleissner, A., Valerius, O., Seiler, S., 2013. HAM-2 and HAM-3 are central for the assembly of the *Neurospora* STRIPAK complex at the nuclear envelope and regulate nuclear accumulation of the MAP kinase MAK-1 in a MAK-2-dependent manner.
Mol Microbiol. 90, 796-812.

Dirr, F., Echtenacher, B., Heesemann, J., Hoffmann, P., Ebel, F., Wagener, J., 2010. AfMkk2 is required for cell wall integrity signaling, adhesion, and full virulence of the human pathogen *Aspergillus fumigatus*.
Int J Med Microbiol. 300, 496-502.

Fleissner, A., Leeder, A. C., Roca, M. G., Read, N. D., Glass, N. L., 2009. Oscillatory recruitment of signaling proteins to cell tips promotes coordinated behavior during cell fusion. Proc Natl Acad Sci U S A. 106, 19387-92.

Free SJ., 2013. Chapter two : Fungal cell wall organization and biosynthesis. Adv Genet. 81, 33-82.

Freitag, M., Hickey, P. C., Raju, N. B., Selker, E. U., Read, N. D., 2004. GFP as a tool to analyze the organization, dynamics and function of nuclei and microtubules in *Neurospora crassa*. Fungal Genet Biol. 41, 897-910.

Fu, C., Iyer, P., Herkal, A., Abdullah, J., Stout, A., Free, S. J., 2011. Identification and characterization of genes required for cell-to-cell fusion in *Neurospora crassa*. Eukaryot Cell. 10, 1100-1109.

Fujimura, M., Ochiai, N., Oshima, M., Motoyama, T., Ichiishi, A., Usami, R., Horikoshi, K., Yamaguchi, I., 2003. Putative homologs of SSK22 MAPKK kinase and PBS2 MAPK kinase of *Saccharomyces cerevisiae* encoded by *os-4* and *os-5* genes for osmotic sensitivity and fungicide resistance in *Neurospora crassa*. Biosci Biotechnol Biochem. 67, 186-191.

Fujioka, T. M., O. Furukawa, K. Sato, N. Yoshimi, A. Yamagata, Y. Nakajima, T. Abe, K., 2007. MpkA-Dependent and -independent cell wall integrity signaling in *Aspergillus nidulans*. Eukaryot Cell. 6, 1497-1510.

Galagan, J. E., Calvo, S. E., Borkovich, K. A., Selker, E. U., Read, N. D., Jaffe, D., FitzHugh, W., Ma, L. J., Smirnov, S., Purcell, S., Rehman, B., Elkins, T., Engels, R., Wang, S., Nielsen, C. B., Butler, J., Endrizzi, M., Qui, D., Ianakiev, P., Bell-Pedersen, D., Nelson, M. A., Werner-Washburne, M.,

Selitrennikoff, C. P., Kinsey, J. A., Braun, E. L., Zelter, A., Schulte, U., Kothe, G. O., Jedd, G., Mewes, W., Staben, C., Marcotte, E., Greenberg, D., Roy, A., Foley, K., Naylor, J., Stange-Thomann, N., Barrett, R., Gnerre, S., Kamal, M., Kamvysselis, M., Mauceli, E., Bielke, C., Rudd, S., Frishman, D., Krystofova, S., Rasmussen, C., Metzenberg, R. L., Perkins, D. D., Kroken, S., Cogoni, C., Macino, G., Catcheside, D., Li, W., Pratt, R. J., Osmani, S. A., DeSouza, C. P., Glass, L., Orbach, M. J., Berglund, J. A., Voelker, R., Yarden, O., Plamann, M., Seiler, S., Dunlap, J., Radford, A., Aramayo, R., Natvig, D. O., Alex, L. A., Mannhaupt, G., Ebbole, D. J., Freitag, M., Paulsen, I., Sachs, M. S., Lander, E. S., Nusbaum, C., Birren, B., 2003.
The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*.
Nature. 422, 859-68.

Garcia, P. T., V. Sanchez, Y., 2009. The Rho1p exchange factor Rgf1p signals upstream from the Pmk1 mitogen-activated protein kinase pathway in fission yeast. Mol Biol Cell. 20, 721-31.

