糸状菌の先端生長における極性制御機構の解析

筑波大学生命環境系　竹　下　典　男

はじめに

糸状菌の細胞は，極性を菌糸の先端に維持することで先端生長を行うことから，細胞極性と形態形成に関わる基礎研究の材料として適している（図1A）．また，糸状菌の動植物に対する病原性やその高い酵素分泌能は菌糸状の形態と密接に関連していることから，糸状菌の菌糸状の形態を支える先端成長の機構を理解することは，糸状菌が関わる動植物への病害防除，醸造・発酵，抗生物質・有用酵素生産などの農芸化学分野の諸産業に大きく貢献するものである（図1B）．

私は，糸状菌のモデル生物である *Aspergillus nidulans* を用いて菌糸の先端生長に関わる因子を多面的に解析することによって，細胞極性制御の分子機構の解明に取り組んだ．その結果，極性マーカータンパク質を独自に見出すことに成功するとともに，それを中心とした細胞骨格と膜輸送の協調的かつ動的な制御に基づく新たな先端生長のモデルを提唱した．これは，糸状菌がどのようにして伸びる（先端生長する）のかという生物学の長年の疑問に明確な回答を与えるものである．これらの研究の成果は，以下の様にまとめられる．

1.　極性マーカータンパク質の発見とその機構解明

菌糸の先端生長のために必要な膜やタンパク質は，菌糸先端への分泌小胞の輸送とエキソサイトーシスによって，菌糸先端に供給される（図1C）．微小管は，菌糸後方から先端に向かう長距離の膜輸送に利用され，アクチンケーブルは菌糸先端でのエキソサイトーシスに関わる（1, 2）．

私は，細胞極性の決定に関わる極性マーカータンパク質（TeaA, TeaR）とそれらによる極性制御機構を発見した（図2A）．TeaA は，微小管の伸長により菌糸先端へ輸送され，微小管が菌糸先端に到達すると，TeaA は形質膜に局在する TeaR（膜結合性の TeaA receptor）との結合を介して，相互依存的に菌糸先端に局在化する（3）．菌糸先端の TeaA は，間接的にアクチンケーブルを重合するフォーミンの局在を制御する．そのため，これら極性マーカーの遺伝子破壊株では，結果的にエキソサイトーシス部位が正常に制御されなくなり，菌糸が曲がって生長する（図2B）．この発見は，糸状菌が真っ直ぐに伸長する微小管を利用して位置情報を菌糸先端に伝達し，菌糸の伸長方向を制御するという，菌糸先端生長における極性維持機構の初めての発見となった（4）．

2.　極性マーカーの集中的局在のための微小管重合制御

菌糸先端には，分泌小胞が高密度に集積した Spitzenkörper と呼ばれる糸状菌特有の構造が見られ，糸状菌の高分泌能に関与する（図2C）．極性マーカーの菌糸先端での集中した局在化が Spitzenkörper の形成に重要であることを示した．さらに，菌糸先端の TeaA が微小管の重合化酵素 AlpA の重合化活性を制御することで，微小管を極性部位に収束させる機構を発見した（図2D）（5）．この TeaA と微小管の相互依存的な関係が，Spitzenkörper の形成と極性マーカーの集中した局在化に必要である（1）．この発見は，糸状菌の特徴的な強い極性を生み出す機構の理解のための基礎的知見として重要である．

3.　超解像顕微鏡による極性マーカーの動態解明

糸状菌の高分泌能は，菌糸先端での活発なエキソサイトーシスに依存する．エキソサイトーシスによって菌糸先端の形質膜に新たな膜が大量に供給されるにもかかわらず，膜結合性の極性マーカー TeaR が拡散せずに極性部位に維持される機構を，超解像顕微鏡を用いた解析で見出した（図3A）（6）．その結果，TeaR の一時的な集合（120 nm）と拡散が観察され，微小管に依存した極性部位の形成と，アクチンケーブルに依存したエキソサイトーシスが交互に繰り返して起こることによって，極性マーカーが菌糸先端に維持される機構を発見した（図3B）（2）．この機構の妥当性はシミュレーション解析においても確認された（6）．この成果は，協調的かつ段階的な動的モデルを利用することによって先端生長の極性制御機構を初めて解明したものである．最近，Ca^{2+} の一時的な細胞内への流入がアクチンの重合とエキソサイトーシスのタイミングを調整することで，この制御に関わることも示している．このような協調的制御による細胞生長のゆらぎとも言える現象は，生物界に普遍的であることを期待させるものである．

