

糸状菌の菌糸極性生長・形態分化に関わる機能分子の細胞遺伝学



東京大学大学院農学生命科学研究科 堀内裕之

はじめに

糸状菌には *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus luchuensis*, *Aspergillus sojae* などの *Aspergillus* 属糸状菌をはじめとして産業上有用なものが多数存在する一方で、稲いもち病菌 *Pyricularia oryzae* ほか多数の植物病原菌, *Aspergillus fumigatus* などの人間を含めた動物に対する感染菌も存在する。また、糸状菌は様々な二次代謝産物を生産する能力をも備えているものが多く、その二次代謝産物の中には医薬として非常に重要なものも多数存在する一方、マイコトキシンなど有害なものも存在する。これらの糸状菌の産業上有用な性質、動植物にとって有害な性質は、糸状菌が菌糸の先端生長と分岐により増殖し、ある時期が来ると無性孢子、有性孢子を生産するという増殖様式と関連する部分も少なくないことが明らかにされている。これらのことから糸状菌の菌糸生長、孢子形成のメカニズムを明らかにすることは、産業上有用な糸状菌のより高度な利用、有害な糸状菌の駆逐につながると考え、筆者らはこれまで主にモデル糸状菌である *Aspergillus nidulans* を対象として研究を行ってきた。

1. 糸状菌のキチン合成酵素

1-1. *A. nidulans* のキチン合成酵素の機能解析

糸状菌、酵母の細胞壁を適当な条件で取り除きプロトプラスト化すると球形になることから、細胞壁はその形態を決定する上で非常に重要な役割を果たしている。更に細胞壁は動物細胞には存在せず、植物細胞の細胞壁も菌類の細胞壁とは成分が異なることから抗真菌剤開発の重要なターゲットの一つである。子囊菌門の糸状菌は主にキチン、グルカンなどの多糖とタンパク質から構成されている。キチンは *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) が β -1,4 結合で繋がったホモポリマーで、ポリマー鎖間での重合が進むと非常に剛性の高い構造となることから糸状菌の形態を決定する上で重要な役割を果たしている。キチンはキチン合成酵素によって UDP-GlcNAc を基質として合成されるが、菌類のキチン合成酵素は膜を複数回貫通するタンパク質で、その構造から7つのクラス (I~VII) に分類されている。これらの中でクラス V と VII に分類される酵素はキチン合成酵素と相同性を持つドメインの N 末端側にアクチンフィラメント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のあるドメイン (MMD) を持つ。 *A. nidulans* はクラス I~VII のキチン合成酵素をすべて持つ (クラス III については2つ) が、筆者らはこれら酵素をコードする遺伝子を単離しその機能解析を行ってきた。その結果、クラス II の ChsA とクラス I の ChsC は隔壁形成に重要な役割を果たしていること、クラス III の ChsB は菌糸先端生長において重要な役割を果たし、クラス V と VII の MMD を持つ CsmA と CsmB は菌糸先端少し後方での細胞壁の成熟化、菌糸損傷の修復、隔壁孔の形成に重

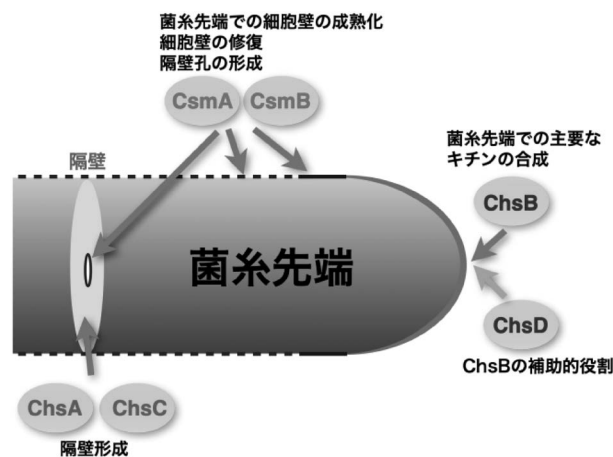


図1 *A. nidulans* におけるキチン合成酵素の菌糸生長、隔壁形成における機能分担

要な役割を果たすこと、クラス IV の ChsD は菌糸生長において ChsB を補助する役割を持つこと等を示すまたは示唆する結果を得ている。これらの結果をまとめたものを図1に示した。