Garcia, R. R.-P., J. M. Bermejo, C. Nombela, C. Arroyo, J., 2009. The high osmotic response and cell wall integrity pathways cooperate to regulate transcriptional responses to zymolyase-induced cell wall stress in *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem. 284, 10901-10911.

Gastebois, A. F., T. Latge, J. P. Mouyna, I., 2010. beta(1-3)Glucanosyltransferase Gel4p is essential for *Aspergillus fumigatus*. Eukaryot Cell. 9, 1294-8.

Gras, D. E., Persinoti, G. F., Peres, N. T., Martinez-Rossi, N. M., Tahira, A. C., Reis, E. M., Prade, R. A., Rossi, A., 2013. Transcriptional profiling of *Neurospora crassa Deltamak-2* reveals that mitogen-activated protein kinase MAK-2 participates in the phosphate signaling pathway. Fungal Genet Biol.

Grobler, J. B., F. Subden, R. E. Van Vuuren, H. J., 1995. The mae1 gene of *Schizosaccharomyces pombe* encodes a permease for malate and other C4 dicarboxylic acids. Yeast. 11, 1485-1491.

Hartland, R. P., Fontaine, T., Debeaupuis, J. P., Simenel, C., Delepierre, M., Latge, J. P., 1996. A novel beta-(1-3)-glucanosyltransferase from the cell wall of *Aspergillus fumigatus*. J Biol Chem. 271, 26843-9.

Hartland, R. P. V., C. A. Klis, F. M. Sietsma, J. H. Wessels, J. G., 1994. The linkage of (1-3)-beta-glucan to chitin during cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast. 10, 1591-1599.

Hasunuma, K. I., T., 1972. Properties of two nuclease genes in *Neurospora crassa*. Genetics. 70, 371-84.

Heinrich, M., Kohler, T., Mosch, H. U., 2007. Role of Cdc42-Cla4 interaction in the pheromone response of *Saccharomyces cerevisiae*. Eukaryot Cell. 6, 317-27.

Hou, Z., C. Xue, Y. Peng, T. Katan, H. C. Kistler, J.-R. Xu., 2002. A mitogen-activated protein kinase gene (*MGV1*) in *Fusarium graminearum* is

required for female fertility, heterokaryon formation, and plant infection. . Mol. Plant-Microbe Interact. . 15, 1119-1127.

Hurtado-Guerrero, R., Mouyna, I., Ibrahim, AF., Shepherd, S., Fontaine, T., Latgé, JP., van Aalten, DM., 2009. Molecular mechanisms of yeast cell wall glucan remodeling. J Biol Chem. 284, 8461-9.

Jung, U. S., Levin, D. E., 1999. Genome-wide analysis of gene expression regulated by the yeast cell wall integrity signalling pathway. Mol Microbiol. 34, 1049-57.

Kalebina, T. S., Laurinavichiute, D. K., Packeiser, A. N., Morenkov, O. S., Ter-Avanesyan, M. D., Kulaev, I. S., 2002. Correct GPI-anchor synthesis is required for the incorporation of endoglucanase/glucanosyltransferase Bgl2p into the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. FEMS Microbiol Lett. 210, 81-5.

Kamei, M., Banno, S., Takahashi, M., Ichiishi, A., Fukumori, F., Fujimura, M., 2013a. Chapter 10 : Regulation and Physiological Function of MAP Kinase and cAMP-PKA Pathways, in : Kasbekar, D. P., McCluskey, K (Editors). *Neurospora*:Genomics and Molecular Biology. 171-192.

Kamei, M., Yamashita, K., Takahashi, M., Fukumori, F., Ichiishi, A., Fujimura, M., 2013b. Deletion and expression analysis of beta-(1,3)-glucanosyltransferase genes in *Neurospora crassa*. Fungal Genet Biol. 52, 65-72.

Kasbekar, D. P., McCluskey, K, 2013. *Neurospora* Genomics and Molecular Biology.

Kim, Y. K., Robyt, J. F., 2000. Enzyme modification of starch granules: formation and retention of cyclomaltodextrins inside starch granules by reaction of cyclomaltodextrin glucanosyltransferase with solid granules. Carbohydr Res. 328, 509-15.

Kitagaki, H. W., H. Shimoi, H. Ito, K., 2002. Two homologous genes, *DCW1* (YKL046c) and *DFG5*, are essential for cell growth and encode glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored membrane proteins required for cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Microbiol. 46, 1011-22.

