

## 論文の内容の要旨

応用生命工学専攻  
平成12年度博士過程入学  
氏名 洪思鉉  
指導教官名 太田明德

## 論文題目

**Isolation and characterization of phospholipase genes and their products in filamentous fungus,**

***Aspergillus nidulans***

**(糸状菌 *Aspergillus nidulans* のホスホリパーゼ遺伝子の単離及びその  
遺伝子産物の解析)**

生体膜は極めて多種類の脂質を含み、中でもリン脂質は膜構造の形成、維持に重要な役割を果たしている。更に最近では、受容体からのシグナル伝達におけるセカンドメッセンジャー生産にも関わっていることも明らかにされており、リン脂質は単に二重膜の形成といった構造的な役割を持つだけでなく、実に多様な生体機能と結びついている。この場合セカンドメッセンジャーの生産はホスホリパーゼにより行われる。ホスホリパーゼはリン脂質の切断部位によってホスホリパーゼ A、ホスホリパーゼ B、ホスホリパーゼ C、ホスホリパーゼ D に分類され、それぞれ多様な isoform が存在する。このようなホスホリパーゼにより分解されたリン脂質の分解産物は細胞の中で様々な役割を果たしていることが動物細胞で明らかにされつつある。しかし糸状菌におけるリン脂質代謝の研究は進んでないのが現状である。そこで動物細胞においてセカンドメッセンジャーとして働いているホスファチジン酸やリゾホスファチジルコリン等を生産するホスホリパーゼ D とホスホリパーゼ A<sub>2</sub> をコードする遺伝子を糸状菌 *Aspergillus nidulans* から単離し、糸状菌の特異的な性質である菌糸の先端生長、胞子形成器官の分化における役割を分子レベルで解析することを目的とした。

## 1. ホスホリパーゼ D 遺伝子の単離とその機能解析

リン脂質を加水分解し、ホスファチジン酸(PA)を生産する酵素であるホスホリパーゼD (PLD) をコードする遺伝子を *A. nidulans* よりクローニングし、*pldA* と命名した。まず *A. nidulans* の EST データベースで得られた他の生物の PLD に対応する配列を PCR 法により増幅し、この断片をプローブとして *A. nidulans* のゲノムライブラリーからコロニーハイブリダイゼーションによりポジティブクローンを得た。このクローンが持つプラスミドの挿入断片の塩基配列決定及び 5'-RACE, 3'-RACE を行いイントロンの位置の決定、翻訳開始コドンの推定を行った。その結果、この遺伝子は 832 アミノ酸よりなるタンパク質をコードし、イントロンは 7 か所存在していた。予想されるアミノ酸配列には酵母 *Saccharomyces cerevisiae* から human の PLD に至るまで高度に保存されている PLD 活性に必要な二つの HKD モチーフやリパーゼ活性を持つタンパク質によく保存されている GGGR モチーフ、GSRS モチーフなど 4 つの領域をコードする部分が存在した。*pldA* のコードするタンパク質 PldA は *S. cerevisiae* の Spo14p、*Candida albicans* の Pld1p と 4 つの領域に対して 25.4% から 43.5% の相同性を示していた。

次に *A. nidulans* における *pldA* の機能について解析するため、*pldA* の破壊株を *A. nidulans* ABPU1 株を親株に *argB* 遺伝子をマーカーとして作製した。破壊株について表現型を検討したが、培地の炭素源の違いまたは、培養温度の違い、浸透圧の違いによる生育速度、孢子形成効率など野生株と比べて差は見られなかった。しかし、蛍光標識したホスファチジルコリン(PC)のアナログである NBD-PC やホスファチジルエタノールアミン(PE)のアナログである NBD-PE を基質として破壊株と野生株の細胞抽出液中の PLD 活性を測定したところ、NBD-PC を基質とした場合は破壊株の活性が野生株に比べて 1.5 倍上昇したが NBD-PE を基質とした場合には活性が 1/4 以下に低下した。また炭素源の異なるエタノール、グリセロール、スレオニン、グルコース培地で培養した菌体を用いて測定した結果、エタノール以外の培地では PldA の活性には大きな差はないが、エタノールを炭素源とした培地で培養した場合、野生株、破壊株ともに活性が高いことが示唆された。浸透圧の異なる YG 培地、1/2YG 培地、YG + 0.6M KCl 培地で培養した場合、高浸透圧培地で培養した菌体では野生株では活性が非常に高いのに対して破壊株では低いことが明らかになった。