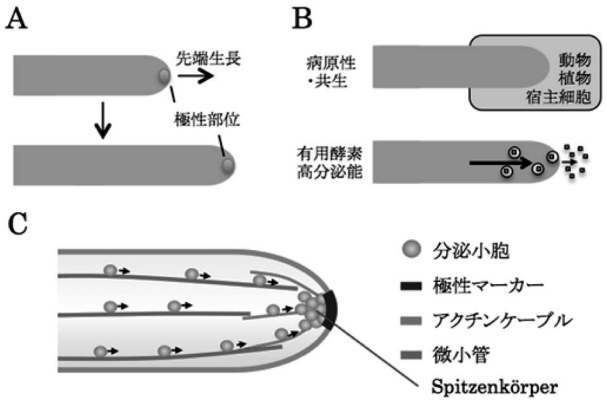

図1　（A）糸状菌の菌糸の先端生長（B）糸状菌の菌糸形態の重要性（C）菌糸の先端生長の機構

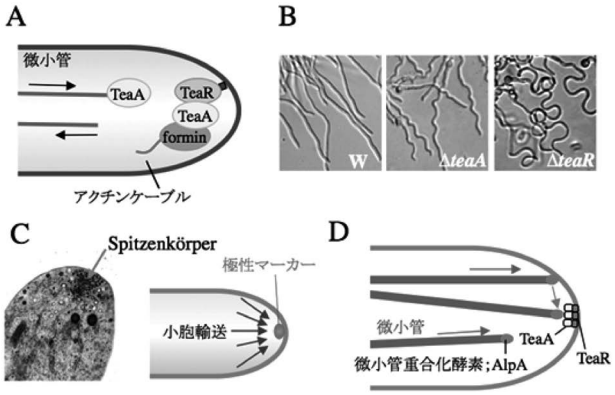

図2　（A）極性マーカー（TeaA, TeaR）の機能（B）極性マーカーの遺伝子破壊株（C）Spitzenkörper と極性マーカーの集中した局在化（D）微小管の収束のための重合化制御

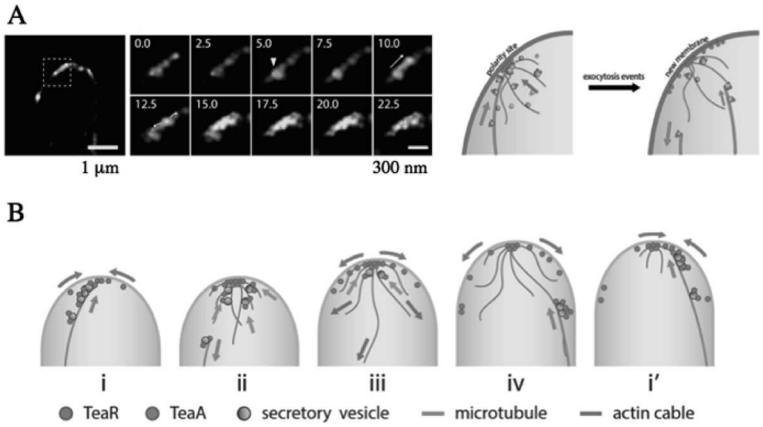

図3 (A) 超解像顕微鏡による極性マーカー TeaR の動態 (B) 一時的な極性の確立を繰り返すことで極性を維持するモデル (Transient polarity assembly model)

4. アクチンケーブルと微小管の相互作用

糸状菌の菌糸先端で合成されるアクチンケーブルの動態を初めて可視化することに成功し，重合速度や重合制御などを解析した (7)．超解像顕微鏡を含むイメージングで，微小管とアクチンケーブルの相互作用と協調的な重合・脱重合制御機構を明らかにした (図4A)．さらに，微小管プラス端がミオシン-V により輸送され，アクチンケーブル上を微小管がガイドされることで極性部位に到達する機構を明らかにした (図4B) (8)．このような微小管とアクチンケーブルの関係は，先のモデル (図3B) を補完し支持するものとなった．

