

氏名(本籍地)	亀井 誠之(千葉県)		
学位の種類	博士(生命科学)		
報告・学位記番号	甲第364号(甲生第31号)		
学位記授与の日付	平成26年3月25日		
学位記授与の要件	本学学位規則第3条第1項該当		
学位論文題目	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		
論文審査委員	主査 教授	博士(学術)	藤村 真
	副査 教授	博士(学術)	一石 昭彦
	副査 教授	農学博士	福森 文康
	副査 埼玉大学名誉教授 理学博士		井上 弘一

【論文審査】

本論文は、アカパンカビ (*Neurospora crassa*) をモデル糸状菌として、菌類が細胞壁の構造を適切に保持する機構「細胞壁の完全性 (cell wall integrity: CWI)」における MAP キナーゼシグナル伝達経路の関与と、その下流で制御される遺伝子群の同定およびその調節機構を解明したものである。菌類の細胞壁は beta-1,3- グルカンやキチンを主成分とする特有の構造をもっており、動物が細胞壁をもたないことから、安全・安心な農業用殺菌剤の創製の標的として注目されている。細胞壁は細胞を強固な殻で覆い物理的なダメージから保護する役割をもつが、菌類は細胞の増殖と分化に伴い細胞の形状を変化させる。菌類の CWI の制御機構は、出芽酵母では特定の MAP キナーゼ (Mpk1) をコアとするシグナル伝達経路により制御されていることが報告されており、植物病原菌のオルソログ遺伝子のノックアウトは病原性に影響することが知られている。しかし、高度な形態形成を伴って増殖・分化をする糸状菌の CWI の調節機構については、これまでほとんど未解明であった。これらのことを踏まえて、亀井誠之君は、糸状菌の CWI 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、病原糸状菌と近縁関係にあるアカパンカビを研究材料として、生化学的、分子遺伝学および細胞学的な手法を用いて研究を行った。その結果として、アカパンカビには3種類の MAP キナーゼ (MAK-1, MAK-2, OS-2) が存在するが、それぞれの MAP キナーゼが独立に CWI の制御に関与する細胞壁関連遺伝子の発現を制御していることを明らかにするとともに、その転写調節因子の一つを新たに同定し、遺伝子発現制御機構を解明した。

本論文の具体的な研究成果として、3種類の MAP キナーゼの各遺伝子破壊株 (*Amak-1*, *Amak-2*, *Aos-2*) のうち、*Amak-1*株と *Amak-2*株が野生株に較べて beta-1,3- グルカン合成酵素阻害剤 (micafungin (MCFG)) に対して高い感受性を示すことを見出した。MAK-1は出芽酵母 CWI 経路の Mpk1 MAP キナーゼのオルソログであり、本研究によりアカパンカビにおいても MAK-1が CWI 制御に関与することが明らかになった。加えて、有性生殖を担うとされる MAK-2が、アカパンカビでは CWI 制御に関与するという予想外の新しい知見を得ることができた。さらに、MAK-1と MAK-2が MCFG 処理により活性化 (リン酸化) されることをウエスタンブロット法により明らかにした。このことは、蛍光タンパク質 YFP を用いた MAK-2の細胞内の局在性解析からも支持され、細胞壁損傷に反応して MAK-2が細胞質から核に移行した。さらに、MAK-1と MAK-2の詳細なリン酸化解析から、MAK-1は通常の生育条件下でもリン酸化されているが、そのリン酸化は *Amak-2*株では減少・消失することから、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した。

MAP キナーゼは様々な遺伝子を制御していると推定される。しかし、CWI 制御に関与する MAK-1および MAK-2が制御する遺伝子はこれまでほとんど報告されていない。そこで、細胞壁損傷により発現誘導される遺伝子群を特定し、その誘導が MAK-1および MAK-2による制御を受けるかを調べた。マイクロアレイ法を用いて MCFG 処理により誘導される遺伝子群を解析し、それらの中から細胞壁関連酵素遺伝子を抽出して、リアルタイム定量 PCR を行うことで、MAK-1および MAK-2により制御される遺伝子を同定した。MAK-1は、*ncw-1* (non-anchored cell wall protein-1) と *egl-1* (GPI-anchored endo-glucanase) 遺伝子の発現を制御し、MAK-2は *gh76-5* (alpha-1,6-mannanase) と *tdt-1* (putative C4-dicarboxylate transporter/malic acid transport protein) 遺伝子の発現を制御することが明らかになった。本研究により、MAK-1および MAK-2によって制御される遺伝子に細胞壁関連酵素遺伝子が含まれることが初めて明らかになり、これらの遺伝子が誘導されないことにより MCFG に対して感受性となることが推定されたが、その詳細な機能は不明であり、これらの遺伝子が細胞壁損傷にどのような役割を担っているのかは、今後の研究を待たなければならない。