Klis, F. M., 1994. Review: cell wall assembly in yeast. Yeast. 10, 851-69.

Klis, F. M. B., S. De Groot, P. W., 2010. Covalently linked wall proteins in ascomycetous fungi. Yeast. 27, 489-93.

Koch, M. R., Pillus, L., 2009. The glucanosyltransferase Gas1 functions in transcriptional silencing. Proc Natl Acad Sci U S A. 106, 11224-9.

Kosako, H. G., Y. Matsuda, S. Ishikawa, M. Nishida, E., 1992. Xenopus MAP kinase activator is a serine/threonine/tyrosine kinase activated by threonine phosphorylation. Embo J. 11, 2903-8.

Krishna, M., Narang, H., 2008. The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple. Cell Mol Life Sci. 65, 3525-44.

Lamb, T. M., Goldsmith, C. S., Bennett, L., Finch, K. E., Bell-Pedersen, D., 2011. Direct transcriptional control of a p38 MAPK pathway by the circadian clock in *Neurospora crassa*. PLoS One. 6, e27149.

Lamb, T. M. F., K. E. Bell-Pedersen, D., 2012. The *Neurospora crassa* OS MAPK pathway-activated transcription factor ASL-1 contributes to circadian rhythms in pathway responsive clock-controlled genes. Fungal Genet Biol. 49, 180-8.

Latge, J. P., 2007. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. Mol Microbiol. 66, 279-90.

Lehman, J. F. G., M. K. Ahlgren, S. K. Metzenberg, R. L., 1973. Regulation of phosphate metabolism in *Neurospora crassa*. Characterization of regulatory mutants. Genetics. 75, 61-73.

Lenormand, P. P., G. Sardet, C. L'Allemain, G. Meloche, S. Pouyssegur, J., 1993. MAP kinases: activation, subcellular localization and role in the control of cell proliferation. Adv Second Messenger Phosphoprotein Res. 28, 237-44.

Lesage, G., Sdicu, A. M., Menard, P., Shapiro, J., Hussein, S., Bussey, H., 2004. Analysis of beta-1,3-glucan assembly in *Saccharomyces cerevisiae* using a

synthetic interaction network and altered sensitivity to caspofungin. Genetics. 167, 35-49.

Levin, D. E., 2005. Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol Mol Biol Rev. 69, 262-91.

Levin, D. E., 2011. Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the cell wall integrity signaling pathway. Genetics. 189, 1145-75.

Li, D., Bobrowicz, P., Wilkinson, H. H., Ebbole, D. J., 2005. A mitogen-activated protein kinase pathway essential for mating and contributing to vegetative growth in *Neurospora crassa*. Genetics. 170, 1091-104.

Lichius, A. L., K. M. Jeffree, C. E. Oborny, R. Boonyarungsrit, P. Read, N. D., 2012. Importance of MAP kinases during protoperithecial morphogenesis in *Neurospora crassa*. PLoS One. 7, e42565.

Maddi, A., Dettman, A., Fu, C., Seiler, S., Free, S. J., 2012a. WSC-1 and HAM-7 are MAK-1 MAP kinase pathway sensors required for cell wall integrity and hyphal fusion in *Neurospora crassa*. PLoS One. 7, e42374.

Maddi, A. F., S. J., 2010. alpha-1,6-Mannosylation of N-linked oligosaccharide present on cell wall proteins is required for their incorporation into the cell wall in the filamentous fungus *Neurospora crassa*. Eukaryot Cell. 9, 1766-75.

Maddi, A. F., C. Free, S. J., 2012b. The *Neurospora crassa dfg5* and *dcw1* genes encode alpha-1,6-mannanases that function in the incorporation of glycoproteins into the cell wall. PLoS One. 7, e38872.

Maerz, S., Ziv, C., Vogt, N., Helmstaedt, K., Cohen, N., Gorovits, R., Yarden, O., Seiler, S., 2008. The nuclear Dbf2-related kinase COT1 and the mitogen-activated protein kinases MAK1 and MAK2 genetically interact to regulate filamentous growth, hyphal fusion and sexual development in *Neurospora crassa*. Genetics. 179, 1313-25.

