

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 対崎 真楠

---

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る。糸状菌の細胞表層は細胞壁によって覆われており、その主要構成成分の一種であるキチンの生合成は菌糸型の形態形成に必須である。糸状菌のモデル生物である *Aspergillus nidulans* のキチン合成酵素 CsmA、CsmB、及び ChsB は菌糸生長に必須の機能を持ち、CsmA 及び CsmB はタンパク質の N 末端側にミオシンと相同性のあるドメイン (MMD) を有する。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。

本論文は、菌糸先端生長に必須の機能を担う上記のキチン合成酵素の機能及び局在化機構について解析したものであり、3 章からなる。

第 1 章では、CsmB の MMD 欠失株を作製し、その表現型、局在、アクチンとの相互作用を解析し、CsmB の正常な局在化と機能に MMD が必要であることが明らかとなった。また、CsmA と CsmB について、酵素の活性中心を含む CSD (キチン合成酵素ドメイン) と MMD を交換したキメラタンパク質を生産する株を作製し、両者のドメインの互換性について検討した。その結果、両者の MMD の一部の機能は代替可能であること、CSD の機能は代替不能であることが示唆された。

第 2 章では、CsmA の菌糸先端への局在化における微小管及びキネシンの寄与について解析した。微小管重合阻害剤による処理やキネシン遺伝子 *kinA* あるいは *kipA* の破壊により CsmA の菌糸先端における局在異常が観察された。また、CsmA と KinA あるいは KipA との菌糸内における共局在が観察され、免疫沈降実験により *in vivo* における両者の物理的相互作用が示された。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。また、MMD 欠失型 CsmA あるいはアクチンとの結合能の欠失した CsmA についても KinA との共局在及び *in vivo* における物理的相互作用が示されたことから、CsmA の菌糸先端へ向かう微小管上の輸送に MMD は不要であることが示唆された。

第 3 章では、元来 MMD を持たないキチン合成酵素 ChsB の菌糸先端への局在化機構について解析し、CsmA の局在化機構と比較検討した。ChsB についても、微小管重合阻害剤処理や *kinA* あるいは *kipA* 遺伝子破壊により菌糸先端における局在異常が観察された。また、ChsB と KinA あるいは KipA との菌糸内における共局在が観察され、免疫沈降実験により *in vivo* における両者の物理的相互作用が示された。これらの結果から、ChsB についても 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、菌糸先端部にお

いて一部両者の共局在が観察されたが、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も一部観察された。生化学的な解析により、両者は近接した膜面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。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。

以上、本論文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、菌糸先端の一部異なる形質膜上の領域に局在化し、先端生長に寄与するメカニズムの一端を明らかにした。本論文で得られた結論は、今後菌糸の極性的な先端生長と細胞壁形成のメカニズムを更に明らかにしていく上で基礎となる重要な事実を含んでおり、学術上、応用上の貢献は多大である。よって審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。