これまでアカパンカビの3種類の MAP キナーゼのうち、OS-2と MAK-2については下流に位置する主な転写因子が特定されていた。本研究において *Amak-1*が細胞壁ストレスに感受性を示すことに着目し、174種類の転写因子遺伝子破壊株のスクリーニングを行い、MAK-1が制御する転写因子を同定した。転写因子 *msn-1*破壊株が細胞壁ストレスに感受性を示し、MSN-1が MAK-1により調節される *ncw-1*と *egl-1*遺伝子の誘導を制御することが明らかになった。MSN-1は酵母では OS-2オルソログによる制御を受ける転写因子であるが、アカパンカビでは MAK-1が制御する転写因子であることを明らかにした。

MAP キナーゼ OS-2は MCFG に応答しなかったことから、CWI への関与は低いと考えられた。しかし、OS-2の活性化により細胞壁関連酵素遺伝子群が誘導されることがマイクロアレイ解析で示唆され、実際に、6種類の遺伝子 (*gel-1*, *dlh-1*, *cht-1*, *ogp-1*, *gox-1*, *man-1*) が OS-2により制御される遺伝子であることを、リアルタイム定量 PCR により確定した。さらに、*gel-1*, *dlh-1*, *cht-1*の3種類の遺伝子は転写因子 ATF-1により調節されることを示した。OS-2は浸透圧ストレスに応答する MAP キナーゼであることから、浸透圧の上昇に伴い発生する膨圧に応答して、細胞壁関連の遺伝子を発現制御していると考えられ、OS-2もまた CWI の維持の一端を担うことが明らかになった。*beta-1,3-glucanosyltransferase* (GEL) は *beta-1,3-* グルカンの側鎖の伸長に関わる重要な酵素であり、アカパンカビは5種類の *gel* 遺伝子をもつが、それぞれの機能的な役割分担は明らかにされていない。*gel-1*遺伝子が、浸透圧ストレスに応答して OS-2の制御を受けることが明らかになったことを受けて、その他の *gel* 遺伝子について解析を行った。これらの中で、唯一 carbohydrate-binding module をもつ *gel-3*遺伝子は、恒常的に高発現しており、その破壊株が生育に大きな影響があった。一方、その他の *gel* 遺伝子の基礎発現量は低く、その遺伝子破壊株は生育に顕著な異常は認められなかった。しかし、*gel-4*が細胞壁ストレスに応答して発現誘導された。これらのことから、GEL-3は栄養生長を担う重要な *beta-1,3-glucanosyltransferase* であり、GEL-1および GEL-4は浸透圧や細胞壁ストレスにそれぞれ応答して働く酵素である可能性を示した。

これらの研究成果は、出芽酵母の CWI 経路が1種類の MAP キナーゼでシンプルに制御されているのに対して、多彩な形態形成をとるアカパンカビでは、複数の MAP キナーゼにより様々な細胞壁の合成・修飾・分解に関与する遺伝子が制御されていることを示しており、今後の菌類の CWI 経路の研究に大きな貢献をするものである。

【審査結果】

学位請求論文に掲載されている研究は、綿密に計画され、多彩な手法を用いて行われており、研究成果は、学術的にみても高いものである。学位請求論文に掲載されている内容の一部は、現在、投稿準備中のものも含まれており、早期の成果の公表が望まれる。しかし、本論文により得られたアカパンカビの cell wall integrity (CWI) 研究の成果は、これまで研究が進んでいた出芽酵母のものとは異なる知見を含んでおり、産業上重要な種を含む糸状菌の分化や植物病原菌の病原性研究に貢献するものである。また、生命科学専攻科 (生命科学専攻) の博士学位審査基準に照らしても妥当な研究内容であると認められる。従って、所定の試験結果と論文評価に基づき、本審査委員会は全員一致をもって亀井誠之氏の博士学位請求論文は、本学博士学位を授与するに相応しいものと判断する。