おわりに

糸状菌の先端生長の研究によって，菌糸の伸長方向を制御するための極性の維持機構と高分泌能のための極性マーカーの集中した局在化機構が明らかとなった．ここでは紹介できなかったものも含め，細胞極性・細胞骨格・膜輸送・膜ドメイン等の多面的な制御系が，協調的かつ段階的に進行することで，先端生長を動的なモデルとして理解できるようになった．これは，糸状菌の先端生長がどのようにしてなされるかという基礎・応用研究にも重要な影響を与える疑問に明確に答えるものである．この過程で，超解像顕微鏡を含む最先端イメージング技術を初めて糸状菌に応用した．私は，現在，筑波大学で超解像顕微鏡による微生物観察技術を継続・発展させている．これらの研究成果は，動物の神経細胞や植物の花粉管などを含む細胞一般の極性生長の理解にも貢献し，再生医療を視野に入れた細胞・組織工学にも応用可能である．さらに，得られた成果は，糸状菌が関わる醸造・発酵，抗生物質・有用酵素生産，医薬・農薬開発，生態系の維持など，農芸化学分野の研究開発や産業への応用にも大きく貢献すると期待される．

謝　辞　本研究は，ドイツのカールスルーエ工科大学 微生物学専攻にて行われたものです．本研究に携わる機会を与えて頂き，ご指導を賜りました同大学 Reinhard Fischer教授に心から感謝申し上げます．超解像顕微鏡による共同研究に携わる機会を頂き，ご指導を賜りました同大学物理学科の Ulrich Nienhaus教授に感謝申し上げます．学生の頃から今日に至るまで，親身にご指導ご鞭撻を賜りました，東京大学応用生命工学専攻細胞遺伝学研究室 太田明徳 教授 (現・中部大学副学長)，堀内裕之 教授，福田良一 助教に深く感謝申し上げます．特に，堀内裕之 教授には，留学後も温かいお言葉とご助言を頂戴しました．また共同研究者として，貴重なご意見・ご助言をいただき，本奨励賞にご推薦下さりました．厚く御礼申し上げます．筑波大学にて本研究を継続・発展させる機会を与えるべくご尽力頂き，日頃より温かいお言葉とご指導を頂いている同大学生命環境系 高谷直樹 教授に深く感謝申し上げます．ERATO野村集団微生物制御プロジェクトでグループリーダーとして研究を行う機会を与えて頂き，貴重なご意見・ご助言を頂いている同大学生命環境系 野村暢彦 教授に深く感謝申し上げます．お名前を挙げ尽くせませんが，本研究にご尽力頂きましたカールスルーエ工科大学微生物学専攻の修了生，在学生の方々，共同研究者の方々に深く感謝申し上げます．

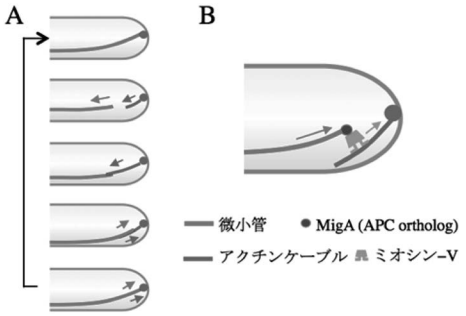

図4 (A) 微小管とアクチンケーブルの協調的重合制御 (B) 微小管プラス端のミオシンによるアクチンケーブルに沿ったガイド機構

(引用文献)

1) Takeshita N, Manck R, Grün N, Herrero S, Fischer R. Curr. Opin. Microbiol. 20C, 34–41 (2014)
2) Takeshita N. Biosci. Biotechnol. Biochem. 80, 1693–1699 (2016)
3) Takeshita N, Higashitsuji Y, Konzack S, Fischer R. Mol. Biol. Cell 19, 339–351 (2008)
4) Fischer R, Zekert N, Takeshita N. Mol. Microbiol. 68, 813–826 (2008)
5) Takeshita N, Mania D, Herrero de Vega S, Ishitsuka Y, Nienhaus GU, Podolski M, Howard J, Fischer R. J. Cell Sci. 126, 5400–11 (2013)
6) Ishitsuka Y, Savage N, Li Y, Bergs A, Grün N, Kohler D, Donnelly R, Nienhaus GU, Fischer R, Takeshita N. Science Advances 1, e1500947 (2015)
7) Bergs A, Ishitsuka Y, Evangelinos M, Nienhaus GU, Takeshita N. Frontiers in Microbiology 7, e682 (2016)
8) Manck R, Ishitsuka Y, Herrero S, Takeshita N, Nienhaus GU, Fischer R. J. Cell Sci. 128, 3569–82 (2015)