

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成 20 年度博士課程進学
氏 名 對崎 真楠
指導教員名 太田 明德

論文題目 糸状菌 *Aspergillus nidulans* の菌糸先端生長における
キチン合成酵素の機能と動態に関する研究

糸状菌は極性的な先端生長により菌糸型の形態を形成する生物であり、先端生長はあらゆる生物の細胞において普遍的に見られる現象である。糸状菌の細胞表面は細胞壁によって覆われており、キチンは糸状菌細胞壁の主要構成成分の一種である。糸状菌においてキチンの生合成は菌糸型の形態形成に必須であり、糸状菌のモデル生物である *Aspergillus nidulans* において、キチンの生合成を担うキチン合成酵素は 7 つのクラスに分類される 8 個が存在する。これらのキチン合成酵素のうち、クラス III に属する ChsB、クラス V に属する CsmA、クラス VI に属する CsmB をコードする遺伝子の破壊株は生育遅延や顕著な表現型の異常を示す。またこれらのキチン合成酵素は膜タンパク質であり、菌糸先端及び隔壁形成部位に局在し、菌糸先端生長並びに隔壁形成において重要な役割を果たしていると考えられる。クラス V 及び VI に属する CsmA と CsmB はタンパク質の N 末端側にアクチン細胞骨格上を移動するモータータンパク質であるミオシンと相同性のあるドメイン (myosin motor-like domain: MMD) を有する。クラス III、V、VI に属

するキチン合成酵素をコードする遺伝子は菌糸型の形態をとり得る真菌類のゲノム中にのみ存在し、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae*、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe*、二形性酵母 *Candida albicans* 等のゲノム中には存在しないことから、菌糸型の形態形成に重要であると考えられる。糸状菌の菌糸先端生長に関わる因子については近年解析が進められているが、菌糸先端における形質膜形成や細胞壁合成に直接的に関わると考えられる因子については、その局在化機構や輸送機構等は殆ど明らかとなっていない。そこで本研究では、ChsB、CsmA、CsmB の菌糸先端生長における機能と、その局在化機構に関する解析を行った。

1 CsmB の機能における MMD の役割及び CsmA とのドメイン互換性

CsmA の MMD はアクチンと相互作用し、CsmA の正常な局在化と機能に必要であることが示唆されている。本研究では CsmB についてもその機能における MMD の役割について検討した。CsmB の MMD 欠失株は *csmB* の全長破壊株と同様の表現型異常を示し、MMD 欠失型 CsmB は菌糸先端及び隔壁形成部位に局在が観察されなかった。また *in vivo* において野生型 CsmB はアクチンとの相互作用が確認されたが、MMD 欠失型 CsmB はアクチンとの相互作用が見られなかった。これらの結果から、CsmB の正常な局在化と機能には MMD とアクチンとの相互作用が必要であることが示唆された。

また、CsmA と CsmB のドメインの互換性について検討するため、*csmA* 破壊株あるいは *csmB* 破壊株において、CsmA 及び CsmB の MMD と酵素の活性部位を含む CSD (chitin synthase domain) を相互に交換した融合タンパク質を野生型 CsmA あるいは CsmB の代わりに生産する株を作製し、*csmA* あるいは *csmB* の破壊による生育遅延や表現型の異常を抑圧できるか解析した。その結果、CsmA の MMD は CsmB の MMD により機能の一部を代替できるが完全には代替できないこと、CsmB の MMD は CsmA の MMD により機能を代替できること、両者の CSD は相互に機能を代替できないことが示唆された。また、CsmA と CsmB は界面活性剤による膜の可溶化条件に差が見られ、CsmB の方が可溶化され易く、その差異は両者の MMD に依存しないことが示された。

2 CsmA の菌糸内局在化機構

CsmA は間接蛍光抗体法による観察により、菌糸先端及び隔壁形成部位における局在が観察され、細胞骨格形成阻害剤による局在変化の観察から正常な局在化に微小管及びアクチンが必要であることが示唆されていたが、その

局在化機構の詳細は不明であった。そこで本研究では CsmA の局在化における微小管及び微小管上を移動するモータータンパク質であるキネシンの機能、及び MMD の役割について解析した。

