糸状菌 *Aspergillus nidulans* の菌糸先端生長における
キチン合成酵素の機能と動態に関する研究

對崎　真楠

目次

序章 6
1　糸状菌研究の現状と今後.....6
2　糸状菌 *Aspergillus nidulans* (*Emericella nidulans*) の生活環.....6
3　糸状菌の菌糸先端生長機構 7
4　細胞壁キチン合成酵素 9
4-1　糸状菌の細胞壁 9
4-2　キチン合成酵素 9
4-3　出芽酵母 *S. cerevisiae* におけるキチン合成酵素の局在と機能 10
4-4　*A. nidulans* におけるキチン合成酵素 12
4-4-1　クラス I-VII キチン合成酵素 12
4-4-2　クラス III キチン合成酵素 ChsB.....12
4-4-3　クラス V 及び VI キチン合成酵素 CsmA 及び CsmB 13
5　本論文の内容.....14

第 1 章　CsmB の機能における MMD の役割及び CsmA とのドメイン互換性24
1-1　序 24
1-1-1　ミオシンの構造と機能 24
1-1-2　糸状菌におけるクラス V 及び VI キチン合成酵素 25
1-1-3　クラス V 及びクラス VI キチン合成酵素の機能的相関 26
1-2　材料と方法 27
1-2-1　菌株.....27
1-2-2　培地.....27
1-2-3　DNA の取り扱い法 29
1-2-4　塩基配列の決定法 29
1-2-5　*E. coli* の形質転換法と *E. coli* からのプラスミド抽出法.....29
1-2-6　プラスミドの構築 29
1-2-7　Double-joint PCR 法による *csmA* 破壊コンストラクトの作製 31
1-2-8　*A. nidulans* の形質転換法.....31
1-2-9　*A. nidulans* の全 DNA 抽出法 32
1-2-10　サザン解析 33

1-2-11　本章で用いた株の作製 33
1-2-12　分生子形成効率の測定 36
1-2-13　バルーン形成頻度の測定 36
1-2-14　*A. nidulans* の細胞抽出液の調製 36
1-2-15　細胞抽出液の分画 37
1-2-16　タンパク質の定量 37
1-2-17　ウェスタン解析 37
1-2-18　間接蛍光抗体法 38
1-2-19　免疫沈降法 39
1-2-20　キチン含量測定 39
1-2-21　膜の可溶化 40
1-2-22　ショ糖密度勾配遠心法及び分画 40
1-3　結果 41
1-3-1　CsmB の機能における MMD の役割 41
1-3-1-1　MMD 欠失型 CsmB (CSΔMB) を生産する株の生育及び表現型 ...41
1-3-1-2　CSΔMB 高生産株の表現型 41
1-3-1-3　MMD 欠失型 CsmB の菌糸内局在 42
1-3-1-4　MMD とアクチンとの *in vivo* における相互作用 43
1-3-2　CsmA と CsmB の各ドメインの融合タンパク質 MACB あるいは MBCA を生産する株の解析 43
1-3-2-1　*csmA* 破壊株において MACB あるいは MBCA を生産する株の解析 44
1-3-2-2　*csmB* 破壊株において MACB あるいは MBCA を生産する株の解析 45
1-3-3　融合タンパク質 MBCA 及び MACB の菌糸内局在 46
1-3-4　CsmA 及び CsmB の可溶化条件の検討 47
1-3-5　MBCA 及び MACB の可溶化条件の検討 48
1-4　考察 48
1-4-1　CsmB の機能における MMD の役割 49
1-4-2　CsmA と CsmB の機能的差異 50
1-4-2-1　MMD の機能的差異 50
1-4-2-2　CSD の機能的差異 51

1-4-2-3　CsmA、CsmB の局在化、膜環境における差異.....52

第 2 章　CsmA の菌糸内局在化機構.....76
2-1　序.....76
2-1-1　糸状菌及び二形性酵母におけるクラス V 及び VI キチン合成酵素の局在.....76
2-1-2　キネシンの分類と小胞輸送における機能.....77
2-2　材料と方法.....79
2-2-1　菌株.....79
2-2-2　培地.....79
2-2-3　DNA の取り扱い法.....79
2-2-4　塩基配列の決定法.....79
2-2-5　*E. coli* の形質転換法と *E. coli* からのプラスミド抽出法.....79
2-2-6　プラスミドの構築.....79
2-2-7　*A. nidulans* の形質転換法.....81
2-2-8　*A. nidulans* の全 DNA 抽出法.....81
2-2-9　サザン解析.....81
2-2-10　本章で用いた株の作製.....81
2-2-11　*A. nidulans* の細胞抽出液の調製.....87
2-2-12　細胞抽出液の分画.....87
2-2-13　タンパク質の定量.....87
2-2-14　ウェスタン解析.....87
2-2-15　蛍光顕微鏡による観察.....87
2-2-16　ショ糖密度勾配遠心法及び分画.....88
2-2-17　免疫沈降法.....88
2-3　結果.....88
2-3-1　生細胞における CsmA の菌糸内局在.....88
2-3-2　ベノミル処理による CsmA の局在変化.....89
2-3-3　キネシン遺伝子破壊株における CsmA の局在.....89
2-3-4　CsmA の局在化におけるクラス I キネシン KinA の機能.....90
2-3-4-1　CsmA と KinA との局在比較.....90
2-3-4-2　CsmA と $KinA^{rigor}$ との物理的相互作用の検討.....91

2-3-5　CsmA の微小管上の輸送における MMD の役割 91
2-3-5-1　EGFP-ΔMA あるいは EGFP-D10A の菌糸内局在 92
2-3-5-2　ΔMA あるいは D10A と KinA との物理的相互作用の検討 92
2-3-6　CsmA の局在化におけるクラス VII キネシン KipA の機能 93
2-3-6-1　CsmA と KipA との局在比較 93
2-3-6-2　CsmA と KipA^{rigor} との物理的相互作用の検討 93
2-3-7　KinA と KipA の機能的相関 94
2-4　考察 95
2-4-1　菌糸内後方から菌糸先端付近への輸送 95
2-4-2　菌糸先端付近から菌糸最先端部への輸送 97
2-4-3　隔壁形成部位への輸送 99

第 3 章　CsmA と ChsB の菌糸内局在化機構の比較 125
3-1　序 125
3-1-1　糸状菌における極性生長 125
3-1-2　クラス III キチン合成酵素 126
3-1-3　菌類における GPI アンカー型タンパク質 127
3-2　材料と方法 129
3-2-1　菌株 129
3-2-2　培地 129
3-2-3　DNA の取り扱い法 129
3-2-4　塩基配列の決定法 129
3-2-5　*E. coli* の形質転換法と *E. coli* からのプラスミド抽出法 129
3-2-6　プラスミドの構築 129
3-2-7　*A. nidulans* の形質転換法 130
3-2-8　*A. nidulans* の全 DNA 抽出法 130
3-2-9　サザン解析 130
3-2-10　本章で用いた株の作製 130
3-2-11　*A. nidulans* の細胞抽出液の調製 134
3-2-12　細胞抽出液の分画 134
3-2-13　タンパク質の定量 134
3-2-14　ウェスタン解析 134

3-2-15　蛍光顕微鏡による観察 134
3-2-16　間接蛍光抗体法 134
3-2-17　ショ糖密度勾配遠心法及び分画 135
3-2-18　免疫沈降法 135
3-3　結果 135
3-3-1　ChsB と TlgB の局在部位の比較 135
3-3-2　ChsB の菌糸先端への局在化における微小管及びアクチンの役割 135
3-3-3　ChsB の局在化における KinA の機能 137
3-3-4　ChsB の局在化における KipA の機能 137
3-3-5　GPI アンカー型タンパク質 ChiA の菌糸内局在 138
3-3-5-1　ChiA の菌糸内局在化における微小管及びアクチンの役割 138
3-3-5-2　ChiA の菌糸内局在化におけるキネシンの機能 138
3-3-6　ChsB と CsmA の菌糸内局在部位の比較 139
3-3-6-1　生細胞における ChsB と CsmA の局在部位の比較 139
3-3-6-2　間接蛍光抗体法による ChsB と CsmA の局在部位の比較 140
3-3-7　CsmA と ChsB の物理的相互作用及び機能的相関の検討 141
3-4　考察 142
3-4-1　ChiA の菌糸内局在化機構 143
3-4-2　ChsB、CsmA、ChiA の菌糸先端への輸送機構の比較 143
3-4-3　ChsB 及び CsmA の菌糸先端及び隔壁形成部位における局在部位の比較 144
3-4-3-1　菌糸先端における局在 145
3-4-3-2　隔壁形成部位における局在 146
3-4-4　ChsB、CsmA、ChiA の存在する膜環境の比較 147
3-4-5　分生子形成器官における ChsB 及び CsmA の局在 148

終章 168

参考文献 172

謝辞 185

序章

1　糸状菌研究の現状と今後

糸状菌は高いタンパク質分泌能を持つことから、古来より数千年に渡り、物質生産の宿主として有用な株の単離、培養、育種が繰り返され、人々の生活の様々な場面に活用されてきた。現在に至るまで、アミラーゼやセルラーゼなどの糖質関連酵素をはじめ、プロテアーゼ、リパーゼなど様々な酵素が糸状菌を宿主として生産され、食品産業における発酵等において活用されている。医療産業分野においても、糸状菌はスクリーニングによる抗真菌薬探索のターゲットとして昨今積極的に活用されてきた。更に、近年は遺伝子工学技術の進歩により、糸状菌を用いて低コストで大量生産できる抗体医薬の開発においても注目されている。酵素生産の全世界の市場規模は工業用と医療用を合わせて年間約 4000~5000 億円にも及ぶと試算されており、宿主として有用な糸状菌の果たす役割は多大であるといえる。一方、植物及び動物に感染しその生存に重篤な被害をもたらす糸状菌の存在も知られており、イネ稲熱病菌の原因菌である *Magnaporthe oryzae*、免疫力の低下した人間に感染し、アスペルギルス症をもたらす *Aspergillus fumigatus*、アフラトキシン生産菌である *Aspergillus flavus* 等がこの例として挙げられる。これらの菌類に対して十分な効果のある抗真菌剤はこれまでのところほとんど無く、近年の免疫抑制剤利用の増加に伴う深在性真菌症の症例の増加や重篤化に対応した多様な抗真菌剤の開発が急務となっている。近年多くの糸状菌において全ゲノム配列が公開されてきていることから、その情報を利用したマイクロアレイ解析、プロテオミクスなどゲノムワイドなオミクス解析が盛んに行なわれており、今後糸状菌特有の遺伝子発現の制御機構の解明などが期待される。また糸状菌の菌糸型の形態形成はその分泌能や感染能と密接に関係していると考えられており、ゲノム情報を利用して形態形成に関する基礎研究が進展することにより、糸状菌を活用する産業上の有用な知見と共に、形態学の基礎的知見が得られると期待される。

2　糸状菌 *Aspergillus nidulans* (*Emericella nidulans*) の生活環

本研究で使用している *A. nidulans* は子嚢菌類に属する糸状菌でテレオモルフ名は *Emericella nidulans* であるが、有性世代の発見が遅れたため、不完全世代のアナモルフ名である *Aspergillus nidulans* が現在でも一般的に使用されている。

A. nidulans は一倍体で安定に増殖し有性生殖を行うことから、遺伝子の掛け合わせ等の古典遺伝学的手法の利用が可能であり、分子生物学的手法も糸状菌の中では最も整備されている菌の一種である。これらのことから *A. nidulans* を対象として研究を行なう場合、これまでに蓄積された多くの知見を活用できる。さらに *A. nidulans* は *Aspergillus oryzae* などの産業上有用な麹菌や、*A. fumigatus* などの病原菌のモデル生物としても研究に利用されている。また 2003 年に全ゲノム配列が公開されており (Galgan *et al.*, 2005) 、遺伝子の相同組換え頻度が飛躍的に向上した Ku 株 (*ku70* 破壊株) の造成 (Nayak *et al.*, 2006) により遺伝子工学的アプローチがより迅速に行なえるようになったことなどから、その研究は急速に進展している。

以下に *A. nidulans* の生活環について述べる（Fig. 0-1） (Todd *et al.*, 2007) 。*A. nidulans* の無性胞子（分生子）は球形の単核細胞で、まず無極性方向に均一に膨張する。その後ある時点で細胞内に極性が生じ、極性部位からの発芽が起き、菌糸生長を開始する。菌糸の細胞質は隔壁によりそれぞれ形質の異なる複数のコンパートメントに分けられている。隔壁の中央には孔が存在し、各コンパートメント同士はつながっている。菌糸は先端生長と分岐とを繰り返し菌糸体を形成し、菌糸体は更に生長しコロニーを形成する。栄養分の飢餓や空気中への曝露により、分生子形成器官の分化が誘導され、気中に多細胞性の分生子柄と呼ばれる構造物が分化する。その上に長円形の細胞であるメトレとフィアライドが出芽により形成され、更にその上に分生子が出芽により連続的に繋がって形成される。また酸素欠乏や光の遮断により有性生殖が誘導され、子嚢殻を形成する。子嚢殻中には子嚢が詰まっており、子嚢中には減数分裂で生じた子嚢胞子が含まれている。子嚢胞子も分生子と同様に発芽し菌糸生長を行い、再び無性生殖、有性生殖を繰り返す。なお、*A. nidulans* はホモタリックであり、培地を植継ぐことにより、一つの核からの分裂によってコロニーを形成する。

以下に、本研究と関わりの深い糸状菌の菌糸先端生長機構、細胞壁キチンの合成についての知見を述べる。

3　糸状菌の菌糸先端生長機構

内部が無極性状態にある細胞の一部分に極性が生じ、その一点を先端として外界へと細胞を伸長させる、いわゆる先端生長はあらゆる生物の細胞において普遍的に見られる特徴であり、動物の胚発生、神経ニューロンの伸長、花粉管

の伸長、出芽酵母における出芽、細胞質分裂等、各々の生物にとって極めて重要な生物学的プロセスに関与している (Nelson, 2003) 。糸状菌の菌糸は極性的な先端生長により長い円筒形の形態を示し、この形態形成は糸状菌の持つ非常にユニークな特徴である。これまでに糸状菌の先端生長については様々な解析が行われており、先端生長は、細胞内の様々な物質の挙動、細胞壁と形質膜の合成、拡張等が複雑に組合わさった現象と考えられている (Virag and Harris, 2006; Sudbery, 2008) 。

菌糸を形成する主な細胞骨格は微小管とアクチンであり、微小管は菌糸先端の伸長方向にプラス端を向けて菌糸先端部に到達するまで伸長しており、菌糸内に 5-8 本のチューブ状の構造体として観察される。アクチンは菌糸先端部においてパッチ状あるいは一部ケーブル状に局在が観察され、アクチンの形成は特に菌糸先端における極性の確立、維持等に関わっている。菌糸先端生長は菌糸の伸長に必要なタンパク質群を含む小胞が菌糸先端付近へ輸送され機能することによって継続されると考えられている。これら先端生長に必要なタンパク質の多くは菌糸後方から先端付近までは微小管依存的に輸送され、先端付近から更に菌糸の最先端部へはアクチン依存的に輸送されることが示唆されている (Taheri-Talesh *et al.*, 2008; Abenza *et al.*, 2009) 。菌糸最先端部には小胞の集合体であり菌糸生長の方向決定等に関わる Spitzenkörper (Spk) (Bartinicki-Garcia *et al.*, 1995) と呼ばれる構造体が観察され、Spk は菌糸後方の微小管から菌糸最先端部へと向かうアクチンへのレールの切り替えを行なう場として機能する可能性が考えられている (Steinberg, 2007; Fischer *et al.*, 2008) 。また菌糸先端からやや後方の形質膜上にはアクチンのリング状の構造が観察され、この膜上の部位からエンドサイトーシスにより菌糸先端へ輸送されたタンパク質の細胞質への回収が行なわれると考えられている (Taheri-Talesh *et al.*, 2008) 。細胞骨格上を移動し、小胞輸送に関わるモータータンパク質としては、アクチン系モータータンパク質であるミオシンが Spk から菌糸先端の形質膜への小胞輸送に関わり、微小管系モータータンパク質であるキネシン、ダイニンが菌糸後方から Spk、あるいはその逆方向へのオルガネラや小胞の輸送に関わると考えられ、近年その詳細な動態についての解析が行なわれている (Steinberg and Perez-Martin, 2007; Fischer *et al.*, 2008) 。

