

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻

平成15年度博士課程 進学

氏名 竹下 典男

指導教員 太田 明德

論文題目 糸状菌 *Aspergillus nidulans* のミオシン様ドメインを持つ
キチン合成酵素の機能解析

糸状菌 *Aspergillus nidulans* は、遺伝学的手法が利用可能であるのに加えて分子生物学的手法が早くから確立されていたことからこれまでに多くの知見が蓄積されており、近年、ゲノム配列も公開されたことからその研究はさらに急速に進むと予想される。また高い菌体外タンパク質分泌能を持つ *Aspergillus oryzae* などの産業上有用な菌のみならず、*Aspergillus fumigatus* などの病原菌のモデル生物としても利用されている。糸状菌の高い分泌能や感染能と菌糸状の形態とは密接に関係していることが示唆されており、糸状菌の形態形成の機構を明らかにすることは、産業上、医薬開発上への応用が期待でき、また生物の形態形成に関する基礎的な知見を得る上でも重要である。

筆者の所属するグループは、糸状菌の形態形成の機構を解明することを目的として、細胞壁成分であるキチンに着目して解析を行っている。糸状菌の細胞表層は細胞壁によって覆われており、多くの糸状菌はその細胞壁の主要構成成分の1つとして *Saccharomyces cerevisiae* 等の大部分の酵母とは異なりキチンを持つ。キチンは *N*-アセチルグルコサミンが β -1,4 結合で繋がった重合体であり、非常に堅い構造となることから糸状菌の形態形成に果たす役割は重大であると考えられる。そして、キチン合成酵素の糸状菌菌糸内の特定の場所への局在化とその活性の厳密な時間的、空間的制御は非常に重要であることが予想される。しかし、糸状菌においてこれらのメカニズムについてはこれまでほとんど未解明のままであった。筆者の所属するグループは、これまでに *A. nidulans* から6種のキチン合成酵素遺伝子を単離し、その機能の解析を行っている(Fig.)。

csmA (chitin synthase with a myosin motor-like domain) 遺伝子は、キチン合成酵素ドメイン (約 750 アミノ酸) の N 末端側に、アクチンケーブル上を走るモータータンパク質であるミオシンに類似した構造のミオシン様ドメイン (約 800 アミノ酸) を持つタンパク質 (CsmA; 1852 アミノ酸) をコードしており、筆者の所属するグループによって初めて単離された (Fig.)。 *csmA* の破壊株では、菌糸の途中が膨らむバルーンや菌糸の中に新たに菌糸が生じる菌糸内菌糸の形成が見られることから、CsmA が細胞壁合成の極性の維持に関わることが示唆され、その機能に両ドメインが必要であることも示されている。近年、ミオシン様ドメインを持つキチン合成酵素遺伝子の存在が、他の糸状菌や菌糸型の形態をとる真菌において明らかとなり始めており、このタイプの遺伝子はゲノム配列の公開されている中で *Ashbya gossypii* 以外の全ての子実菌類の糸状菌において 2 種類ずつ存在し、それら遺伝子のコードするタンパク質はそれぞれクラス V と VI に分類される (Fig.)。その中にはその生物の病原性に必須であるものも含まれている。このタイプのキチン合成酵素遺伝子は、接合菌類や担子菌類の糸状菌にも存在するが、酵母 *Saccharomyces cerevisiae*、*Schizosaccharomyces pombe* には存在しないことから、ミオシン様ドメインを持つキチン合成酵素が糸状菌に普遍的に存在し、糸状菌特有の機能を持つことが予想される。そこで本研究では CsmA の機能解析を行い、更に *A. nidulans* にもう一つ存在するミオシン様ドメインを持つキチン合成酵素をコードする遺伝子 *csmB* を単離し、その機能と CsmA と CsmB の機能的相関についての解析を行った。