Margolin, B. S., Freitag, M., Selker, E.U., 1997. Improved plasmids for gene targeting at the *his-3* locus of *Neurospora crassa*. Fungal Genet Newsl. 44, 34-36.

Matsuda, S. K., H. Takenaka, K. Moriyama, K. Sakai, H. Akiyama, T. Gotoh, Y. Nishida, E., 1992. Xenopus MAP kinase activator: identification and function as a key intermediate in the phosphorylation cascade. Embo J. 11, 973-82.

Mazan, M., Ragni, E., Popolo, L., Farkas, V., 2011. Catalytic properties of the Gas family beta-(1,3)-glucanosyltransferases active in fungal cell-wall biogenesis as determined by a novel fluorescent assay. Biochem J. 438, 275-82.

Millar, J. B., 1999. Stress-activated MAP kinase (mitogen-activated protein kinase) pathways of budding and fission yeasts. Biochem Soc Symp. 64, 49-62.

Miller, T. K., Renault, S., Selitrennikoff, C. P., 2002. Molecular dissection of alleles of the *osmotic-1* locus of *Neurospora crassa*. Fungal Genet Biol. 35, 147-55.

Mishra, N. C., Tatum, E. L., 1972. Effect of L-sorbose on polysaccharide synthetases of *Neurospora crassa* (glycogen-1,3-glucan-morphology-cell wall-digitonin-particulate enzymes). Proc Natl Acad Sci U S A. 69, 313-7.

Mouyna, I., Hartland, R. P., Fontaine, T., Diaquin, M., Simenel, C., Delepierre, M., Henrissat, B., Latge, J. P., 1998. A 1,3-beta-glucanosyltransferase isolated from the cell wall of *Aspergillus fumigatus* is a homologue of the yeast Bgl2p. Microbiology. 144 (Pt 11), 3171-80.

Mouyna, I., Fontaine, T., Vai, M., Monod, M., Fonzi, W. A., Diaquin, M., Popolo, L., Hartland, R. P., Latge, J. P., 2000. Glycosylphosphatidylinositol-anchored glucanosyltransferases play an active role in the biosynthesis of the fungal cell wall. J Biol Chem. 275, 14882-9.

Mouyna, I., Monod, M., Fontaine, T., Henrissat, B., Lechenne, B., Latge, J. P., 2000. Identification of the catalytic residues of the first family of beta(1-3)glucanosyltransferases identified in fungi. Biochem J. 347 Pt 3, 741-7.

Mouyna, I., Morelle, W., Vai, M., Monod, M., Lechenne, B., Fontaine, T., Beauvais, A., Sarfati, J., Prevost, M. C., Henry, C., Latge, J. P., 2005. Deletion of *GEL2*

encoding for a beta(1-3)glucanosyltransferase affects morphogenesis and virulence in *Aspergillus fumigatus*. Mol Microbiol. 56, 1675-88.

Mrsa, V. K., F. Tanner, W., 1993. Purification and characterization of the *Saccharomyces cerevisiae BGL2* gene product, a cell wall endo-beta-1,3-glucanase. J Bacteriol. 175, 2102-6.

Ninomiya, Y. S., K. Ishii, C. Inoue, H., 2004. Highly efficient gene replacements in Neurospora strains deficient for nonhomologous end-joining. Proc Natl Acad Sci U S A. 101, 12248-53.

Noguchi, R., Banno, S., Ichikawa, R., Fukumori, F., Ichiishi, A., Kimura, M., Yamaguchi, I., Fujimura, M., 2007. Identification of OS-2 MAP kinase-dependent genes induced in response to osmotic stress, antifungal agent fludioxonil, and heat shock in *Neurospora crassa*. Fungal Genet Biol. 44, 208-18.

Ochiai, N., Fujimura, M., Motoyama, T., Ichiishi, A., Usami, R., Horikoshi, K., Yamaguchi, I., 2001. Characterization of mutations in the two-component histidine kinase gene that confer fludioxonil resistance and osmotic sensitivity in the *os-1* mutants of *Neurospora crassa*. Pest Manag Sci. 57, 437-42.

Pandey, A., Roca, M. G., Read, N. D., Glass, N. L., 2004. Role of a mitogen-activated protein kinase pathway during conidial germination and

hyphal fusion in *Neurospora crassa*. Eukaryot Cell. 3, 348-58.