糸状菌の先端生長は複雑かつ厳密に制御されていることから詳細な機構は不明であるが、先端生長に関わる個々の因子についての解析が近年精力的に進め

られており、これらの因子の相互作用、機能的相関が明らかになりつつある (Figs. 0-2 and 0-3) (Steinberg, 2007; Taheri-Talesh *et al*., 2008) 。しかし、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輸送による局在化機構等は殆ど明らかとなっていない。

4　細胞壁キチン合成酵素

4-1　糸状菌の細胞壁 (Fig. 0-4) (Latge, 2007)

糸状菌の細胞表層は細胞壁によって覆われており、菌糸を適当な条件下で溶菌酵素処理し細胞壁を溶かすと、菌糸状の構造が球形のプロトプラストに変化することから、菌糸状の形態形成、維持において細胞壁が重要な役割を果たしていると考えられる。*Saccharomyces cerevisiae*、*Schizosaccharomyces pombe*、*Candida albicans* などの多くの酵母の細胞壁は主にグルカンとマンノプロテインからなるのに対し、糸状菌の細胞壁は主にグルカンとキチンからなる。*A. fumigatus* の細胞壁中の不溶層はキチンを核としてβ-1,3/1,4-グルカン、分岐したβ-1,3/1,6-グルカン、ガラクトマンナンが結合することによって構成されている。これは *S. cerevisiae* の細胞壁と比較すると、β-1,3/1,4-グルカン及びガラクトマンナンを含む点、β-1,6-グルカンを含まない点、細胞壁に共有結合して存在するタンパク質が殆ど存在しない点で大きく異なる。また *A. fumigatus* の細胞壁中の可溶層はα-1,3/1,4-グルカン及びそれに結合したガラクトマンナンから構成され、*S. cerevisiae* の場合α-1,3/1,4-グルカンを含まない点で大きく異なる。

糸状菌においてキチンは細胞壁構成成分の 10~30%程度の割合を占めるのに対し、*S. cerevisiae*、*C. albicans* においては約 1~2%である。このことから糸状菌における細胞壁キチンの役割は酵母よりも複雑化し、その生合成が厳密に制御されていると予想される。キチンは *N*-アセチルグルコサミン （GlcNAc） がβ-1,4 結合でつながった直鎖状のホモポリマーであり、このポリマーが整列し結晶化することで、細胞壁に強度を付与する構造となることが知られている。

4-2　キチン合成酵素

キチンの合成反応を触媒するキチン合成酵素（UDP-GlcNAc: chitin *N*-acetylglucosaminyl transferase, EC 2.4.1.16）は、UDP-GlcNAc (Uridine diphosphate *N*-acetylglucosamine) を基質とした重合反応を行う。キチン合成酵素の触媒サブユニットをコードする遺伝子（以下キチン合成酵素遺伝子と呼ぶ）

は、*S. cerevisiae* においてキチン合成酵素活性の低下を相補する遺伝子として最初に単離された (Bulawa *et al.*, 1986) 。全ゲノム配列が解読された現在、*S. cerevisiae* には 3 つのキチン合成酵素遺伝子 *CHS1~CHS3* が存在することが明らかとなっている (Orlean, 1997) 。また、保存された配列をもとに他の酵母や糸状菌からキチン合成酵素遺伝子が多数単離され、現在菌類のキチン合成酵素はその遺伝子産物の構造から少なくとも 7 つのクラスに分類されている（Fig. 0-5） (Riquelme and Bartinicki-Garcia, 2008; Horiuchi, 2009) 。クラス VI とクラス VII はこれまでのいくつかの系統学的解析において分類の方法が異なっているが、本論文では *A. nidulans* の CsmB をクラス VI に分類して記述する (Fig. 0-5 B) 。7 つのクラスは配列の類似性から更にクラス I~III、クラスⅣ~Ⅵ、クラス VII の 3 つの区分に分けられている (それぞれ Division 1, 2, and 3) 。Division 1 に属するものは、N 末端側約 1/3 が親水性で保存度が低く機能が不明の領域、中央部は保存されており触媒部位を含む領域、C 末端側約 1/3 が疎水性で複数の推定上の膜貫通ドメインを持つ領域からなる。全てのキチン合成酵素は、触媒部位を細胞質側に向けて存在する膜タンパク質であると考えられている (Horiuchi and Takagi, 1999) 。Division 2 の N 末端はクラス I~III より長く、触媒部位を含む C 末端領域の N 末側に非ヘム結合型シトクロム b_5 様ドメインを持ち (Mifsud and Bateman, 2002) 、クラス V 全てとクラスⅥの一部はさらにその N 末側にミオシンと相同性を有するドメインを持つ。このタイプのミオシン融合型キチン合成酵素は自然界において真菌類とアコヤガイ *Pinctada fucata* にのみ存在が確認されている (Suzuki *et al.*, 2007) 。また、クラスⅢ、V、Ⅵ、Ⅶのキチン合成酵素は糸状菌または菌糸状の形態をとりうる真菌類にのみ存在し、酵母 *S. cerevisiae*、*S. pombe*、*C. albicans* のゲノム中にはこれらのクラスのキチン合成酵素をコードする遺伝子が存在しないことから、菌糸状の形態形成に特に重要な機能を持つことが予想される。

4-3　出芽酵母 *S. cerevisiae* におけるキチン合成酵素の局在と機能

前述のように、出芽酵母 *S. cerevisiae* のゲノム上には 3 つのキチン合成酵素（Chs1~3p） の触媒サブユニットをコードする遺伝子が見つかっており (Orlean, 1997) 、それぞれの局在と機能が明らかになっている (Fig. 0-6) (Lesage and Bussey, 2006) 。

クラスⅣキチン合成酵素 Chs3p は、出芽開始時の母細胞と娘細胞のつなぎ目

（bud neck）に現れるキチンリングの形成、細胞壁中のおよそ 90%のキチンの合成を行っており (Shaw *et al*., 1991) 、bud の形成、伸長時に bud neck の形質膜上に局在化することが知られている (Roncero, 2002) 。Chs3p は小胞輸送により形質膜に輸送され、その輸送の制御には Chs5p、Chs6p、Chs7p が関わることが示唆されており、これらの変異株及び遺伝子破壊株では Chs3p が形質膜に輸送されない (Trilla *et al*., 1999; Santos *et al*., 1997; Ziman *et al*., 1998) 。Chs5p 及び Chs6p は、Chs6p のパラログである Bch1p、Bud7p、Bch2p、small GTPase である Arf1p と Exomer と呼ばれる複合体を形成し、Chs3p と結合し、Chs3p をトランスゴルジネットワークから細胞表層の形質膜へ輸送することが示唆されている (Sanchatjate *et al*., 2006; Trautwein *et al*., 2006; Wang *et al*., 2006) 。Chs3p 特異的シャペロンである Chs7p は、Chs3p の ER における凝集を防ぎ、ER 膜からの輸送が正常に行なわれるために必要であることが示されている (Kota and Ljungdahi, 2005) 。*S. cerevisiae* のクラス V ミオシンである Myo2p、syntaxin ホモログである Tlg1p、Tlg2p も Chs3p の正常な局在化に必要であることが示されている (Santos and Snyder, 1997; Holthuis *et al*., 1998) 。Late Golgi から bud neck にはセプチン、Bni4p、Chs4p との相互作用を介して局在化する。Chs4p は Chs3p のサブユニットであり、Chs3p は bud neck の形質膜上で活性化すると考えられている (Demarini *et al*., 1997) 。娘細胞が生長すると Chs3p はその局在部位を変化させ、形質膜からエンドサイトーシスで取り込まれ、初期エンドソーム、トランスゴルジネットワーク上に局在化し、次の bud 形成時までこれら細胞内オルガネラに蓄積する。このように Chs3p は形質膜と細胞内オルガネラとの間をキトソームと呼ばれる小胞で往復することで機能すると考えられている (Valdivia *et al*., 2002) 。Chs3p の形質膜または細胞内オルガネラへの局在の制御に、small GTPase である Rho1p と、細胞壁の完全性の維持に関わる protein kinase C （PKC）である Pkc1p、さらに Rab タンパク質である Ypt31p、Ypt32p が関わることが示唆されている (Valdivia and Schekman, 2003; Ortiz and Novick, 2006) 。

クラス II に属する Chs2p は、細胞分裂時にアクトミオシンリングの収縮と協調して bud neck における一次隔壁形成を行っており、隔壁形成時 bud neck の形質膜上に局在が観察される (Shaw *et al*., 1991; Schmitz *et al*., 2002; Roh *et al*., 2002) 。Chs2p の小胞体から bud neck への輸送は、有糸分裂に関連したキナーゼの不活性化によることが示されている (Zhang *et al*., 2006) 。

クラスⅠに属する Chs1p は、母細胞と娘細胞が分離した後の細胞壁の修復機構に関与することが知られており (Cabib *et al*., 1989; Cabib *et al*., 1992) 、その輸送はトランスゴルジネットワークからキトソームを経て形質膜に至ることが示唆されている (Ziman *et al*., 1996) 。

4-4　*A. nidulans* におけるキチン合成酵素

4-4-1　クラス I-VII キチン合成酵素

A. nidulans にはそのゲノム配列から 8 種のキチン合成酵素をコードすると考えられる遺伝子 (*chsA*、*chsB*、*chsC*、*chsD*、*chsF*、*chsG*、*csmA*、*csmB*) が存在するが、当研究室ではこれまでに *A. nidulans* より 6 つのキチン合成酵素遺伝子 （*chsA*、*chsB*、*chsC*、*chsD*、*csmA*、*csmB*）を単離し、機能解析を行ってきた (Horiuchi, 2009) 。これら遺伝子産物である ChsA、ChsB、ChsC、ChsD、CsmA、CsmB はそれぞれクラスⅡ、Ⅲ、Ⅰ、Ⅳ、Ⅴ、Ⅵに属する (Fig. 0-7) 。現在までに各遺伝子の破壊株、様々な組み合わせの多重破壊株が作製され、機能解析、機能的相関の解析が行われている (Fig. 0-8) 。それらのうち、本研究に関連するクラス III、V、VI キチン合成酵素について以下に詳述する。

4-4-2　クラス III キチン合成酵素 ChsB

A. nidulans のクラス III キチン合成酵素 ChsB は、当研究室で初めて単離された遺伝子であり、分子量が約 102 kDa、916 アミノ酸からなるタンパク質 ChsB をコードしている。*chsB* の完全破壊株は、非常に小さなコロニーしか形成できず、菌糸の多分岐化、分生子形成能の欠失、隔壁の湾曲、菌糸の中に新たに菌糸が伸長する菌糸内菌糸等の表現型異常が観察されたことから、ChsB が菌糸の先端生長に必須の役割を持つことが示唆された (Fig. 0-9 A-C) (Yanai *et al*., 1994; 福田, 2006; Fukuda *et al*., 2009) 。また、*chsB* の発現を抑制する株で *chsA* を *chsB* のプロモーター下で発現させても生育の遅れが回復できないことから、ChsB の機能を ChsA がタンパク質レベルで代替できないことも示された (Ichinomiya *et al*., 2002) 。一方、*chsB* の発現を抑制する株で *csmA* を破壊すると、二重変異はそれぞれの単独変異の影響を合わせたものとほぼ同様であったことから、*chsB* と *csmA* の機能的重複は小さいと考えられた (廣井, 2001) 。生細胞における EGFP-ChsB の局在観察、及び間接蛍光抗体法による FLAG-ChsB の局在観察の結果、EGFP-ChsB は菌糸先端及び隔壁形成部位に局

在が観察され (Fig. 0-9 D and E) (Fukuda *et al.*, 2009) 、分生子形成器官においてはメトレ先端や、メトレとフィアライドあるいはフィアライドと分生子の間の隔壁に局在が観察された (Fukuda *et al.*, 2009) 。また、FLAG-ChsB はリン酸化による翻訳後修飾を受けることが示されている (福田, 2006) 。

4-4-3　クラス V 及び VI キチン合成酵素 CsmA 及び CsmB

A. nidulans におけるクラス V、VI キチン合成酵素遺伝子 *csmA*、*csmB* はミオシンと相同性のあるドメインを有するキチン合成酵素をコードする遺伝子として当研究室において初めて単離された (Fujiwara *et al.*, 1997; Horiuchi *et al.*, 1999; Takeshita *et al.*, 2006) 。CsmA (chitin synthase with a myosin motor-like domain) は約 210 kDa、1852 アミノ酸からなり、N 末端側に約 800 アミノ酸からなるミオシン様ドメイン (myosin motor-like domain; MMD) 、C 末端側に約 750 アミノ酸からなるキチン合成酵素ドメイン (chitin synthase domain; CSD) を持つ。また CsmB は約 190 kDa、1739 アミノ酸からなり、N 末端側に約 600 アミノ酸からなる MMD、C 末端側に約 800 アミノ酸からなる CSD を持つ (Fig. 0-7) 。*csmA* と *csmB* はプロモーター領域を一部共有するように染色体上に head to head で位置しており、この位置関係はゲノム配列が公開されている他の子嚢菌類の糸状菌においても保存されている。

csmA 破壊株では菌糸の途中が膨らむバルーン構造、菌糸の中に新たに菌糸が生じる菌糸内菌糸といった形態異常が見られ (Fig. 0-10 A) 、低浸透圧条件では野生型株と比較して生育が遅れ、分生子形成効率は極端に低下した（Horiuchi *et al.*, 1999） 。また、*chsA chsC csmA* 三重破壊株は特に低浸透圧培地で重篤な生育阻害が見られ、*chsA* や *chsC* の単独破壊株と比較して *chsA chsC* 二重破壊株では低浸透圧培地においてキチン含量が増加し、*csmA* の発現量が上昇したことから、*chsA chsC* 二重破壊株の細胞壁の修復に CsmA が関わっていることが示唆された (Yamada *et al.*, 2005) 。

更に、*csmB* 破壊株においても、バルーン構造、菌糸内菌糸といった *csmA* 破壊株と類似した菌糸の形態異常が観察された (Fig. 0-10 B) (Takeshita *et al.*, 2006) 。また、*csmA* 破壊株では観察されない *csmB* 破壊株に特徴的な表現型として、菌糸の途中における褐色の凝集体形成、分生子柄の分岐、二次分生子柄の形成等が観察された (Fig. 0-10 B、一部データは示さない) (Takeshita *et al.*, 2006) 。そして、*csmA* と *csmB* の二重破壊が試みられたが、ヘテロカリオンと

考えられる株しか得られず、この株をホモ化すると菌糸の生育が途中で停止し、コロニーが形成されないことから、二重破壊が合成致死となることが示された (Fig. 0-10 C) (Takeshita *et al*., 2006) 。

また、CsmA、CsmB は共に菌糸先端及び隔壁形成部位においてアクチンと近接した部位に局在する様子が観察され (Fig. 0-10 D and E) (Takeshita *et al*., 2005; Takeshita *et al*., 2006) 、CsmA についてはその正常な局在化と機能に MMD とアクチンとの結合が重要であることが示唆されている (Takeshita *et al*., 2005) 。更に *in vitro* で CsmA、CsmB の MMD がアクチンフィラメントと結合することが示されている (Takeshita *et al*., 2005; Takeshita *et al*., 2006) 。これらのことから、MMD を持つキチン合成酵素は、MMD を介してアクチンフィラメントと結合し、アクチン細胞骨格依存的に菌糸先端などにおける極性的なキチン合成に関与すると予想されている (Takeshita *et al*., 2005; Takeshita *et al*., 2006) 。