以上の結果をまとめると *pldA* の破壊株では NBD-PE に対する活性が低下したことから、PldA は PC より PE に対して活性が高いことが予想された。さらにこの活性は野生株では高浸透圧培地で上昇しているのに対し、破壊株では上昇が見られなかったことから、この酵素は細胞外の浸透圧などのシグナルによって活性が誘導される可能性が示唆された。また破壊株において NBD-PC を基質とした PLD 活性の低下が見られないことから、*A. nidulans* には他の PLD をコードする遺伝子が存在することも示唆された。

## 2. ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> 遺伝子の単離とその機能解析

リン脂質の2位のアシル鎖を加水分解し脂肪酸とリゾリン脂質を生産する酵素である細胞質ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>)をコードする遺伝子を *A. nidulans* よりクローニングし、*plaA* と命名した。哺乳類の cPLA<sub>2</sub> の保存領域の配列を利用して *A. nidulans* の DNA を鋳型として PCR 法により断片を増幅させた。この断片を用いて *pldA* の場合と同様の手法で *plaA* を単離しイントロンの位置の決定、N 末端の推定を行った。その結果、この遺伝子は 837aa よりなるタンパク質をコードすることが予想され、イントロンは存在しなかった。そのアミノ酸配列には現在まで報告された哺乳類の cPLA<sub>2</sub> に保存されている GGGR, GXSGX モチーフなどリパーゼ活性を持つ領域を確認した。human の cPLA<sub>2</sub> の場合には三つの isoform が存在することから *A. nidulans* の中で *plaA* の isoform の存在を調べるためゲノム DNA を種々の制限酵素で分解したものに対して緩い条件でサザン解析を行った結果、*A. nidulans* にはこの遺伝子と相同性を持つ遺伝子が存在していることが示唆された。炭素源により発現の様子を調べるため、完全培地、種々の炭素源の最少培地で培養した菌体から抽出した RNA に対しノーザン解析を行った結果、*plaA* の発現量はラクトース、グルコースを炭素源とした最少培地で他の培養条件より高かった。*plaA* 遺伝子産物 PlaA の生産を酵母 *S. cerevisiae* で試みたが、活性が検出できなかったことから活性中心を含む配列の直前の ATG から C 末端側を酵母で発現させて活性を測定した。<sup>14</sup>C で標識された PC や PE を基質として活性を測定した結果、この産物は PC より PE に対する活性が高く、その活性は Ca<sup>2+</sup>非依存性であることが明らかになった。*A. nidulans* における *plaA* の機能について解析するため *plaA* の破壊株を *pldA* と同様の方法で作製して表現型を検討したが、培地の炭素源の違いによる生育速度、培養温度の違いまたは、胞子形成効率など野生株と比べての差は見られなかった。*plaA* を培地の炭素源の違いによりその発現を制御できる *A. nidulans* の *alca* プロモーターの下流で高発現させた株では野生株に比べてより多くの子嚢胞子（有性胞子）を形成したことから *plaA* は有性生殖において機能を持つことが示唆された。さらに高発現株、野生株での脂肪酸組成の分析を行った結果、高発現株ではリノール酸の割合が増加していた。

以上の結果をまとめると *plaA* はノーザン解析で有性生殖に好適な培地であるラクトース、グルコースを炭素源とした最少培地で発現量が高かったこと、高発現株では子嚢胞子の形成が野生株に比べ促進されたことから *plaA* は有性生殖の正の調節因子であることが示唆された。また高発現株ではリノール酸の割合が増加した。*A. nidulans* ではリノール酸由来の物質であるプサイファクター (precocious sexual inducers, hydroxylated linoleic acid molecules)が有性生殖を促進することが知られている。cPLA<sub>2</sub> が哺乳類などの高等真核生物においてはアラキドン酸カスケードの初発酵素であることまた、植物においても PLA<sub>2</sub> によりリノール酸が遊離しそれが過酸化されてプサイファクターと類似な構造を持つ物質が生産されることから PlaA はプサイファクター生産の初発酵素である可能性が示唆された。