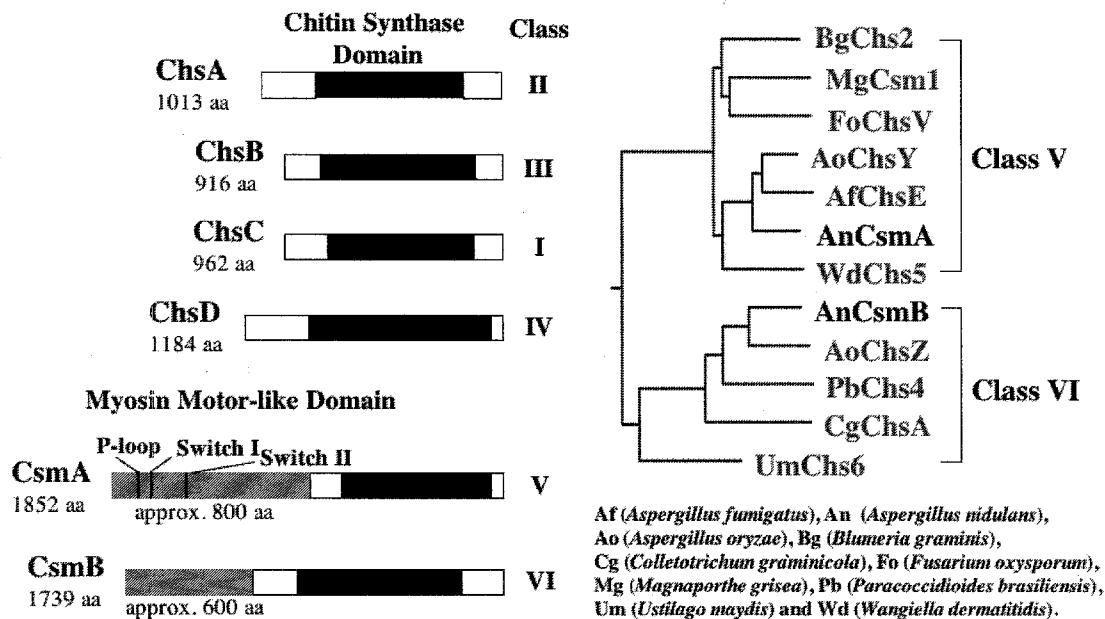


Fig. Cartoon depicting chitin synthases of *Aspergillus nidulans* and phylogenetic tree of class V and VI chitin synthases.

1. CsmA の存在状態と発現制御¹⁾

CsmA の細胞内での存在状態を解析するため、その C 末端に 9 コピーの HA のタグが付加され正常な機能を有する CsmA-HA を、野生型 CsmA の代わりに発現できる株 (CA2 株) を作製した。抗 HA 抗体で Western 解析を行なったところ、SDS-PAGE 上でそのアミノ酸配列から予想されるサイズに近い約 210kDa の位置にバンドが見られた。また培養時間の経過に伴い CsmA-HA がキチン合成酵素ドメインとミオシン様ドメインの間で切断されて存在することが示唆された。一方、*csmA* が低浸透圧条件下で高発現することを示し、それまで単離されていなかった *csmA* のプロモーター領域の単離、配列決定を行い数種の発現制御に関わる配列の存在を示唆した。

2. CsmA の局在とミオシン様ドメインの機能解析²⁾

糸状菌の先端生長には、細胞壁キチンの極性的な合成が必須である。一方、アクチン細胞骨格は菌糸の極性を決定するうえで重要な役割を担っている。CsmA はミオシン様ドメインを介してアクチン細胞骨格と極性的なキチン合成をつなぐタンパク質であることが予想されたことから、CsmA の菌糸内での局在とミオシン様ドメインの機能について解析を行った。まず、CsmA とアクチンの関連について検討するため、CA2 株において抗 HA 抗体と抗アクチン抗体を用いた間接蛍光抗体法によりそれぞれの局在を解析し、CsmA-HA が菌糸先端と隔壁形成部においてアクチンと非常に近接した部位に局在化していることを示した。抗 HA 抗体を用いた免疫沈降実験ではアクチンが CsmA-HA と共沈するが、ミオシン様ドメインを欠失させたものとは共沈しないことから、CsmA のミオシン様ドメインが *in vivo* でアクチンと結合することが示唆された。また間接蛍光抗体法において、ミオシン様ドメインを欠失させた変異型 CsmA-HA は菌糸先端、隔壁形成部に局在化せず、CsmA の正常な局在化にミオシン様ドメインが必要であることを示した。次に、ミオシン様ドメインのモーター活性について検討するため、ミオシン様ドメインにおけるモーター活性に必須と考えられる ATP 結合部位に変異を導入した変異体を野生型 CsmA の代わりに発現する株を作製した。しかし、表現型や変異型 CsmA の局在に異常が見られず、ミオシン様ドメインのモーター活性が CsmA の局在化、機能に必須ではないことが示唆された。そこで、ミオシン様ドメインとアクチンとの結合の重要性を検討した。ミオシン様ドメインのアクチン結合領域と予想される部位に変異を導入した変異体を野生型 CsmA の代わりに発現する株を作製した。表現型は *csmA* 破壊株と類似しており、変異型 CsmA の局在も異常であった。更に、ミオシン様ドメインを *in vitro* で合成し、F-アクチンとの pull-down 実験を行うことにより、上記の変異を有するミオシン様ドメインと F-アクチンとの親和性が低下していることを示した。以上のことから、ミオシン様ドメインの機能にはアクチンと結合することが重要であることが示唆され、CsmA がミオシン様ドメインとアクチンの結合を介して、アクチン細胞骨格依存的に細胞内で局在化し極性的な細胞壁合成に関わることが示唆された。