CsmA と CsmB はその機能における類似性が示唆されているが、*csmB* 破壊株における CsmA の局在及び *csmA* 破壊株における CsmB の局在が顕著に影響を受けず、菌糸先端および隔壁形成部位に正常に局在することから、両者が独立に機能することが示唆されている (Takeshita *et al*., 2006; 對崎, 2007) 。また、*csmB* 破壊株において *csmA* を高発現させた場合、あるいは *csmA* 破壊株において *csmB* を高発現させた場合にも、*csmB* あるいは *csmA* の破壊による形態異常等が抑圧されないことから、両者の機能が少なくとも一部異なることも示唆されている (Takeshita *et al*., 2006; 對崎, 2007) 。

5　本論文の内容

以上のような背景から、*A. nidulans* のキチン合成酵素 CsmA、CsmB 及び ChsB は、細胞壁の合成に直接関与し、キチン合成に伴う菌糸型の形態形成に非常に重要な役割を果たしていると考えられる。従って、菌糸先端生長を始めとする糸状菌の形態形成メカニズムを研究する上でキチン合成酵素の局在化機構や機能を解明することは大きな意味を持つと言える。そこで本研究では、これらのキチン合成酵素の菌糸先端生長における機能と、その局在化機構に関する解析を行なった。本論文は 3 章から構成されており、第 1 章では CsmB の機能における MMD の役割、CsmA と CsmB の各ドメインの互換性、機能的差異について検討した。第 2 章では CsmA の菌糸先端への局在化機構及び局在化における

MMD の役割について、輸送に関わるモータータンパク質であるキネシンとの機能的相関を解析した。第 3 章では ChsB の菌糸先端への局在化機構を解析し、CsmA 及び GPI アンカー型キチン分解酵素である ChiA と局在化機構の差異について検討した。

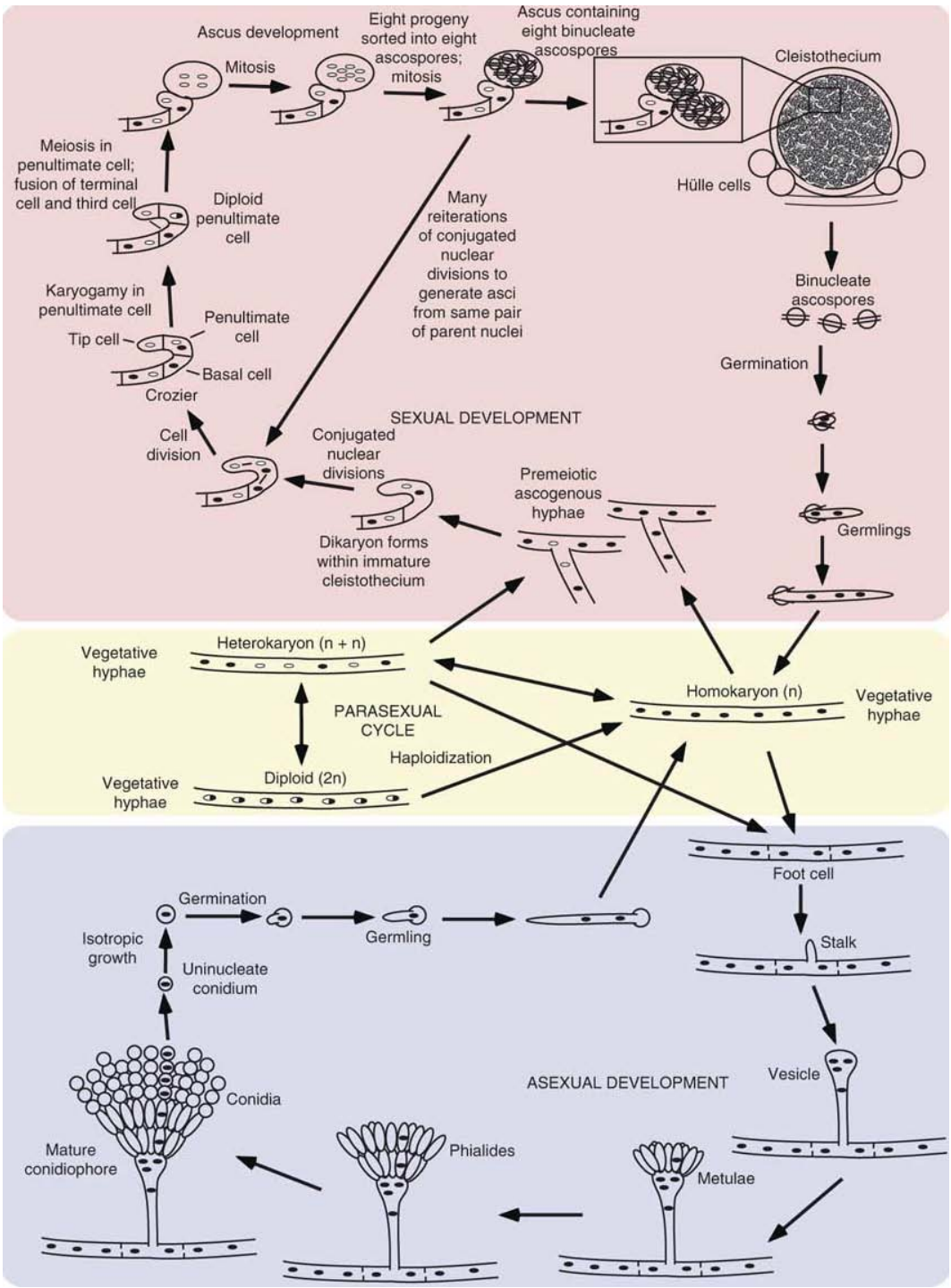


Figure 0-1. Life cycle of *A. nidulans*. (Todd *et al*., 2007)

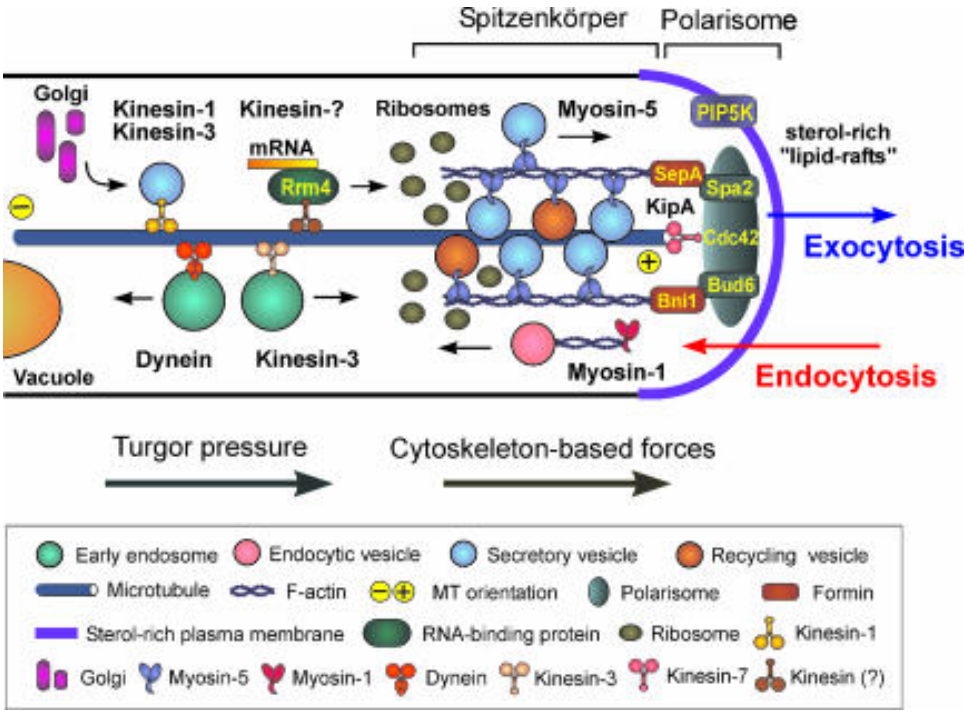


Figure 0-2. A model of hyphal tip growth. (Steinberg, 2007)

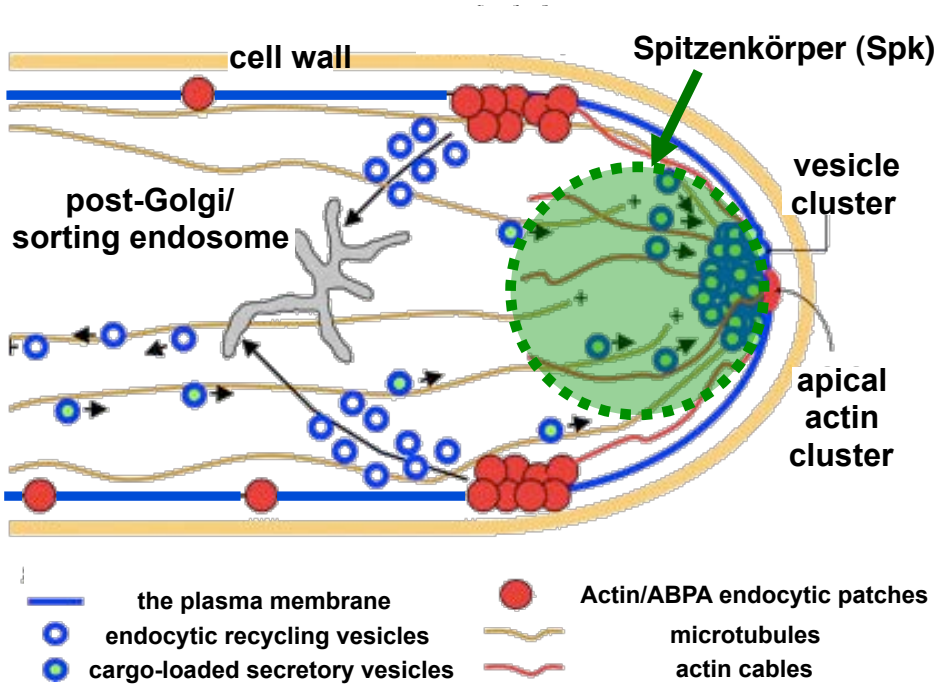


Figure 0-3. A model for hyphal tip growth in *A. nidulans*.
(Taheri-Talesh *et al.*, 2008, modified.)

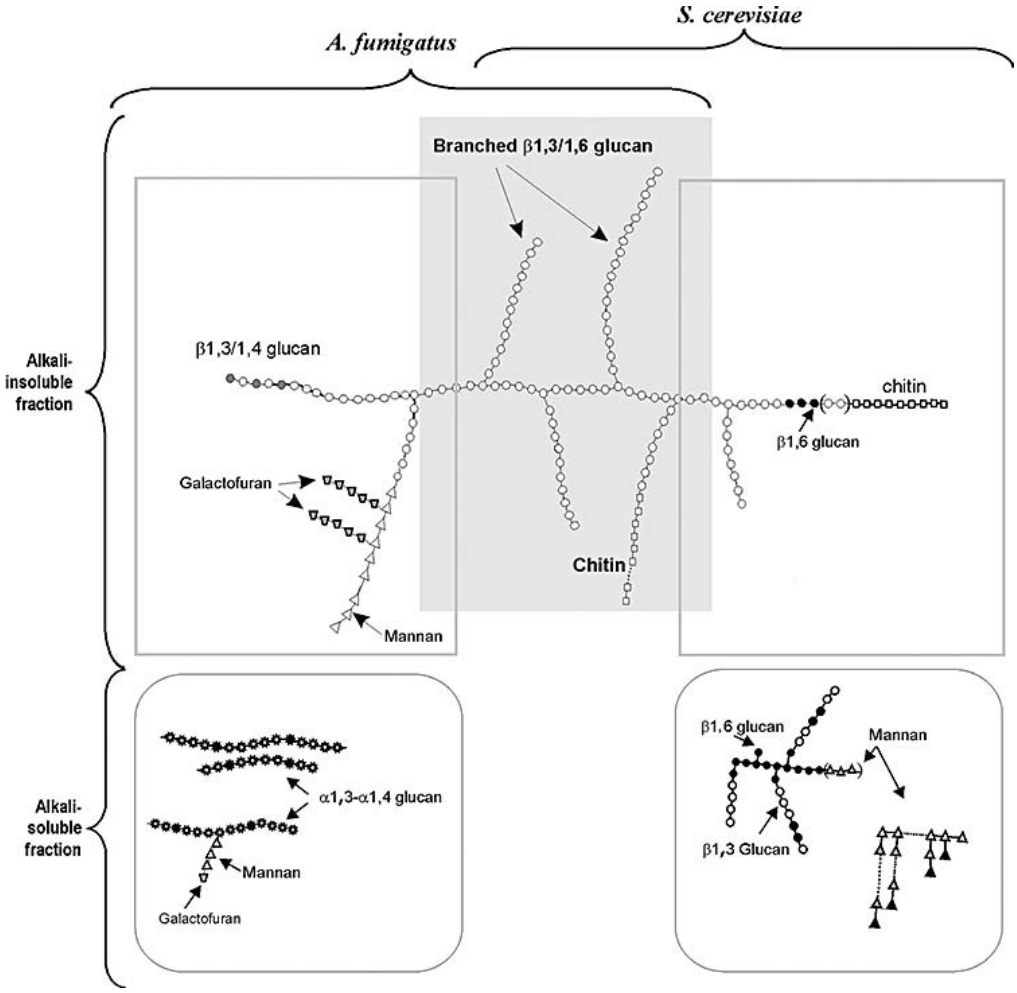


Figure 0-4. Polysaccharides of cell wall of the mould *Aspergillus fumigatus* and the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. (Latge, 2007)

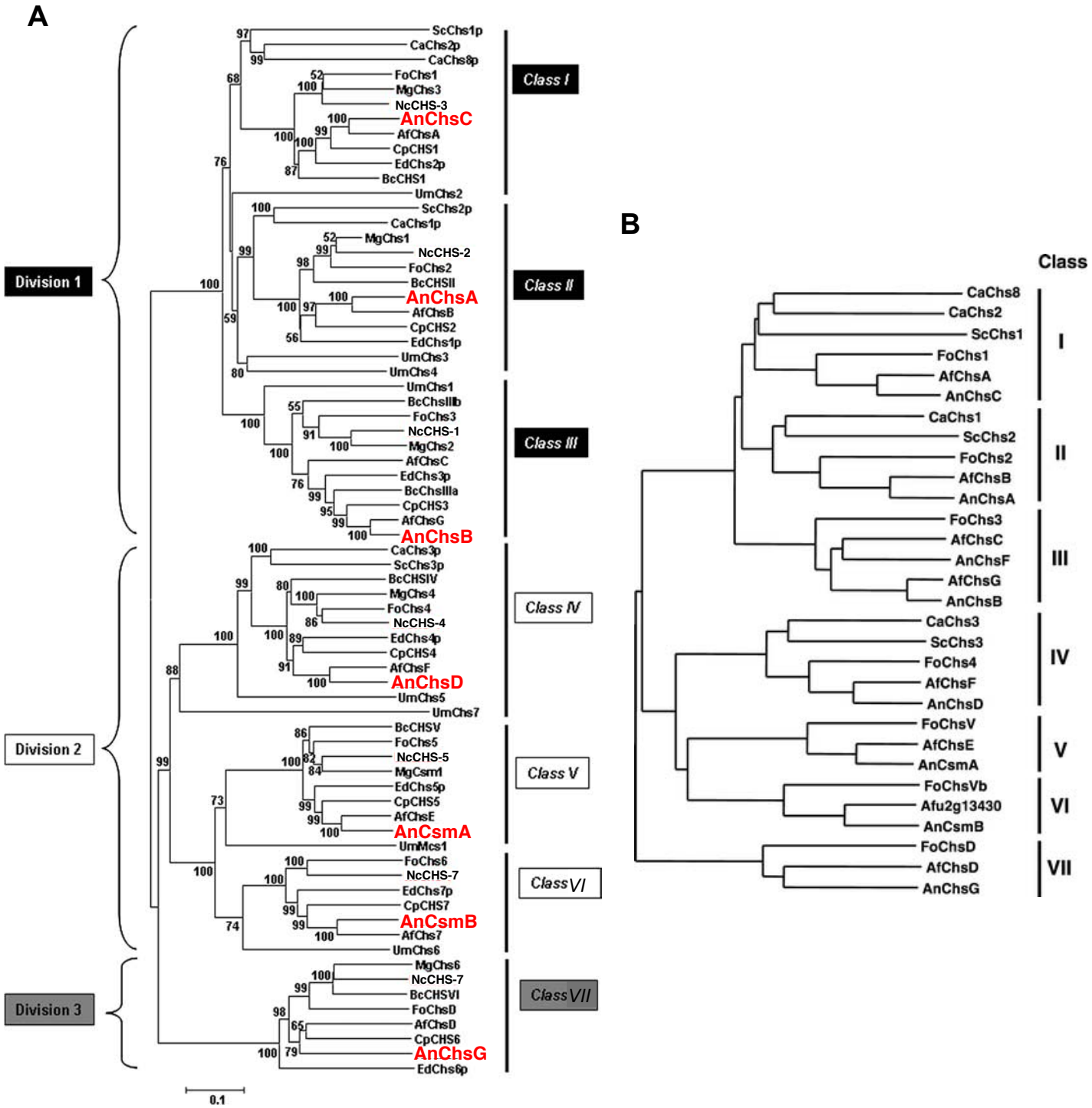


Figure 0-5.