Park, G., Pan, S., Borkovich, K. A., 2008. Mitogen-activated protein kinase cascade required for regulation of development and secondary metabolism in *Neurospora crassa*. Eukaryot Cell. 7, 2113-22.

Perkins, D. D., 1974. Osmotic mutants. *Neurospora* Newsl. 21, 25-26.

Polizeli Mdel, L. N.-J., M. A. da Silva, M. M. Jorge, J. A. Terenzi, H. F., 1995. (1,3)-beta-D-glucan synthase activity in mycelial and cell wall-less phenotypes of the *fz, sg, os-1* ("*slime*") mutant strain of *Neurospora crassa*. Exp Mycol. 19, 35-47.

Popolo, L., Ragni, E., Carotti, C., Palomares, O., Aardema, R., Back, J. W., Dekker, H. L., de Koning, L. J., de Jong, L., de Koster, C. G., 2008. Disulfide bond structure and domain organization of yeast beta(1,3)-glucanosyltransferases involved in cell wall biogenesis. J Biol Chem. 283, 18553-65.

Posada, J., Cooper., J. A., 1992. Molecular signal integration. Interplay between serine, threonine, and tyrosine phosphorylation. Mol Biol Cell. 3, 583-92.

Ragni, E., Fontaine, T., Gissi, C., Latge, J. P., Popolo, L., 2007. The Gas family of proteins of *Saccharomyces cerevisiae*: characterization and evolutionary analysis. Yeast. 24, 297-308.

Ramamoorthy, V., Zhao, X., Snyder, A. K., Xu, J. R., Shah, D. M., 2007. Two mitogen-activated protein kinase signalling cascades mediate basal resistance to antifungal plant defensins in *Fusarium graminearum*. Cell Microbiol. 9, 1491-506.

Ray, L. B. S., T. W., 1987. Rapid stimulation by insulin of a serine/threonine kinase in 3T3-L1 adipocytes that phosphorylates microtubule-associated protein 2 *in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A. 84**,** 1502-6.

Reese, A. J. D., T. L., 2003. Cell wall alpha-1,3-glucan is required to anchor the *Cryptococcus neoformans* capsule. Mol Microbiol. 50, 1401-9.

Reese, A. J. Y., A. Breger, J. A. Beauvais, A. Liu, H. Griffith, C. L. Bose, I. Kim, M. J. Skau, C. Yang, S. Sefko, J. A. Osumi, M. Latge, J. P. Mylonakis, E. Doering, T. L., 2007. Loss of cell wall alpha(1-3) glucan affects *Cryptococcus neoformans* from ultrastructure to virulence. Mol Microbiol. 63, 1385-98.

Rispail, N. S., D. M. Ant, C. Czajkowski, R. Grunler, A. Huguet, R. Perez-Nadales, E. Poli, A. Sartorel, E. Valiante, V. Yang, M. Beffa, R. Brakhage, A. A. Gow, N. A. Kahmann, R. Lebrun, M. H. Lenasi, H. Perez-Martin, J. Talbot, N. J. Wendland, J. Di Pietro, A., 2009. Comparative genomics of MAP kinase and calcium-calcineurin signalling components in plant and human pathogenic fungi. Fungal Genet Biol. 46, 287-98.

Robertson, A. M., Hagan., I. M., 2008. Stress-regulated kinase pathways in the

recovery of tip growth and microtubule dynamics following osmotic stress in *S. pombe*. J Cell Sci. 121, 4055-68.

Roca, M. G., Arlt, J., Jeffree, C. E., Read, N. D., 2005. Cell biology of conidial anastomosis tubes in *Neurospora crassa*. Eukaryot Cell. 4, 911-9.

Rolli, E., Ragni, E., de Medina-Redondo, M., Arroyo, J., de Aldana, C. R., Popolo, L., 2011. Expression, stability, and replacement of glucan-remodeling enzymes during developmental transitions in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Biol Cell. 22, 1585-98.

Saporito-Irwin, S. M., Birse, C. E., Sypherd, P. S., Fonzi, W. A., 1995. PHR1, a pH-regulated gene of *Candida albicans*, is required for morphogenesis. Mol Cell Biol. 15, 601-13.