3. *csmB* の機能解析、*csmA* と *csmB* の機能的相関関係の解析³⁾

これまで一つの生物においては、クラス V と VI に分類されるキチン合成酵素をコードする遺伝子のどちらか一方の破壊株が作製され解析されているものの、二重破壊株の作製は報告されておらず、両者の機能的関わりは不明であった。そこで *A. nidulans* におけるミオシン様ドメインを持つキチン合成酵素をコードするもう一つの遺伝子 *csmB* を単離し、それ自身の機能と、また *csmA* との機能的相関についての解析を行った。まず *csmB* 破壊株を作製したところ、*csmA* 破壊株と類似した表現型が見られ、両者の機能の類似性が示唆された。次に、*csmA* と *csmB* の二重破壊を試みたが、合成致死となることが示された。そこで、*csmB* が破壊され、*csmA* の発現が制御可能な株を作製した。この株を *csmA* の発現を抑制する条件で生育させたところ、著しい生育の遅れが見られ、単独破壊株で見られる表現型の他に先端生長に重篤な異常が見られた。このことから、CsmA と CsmB が先端生長において相補的な機能を持つことが示唆された。逆に、*csmB* が破壊された株で *csmA* の発現量を増加させても、*csmB* の破壊による形態異常を抑圧することはできず、両者の機能が異なることも示唆された。*csmA* と *csmB* はプロモーター領域を共有するように染色体上に位置し、*csmB* は低浸透圧条件下で *csmA* と同様にその mRNA 量が多いことが示された。CsmB の機能をタンパク質レベルで検討するため、その C 末端に 3 コピーの FLAG タグが付加されほぼ正常な機能を有する CsmB-FLAG を野生型 CsmB 代わりに発現する株を作製した。そして、CsmB-FLAG が菌糸先端と隔壁形成部位においてアクチン近傍に局在化することを示し、CsmA-HA とも近接した領域に局在化することを示した。更に、CsmB のミオシン様ドメインと F-アクチンとの結合を *in vitro* で示した。これらのことから、CsmB も CsmA と同様にミオシン様ドメインとアクチンの結合を介して局在化し極性的な細胞壁合成に関わること、*csmA* と *csmB* の条件的二重変異株の表現型を考え合わせると、その両者の菌糸先端における機能が正常な先端生長に必須であることが推定された。

糸状菌の先端生長には、細胞壁キチンの極性的な合成が必須であり、一般的に糸状菌の細胞壁のキチン含量は、酵母 *S. cerevisiae* のものよりずっと多い。これらのことから、糸状菌はキチン合成を時空間的により厳密に制御するために、特有の機構を持っている可能性がある。CsmA と CsmB はミオシン様ドメインを有することで極性の決定に関わるアクチン細胞骨格と相互作用し、より複雑な糸状菌特有のキチン合成を可能にする極めて重要なタンパク質であることが考えられる。

References

1. Takeshita, N., Ohta, A., Horiuchi, H. (2002) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **298**, 103-109.
2. Takeshita, N., Ohta, A., Horiuchi, H. (2005) *Mol. Biol. Cell*, **16**, 1961-1970.
3. Takeshita, N., Yamashita, S., Ohta, A., Horiuchi, H. (2006) *Mol. Microbiol.* in press.