(A) Phylogenetic relationships between chitin synthase sequences of 71 fungal taxa. (Riquelme and Bartnicki-Garcia, 2008, modified.) Red letters indicate chitin synthases in *A. nidulans*.

(B) Phylogenetic tree of fungal chitin synthases. (Horiuchi, 2009)

Abbreviations; Af, *Aspergillus fumigatus*; An, *Aspergillus nidulans*; Bc, *Botrytis cinerea*; Ca, *Candida albicans*; Fo, *F usarium oxysporum*; Mg, *Magnaporthe grisea*; Nc, *Neurospora crassa*; Sc, *Saccharomyces cerevisiae*; Um, *Ustilago maydis*; Ed, *Exophiala dermatiridis*

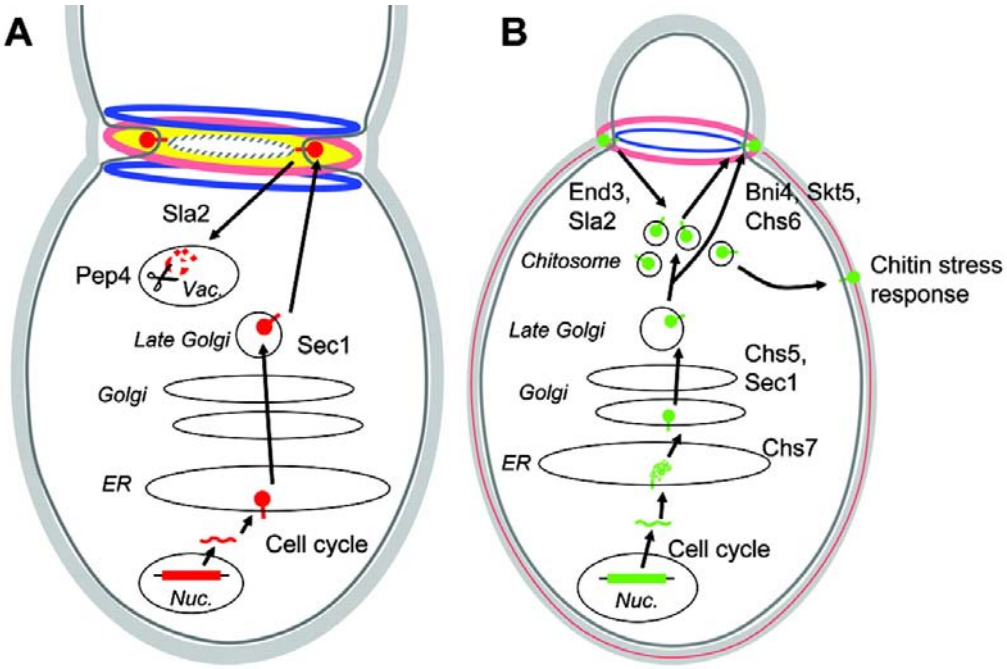


Figure 0-6. Trafficking and biosynthetic pathways for chitin synthases 2 (A) and 3 (B). (Lesage and Bussey, 2006)
The *CHS2* and *CHS3* genes and their products are represented in red (A) and green (B), respectively. The chitin made by Chs2 is shown in yellow, and that made by Chs3 is shown in pink. The cell wall, the plasma membrane, and septin rings are shown in light and dark gray and as a blue ring, respectively (A and B), and the actin-myosin ring is represented as a hatched gray ring (A). Nucleus, Nuc.; vacuole, Vac.

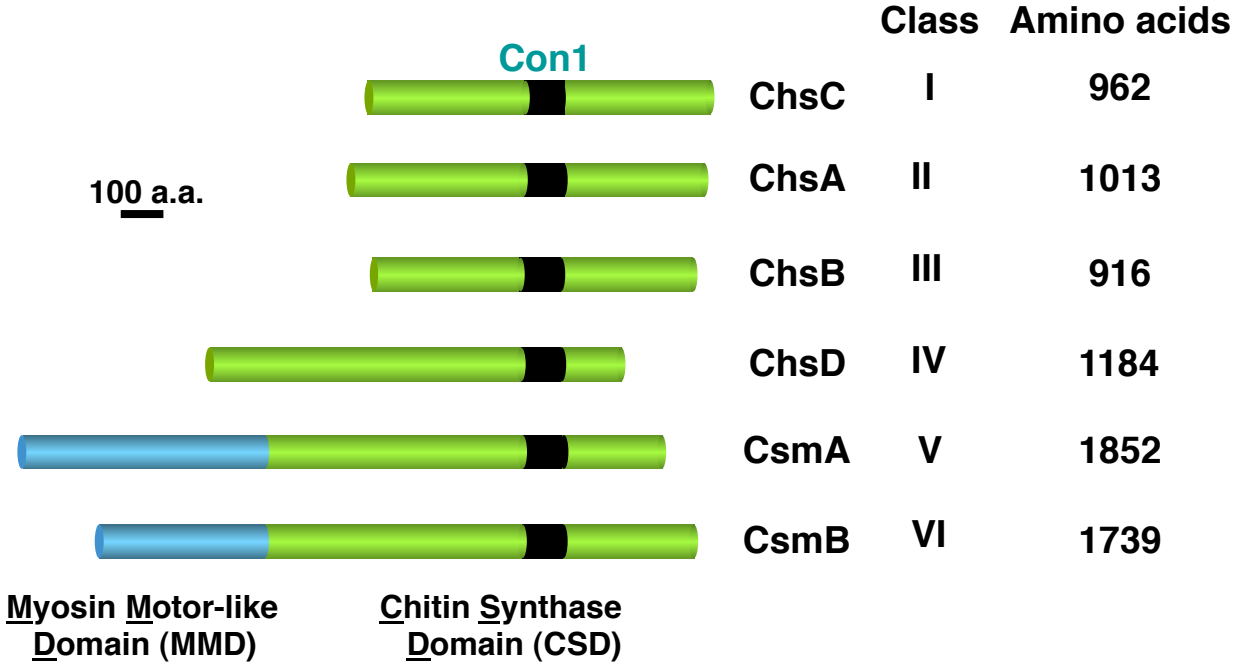


Figure 0-7. Sturctures of chitin synthases in *A. nidulans*.
Con1 is conserved catalytic domain in these chitin synthases. Class V (CsmA) and class VI (CsmB) chitin synthases have a myosin motor-like domain (MMD) in their N-termini.

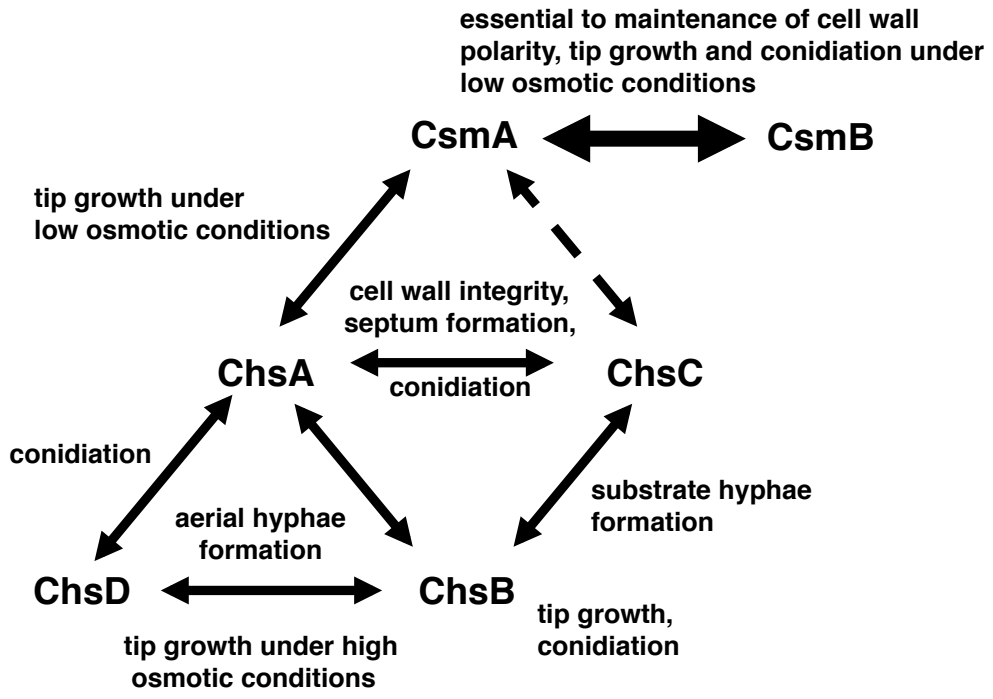


Figure 0-8. Functional relationships of chitin synthases in *A. nidulans*.

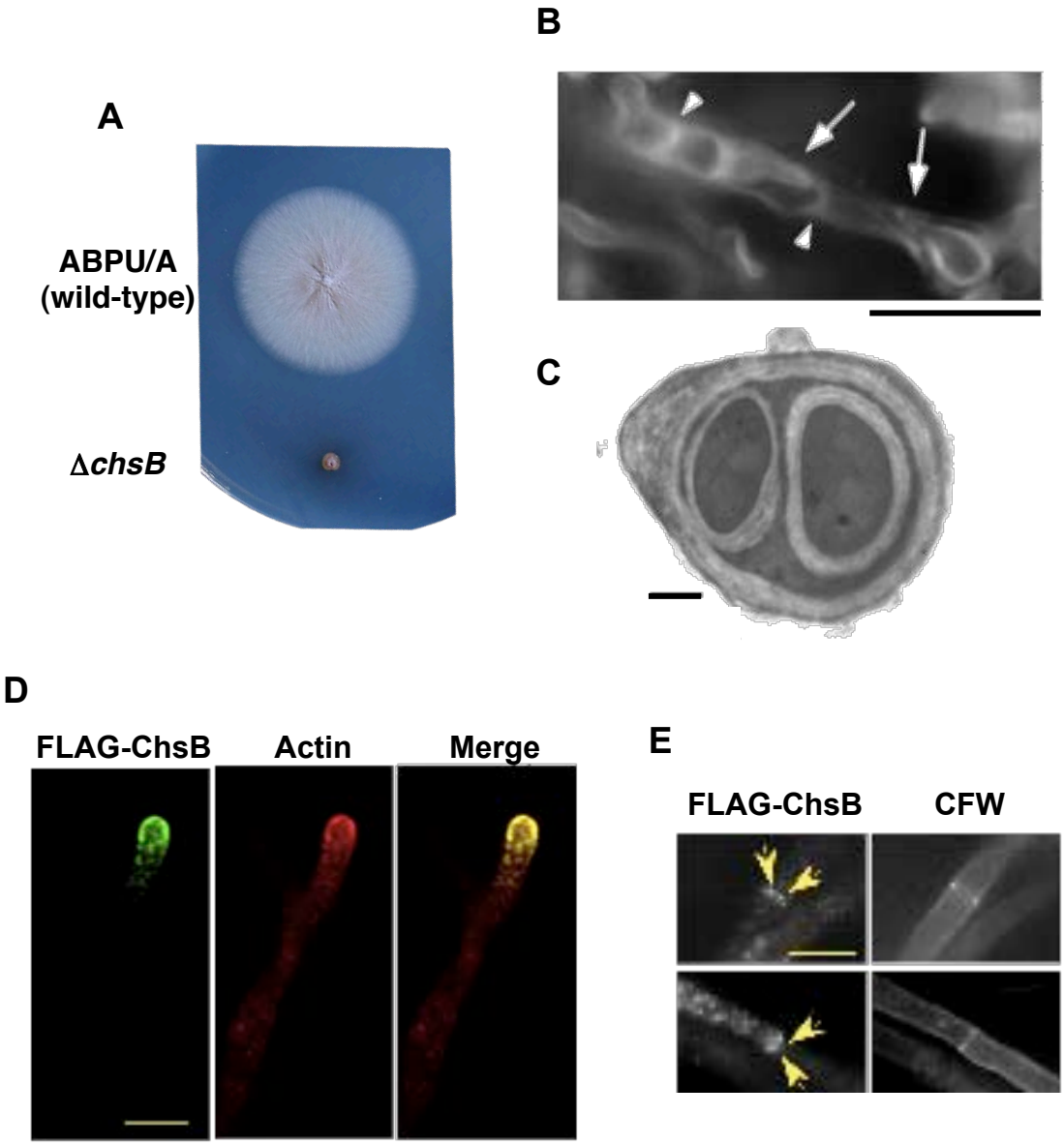


Figure 0-9. Phenotypes of *chsB* deletion mutant and Localization of FLAG-ChsB.
(A-C) Phenotypes of Δ*chsB* mutant. (福田, 2006; Fukuda e*t al*., 2009)
(A) Colonies of ABPU/A (wild-type) and Δ*chsB* strains grown on YGuu plate for 3 days.
(B) CFW (calcofuruor white) staining of the hypha of Δ*chsB* strain.
Arrows indicate multilayered cell walls or intrahyphal hypha. Arrowheads indicate wavy septa. Scale bar, 10 μm.
(C) TEM of Δ*chsB* strain.This hyphae formed double or multilayered cell walls. Scale bar, 500 nm.
(D and E) Localization of FLAG-ChsB at hyphal tip (D) and forming septa (E). Arrows indicate the sites with strong fluorescence. Scale bars, 5 μm.