Sengar, A. S. M., N. A. Marini, N. J. Young, D., 1997. Mkh1, a MEK kinase required for cell wall integrity and proper response to osmotic and temperature stress in *Schizosaccharomyces pombe*. Mol Cell Biol. 17, 3508-19.

Sestak, S., Hagen I., Tanner W., Strahl S., 2004. Scw10p, a cell-wall glucanase/transglucosidase important for cell-wall stability in *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiology. 150, 3197-208.

Smits, G. J., van den Ende, H., Klis, F. M., 2001. Differential regulation of cell wall biogenesis during growth and development in yeast. Microbiology. 147,

781-94.

Staleva, L. H., A. Orlow, S. J., 2004. Oxidative stress activates FUS1 and RLM1 transcription in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in an oxidant-dependent Manner. Mol Biol Cell. 15, 5574-82.

Steinberg, G., 2007. Hyphal growth: a tale of motors, lipids, and the Spitzenkorper. Eukaryot Cell. 6, 351-60.

Sun, X., Zhang, H., Zhang, Z., Wang, Y., Li, S., 2011. Involvement of a helix-loop-helix transcription factor CHC-1 in CO(2)-mediated conidiation suppression in *Neurospora crassa*. Fungal Genet Biol. 48, 1077-86.

Takahashi, M., Yamashita, K., Shiozawa, A., Ichiishi, A., Fukumori, F., Fujimura, M., 2010. An AP-1-like transcription factor, NAP-1, regulates expression of the glutathione S-transferase and NADH:flavin oxidoreductase genes in *Neurospora crassa*. Biosci Biotechnol Biochem. 74, 746-52.

Takanaga, H., Ohtsuki, S., Hosoya, Ki, Terasaki, T., 2001. GAT2/BGT-1 as a system responsible for the transport of gamma-aminobutyric acid at the mouse blood-brain barrier. J Cereb Blood Flow Metab. 21, 1232-9.

Tamaru, H., Inoue, H., 1989. Isolation and characterization of a laccase-derepressed mutant of *Neurospora crassa*. J. Bacteriol. 171, 6288-6293.

Tomishige, N., Noda, Y., Adachi, H., Shimoi, H., Takatsuki, A., Yoda, K., 2003. Mutations that are synthetically lethal with a *gas1Delta* allele cause defects in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Genet Genomics. 269, 562-73.

Tian, C., Beeson, W. T., Iavarone, A. T., Sun, J., Marletta, M. A., Cate, J. H., Glass, N. L., 2009. Systems analysis of plant cell wall degradation by the model filamentous fungus *Neurospora crassa*. Proc Natl Acad Sci U S A. 106, 22157-62.

Tzelepis, G. D., Melin, P., Jensen, D. F., Stenlid, J., Karlsson, M., 2012. Functional analysis of glycoside hydrolase family 18 and 20 genes in *Neurospora crassa*. Fungal Genet Biol. 49, 717-30.

Valiante, V., Heinekamp, T. Jain, R., Hartl, A., Brakhage, A. A., 2008. The mitogen-activated protein kinase MpkA of *Aspergillus fumigatus* regulates cell wall signaling and oxidative stress response. Fungal Genet Biol. 45, 618-627.

Van Nguyen, T., Kroger, C., Bonnighausen, J., Schafer, W., Bormann, J., 2013. The ATF/CREB Transcription Factor Atf1 Is Essential for Full Virulence, Deoxynivalenol Production, and Stress Tolerance in the Cereal Pathogen *Fusarium graminearum*. Mol Plant Microbe Interact. 26, 1378-94.

Vitalini, M. W., de Paula, R. M., Goldsmith, C. S., Jones, C. A., Borkovich, K. A.,

Bell-Pedersen, D., 2007. Circadian rhythmicity mediated by temporal regulation of the activity of p38 MAPK. Proc Natl Acad Sci U S A. 104, 18223-8.

Vogel, H. J., 1956. A convenient growth medium for *Neurospora* (Medium N). Microbial Genet. Bull. 13, 42-43.

Vogt, N., Seiler, S., 2008. The RHO1-specific GTPase-activating protein LRG1 regulates polar tip growth in parallel to Ndr kinase signaling in *Neurospora*. Mol Biol Cell. 19, 4554-69.