1-2. *A. nidulans* キチン合成酵素の菌糸先端への局在化機構の解析

ChsB, CsmA は主に菌糸先端の細胞表層、形成中の隔壁などに局在するが、筆者らはこれら酵素が菌糸先端またはその近傍に局在する機構について解析を行った。糸状菌の菌糸内には微小管が主にそのプラス端を菌糸先端に向けて複数存在しているが、これら酵素が微小管上を走るモータータンパク質キネシン-1 (KinA) によって菌糸先端まで輸送される機構を明らかにした。この場合、CsmA の MMD はこの輸送には不要であることをも示した。さらに、 *A. nidulans* においてエンドサイトーシスに関与し、菌糸生長における極性の確立に必須の因子をコードする遺伝子 *wspA* の条件変異株を用いた解析から、ChsB と CsmA は菌糸先端より少し後方の部分でエンドサイトーシスにより菌糸内部へ取り込まれることを示し、菌糸先端へリサイクルされていることを示唆した。また、ChsB の菌糸先端後方での効率の良い細胞内への取り込みにはアダプタータンパク質の AP-2 複合体が関与すること、また ChsB の N 末端部分が菌糸先端への局在に関与すること等をも示した。

1-3. *A. nidulans* キチン分解酵素の機能解析

糸状菌はその生活環において、様々な形態変化を引き起こすが、細胞壁の主成分としてキチンを含むことから、それら形態変化にはキチン分解酵素も重要な働きを担っていると考えられる。そこで *A. nidulans* の ChiA と ChiB の2種のキチナーゼについてもその機能解析を行った。その結果、ChiB が培養後期の自己溶菌において主要な役割を果たしていること、分生子の発芽時に *chiA* の発現が誘導されること、ChiA が GPI-アンカー型のタンパク質として細胞膜上に存在することを示した。

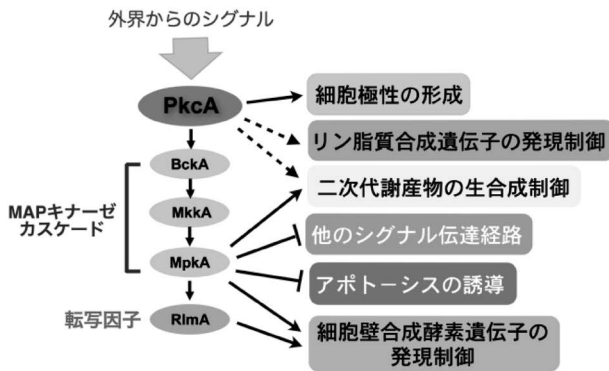


図2 *A. nidulans* の PkcA の機能
現時点で MAP キナーゼカスケードを介しているか未解明のシグナルについては破線の矢印で示した。

なお、この結果は糸状菌で GPI-アンカー型タンパク質の存在を生化学的に実証した最初の例となった。

2. *A. nidulans* プロテインキナーゼ C の機能

筆者らは糸状菌におけるプロテインキナーゼ C (PKC) の働きにも注目し *A. nidulans* において唯一の PKC をコードする遺伝子 *pkcA* を単離して機能解析を行った。 *pkcA* が酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の PKC をコードする遺伝子 *PKC1* とは異なり、浸透圧安定化剤の存在下でも生育に必須の機能を持つことを明らかにし、さらにその温度感受性株、活性化型 PkcA を高発現する株を作製して解析することにより PkcA の関与する多岐にわたる機能について解析を行った。その結果の概略を図2に示した。PkcA は各種の細胞壁合成関連遺伝子の発現を MAP キナーゼカスケードとその下流に位置する転写因子 RlmA を介して制御する場合と、RlmA を介さないで制御する場合があること、MAP キナーゼカスケードを介さずに細胞極性の形成を制御すること、MAP キナーゼカスケードを介して高温ストレス化での分生子発芽時アポトーシスの誘導を抑制すること、未発表ではあるが Ca シグナル伝達系等を負に制御すること、様々な二次代謝産物の生合成を直接的または間接的に制御すること等を明らかにした。次項で述べるが一部のリン脂質合成遺伝子の発現に関与することを明らかにしている。