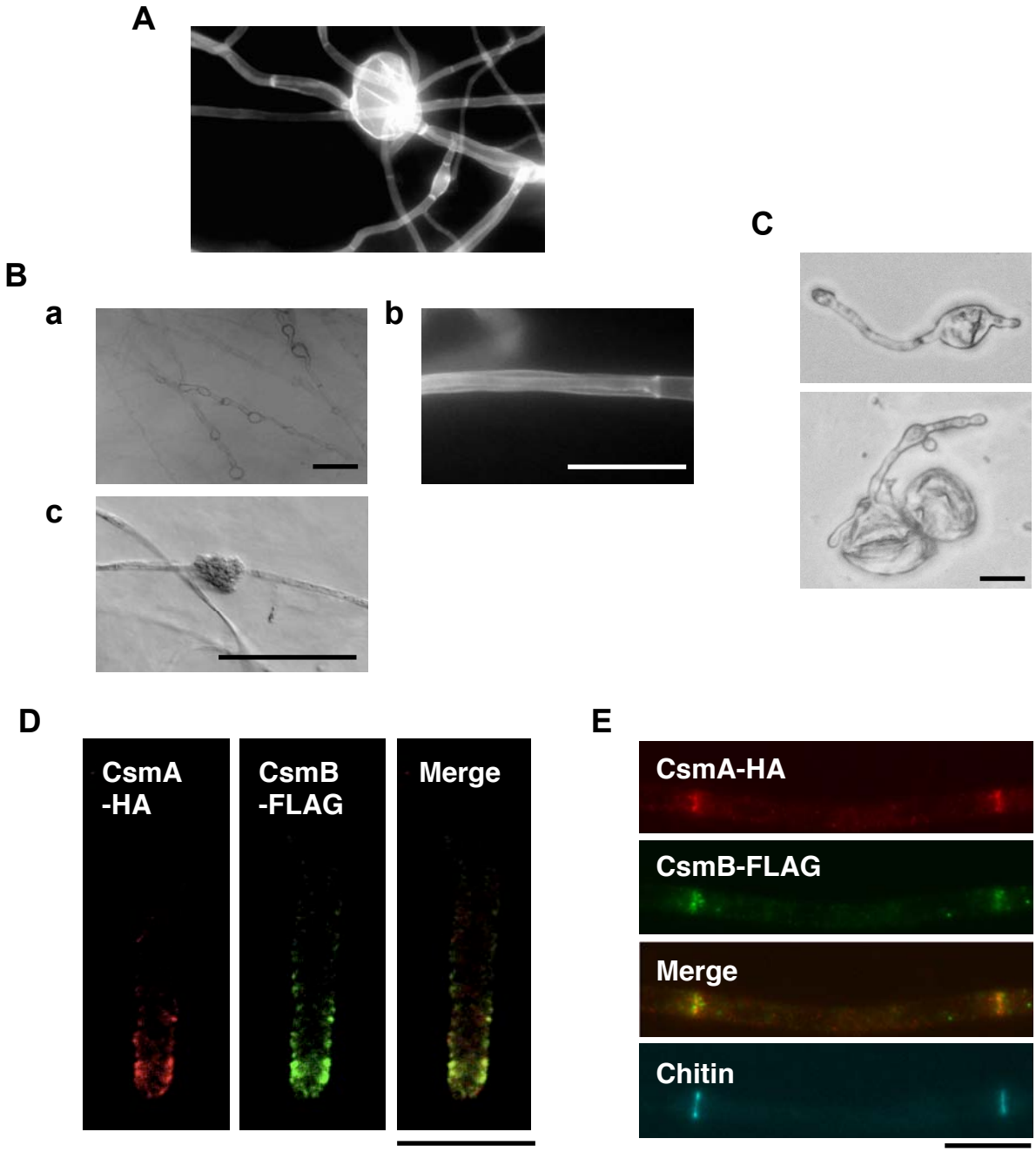


Figure 0-10.
(A-C) Phenotypes of a *csmA* or *csmB* single deletion mutant and a *csmAcsmB* double deletion mutant.
(A) Abnormal morphologies of the hyphae in the *csmA* deletion mutant. (Horiuchi *et al*., 1999)
(B) Abnormal morphologies of the hyphae in the *csmB* deletion mutant. (Takeshita *et al*., 2006) Each panel indcates: balloons (a), an intrahyphal hypha (b), and a brownish clump (c). Scale bars, 10 μm.
(C) Terminal phenotypes of the *csmAcsmB* double mutant (homokaryon). (Takeshita *et al*., 2006) Scale bar, 20 μm.
(D and E) Localization of CsmA-HA and CsmB-FLAG at a hyphal tip (D) and forming septa (E). (Takeshita *et al*., 2006) Scale bars, 10 μm.

第 1 章　CsmB の機能における MMD の役割及び CsmA とのドメイン互換性

1-1　序

1-1-1　ミオシンの構造と機能

ミオシンは ATP の化学的エネルギーを運動エネルギーへと変換するモータータンパク質の一つで、初めは筋肉収縮に関わるタンパク質として単離された。その後、様々な構造と機能を持つミオシンが真核細胞で次々と発見され、ミオシンがスーパーファミリーを形成していることが明らかとなった。現在では各ミオシン頭部のアミノ酸配列を元に、少なくとも 17 のサブファミリーに分類されている (Fig. 1-1) (Hodge and Cope, 2000) 。ミオシンはその 3 次元構造的特徴から、単頭部構造を持つものと 2 頭部構造を持つものに大別され、頭部にモーター分子としての活性があると考えられている。また、頭部と尾部の間に軽鎖結合部位を持ち、いくつかのクラスのミオシンではこの部分に存在する IQ モチーフにカルモジュリンが結合し軽鎖として機能していることが知られている。

坦子菌類に属する糸状菌 *Ustilago maydis* のクラス V ミオシンは菌糸先端にドーム状のスポットとして局在が観察され、Spitzenkörper と類似した局在を示す (Weber *et al*., 2003) 。また、小胞輸送、菌糸型の伸長に関わることも示唆されている (Weber *et al*., 2003; Schuchardt *et al*., 2005) 。*A. nidulans* においてはクラス I ミオシンをコードする *myoA* が単離され、*myoA* は生育に必須な遺伝子であることが示されている (McGoldrick *et al*., 1995) 。また、MyoA は菌糸先端、隔壁形成部位に局在化し、菌糸の極性生長に必要であることが示唆されている (Yamashita *et al*., 2000) 。更に、モーター活性が野生型の 1 %以下である変異型タンパク質を野生型の変わりに発現させても、破壊株のような表現型を示さないことから、MyoA の機能にモーター活性が必要でないことが示唆されており、生育に必須な遺伝子として菌糸先端におけるアクチン細胞骨格の適切な局在に関わると推測されている (Liu *et al*., 2001) 。クラス XVII ミオシンは N 末端側にミオシンと相同性を示すドメイン、C 末端側にキチン合成酵素ドメインを持ち、CsmA の MMD はクラス XVII に分類されており、このクラスに属するミオシンは単頭で機能することが予想され、配列中に IQ モチーフを持たない。一方、CsmB の MMD はこれまでにミオシンのサブファミリーには分類されていない。この他 *A. nidulans* のゲノム中にはクラス II と V のミオシンをコードする遺伝子がそれぞれ一つずつ存在するが、解析結果は報告されていない。

1-1-2　糸状菌におけるクラス V 及び VI キチン合成酵素

近年、多数の糸状菌や菌糸型の形態形成を行なう真菌類において、ミオシン様ドメイン (MMD) を持つキチン合成酵素遺伝子が単離され、その機能解析が行なわれている。このタイプのキチン合成酵素遺伝子は、翻訳されるタンパク質のアミノ酸配列の相同性からクラス V、VIに分類されている。麹菌 *Aspergillus oryzae* のクラス VI キチン合成酵素をコードする遺伝子 *chsZ* の破壊株では、バルーン構造や菌糸内菌糸の形成が観察され (Muller *et al.*, 2002a, b、この論文では *csmA* と名付けられている) 、*A. nidulans* の *csmA* あるいは *csmB* の破壊株と類似性が見られる。トウモロコシ炭疽病の原因菌である *Colletotrichum graminicola* のクラス V キチン合成酵素をコードする遺伝子 *chsV* の破壊株では、バルーン状の溶菌が観察され、感染組織内での菌糸伸長に異常が生じることが示されている (Werner *et al.*, 2007) 。また同じく *C. graminicola* のクラス VI キチン合成酵素をコードする遺伝子 *chsA* の破壊株では、菌糸の膨張や胞子の溶菌が見られ、ChsA が細胞壁の強度の維持に関わることが示唆されている (Amunuaykanjanasin and Epstein, 2003) 。ヒトに感染する *Aspergillus fumigatus* のクラス V キチン合成酵素、*Wangiella dermatitidis* のクラス V のキチン合成酵素、*Ustilago maydis* のクラス V、VI のキチン合成酵素等も、細胞壁の剛性に関わることが示唆され、更にその生物の病原性に必要であることが示されている (Madrid *et al.*, 2003; Garcera-Teruel *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2004; Weber *et al.*, 2006; Werner *et al.*, 2007; Martin-Urdiroz *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2009; Cui *et al.*, 2009) 。

CsmA、CsmB は全長で 39%の相同性を示す。クラスVIのキチン合成酵素の MMD はクラス V のものより短く、ミオシンやクラス V のキチン合成酵素の MMD において保存されている P-loop、Switch I、Switch II といった ATP 結合領域が保存されていない (Chigira *et al.*, 2002; Nino-Vega *et al.*, 2004) 。このことから、クラスVIのキチン合成酵素の MMD はモーター活性を持たないことが予想されるが、ATP 結合領域のコンセンサス配列が保存されている CsmA についてもその正常な機能にモーター活性が必須でないことが示唆されている (Takeshita *et al.*, 2005) 。また、CsmA の MMD (アミノ酸、1-800) と CsmB の MMD (アミノ酸、1-600) のアミノ酸レベルでの相同性は 21％と低く、CsmA のキチン合成酵素ドメイン（CSD）（アミノ酸、1000-1852) と CsmB の CSD (アミノ酸、900-1739) の相同性（55％）よりも低い (竹下, 2005) 。CsmA の MMD は、ミ

オシンの分類においてクラス XVII に分類されており、クラス I 及び VI に属するミオシンと 26％の同一性を示す。一方、CsmB の MMD は、クラス I、VII 及び X のミオシンと 26％の同一性を示す。糸状菌は有性生殖の形態の違いにより、子嚢菌類、接合菌類、担子菌類に分類されており、これまでゲノム配列が公開された中では、*S. cerevisiae* の近縁であり糸状菌としては極めてゲノムサイズが小さい *Ashbya gossipii* を唯一の例外として、子嚢菌類に属する糸状菌においてクラス V、VIキチン合成酵素をコードする遺伝子がそれぞれ一つずつ存在する。一方、接合菌類に属する *Rhizopus oryzae*、*Phycomyces blakesleanus* にはクラスVIキチン合成酵素をコードする遺伝子が存在しないことが明らかとなっている（http://www.fgsc.net/）。また担子菌類に属する二形性酵母 *Ustilago maydis*、*Cryptococcus neoformans* のクラス VI キチン合成酵素には MMD が存在するが、ウシグソヒトヨタケ *Coprinopsis cinerea* のクラスVIキチン合成酵素には MMD が存在しないことが明らかとなっている（Garcera-Teruel *et al.*, 2004; Banks *et al.*, 2005; http://www.fgsc.net/）。また、子嚢菌類に属するアルカン資化性の二形性酵母 *Yarrowia lipolytica* におけるクラスVIのキチン合成酵素には MMD を持つものと持たないものの二種類が存在する（盛, 2007）。これらのことから、糸状菌におけるクラス V とクラス VI のキチン合成酵素の MMD の機能は必ずしも類似しない可能性も考えられる。CsmA の MMD 欠失株、あるいは MMD のアクチン結合部位の変異株では CsmA が正常に局在化しなくなること、MMD 欠失型 CsmA、変異型 CsmA では *in vitro* においてアクチンとの結合が見られなくなること等から、CsmA の正常な局在化と機能には MMD とアクチンとの結合が重要であることが示唆されている（Takeshita *et al.*, 2005）。一方、CsmB については、その局在が菌糸先端、隔壁形成部位に見られ、CsmA、アクチンと近接した部位に局在化すること、*in vitro* においてアクチンとの結合が示されていることから（Takeshita *et al.*, 2006）、CsmB もその機能に MMD とアクチンとの結合が重要であることが予想される。

1-1-3　クラス V 及びクラス VI キチン合成酵素の機能的相関

A. nidulans において、*csmA*、*csmB* は単独破壊株の表現型の類似性、二重破壊の合成致死性が示唆されている（Horiuchi *et al.*, 1999; Takeshita *et al.*, 2006）。しかし、単独破壊株の表現型に一部違いが見られること、*csmA* あるいは *csmB* 一方の破壊株において他方を高発現させても、一方の破壊による形態

異常が抑圧されないこと等から、両者の機能的差異も示唆されている(Takeshita *et al.*, 2006; 對崎, 2007) 。一方、他の糸状菌におけるクラス V、VI キチン合成酵素についても近年、これらが細胞壁形成や組織への侵入等に関わる事を示唆する知見が得られてきているが、菌糸内での存在状態、局在等のタンパク質レベルでの解析は遅れている。*Colletotrichum graminicola*、*Ustilago maydis* 等において各々の単独破壊株の表現型の類似性が示唆されているものの(Amunuaykanjanasin and Epstein, 2003 and 2006; Werner *et al.*, 2007; Weber *et al.*, 2006) 、両者の機能的相関については知見に乏しく、植物病原菌 *Fusarium oxysporum* においてクラス V、VI キチン合成酵素遺伝子の二重破壊株が作製され、*A. nidulans* の場合と異なり二重破壊が致死でないという報告(Martin-Urdiroz *et al.*, 2008) にとどまっている。

このような背景から、本章ではクラス VI に属する CsmB の機能における MMD の役割、クラス V に属する CsmA と CsmB との機能的相関、特にドメインの互換性について解析した。

1-2　材料と方法

1-2-1　菌株

Escherichia coli :

DH5α　*recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*, Δ(*lacZYA-argF*) U169, F-, φ80d*lacZ*ΔM15, *deoR*, *phoA*

Aspergillus nidulans :

本章で用いた *A. nidulans* 菌株を Table 1-1 に示し、その作製について 1-2-11 に示した。

1-2-2　培地

E. coli 用培地 :

LB 培地

Bacto tryptone (Difco)	10 g
Bacto yeast extract (Difco)	5 g
NaCl	5 g
Distilled water	up to 1000 ml

固体培地を調製する場合には、寒天末を 1.5 %の濃度で加えた。必要に応じて Ampicillin を 50 μg/ml になるように加えた。大腸菌は 37℃で培養した。

A. nidulans 用培地 ：

Rowland and Turner の MMG 最少培地 (Minimam Medium + Glucose) と YG 完全培地 (Yeast extract + Glucose) の組成（Rowland and Turnar, 1973）を一部改変して用いた。

最少培地（MMG）

$NaNO_3$	6.0 g
KCl	0.52 g
KH_2PO_4	1.52 g
Trace elements*	1.0 ml
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.52 g
Glucose	20 g
Distilled water	up to 1000 ml

* Trace elements solution

$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	1.0 g
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	8.8 g
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.40 g
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	0.15 g
$Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$	0.05 g
Distilled water	up to 1000 ml

YG 完全培地

Bacto yeast extract （Difco laboratories, USA）	5.0 g
Trace elements	1.0 ml
Glucose	10 g
Distilled water	up to 1000 ml

アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子（*alcA*）プロモーターを用いて遺伝子の発現を誘導する際、全ての場合について、炭素源を glucose から 100 mM threonine と 0.1% fructose に変更した培地（YTF 培地、MMTF 培地）を使用した。固体培地を調製する場合には、寒天末を 1.5 %の濃度で加えた。

また、栄養要求性を持つ株については、必要に応じて以下の栄養源を培地に加えた。uridine と uracil に関しては培地に加えた場合、培地名の後に小文字で示した (例 YGuu: YG 培地に uridine と uracil を加えたもの) 。コロニー直径等の生育速度の比較の際は YG、YGuu、YTF、YTFuu の完全固体培地を用いた。