Watanabe, S., Yamashita, K., Ochiai, N., Fukumori, F., Ichiishi, A., Kimura, M., Fujimura, M., 2007. OS-2 mitogen activated protein kinase regulates the clock-controlled gene *ccg-1* in *Neurospora crassa*. Biosci Biotechnol Biochem. 71, 2856-9.

Westergaard, M., H. K. Mitchell., 1947. *Neurospora*. V. A synthetic medium favoring sexual reproduction. Am. J. Bot., 34, 573-577.

Xu, J. R., Staiger, C. J., Hamer, J. E., 1998. Inactivation of the mitogen-activated protein kinase Mps1 from the rice blast fungus prevents penetration of host cells but allows activation of plant defense responses. Proc Natl Acad Sci U S A. 95, 12713-8.

Yamashita, K., Shiozawa, A., Watanabe, S., Fukumori, F., Kimura, M., Fujimura, M.,

2008. ATF-1 transcription factor regulates the expression of *ccg-1* and *cat-1* genes in response to fludioxonil under OS-2 MAP kinase in *Neurospora crassa*. Fungal Genet Biol. 45, 1562-9.

Yamashita, K. S., A. Banno, S. Fukumori, F. Ichiishi, A. Kimura, M. Fujimura, M., 2007. Involvement of OS-2 MAP kinase in regulation of the large-subunit catalases CAT-1 and CAT-3 in *Neurospora crassa*. Genes Genet Syst. 82, 301-10.

Yoshimi, A., Kojima, K., Takano, Y., Tanaka, C., 2005. Group III histidine kinase is a positive regulator of Hog1-type mitogen-activated protein kinase in filamentous fungi. Eukaryot Cell. 4**,** 1820-8.

Yu, L., Qi, M., Sheff, M. A., Elion, E. A., 2008. Counteractive control of polarized morphogenesis during mating by mitogen-activated protein kinase Fus3 and G1 cyclin-dependent kinase. Mol Biol Cell. 19, 1739-52.

Zhang, S. X., Y. Keyhani, N. O., 2011. Contribution of the *gas1* gene of the entomopathogenic fungus Beauveria bassiana, encoding a putative glycosylphosphatidylinositol-anchored beta-1,3-glucanosyltransferase, to conidial thermotolerance and virulence. Appl Environ Microbiol. 77, 2676-84.

Zhang, Y. L., R. Pillonel, C. Lam, S. Xu, J. R., 2002. Osmoregulation and fungicide resistance: the *Neurospora crassa os-2* gene encodes a HOG1

mitogen-activated protein kinase homologue. Appl Environ Microbiol. 68, 532-8.

坂野真平、2005年度 東洋大学大学院生命科学研究科 博士学位論文
『糸状菌の形態形成を制御するシグナル伝達経路に関する研究』

山下和宏、2010年度 東洋大学大学院生命科学研究科 博士学位論文
『糸状菌のストレス応答シグナル伝達経路の下流で制御される転写調節因子の機能解析』

高橋正和、2012年度 東洋大学大学院生命科学研究科 博士学位論文
『アカパンカビの酸化ストレス応答機構の解明』

謝辞

本研究の遂行及び完成にあたり、終始、懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました東洋大学大学院生命科学研究科 環境応答研究室 藤村 真 教授に深く感謝致します。研究の御指導から議論に至るまで、一研究者として大変貴重な経験をさせて頂きました。ただただ感謝致しております。

また、本研究を遂行するうえで、多くの御助言、御指導を賜りました東洋大学大学院 生命科学研究科 一石 昭彦 教授、福森 文康 教授に心より感謝致します。さらに、数多くの御指導、御鞭撻を賜りました埼玉大学 井上 弘一 名誉教授、一般社団法人 日本植物防疫協会 山口 勇 理事長に深く感謝致します。

実験手法、研究生活や展開につきまして、多くの御指導を賜りました環境応答研究室の先輩である 坂野 真平 博士、山下 和宏 博士、高橋 正和 博士、そして同輩の石神 陽平 氏には、研究開始当初から様々な面で大変お世話になりました。心より感謝致します。

最後になりましたが、環境応答研究室(旧 作物保護研究室)の諸先輩方や後輩達を始め、この場ではお名前を挙げられなかった数多くの方々のお力添えなしには本研究を遂行することは出来ませんでした。心より、御礼申し上げます。

2013年11月26日

亀井 誠之