

糸状菌における新規細胞内タンパク質局在化機構の解明

堀内 裕之

(東京大学大学院農学生命科学研究科)

研究の目的

真核生物の細胞には様々な細胞内小器官が存在し、これらが機能を果たすには多くのタンパク質が細胞内で決められた時期に決められた場所に局在化する必要がある。このため真核生物は様々なタンパク質局在化機構を備えている。我々のグループではこれまで糸状菌の菌糸先端生長、形態形成のメカニズムを解明することを目的としてその細胞壁の合成・分解に注目し研究を行ってきたが、その過程で新規の局在化機構により菌糸先端に局在化していると考えられる非常にユニークな構造を持つ細胞壁合成酵素を発見しその解析を行っている。

糸状菌 *Aspergillus nidulans* は子囊菌類に属する糸状菌で細胞壁の主要構成成分はキチンとグルカンである。我々のグループでは *A. nidulans* より6種のキチン合成酵素遺伝子を単離しその機能解析を行っている。このうちの2つの遺伝子 (*csmA*, *csmB*) はキチン合成酵素ドメイン (CSD) の N 末端側にアクチンの上を走るモータータンパク質であるミオシンと相同性を有するドメイン (MMD) を持つタンパク質をコードしている (図1) (1,2)。このような構造を持つタンパク質は比較的細胞壁のキチン含量が高い二形性酵母、糸状菌に普遍的に存在することが明らかになりつつあるが、酵母 *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida albicans* などには存在しない。これまでに *csmA* の遺伝子産物 CsmA において MMD を欠失させたものはその機能を失い細胞内での局在も異常になること、さらにその MMD はアクチンと結合することがその機能に必要なことが明らかになっている (3-5)。そこで本研究では CsmA と CsmB の MMD の機能の解析とその機能の異同について検討することを目的とした。

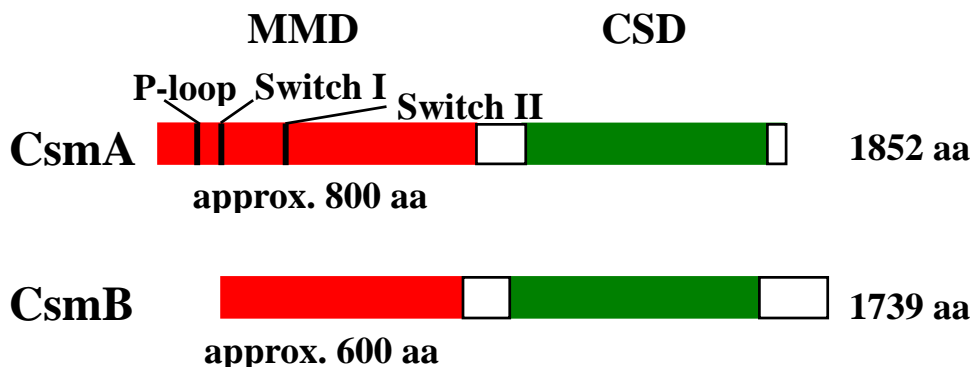


図1 CsmAとCsmBの構造

方法

CsmB の MMD の機能について検討するため CsmB の MMD を欠失したタンパク質を野生型 CsmB の代わりに発現する株を作製し、その表現形を検討した。またこの MMD 欠失型 CsmB に FLAG タグをつないだものの細胞内での局在部位について間接蛍光抗体法を用いて検討した。さらに CsmA と CsmB の MMD の機能の違いを検討するためそれぞれの MMD と CSD を交換したキメラタンパク質を *csmA* 破壊株、*csmB* 破壊株で生産させ、それぞれの破壊株の表現形の回復を指標として解析することにより、その機能性の差異について検討した。また融合タンパク質の細胞内での局在部位についても検討した。

結果

1. CsmB の MMD の機能解析

CsmA の MMD にはミオシンの機能に必須のコンセンサス配列 P-loop、Switch I、Switch II が存在するが CsmB の MMD には存在しない。そこで CsmB の MMD の機能を検討するためまず CsmB の MMD を欠失させたタンパク質を *csmB* 遺伝子の本来のプロモーター下または *alcA* プロモーター (*alcA*(p)) 下で野生型 CsmB の代わりに生産できる *A. nidulans* の株 (それぞれ Δ MB 株、*alcA*(p)- Δ MB 株と呼ぶ) を作製しその表現型について解析した。*alcA*(p) の発現は培地の炭素源によって制御可能で培地の炭素源がエタノール、トレオニンなどの場合高発現する。*csmB* 破壊株は生育の遅れ、バルーンの形成などの表現形の変化を示すが (2)、 Δ MB 株は低浸透圧下で生育の遅れを示しバルーンの形成も見られた。*alcA*(p)- Δ MB 株において CsmB の MMD を欠失させたタンパク質を高生産させたところ生育の遅れは回復し、バルーン形成の頻度も低下した。このことは CsmA の機能がその MMD に完全に依存している (3,5) のとは対照的で、CsmB においては MMD への機能の依存性が CsmA に比べて低いことを示唆する。またこの MMD 欠失型 CsmB の細胞内での局在について検討するためこのタンパク質の C 末端に FLAG タグをつないだものを発現できる株を作製しその細胞内での局在部位について検討したところ、菌糸表層への局在は観察されたものの野生型の CsmB で見られた菌糸先端への局在が観察されず、MMD がその局在に重要な役割を果たすことが示唆された。