また必要に応じて、浸透圧安定化剤として YG あるいは YGuu 完全培地に 0.6 M の濃度で KCl を加え、YG+0.6 M KCl あるいは YGuu+0.6 M KCl と表記した。特に断らない限り生育は 37℃で行った。

Arginine	0.20 mg/ml
Biotine	0.02 μg/ml
Pyridoxine	0.05 μg/ml
Uridine	2.44 mg/ml （10 mM）
Uracil	1.12 mg/ml （10 mM）

1-2-3　DNA の取り扱い法

制限酵素、Bacterial alkaline phosphatase（BAP）は TaKaRa の製品を用い、使用法はその説明書に従った。DNA の平滑末端化、連結には TaKaRa T4 Polynucleotide Kinase、TaKaRa DNA Ligation Kit ver. 2.1 を用い、使用法はその説明書に従った。電気泳動後のアガロースゲルからの DNA の回収には、ウルトラフリーC30HV00 （MILLIPORE）を用い、使用法はその説明書に従った。

1-2-4　塩基配列の決定法

塩基配列決定の際の PCR（polymerase chain reaction）は、Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いて行った。方法は、Kit の説明書に従った。その反応物を ABI PRISM 310 Genetic Analyzer を用いて解析することにより塩基配列を決定した。操作法は付属の説明書に従った。

1-2-5　*E. coli* の形質転換法と *E. coli* からのプラスミド抽出法

E. coli の形質転換には $CaCl_2$/RbCl 法を用い、プラスミド抽出には Alkaline lysis 法を用いた (Sambrook *et al.*, 1989) 。

1-2-6　プラスミドの構築

本章で用いたオリゴヌクレオチドを以下に示す。

csmA773For: 5’- TTAATGAATGGACACTTCGT -3’
pyroA-csmARev:
5’-CACCGAGCCGAGTATAAGCCCTTACGCTTTCGCGCACTTC -3’
pyroA-csmAFor:
5’- CAAAAACCCGTATACTCCTGCTATACTATTGCCCCAGAAA -3’
csmA7696Rev: 5’- CTAGACACGATGTTTAGCGA -3’

csmA773nestFor: 5’- TTAATGAATGGACACTTC -3’
csmA7696nestRev: 5’- GAAGAATCCGGGTTCA -3’
AP1: 5’- ATAGTAACAGGTCAGGGTAT -3’
AP2: 5’- ATGACCAAGGTCTGCTTTAT -3’
BchsStu: 5’- CGGAGGCCTTATGGACTGCCTTCGTTTGG -3’
BchsXba: 5’- CGGTCTAGATTATGAGGAAGTCAATGCTT -3’
BmyoSpeN: 5’- CGGACTAGTATGTCGAATCGATTCTCTGTG -3’
BmyoSpeC: 5’- CGGACTAGTAACACGGCGTCCAAGGGT -3’
MACB-5-3XFLAG-EcoT: 5’- CCATGCATTCGCAGTACTCCTCT -3’
MACB-3-3XFLAG-EcoT: 5’- CCATGCATTCACTACTTGTCATC -3’

本章で使用したプラスミドを以下のように構築あるいは利用した。
pUCPYROA: 約 2.7 kb の *A. nidulans* ピリドキシン合成遺伝子 (*pyroA*) を含むプラスミドで、*csmA* 破壊用コンストラクトの作製に使用した (柳田, 2004) 。

pSS1: 約 2.2 kb の *A. nidulans* アルギニン合成遺伝子 (*argB*) を含むプラスミドで、pMACB の作製及びサザン解析に使用した (Motoyama *et al.*, 1994) 。

pMACB: 融合タンパク質 MACB (1-3-2、Fig. 1-9 参照) を発現し生産する株の作製に使用した。
AP1、AP2 をプライマーとして *csmA* のプロモーター領域をコードする約 1.0 kb の断片を A26 株 (Table 1-1 参照) の total DNA を鋳型として PCR により増幅し、Sma I 消化した pSS1 に連結し、pAP を作製した。*csmA* をコードする全領域を含む pM3X2 (Fujiwara *et al.*, 1997) 由来の約 2.7 kb の Xba I 及び Bal I 断片 (MA) と、プライマーBchsStu、BchsXba を用いて A26 株の total DNA を鋳型として PCR により増幅した *csmB* の CSD をコードする約 3.0 kb の断片 (CB) を連結し、更に Xba I 消化後、Xba I 消化し BAP 処理した pAP に連結し pMACB を作製した。

pMBCA: 融合タンパク質 MBCA (1-3-2、Fig.1-9 参照) を発現し生産する株の作製に使用した。
csmA をコードする全領域を含む pM3X2 由来の約 7.7 kb の Xba I 断片を、Xba I 消化し BAP 処理した pAP に連結し pANA を作製した。プライマーBmyoSpeN、BmyoSpeC を用いて A26 株の total DNA を鋳型として *csmB* の MMD をコードする約 2.1 kb の断片を PCR により増幅し、SpeI 消化後、SpeI 消化し BAP 処理した pANA に連結し、pMBCA を作製した。

pMACB-FLAG: 融合タンパク質 MACB の C 末端に 3×FLAG を付加したタンパク質を生産する株の作製に使用した。

MACB-5-3XFLAG-EcoT 、MACB-3-3XFLAG-EcoT をプライマーとして、 pBF (Takeshita *et al*., 2006) を鋳型として、3×FLAG を含む約 0.7 kb の断片を PCR により増幅し、EcoT22I 消化後、EcoT22I 消化し BAP 処理した pMACB に連結し、pMACB-FLAG を作製した。

pHA9: 融合タンパク質 MBCA の C 末端側に 9×HA を付加したタンパク質を生産する株の作製に使用した（Takeshita *et al*., 2002）。

以上、タンパク質生産に用いるプラスミドに関しては PCR により増幅した部分は全て塩基配列を決定し、エラーが入っていないことを確認した。

1-2-7　Double-joint PCR 法による *csmA* 破壊コンストラクトの作製

Double-joint PCR 法は Yu らの方法 (Yu *et al*., 2004) に従って行った。A26 株 (Table 1-1 参照) total DNA を鋳型として、プライマーcsmA773For 、pyroA-csmARev を用いて *csmA* の ORF 外側の上流約 1.0 kb (A-5'とする) 、プライマーpyroA-csmAFor、csmA7696Rev を用いて *csmA* の ORF 外側の下流約 1.5 kb (A-3'とする) を PCR により増幅した。pUCPYROA の Pst I-Bam HI 由来の約 2.7 kb の *pyroA* 配列と A-5'、A-3'を混合し、プライマーを加えず PCR を行ない、その PCR 産物を鋳型としてプライマー csmA773nestFor 、csmA7696nestRev を用いて更に PCR を行ない、増幅した約 5.2 kb の領域を *csmA* 破壊用コンストラクトとして用いた。

1-2-8　*A. nidulans* の形質転換法

分生子約 10^8 個を YGuu 培地 50 ml の入った 300 ml 容臍付き三角フラスコに植菌し、37℃で一晩振盪培養した。それを 50 ml 容コニカルチューブに移し、4,000 rpm で 10 分間遠心し、デカンテーションにより培地を除くことで菌体を回収した。菌体に酵素溶液（Solution 1）10 ml を加え、30℃で 2 時間から 4 時間穏やかに振盪培養した。その後、4,000 rpm、4℃で 10 分間遠心し、デカンテーションにより上清を除き、プロトプラストを回収した。このプロトプラストに 10 ml の Solution 2 を加え、ピペッティングにより穏やかに懸濁し、4,000 rpm、4℃で 10 分間遠心する、ということを二回繰り返すことによりプロトプラストを洗浄した。デカンテーションにより上清を取り除いた後、Solution 3 を 400 μl 加え、ピペッティングにより穏やかに懸濁した。この懸濁液 100 μl に数 μg の

DNA を含む滅菌水 10 μl および 50 μl の Solution 4 を加え、ピペッティングにより穏やかに懸濁した。氷上に 15 分静置後、1 ml の Solution 4 を加えピペッティングにより穏やかに懸濁し、室温で 15 分静置した。これをあらかじめ 48℃に保温しておいた上層培地 5 ml に混ぜ、下層培地に広げ、37℃でインキュベートした。

Solution 1、2、3、4 及び上層培地、下層培地の組成は以下の通りである。

Solution 1（10 ml）

10 mM Na phosphate 0.8 M NaCl buffer （pH 6.0, filter-sterilized）	10 ml
Yatalase™ （TaKaRa）	30 mg
LYSING ENZYMES L2265（SIGMA）	3 mg

Solution 2

NaCl	0.8 M

Solution 3

KCl	0.6 M
$CaCl_2$	0.1 M
Tris-HCl （pH 7.5）	10 mM

Solution 4 （filter-sterilized）

PEG8000	25% （w/v）
KCl	0.6 M
$CaCl_2$	0.1 M
Tris-HCl （pH 7.5）	10 mM

上層培地

MMG	1×
Sucrose	1 M
Agar	1%

下層培地

MMG	1×
Sucrose	0.2 M
Agar	1.5%

1-2-9　*A. nidulans* の全 DNA 抽出法

A. nidulans からの全 DNA の抽出は Hynes らの方法 (Hynes *et al.*, 1983) と Oakley らの方法 (Oakley *et al.*, 1987) を参考に以下のように行った。最少培地 5 ml を入れた希釈管で 2~3 日間程度培養した菌体を、G3 ガラスフィルター（柴田化学器械工業）で濾過し、蒸留水でよく洗浄した。この菌体をエッペンドルフチューブに入れ一晩凍結乾燥した後、爪楊枝を用いて粉状になるまで破砕した。菌体破砕物に 500 μl の 50-20 TE 液（50 mM Tris-HCl pH 8.0、20 mM EDTA）、250 μl の TE-SDS 液（10 mM Tris-HCl pH 8.0、1 mM EDTA、10% SDS）を加えて穏やかによく懸濁した後、60℃で 30 分間、時々穏やかに攪拌しながらインキュベートした。その後、275 μl の酢酸カリウム液（3 M CH_3COOK、5 M CH_3COOH）と 600 μl のフェノール：クロロフォルム：イソアミルアルコール (Sambrook *et al.*, 1989) を加えよく混ぜ、氷上で、10 分以上静置した。その後、15,000 rpm、4℃で 5 分間遠心した後、上清を別のエッペンドルフチューブに移し、これに 0.6 容量のイソプロパノールを加え室温で 10 分間静置した。15,000 rpm、室温で 15 分間遠心し、沈殿を 70%エタノールで洗浄し、15,000 rpm、室温で 1 分間遠心し、上清を注意深く取り除き、1 分間風乾させた。これに 100 μl の RNase A 液（1.0 ml の蒸留水に 10 mg/ml の RNase A (Sambrook *et al.*, 1989) を 10 μl と 7.5 M CH_3COONH_4 を 2 μl 加えたもの）を加え、50℃で 1 時間、時々穏やかに攪拌しながらインキュベートした。その後 15,000 rpm、4℃で 10 分間遠心し、上清を別のエッペンドルフチューブに移し、これに 10 μl の酢酸カリウム液（3M CH_3COOK、5M CH_3COOH）と 200 μl のエタノールを加え-20℃で 10 分間以上静置した。15,000 rpm、4℃で 10 分間遠心し、沈殿を 70%エタノールで洗浄し、15,000 rpm、室温で 1 分間遠心し、上清を取り除き、1 分間風乾させた後、20 μl の TE を加えて全 DNA 液とした。

1-2-10　サザン解析

形質転換体の全 DNA を適当な制限酵素で処理した後、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離し、アガロースゲルを 0.25 M HCl で 10 分間処理した後、0.4 M NaOH を用いて、3 時間以上かけて Hybond-N+（GE HEALTHCARE）に DNA 断片をトランスファーした。プローブのラベリング、ハイブリダイゼーションには AlkPhos Direct system（GE HEALTHCARE）を用い、方法は付属の説明書に従った。

1-2-11　本章で用いた株の作製

pyroAΔA1, 2: *pyroA* マーカーを用いて *csmA* 破壊株を作製するため、Double-joint PCR 法 (1-2-7 参照) により *pyroA* マーカーと *csmA* の ORF 全長を置換する為

の約 5.2 kb の断片を作製し、ABPU1 株 (Table 1-1) (Motoyama *et al*., 1996) を親株として形質転換を行なった。ピリドキシン要求性の回復した 2 株以上の形質転換体を取得し、これらの株の全 DNA を調製し、NdeI 消化後、pM3X2 由来の約 7.0 kb の XbaI 断片をプローブとしてサザン解析を行なったところ、親株である ABPU1 株では 0.8 kb の位置にバンドが見られるのに対し、2 株について 1.9 kb の位置にバンドが見られた (Fig. 1-2) (結果は 1 株についてのみ示した。サザン解析の結果については以下同様とする) 。この結果から目的の位置で相同組換えが起きていることが確認され、pyroA/ΔA1, 2 株と命名した。

MACBΔA1, 2: *csmA* 破壊株において融合タンパク質 MACB (Fig. 1-9 参照) を発現し生産する株を作製するため、pMACB (1-2-6 参照) 由来の約 12.0 kb の SmiI 断片を用いて、pyroA/ΔA1 株を形質転換し、元の *csmA* とはゲノム上の別の位置である *argB* 部位で相同組換えを行ない、融合タンパク質 MACB を発現する株を作製した。アルギニン要求性の回復した複数株の形質転換体を取得し、これらの形質転換体から全 DNA を調製し、XbaI 消化後、pSS1 (1-2-6 参照) 由来の約 1.1 kb の HindⅢ断片をプローブとしてサザン解析を行なった。その結果、親株である pyroA/ΔA 株では 3.0 kb の位置にバンドが見られるのに対し、それぞれ 2 株について 2.5 kb、5.4 kb の位置に 2 本のバンドが見られた (Fig. 1-3) 。この結果から目的の位置で相同組換えが起きていることが確認され、それぞれ MACBΔA1, 2 株と命名した。

MBCAΔA1, 2: *csmA* 破壊株において融合タンパク質 MBCA を発現し生産する株を作製するため、pMBCA (1-2-6 参照) 由来の約 12.0 kb の SmiI 断片を用いて、MACBΔA 株と同様の形質転換を行い候補株を取得し、同様のサザン解析により目的の株を 2 株作製した (Fig. 1-3) 。これらの株を MBCAΔA1, 2 株と命名した。

ΔcsmA/csmA1, 2: 融合タンパク質発現株のコントロールとして、*argB* 部位において *csmA* 全長を発現する株を作製するため、pANA (1-2-6 参照) 由来の約 12.0 kb の SmiI 断片を用いて、MACBΔA 株と同様の形質転換を行い候補株を取得し、同様のサザン解析により目的の株を 2 株作製した (Fig. 1-3) 。これらの株を ΔcsmA/csmA1, 2 株と命名した。

ΔcsmA/argB1, 2: *argB* 部位においてアルギニン合成欠損を回復する機能的な *argB* を発現する株を作製するため、pSS1 (1-2-6 参照) 由来の約 5.0 kb の SmiI 断片を用いて、MACBΔA 株と同様の形質転換を行い候補株を取得し、同様のサザン解析により目的の株を2株作製した (Fig. 1-3) 。これらの株をΔcsmA/argB1, 2 株と命名した。

MACBΔB1, 2: *csmB* 破壊株において融合タンパク質 MACB を発現し生産する株を作製するため、pMACB (1-2-6 参照) 由来の約 12.0 kb の SmiI 断片を用いて、ΔMB1 株 (Table 1-1) を形質転換し、元の *csmB* とはゲノム上の別の位置である *argB* 部位で相同組換えを行ない、融合タンパク質 MACB を発現する株を作製した。MACBΔA 株と同様のサザン解析により目的の株 2 株が得られたことを確認し (Fig. 1-3) 、これらの株を MACBΔB1, 2 株と命名した。

