

# 麴菌におけるタンパク質寿命決定機構による新規な分生子形成制御機構の解明

田中 瑞己  
東京農工大学大学院 農学研究院

## 研究の目的

細胞内タンパク質の安定性は N 末端のアミノ酸に依存することが知られている。真核生物では一般的に、N 末端のアミノ酸がアルギニンやリジン、ヒスチジンである細胞内タンパク質は、N 末端のアミノ酸依存的にユビキチンリガーゼ Ubr1 によって認識され、プロテアソームによる分解に導かれる。この N-end rule と呼ばれるタンパク質寿命決定機構は、ペプチド輸送体遺伝子の発現制御など様々な細胞制御に関与していることが知られている。我々は、麴菌のペプチド輸送体遺伝子の解析を行う過程で、Ubr1 オートログ遺伝子(*ubrA*)を麴菌で破壊すると、分生子形成が著しく促進されることを発見した。糸状菌における N-end rule についての研究はこれまでに全く報告がなく、分生子形成への関与についても知られていない。本研究では、*ubrA* 破壊株における分生子形成制御因子の動態を解析し、タンパク質寿命決定機構による新規な分生子形成制御機構の分子機構を明らかにすることを目的とする。

## 方法

麴菌において N-end rule が適用されるかを調べるため、N 末端のアミノ酸が異なる GFP を発現させることが可能なユビキチン融合 GFP<sup>(1)</sup>を野生株と *ubrA* 破壊株で発現させ、抗 GFP 抗体を用いたウェスタン解析によって細胞内の GFP 量を比較した。また、N-end rule が分生子形成を制御する転写因子の制御に関与しているかを調べるため、転写因子に 3×FLAG タグを融合して野生株と *ubrA* 破壊株で発現させ、抗 FLAG 抗体を用いたウェスタン解析によって細胞内の転写因子の量を比較した。

## 結果

### 1. 麴菌における N-end rule の解析

N 末端アミノ酸がメチオニンまたはアルギニンである GFP をユビキチンとの融合タンパク質として発現させた。この融合タンパク質は脱ユビキチン化酵素によってユビキチンが切り離されるため、N 末端アミノ酸が異なる GFP の挙動を解析することが可能である。野生株では N 末端がメチオニンの GFP (M-GFP) のみが検出可能であったのに対し、*ubrA* 破壊株では N 末端がアルギニンの GFP (R-GFP) も M-GFP と同様に検出された。この結果から、麴菌において R-GFP が UbrA 依存的に分解されており、N-end rule が存在することが示された。

### 2. 分生子形成を制御する転写因子への N-end rule の関与

糸状菌の分生子形成は、マスターレギュレーターである転写因子 BrlA を中心として制御されている。brlA 遺伝子には 2 ヶ所の転写開始点が存在し、BrlA $\alpha$ と N 末端が BrlA $\alpha$ よりも 23 アミノ酸長い BrlA $\beta$ の2種類の翻訳産物が生じることが明らかとなっている<sup>(2)</sup>。C 末端に 3×FLAG タグを融合した BrlA $\alpha$ と BrlA $\beta$ を野生株と *ubrA* 破壊株でそれぞれ発現させてウェスタン解析を行った結果、全長の翻訳産物と推定される約 50 kDa のシグナルについては、BrlA $\alpha$ と BrlA $\beta$ のいずれも野生株と *ubrA* 破壊株で大きな存在量の違いは見られなかった。一方、いずれの BrlA を発現させた場合も約 30 kDa 付近にもシグナルが検出され、*ubrA* 破壊株で野生株よりも強く検出された。この結果から、BrlA $\alpha$ と BrlA $\beta$ はいずれも切断を受けており、C 末端側の切断断片が UbrA 依存的に分解されることが示唆された。

出芽酵母においては、ホメオボックス転写因子である Cup9 が N-end rule 依存的に分解されることが知られている。近年、*Aspergillus* 糸状菌においてホメオボックス転写因子である HbxA と HbxB が分生子形成制御に関与することが報告されたことから、これらの C 末端に 3×FLAG タグを融合して野生株と *ubrA* 破壊株で発現させた。いずれの転写因子も全長の翻訳産物および切断断片と推定されるシグナルがウェスタン解析によって検出されたが、野生株と *ubrA* 破壊株でいずれのシグナル強度にも大きな違いは見られなかった。

## 結論

本研究により、糸状菌においても N-end rule が適用されることが初めて示された。また、分生子形成制御のマスターレギュレーターである BrlA が切断を受けており、C 末端側の切断断片が UbrA 依存的に分解されていることが示唆された。BrlA の DNA 結合ドメインは C 末端近傍に存在することから、*ubrA* 破壊株では転写制御能を有した BrlA の C 末端側の切断断片が蓄積することで分生子形成が促進されている可能性が示された。今後は、BrlA の C 末端側の切断断片が転写制御能を有するかの検証と BrlA の切断部位の同定を行うことで、N-end rule による分生子形成制御の分子機構が明らかになることが期待される。

## 文献

1. Dantuma N P., Lindsten K, Glas R, Jellne M, Masucci M G, Short-lived green fluorescent proteins for quantifying ubiquitin/proteasome-dependent proteolysis in living cells, *Nat Biotechnol.*, **18**, 538-543 (2000)
2. Prade R A, Timberlake W E, The *Aspergillus nidulans* brlA regulatory locus consists of overlapping transcription units that are individually required for conidiophore development, *EMBO J.*, **12**, 2439-2447 (1993)