

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 竹下 典男

第1章では、CsmA の細胞内での存在状態と発現制御について述べている。糸状菌 *Aspergillus nidulans* のキチン合成酵素である CsmA は、当研究室において初めて発見されたミオシン様ドメイン(MMD)を有する特徴的な酵素であり、糸状菌にのみ普遍的に存在し、糸状菌特有の機能を持つことが予想される。細胞壁成分であるキチンは、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、キチン合成酵素の菌糸内の特定の場所への局在化とその活性の厳密な時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。本研究では、CsmA に 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 抗体を用いた Western 解析により CsmA が約 210kDa のタンパク質として生産されていることを示した。糸状菌においてキチン合成酵素をタンパク質レベルで検出したことは、本研究が最初であった。また、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配列決定を行うことで、数種の発現制御に関わる配列の存在を示唆した。そして、*csmA* が低浸透圧条件下で高発現することを示した。

第2章では、CsmA の局在とミオシン様ドメインの機能解析について述べている。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おり、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、ミオシン様ドメインとアクチンとの関わりについて解析を行っている。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。また、CsmA のミオシン様ドメインがアクチンと結合することを *in vivo* と *in vitro* で示唆した。さらに、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することで、CsmA の機能と局在化に、ミオシン様ドメインとアクチンとの結合が重要であることを示唆した。今回の結果は、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というモデルを支持するものである。

第3章では、*csmB* の機能解析、*csmA* と *csmB* の機能的相関関係の解析について述べ

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ほぼ全ての子のう菌類の糸状菌において2種類ずつ存在する。これまで一つの生物においては、2つ存在するこのタイプの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ている。まず *csmB* 破壊株を作製し、*csmA* 破壊株と類似した表現型が見られたことから、両者の機能の類似性を示唆した。次に、*csmA* と *csmB* の二重破壊が合成致死となることを示した。そこで、*csmA* と *csmB* の条件的二重変異株を作製し、これらが著しい生育の遅れや、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を示すことを明らかにした。このことから、CsmA と CsmB が先端生長において重複した機能を持つことを示唆した。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。これらの結果は、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、その両者の菌糸先端における少なくともどちらか一方の機能が正常な先端生長に必須であることを示唆するものである。

以上要するに、本研究は糸状菌におけるミオシン様ドメインを持つキチン合成酵素の機能解析であり、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提唱する知見となっており、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士(農学)の学位として価値あるものと認めた。