MBCAΔB1, 2: *csmB* 破壊株において融合タンパク質 MBCA を発現し生産する株を作製するため、pMBCA (1-2-6 参照) 由来の約 12.0 kb の Smi I 断片を用いて、MACBΔB 株と同様の形質転換を行い候補株を取得し、同様のサザン解析により目的の株を2株作製した (Fig. 1-3) 。これらの株を MBCAΔB1, 2株と命名した。

MACB-FLAGΔB1, 2: *csmB* 破壊株において C 末端側に 3xFLAG タグを付加した融合タンパク質 MACB-FLAG を発現し生産する株を作製するため、pMACB-FLAG (1-2-6 参照) 由来の約 12.0 kb の SmiI 断片を用いて、MACBΔB 株と同様の形質転換を行い候補株を取得し、同様のサザン解析により目的の株を 2 株作製した (Fig. 1-3) 。これらの株を MACB-FLAGΔB1, 2 株と命名した。

MBCA-HAΔA1, 2: *csmA* 破壊株において C 末端側に 9xHA タグを付加した融合タンパク質 MBCA-HA を発現し生産する株を作製するため、pHA9 (1-2-6 参照) 由来の約 3.0 kb の EcoRI-BglII 断片を用いて、MBCAΔA1 株を形質転換し、ウリジン及びウラシル要求性の回復した 2 株以上の形質転換体を取得し、これらの株の全 DNA を調製し、Sph I 消化後、pMK10 (Fujiwara *et al.*, 1997) 由来の約 1.2 kb の断片をプローブとしてサザン解析を行なったところ、親株である MBCAΔA1 株では 2.3 kb の位置にバンドが見られるのに対し、2 株について 4.0 kb の位置にバンドが見られた (Fig. 1-4) 。この結果から目的の位置で相同組換

えが起きていることが確認され、MBCA-HAΔA1, 2 株と命名した。

以上、本章で作製し命名したそれぞれの株 1 番、2 番の 2 株については、YGuu 固体完全培地及び MMGuu 最少培地上で生育させ、生育速度及び表現型に顕著な違いが見られないことを確認し、以降の解析では全て 1 番の株を用い、番号を省略して表記した。

1-2-12　分生子形成効率の測定

それぞれの株の分生子約 10^3 個を計数し、滅菌水に懸濁後、YG あるいは YGuu、YG+0.6 M KCl あるいは YGuu+0.6 M KCl 完全固体培地上にスポットし、3 日間培養した。培地上に 0.01% Tween 20 溶液を加え、滅菌スポイトを用いて分生子を懸濁し、15 ml 容コニカルチューブに移し、ボルテックスで混合した。これを 5,000 rpm、4℃で 5 分間遠心し、上清を捨て、再度 0.01% Tween 20 溶液を加える行程を二回行い洗浄した。その後、上清を捨て、沈殿に滅菌水 1 ml を加え、Thoma 計数盤を用いて分生子数を計数した。

1-2-13　バルーン形成頻度の測定

バルーンの形成頻度を測定するため、各々の株の分生子約 10^3 個を計数し、MMG 固体培地、MMGuu 固体培地あるいは MMTF 固体培地に塗布して植菌し、2 日間培養した。コロニーの中心付近の 5 か所の 1 mm^2 の範囲でバルーンの数を計測し、その平均をバルーンの形成頻度とした。

1-2-14　*A. nidulans* の細胞抽出液の調製

固体培地上で生育させた株から分生子を白金耳で掻き取り、YG、YGuu あるいは YTF 液体培地で 14-16 h 振盪培養し、生育した菌体をガラスフィルターで濾過し、菌体約 0.2 g を調製した。菌体を 1.5 ml 容のエッペンドルフチューブにいれ、菌体破砕用緩衝液（20 mM Tris-HCl pH 7.4、150 mM NaCl、2mM EDTA）200 μl とプロテアーゼインヒビターカクテル（SIGMA）を 1 μl 加え、メタルコーン（YASUI KIKAI）を入れた。これをマルチビーズショッカー（YASUI KIKAI）により 1 分破砕し、低温で 1 分静置するという処理を 2 回繰り返したのち、メタルコーンを取り出しガラスビーズ（YASUI KIKAI）を約 200 μl 分加え、メタルコーンと同様にマルチビーズショッカーで菌体を破砕した。その後サンプルを 1,000 g、15 分間 4℃で遠心し未破砕菌体及びガラスビーズを取り除き、上清を細胞抽出液とした。あるいは菌体約 0.2 g を調製後、乳鉢に移し液体窒素を加え菌体を急速凍結させ、乳棒で破砕し、菌体破砕用緩衝液 200 μl とプロテア

ーゼインヒビターカクテル（SIGMA）を 1 μl 加え、ピペッティングにより菌体と緩衝液をよく懸濁させた後、1,000 g、15 分間 4℃で遠心し未破砕菌体を取り除き、上清を細胞抽出液とした。

1-2-15　細胞抽出液の分画

1-2-14 の方法により調製した細胞抽出液 100 μl を、10,000 g、15 分間 4℃で遠心し、上清を除きペレットに 100 μl の菌体破砕用緩衝液を加えたものを low-speed pellets （LSP）とし、先の遠心の上清を 100,000 g、1 時間 4℃で遠心し、そのペレットに 100 μl の菌体破砕用緩衝液を加えたものを high-speed pellets （HSP）とし、その上清を high-speed supernatant （HSS）とした。各画分 100 μl のうち、10 μl をウェスタン解析に用いた。

1-2-16　タンパク質の定量

タンパク質の定量は、BCA^{TM} Protein Assay Kit（PIERCE）を用いて行い、方法は付属の使用説明書に従った。

1-2-17　ウェスタン解析

細胞抽出液は 1-2-16 の方法で総タンパク質量が約 10 μg となるように調製し、1/5 量の SDS-PAGE 6×sample buffer (0.35 M Tris-HCl pH 6.8, 10% (w/v) SDS, 30% (v/v) glycerol, 0.6 M DTT, 0.18 mM bromophenol blue) を加え 3~5 分間 100 ℃で煮沸した後 SDS を含む 6 %のポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動した。Hybond-ECL（GE HEALTHCARE）メンブレンに一晩、トランスファーバッファー中において 20 mA で電気的にトランスファーした。メンブレンを 25 ml の 5% skim milk（Difco）を含む PBS で室温、1 時間振盪後、PBS Tween 20 溶液で（0.1% Tween 20 を含む PBS）で 15 分、2 回洗浄し、PBS で 1:5000 に希釈したマウス由来の抗 FLAG 抗体（SIGMA）、PBS で 1:2500 に希釈したマウス由来の抗 HA 抗体 (SIGMA)、あるいは PBS で 1:1000 に希釈したマウス由来の抗アクチン抗体 (ICN Biomedicals) を含む溶液中で室温環境下 1 時間以上振盪させた。その後、PBS Tween 20 溶液で 15 分、2 回洗浄し、PBS で 1:5000 に希釈した horseradish peroxidase （HRP）が連結した mouse IgG 抗体を含む溶液中で室温 1 時間振盪させた。その後、PBS Tween 20 溶液で 15 分、2 回洗浄し、HRP 活性を検出した。HRP 活性の検出は、ECL detection system（GE HEALTHCARE）を用い、方法は付属の説明書に従った。それぞれの溶液の組成は以下の通りである。

PBS

NaCl	8.0 g	
KCl	0.2 g	
Na_2HPO_4	1.44 g	
KH_2PO_4	0.24 g	
Distilled water	up to 1000 ml	（pH 7.4）

Transfer buffer

Tris-HCl （pH 8.3）	25 mM
Glycine	9.0 g
Methanol	160 ml
SDS	0.8 g
Distilled water	up to 800 ml

1-2-18　間接蛍光抗体法

間接蛍光抗体法は、Harris らと Esnault らの方法 (Harris *et al*., 1994; Esnault *et al*., 1999) を参考にして行った。固体培地上で生育させた株から分生子を白金耳で掻き取り、カバーガラス上の 200 μl の液体培地に植菌し、37℃で一晩生育させた。その後、カバーガラス上に付着した菌糸に、3.7%ホルムアルデヒド、5 mM $MgSO_4$、25 mM EGTA を含む PBS を滴下し、45~60 分、室温で固定した。その後 0.05%の Tween 20 を含む PBS （PBST）でカバーガラスを穏やかに洗浄した。細胞壁を消化するため、200 μl の消化酵素液（1 ml の PBS に Yatalase™（TaKaRa） 3 mg、LYSING ENZYMES L2265（SIGMA）1 mg、EGG WHITE（SIGMA） 10 mg を加えたもの） を滴下し、60 分、室温で静置した。PBST でカバーガラスを穏やかに洗浄し、エタノールを滴下し、10 分、－20℃で静置した。数回、PBST でカバーガラスを洗浄し、1: 500 で希釈したマウス由来の抗 FLAG 抗体（SIGMA）、1:200 で希釈したマウス由来の抗 HA 抗体 (SIGMA) 、あるいは 1: 500 で希釈したラビット由来の抗アクチン抗体（SIGMA）、及び 0.1% BSA を含む PBS を滴下し、室温で 1 時間以上静置した。PBST でカバーガラスを穏やかに洗浄し、二次抗体に FITC が結合した抗マウス IgG 抗体（SIGMA）を 1: 250 となるよう希釈し、Cy3 が結合した抗ラビット IgG 抗体（SIGMA）を 1: 1000 となるように希釈し、0.1% BSA を含む PBS を滴下し、遮光して室温で 1 時間静置した。PBST でカバーガラスを洗浄し、必要に応じて 0.01 % calcofluor white （fluorescent brightner 28, SIGMA）溶液を滴下し、5 分静置し、PBST でカバーガラスを洗浄し、スライドガラスにマウンティング液 5 μl（グリセロール 90 ml、PBST10 ml を混合したものに約 3 mg の *p*-フェニレンジアミンを加えた

もの）を滴下しカバーガラスをかぶせて検鏡した。観察には落射蛍光顕微鏡（BX52、Olympus）を用い、観察像は冷却 CCD カメラ ORCA-ER（浜松ホトニクス）を用いて取込み、AQUACOSMOS 基本ソフトウェア（浜松ホトニクス）を用いて解析した。あるいは必要に応じて共焦点顕微鏡 (FV500、Olympus) を観察に用い、FLUOVIEW (Olympus) ソフトウェアを用いて解析した。

1-2-19　免疫沈降法

1-2-14 で示した方法で細胞抽出液を調製し、更に菌体破砕用緩衝液 200 μl を加え、5,000 g、10 分間 4℃で遠心しその上清を再び 5,000 g、10 分間 4℃で遠心した。その上清 250 μl を、予め 1.5 ml 容のエッペンドルフチューブにいれ氷上で冷やしておいた IP buffer（0.1 % Triton X-100、100 mM NaCl、10 mM EDTA、50 mM Tris-HCl （pH 7.4））1250 μl に加えた。Protease Inhibitor Cocktail（SIGMA）を更に 5 μl 加え、抗 FLAG 抗体を 10 μl 加え、4℃で rotater により 1 時間インキュベートした。その後 Protein G Sepharose （Pharmacia Biotech）20 μl を加えて、更に 4℃で rotater により 1 時間インキュベートした。5,000 g、10 分間 4℃で遠心し、上清を注意深く取り除き、目的のタンパク質以外を取り除くため同様の洗浄を数回繰り返し、20 μl の IP buffer を加えて、免疫沈降後のサンプルとした。

1-2-20　キチン含量測定

細胞壁キチン含量の測定は Specht らの方法 (Specht *et al.*, 1996) を一部改変して行なった。各々の株の分生子約 10^5 個を YGuu 固体培地上にセロファンを敷いて 2 日間生育させ、固体培地から直接菌糸を掻き取り、菌体約 0.2 g を調製した。これに 1M KOH を 500 μl 加え、メタルコーン (YASUI KIKAI) を入れ、マルチビーズショッカー (YASUI KIKAI) により 1 分破砕し、低温で 1 分静置するという処理を 5 回繰り返した。その後、超音波破砕機 (BRANSON) を用いて更に破砕し、菌体破砕液を 100℃で 30 分間加熱した後、氷上で冷却し、15,000 rpm、 4 ℃で 5 分間遠心した。上清を回収し、沈殿に再度 1M KOH 500 μl を加え、超音波破砕し、15,000 rpm、4℃で 5 分間遠心し、先の上清と合わせてタンパク質の定量に用いた（これにより得られた画分を「アルカリ可溶画分: Alkali-soluble fraction」と定義する）。沈殿には 1 ml の蒸留水を加えよく懸濁し、超音波破砕し、15,000 rpm、4℃で 5 分間遠心して沈殿を洗浄する操作を 2 回行い、得られた沈殿を細胞壁画分とした。これに 1 ml の酵素溶液 (50 mM Sodium citrate pH 5.8、1% (w/v) Yatalaze (TaKaRa) 、0.2% (w/v) Lysing Enzyme (Sigma) 、1% (w/v) β-glucuronidase、0.02% NaN_3) を加えよく懸濁し、37℃で 16 時間インキュベートした後、15,000 rpm で 1 分間遠心し、*N*-アセチルグルコ

サミン (GlcNAc) の定量に用いた (これにより得られた画分を「アルカリ不溶画分: Alkali-insoluble fraction」と定義する) 。キチン含量の定量については Reissig らの方法 (Reissig *et al.*, 1955) に従った。0.8 M potassium borate-KOH buffer pH 9.1 17 μl と 10 倍あるいは 20 倍に希釈した上清 83 μl とを混合し、沸騰湯浴中で 3 分間加熱した。水冷後、DMAB 試薬を 1.0 ml 加えた後、37℃に 20 分間保ち、585 nm の吸光度を測定した。ただし、DMAB 試薬は *p*-dimetylaminobenzaldehyde (DMAB) 10 g を 10% (w/v) の濃塩酸を含む氷酢酸 100 ml に溶かし、使用直前に酢酸で 10 倍に希釈したものを用いた。アルカリ可溶画分におけるタンパク質定量 (定量の方法は 1-2-16 参照) 、及びアルカリ不溶画分における *N*-acetylglucosamine（GlcNAc）定量を行ない、GlcNAc/protein の相対値をキチン含量として評価した。

1-2-21　膜の可溶化

1-2-14 で示した方法で得られた細胞抽出液に、終濃度が以下のようになるように各種界面活性剤を加え、氷上で 2 時間、時々ピペッティングにより懸濁しながら処理した。その後 100,000 g で 1 時間遠心し、上清画分を回収した。沈殿に対しては上清画分と等量の菌体破砕用緩衝液を加え、ピペッティングによりよく懸濁し、沈殿画分とした。

CHAPS 2% (w/v)
Triton X-100 2% (v/v)
デオキシコール酸ナトリウム 1% (w/v)
SDS 1% (w/v)

1-2-22　ショ糖密度勾配遠心法及び分画

ショ糖密度勾配遠心法による細胞抽出液の分画は Antebi らの方法を参考に、一部改変して行なった (Antebi *et al.*, 1992) 。プラスチック製遠心チューブ (Seton Scientific) 中に、1 M Tris-NaCl (pH 7.5) を含む 40% (w/v) スクロース溶液約 5.5 ml を下に、1 M Tris-NaCl (pH 7.5) を含む 5% (w/v) スクロース溶液約 5.5 ml を上になるように静かに重層し、GRADIENT MATE™ (BIOCOMP) にセットし、81.5°、21 rpm で 1 分 25 秒間回転させ、5%から 40%の連続的な密度勾配溶液を作製した。その後、1-2-14 の方法により調製した細胞抽出液、あるいは 1-2-21 の方法により膜の可溶化処理を行ない遠心する前の細胞抽出液を密度勾配溶液に静かに重層し、日立 P40ST スイングローターを用い、28,200 rpm (100,000×g) で 4 時間、4℃で遠心した。遠心後、PISTON GRADIENT FRACTIONATORTM (BIOCOMP) にセットし、サンプルを上層から 0.72 mm ず