2. CsmA、CsmB の MMD の機能の比較

csmA 破壊株、*csmB* 破壊株は一部異なる表現型も示すが、低浸透圧下での頻繁な溶菌、生育の遅れ、バルーンの形成など類似の表現型の変化を示すことから CsmA、CsmB の機能の類似性が示唆されていた (2,3) が、*csmA*、*csmB* はそれぞれ *csmB*、*csmA* の破壊による表現型の変化を抑圧できないことが明らかになっている (2, 未発表)。また CsmA、CsmB の MMD のアミノ酸レベルでの相同性は 21% 程度と低い。そこで CsmA と CsmB の MMD の機能の異同について検討するため CsmA の MMD と CsmB の CSD の融合タンパク質 MACB をコードする遺伝子を *csmA* 破壊株、*csmB* 破壊株の *argB* 部位で発現できる株を作製しそれぞれ MACB Δ A 株、MACB Δ B 株と命名した。CsmB の MMD と CsmA の CSD の融合タンパク質 MBCA をコードする遺伝子についても同様にして *csmA* 破壊株、*csmB* 破壊株に導入しそれぞれ MBCA Δ A 株、MBCA Δ B 株を作製した。これら MACB、MBCA の生産

には *csmA* のプロモーターを用いた。またこれらの株のコントロールとして野生型の *csmA* を *csmA* 破壊株の *argB* 部位で発現できる株 (CsmAΔA 株)、*csmB* を *csmB* 破壊株の *argB* 部位で *csmA* のプロモーター下、発現できる株 (CsmBΔB 株) をも作製した。CsmAΔA 株、CsmBΔB 株は野生株と同様の表現型を示した。まず MACBΔA 株、MBCAΔA 株についてその表現型を CsmAΔA 株、*csmA* 破壊株と比較したところ MBCAΔA 株は *csmA* 破壊株の生育の遅れはほぼ完全に回復した。バルーンの形成効率も減少したが CsmAΔA 株ほどには回復しなかった。MACBΔA 株は生育の遅れ、バルーンの形成効率ともほとんど回復しなかった。一方、MBCAΔB 株は *csmB* 破壊による生育の遅れ、バルーンの形成とも回復せず *csmB* 破壊株と同様の表現型を示したのに対し、MACBΔB 株は CsmBΔB 株同様、野生株に近い表現型を示した。さらに MACB の C 末端に FLAG タグをつないだタンパク質を生産できる株を作製しその菌糸内での局在部位について間接蛍光抗体法と生化学的手法を用いて検討したところ、少なくとも一部は菌糸の先端の膜上に局在することが示唆された。

結論

以上の結果より、CsmB においてその機能と細胞内での局在化に MMD が重要な役割を果たしていることが示された。また CsmA と CsmB において CSD の交換は機能的に不可能であるが、MMD の交換は CsmB の場合可能で CsmA の場合でも部分的に可能であることが明らかとなった。また MACB の局在の検討から CsmB においては MMD が CsmA 由来でも菌糸先端への局在化がおこることから、CsmA の MMD はそれに続くタンパク質を菌糸先端へ輸送する機能を持つと考えられる。

参考文献

1. Fujiwara, M., H. Horiuchi, A. Ohta, and M. Takagi. A novel fungal gene encoding chitin synthase with a myosin motor-like domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **236**:75-78 (1997)
2. Takeshita, N., S. Yamashita, A. Ohta, and H. Horiuchi. *Aspergillus nidulans* class V and VI chitin synthases CsmA and CsmB, each with a myosin motor-like domain, perform compensatory functions that are essential for hyphal tip growth. *Mol. Microbiol.* **59**:1380-1394 (2006)
3. Horiuchi, H., M. Fujiwara, S. Yamashita, A. Ohta, and M. Takagi. Proliferation of intrahyphal hyphae caused by disruption of *csmA* which encodes a class V-chitin synthase with a myosin motor-like domain in *Aspergillus nidulans*. *J. Bacteriol.* **181**:3721-3729 (1999)
4. Takeshita, N., A. Ohta, and H. Horiuchi. *csmA*, a gene encoding a class V chitin synthase with a myosin motor-like domain of *Aspergillus nidulans*, is translated as a single polypeptide, and regulated in response to osmotic conditions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **298**:103-109 (2002)

5. Takeshita, N., A. Ohta, and H. Horiuchi. CsmA, a class V chitin synthase with a myosin motor-like domain, is localized through direct interaction with the actin cytoskeleton in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Biol. Cell* **16**:1961-1970 (2005)