3. *Aspergillus* 属糸状菌の形態分化におけるリン脂質の機能

筆者らは糸状菌の菌糸生長、形態分化におけるリン脂質の役割についても検討を行っている。菌類の生体膜はホスファチジルコリン (PC)、ホスファチジルエタノールアミン (PE)、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、カルジオリピン等を主成分とする。このうち PE の合成酵素をコードすると考えられる3種の遺伝子の発現制御に PkcA が関与していることを発見し、それら遺伝子の機能解析を行った。その結果、このうちのひとつ *psdB* が菌糸生長、極性の維持、分生子形成などにおいて重要な役割を持つことが明らかになった。また *A. oryzae* を用いた研究から、PC が基底菌糸からの気中菌糸の形成において非常に重要な役割を果たしていることを明らかにしている。これらの結果をまとめたものを図3に示した。

これらの結果は糸状菌の菌糸生長・形態分化において、生体膜リン脂質の組成の維持が非常に重要な役割を担っていることを示しており、糸状菌における菌糸生長、分化のしくみの理解

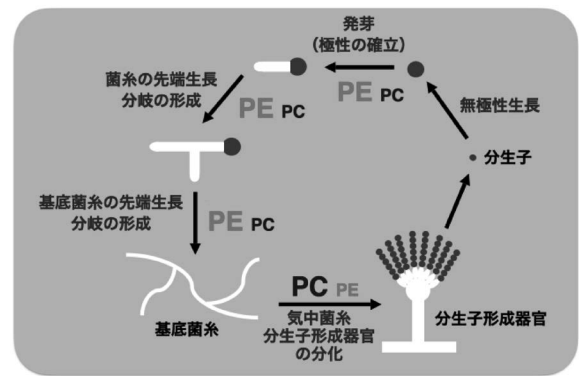


図3 *A. nidulans*, *A. oryzae* における菌糸生長、形態分化におけるリン脂質の役割
無性生活環の各ステップにおいて重要な働きをするリン脂質を示した。

に新たな局面を切り開くものと考えている。

4. *Rhizopus* 属糸状菌のキチン関連遺伝子の機能解析

筆者らは *Aspergillus* 属糸状菌以外にも産業上有用な株を多く含むケカビ門に属する *Rhizopus* 属糸状菌のキチン合成酵素、キチン分解酵素についてもそれらの遺伝子を単離して機能解析を行った。 *Rhizopus* 属糸状菌を対象とした研究は *Aspergillus* 属糸状菌を対象とした研究を開始する以前に行ったものであるが、その解析を行っている間に *Rhizopus* 属糸状菌では遺伝子重複が高度に行われていること、相同組換えの頻度が低く遺伝子破壊などが困難であることなども明らかとなり、対象を *Aspergillus* 属糸状菌に変更した。しかし最近では *Rhizopus* 属糸状菌での遺伝子破壊などもある程度可能となり、様々な分子生物学的手法も整備されつつあるので、今後 *Rhizopus* 属糸状菌のキチン関連遺伝子の機能解析が進むことが期待される。

おわりに

糸状菌は多細胞生物で、その生活環の中で様々な形態変化を引き起こす。更にその形態変化が糸状菌の有用性、有害性と密接に関連していることに筆者は興味を持ちこれまで研究を行ってきた。紙面のスペースの都合で触れなかったが、 *A. nidulans* の無性胞子である分生子の形成機構についての解析も行っており、糸状菌以外にも二形性酵母の偽菌糸型生長、菌糸型生長の機構についても *Candida maltosa*, *Yarrowia lipolytica* を対象として解析を行った。今後これらの研究成果が糸状菌の菌糸生長の機構、形態分化の機構、二形性酵母の菌糸型生長の機構解明につながることを期待したい。

謝辞 本研究は東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻細胞遺伝学研究室(旧・放射線微生物学研究室)において行われたものです。筆者の研究室配属以来ご指導、ご鞭撻をたまわりました故・矢野圭司先生、高木正道先生(元新潟薬科大学学長)、太田明德先生(現・中部大学監事)、福田雅夫先生(現・長岡技術科学大学大学院特任教授)に厚く御礼申し上げます。また研究室スタッフとして教育、研究にご協力いただいた福田良一准教授、岩間亮助教、ならびにこれまでの私の研究を支えてくださった共同研究者の方々、研究室OB、現研究室員の皆様に心より感謝申し上げます。