生細胞における CsmA の局在観察の結果、CsmA は菌糸先端を含む形質膜上及び形成中の隔壁部位に局在が観察され、一部菌糸内においてもエンドソームにおける局在が観察された。また微小管重合阻害剤による処理やキネシン *kinA* あるいは *kipA* 遺伝子の破壊により、菌糸先端付近において CsmA のドット状の局在や細胞質に拡散した局在等の異常が観察された。一方、*kinA* あるいは *kipA* 破壊株において隔壁形成部位における CsmA の局在には顕著な異常は観察されなかった。微小管に沿ってフィラメント状の局在を示す変異型 KinA^{rigor} または KipA^{rigor} と CsmA の局在部位を同一の株において比較した結果、菌糸先端から後方において CsmA とこれらの変異型キネシンのフィラメント状の共局在が観察された。更に、KinA^{rigor} 及び KipA^{rigor} は CsmA と *in vivo* において相互作用することが示された。これらの結果から、CsmA は KinA あるいは KipA との相互作用により微小管上を菌糸先端付近へ輸送されることが示唆された。次にこの微小管上の輸送における MMD の役割について検討した。MMD 欠失型 CsmA (Δ MA) 及びアクチンとの結合能の欠失した CsmA (D10A) の局在観察の結果、菌糸先端から後方において KinA^{rigor} のフィラメント状の局在との共局在が観察された。また、 Δ MA 及び D10A と KinA^{rigor} との *in vivo* における相互作用が示された。これらの結果から、菌糸先端付近へ向かう微小管上の CsmA の輸送には MMD が不要であることが示唆された。

3 CsmA と ChsB の菌糸内局在化機構の比較

ChsB は菌糸の生長に必須の機能を持ち、菌糸先端及び隔壁形成部位における局在が観察されている。ChsB は特に菌糸の最先端部において局在が観察され、先端生長において極性的なキチン合成に関わる可能性が考えられている。しかし ChsB についても CsmA と同様その局在化機構の詳細は不明であった。そこで ChsB の菌糸内局在化における微小管及びキネシンの役割について解析し、CsmA の局在化機構との比較を行なった。

ChsB は微小管重合阻害剤による処理や *kinA* あるいは *kipA* の破壊により菌糸先端における局在異常が観察され、菌糸先端から後方において KinA^{rigor} あるいは KipA^{rigor} とのフィラメント状の共局在が観察された。一方、*kinA* あるいは *kipA* 破壊株において隔壁形成部位における ChsB の局在に顕著な異常は観察されなかった。また、ChsB と KinA^{rigor} あるいは KipA^{rigor} との *in vivo* に

における相互作用が示された。これらの結果から、ChsBはCsmAと同様にKinAあるいはKipAとの相互作用により微小管上を菌糸先端付近へ輸送されることが示唆された。

CsmAとChsBの局在化機構の比較のため、生細胞における観察、あるいは間接蛍光抗体法による観察により両者の菌糸内における局在を同時に観察したところ、菌糸先端及び隔壁形成部位において一部共局在が観察されたが、菌糸先端においてChsBは菌糸最先端部に局在するのに対し、CsmAは先端からやや後方の形質膜上に局在するという局在部位の違いが一部観察された。隔壁形成部位においても両者の局在は隔壁形成の異なる時期に一部観察された。生化学的な解析により、両者は近接した膜画分に存在することが示唆されたが、*in vivo*における両者の相互作用は検出されなかった。また、*csmA*破壊株においてChsBの顕著な局在異常は観察されなかった。これらの結果から、CsmAとChsBはKinAあるいはKipAとの相互作用を介してそれぞれ独立に微小管上を菌糸先端付近へ輸送され、菌糸先端の形質膜上の一部異なる領域に局在化することが示唆された。

総括

糸状菌の菌糸型の形態形成は菌糸先端における極性的な生長によって支持されており、菌糸先端の形質膜上において機能するキチン合成酵素は細胞壁形成と先端生長とをリンクする重要な因子であると考えられる。本研究における解析から、少なくとも一部のキチン合成酵素が微小管上をキネシンによって菌糸先端方向へ輸送され、菌糸先端の形質膜上の一部異なる領域に局在化し、先端生長に寄与することが示唆された。キチン合成酵素は菌糸先端や隔壁形成部位において局在部位及び局在時期が異なることにより、時間的、空間的に異なる段階でこれらの部位におけるキチンの生合成に機能する可能性が考えられる。今後これらのキチン合成酵素と相互作用するタンパク質や輸送に関わるキネシン以外の因子等を明らかにし、その機能的相関を解析することにより、キチン合成酵素による菌糸の極性的な先端生長と細胞壁形成のメカニズムがより明確に示されると期待される。