つ、11 あるいは 12 のフラクションに分取した。これらのサンプルはそれぞれ 30 μl をウェスタン解析に用いた。

1-3　結果

1-3-1　CsmB の機能における MMD の役割 (Tsuizaki *et al.*, 2009)

1-3-1-1　MMD 欠失型 CsmB (CSDMB) を生産する株の生育及び表現型

CsmB の機能における MMD の必要性について検討するため、MMD 欠失型 CsmB を生産する株 (CSΔMB 株) (Table 1-1) を作製した。序でも述べたように、*csmB* 破壊株は野生型株と比較して生育が遅延し、菌糸途中におけるバルーン構造の形成、褐色の凝集体形成といった形態異常を示す (Takeshita *et al.*, 2006) 。低浸透圧である YG 固体培地で 3 日間生育させた場合、*csmB* 破壊株 (A1149/ΔB 株) (Table 1-1) のコロニー直径は野生型株の 60%程度であるのに対し、CSΔMB 株のコロニー直径は 70%程度であった (Fig. 1-5 A-a) 。また CSΔMB 株は MMG 固体培地上で生育させた場合、*csmB* 破壊株で観察されるバルーン構造、褐色の凝集体が観察され、バルーン形成頻度は *csmB* 破壊株と同程度であった (Fig. 1-5 A-b, B) 。また、分生子形成効率を測定したところ、*csmB* 破壊株と同程度 (野生型株の 2%程度) であった。これらの結果から、CSΔMB は CsmB の機能をほぼ欠失していることが示唆された。

1-3-1-2　CSΔMB 高生産株の表現型

CSΔMB の安定性、局在等を解析するため、CSΔMB-FLAG を生産する CSΔMBF 株 (Table 1-1) を作製し、この株を用いてウェスタン解析を行なった。CSΔMBF 株は、YG 固体培地上で生育させた場合、FLAG タグを付加していない CSΔMB 株と同様に、生育の遅延、バルーン構造、褐色の凝集体の形成等の菌糸の形態異常が観察された。CSΔMBF 株の細胞抽出液を用いて、抗 FLAG 抗体によるウェスタン解析を行なったところ、CSΔMB-FLAG と予想される 130 kDa 付近にバンドは検出されなかった (データは示さない) 。このことから CSΔMB はタンパク質の安定性が低下すると考えられたため、培地の炭素源により発現誘導が可能な *alcA* プロモーター下で CSΔMB を発現し生産する株を作製し、以降の解析を行なった。*alcA* プロモーター下で *csmB* あるいは *CSΔMB* を発現する株 (alc-CSMB 株、alc-CSΔMB 株) (Table 1-1) をプロモーターの発現抑制条件である YG 固体培地、あるいは MMG 固体培地で生育させた場合、*csmB* 破壊株と同様に、生育の遅延、バルーン構造等の菌糸の形態異常が観察された。一方これ

らの株を *alcA* プロモーターの発現誘導条件である YTF 固体培地、あるいは MMTF 固体培地で 3 日間生育させた場合、どちらの株もコロニー直径は野生型株と同程度であり、*csmB* 破壊株で見られる生育の遅延はほぼ回復していた (Fig. 1-6 A-a) 。また alc-CSMB 株においてはバルーン構造等の菌糸の形態異常は殆ど観察されなかったが、alc-CSΔMB 株においては *csmB* 破壊株と比較して低頻度ではあるがバルーン構造が観察された (Fig. 1-6 A-b, B) 。このことから、*CSΔMB* を高発現させても、CsmB の機能が完全には相補されないことが示唆された。

なお、本章における解析では、親株として遺伝子の非相同組換えに関わる *ku70* 遺伝子の破壊株 (A1149 株、Table 1-1 参照) を用いており、この *ku70* の破壊株は *A. nidulans* において 90%以上の確率で相同組換えが起こることが報告されている (Nayak *et al.*, 2006) 。本章では、A1149 株を親株として、A1149/ΔB 株 (*csmB* 破壊株)、CSΔMB 株、alc-CSMB 株、alc-CSΔMB 株 (以上、Table 1-1 参照) を作製した。本章で作製した *csmB* 破壊株 (A1149/ΔB 株) は当研究室においてこれまでに取得されていた *csmB* 破壊株 (Takeshita *et al.*, 2006) と比較して顕著な表現型の違い、生育速度の違いが観察されなかったことから、*ku70* の破壊による遺伝的バックグラウンドの違いがこれらの株の生育、表現型に与える影響は小さいと考えられた。

1-3-1-3　MMD 欠失型 CsmB の菌糸内局在

次に、CSΔMB の局在を観察するため、CsmB-FLAG あるいは CSΔMB-FLAG を *alcA* プロモーター下で発現する株 (alc-CSMBF 株及び alc-CSΔMBF 株) (Table 1-1) を作製した (Fig. 1-7 A) 。alc-CSMBF 株、alc-CSΔMBF 株は FLAG タグを付加していない alc-CSMB 株、alc-CSΔMB 株と同様に、*alcA* プロモーターの発現を誘導する条件である YTF 固体培地、あるいは MMTF 固体培地上で生育させた場合、alc-CSMBF 株は正常な菌糸の形態を示し、alc-CSΔMBF 株では低頻度でバルーン構造等の菌糸の形態異常が観察された。alc-CSMBF 株、alc-CSΔMBF 株の細胞抽出液を用いて抗 FLAG 抗体によるウェスタン解析を行なった。その結果、alc-CSMBF 株では約 200 kDa と約 190 kDa の位置、alc-CSΔMBF 株では約 140 kDa と約 130 kDa の位置にシグナルが検出された (Fig. 1-7 B) 。CsmB-FLAG、CSΔMB-FLAG の予想される分子量はそれぞれ約 190 kDa、約 130 kDa であることから、Fig. 1-7 B において約 190 kDa、約 130 kDa

の位置のシグナルがそれぞれ対応していると考えられた。また、CsmB-FLAG、CSΔMB-FLAG 共に予想されるサイズより大きいサイズにもシグナルが見られたことから、CsmB の CSD は何らかの翻訳後修飾を受けている可能性が考えられた。

alc-CSMBF 株、alc-CSΔMBF 株を用い、抗 FLAG 抗体および抗アクチン抗体による間接蛍光抗体法により FLAG 融合タンパク質、アクチンの染色、同時に calcofluor white によるキチンの染色を行なった。観察の結果、*alcA* プロモーター下で発現し生産させた CsmB-FLAG は、*csmB* 本来のプロモーター下で CsmB-FLAG を発現し生産させた場合と同様に、菌糸先端及び隔壁形成部位に蛍光が集中して観察され、アクチン、キチン近傍に局在する様子が観察された (Fig. 1-7 C; Takeshita *et al.*, 2006) 。一方、CSΔMB-FLAG は、菌糸内に局所的な蛍光は観察されず、菌糸先端及び隔壁形成部位のアクチン、キチン近傍における局在は観察されなかった (Fig. 1-7 D) 。

1-3-1-4　MMD とアクチンとの *in vivo* における相互作用

alc-CSMBF 及び alc-CSΔMBF 株の細胞抽出液を用いて抗 FLAG 抗体による免疫沈降を行ない、その沈殿画分について抗アクチン抗体によるウェスタン解析を行なうことで、CsmB の MMD とアクチンとの *in vivo* での相互作用の有無を検討した。これらの株の細胞抽出液を用い、抗 FLAG 抗体による免疫沈降を行ない、その沈殿画分を用いて、抗 FLAG 抗体、抗アクチン抗体によるウェスタン解析を行なった (Fig. 1-8) 。抗 FLAG 抗体によるウェスタン解析の結果、免疫沈降前の上清画分に含まれる CsmB-FLAG、CSΔMB-FLAG の存在量に対し、免疫沈降後の沈殿画分に含まれる CsmB-FLAG、CSΔMB-FLAG の存在量が 80% 程度であり、抗 FLAG 抗体による免疫沈降効率が十分であることが確認された。また抗アクチン抗体によるウェスタン解析の結果、alc-CSMBF 株由来の細胞抽出液において免疫沈降後に約 42 kDa の位置にアクチンのバンドが検出されたことから、CsmB-FLAG とアクチンが共沈することが示された。一方、alc-CSΔMBF 株由来の細胞抽出液では免疫沈降後にアクチンのバンドが検出されず、MMD の欠失により CsmB がアクチンと共沈しなくなることが示された。これらの結果から、CsmB の MMD がアクチンと *in vivo* で相互作用することが示された。

1-3-2　CsmA と CsmB の各ドメインの融合タンパク質 MACB あるいは MBCA

を生産する株の解析

CsmA、CsmB の MMD と CSD の互換性を検討するため、CsmA の MMD を含む領域 (MA) (アミノ酸、1-830) と CsmB の CSD を含む領域 (CB) (アミノ酸、701-1739) の融合タンパク質 MACB、あるいは CsmB の MMD を含む領域 (MB) (アミノ酸、1-700) と CsmA の CSD を含む領域 (CA) (アミノ酸、831-1852) の融合タンパク質 MBCA (Fig. 1-9) を、*csmA* 破壊株、あるいは *csmB* 破壊株において野生型 CsmA、CsmB の代わりに生産する株を作製し、*csmA* あるいは *csmB* の破壊による生育遅延、表現型の異常等が回復するかどうか解析した。

1-3-2-1　*csmA* 破壊株において MACB あるいは MBCA を生産する株の解析

csmA 破壊株において MACB あるいは MBCA を *csmA* のプロモーターの下流で生産する株 (MACBΔA 株、MBCAΔA 株) (Table 1-1) を作製し、YGuu 固体培地上で 3 日間生育させた MACBΔA 株、MBCAΔA 株のコロニー直径及び表現型について解析した。また、バルーン形成頻度、分生子形成効率、細胞壁キチン含量を測定した (Fig. 1-10 and Table 1-2) 。

MACBΔA 株は *csmA* 破壊株に野生型 *csmA* を *argB* 部位で発現させた positive control (ΔcsmA/csmA 株) (Table 1-1) と比較して生育が遅く、コロニー直径も栄養要求性を揃えたのみの negative control (ΔcsmA/argB 株) (Table 1-1) と同程度であった (Fig. 1-10 A-a and Table 1-2) 。また、MMGuu 固体培地において生育させた MACBΔA 株では *csmA* 破壊株で観察される菌糸の溶菌、バルーン構造といった形態異常 (Horiuchi *et al.*, 1999) が観察された (Fig. 1-10 A-b) 。またバルーン形成頻度は negative control の 65%程度であった (Fig. 1-10 B) 。一方、YGuu 固体培地で生育させた MBCAΔA 株では *csmA* 破壊による生育遅延が回復し、positive control と同程度のコロニー直径であった (Fig. 1-10 A-a and Table 1-2) 。しかし、分生子形成効率は positive control の 30%程度であり、negative control と比べて低頻度であるが、溶菌やバルーン構造が観察された (Fig. 1-10 A-b and Table 1-2) 。バルーン形成頻度は negative control の 20%程度であった (Fig. 1-10 B) 。*csmA* 破壊株は培地に浸透圧安定化剤として KCl を添加すると生育遅延、菌糸の形態異常がある程度回復することが示されている (Horiuchi *et al.*, 1999) 。本解析でも YGuu 固体培地に KCl を終濃度 0.6 M で添加した場合、MACBΔA 株の生育遅延、菌糸の形態異常、MBCAΔA 株の菌糸の形態異常はある程度回復したが、両株とも分生子形成効率は顕著には回復しなかった (データは

示さない) 。また、キチン含量測定の結果、positive control である∆csmA/csmA 株では negative control である∆csmA/argB 株と比較してキチン含量が多かった (Table 1-2) 。*csmA* 破壊株においては細胞壁キチン含量が野生型株の 80%程度に低下すること (對崎, 2007) から、*csmA* の破壊による生育遅延、菌糸の形態異常の回復により、キチン含量も野生型株と同程度に回復すると考えられた。MACB∆A 株、MBCA∆A 株のキチン含量は共に negative control より若干多かったが、positive control の 85%程度であった (Table 1-2) 。このことから、MBCA∆A 株においても *csmA* の破壊による影響が一部回復していないことが示唆された。

これらの結果から、融合タンパク質 MACB は CsmA の機能をほぼ代替できず、MBCA は CsmA の機能を一部代替出来るが、完全には代替できないことが示唆された。

1-3-2-2　*csmB* 破壊株において MACB あるいは MBCA を生産する株の解析

csmB 破壊株において MACB あるいは MBCA を *csmA* のプロモーターの下流で生産する株 (MACB∆B 株、MBCA∆B 株) (Table 1-1) を作製し、YGuu 固体培地上で 3 日間生育させた MACB∆B 株、MBCA∆B 株のコロニー直径及び表現型について解析した。また、バルーン形成頻度、分生子形成効率、細胞壁キチン含量を測定した (Fig. 1-11 and Table 1-3) 。

csmA のプロモーター下で *csmB* を発現させた positive control (∆csmB/csmA(p)-csmB 株) (Table 1-1) においては、*csmB* 破壊による生育遅延や表現型の異常はほとんど観察されず、*csmA* のプロモーターが *csmB* のプロモーターとしても代替可能であることが示唆された。MACB∆B 株では *csmB* 破壊による生育遅延は回復し、positive control と同程度のコロニー直径であった (Fig. 1-11 A-a and Table 1-3) 。また、分生子形成効率も positive control と同程度に回復し、MMGuu 固体培地上で生育させた場合、*csmB* 破壊株で観察される菌糸途中の褐色の凝集体やバルーン構造は殆ど観察されなかった (Fig. 1-11 and Table 1-3) 。一方、MBCA∆B 株は positive control と比較して生育が遅く、栄養要求性を揃えたのみの negative control (∆csmB/argB 株) (Table 1-1) と同程度のコロニー直径及び分生子形成効率であった (Fig. 1-11 A-a and Table 1-3) 。また、MBCA∆B 株では *csmB* 破壊株で観察される菌糸の溶菌、菌糸途中の褐色の凝集体、バルーン構造といった形態異常が観察された (Fig. 1-11 A-b) 。バル

ーン形成頻度も negative control と同様、依然として高頻度であった (Fig. 1-11 B) 。*csmB* 破壊株も、*csmA* 破壊株同様、培地に浸透圧安定化剤として KCl を添加すると生育遅延、菌糸の形態異常がある程度回復することが示されている (Takeshita *et al*., 2006) 。本解析でも YGuu 固体培地に KCl を終濃度 0.6 M で添加した場合、MBCAΔB 株の生育遅延、菌糸の形態異常はある程度回復した。しかし、分生子形成効率は顕著には回復しなかった (データは示さない) 。また、キチン含量測定の結果、positive control である ΔcsmB/csmA(p)-csmB 株では negative control である ΔcsmB/argB 株と比べてキチン含量が多かった (Table 1-3) 。*csmB* 破壊株においても *csmA* 破壊株同様、細胞壁キチン含量が野生型株の 80%程度に低下すること (對崎, 2007) から、*csmB* の破壊による生育遅延、菌糸の形態異常の回復により、キチン含量も野生型株と同程度に回復すると考えられた。MACBΔB 株のキチン含量は positive control と同程度であり、*csmB* の破壊によるキチン含量の低下は回復していた (Table 1-3) 。一方、MBCAΔB 株のキチン含量は negative control と同程度であり、positive control の 80 %程度であった (Table 1-3) 。このことから、MACBΔB 株においては *csmB* の破壊による影響がほぼ回復し、MBCAΔB 株においては回復していないことが示唆された。

これらの結果から、融合タンパク質 MACB は CsmB の機能を代替できること、MBCA は CsmB の機能を代替できないことが示唆された。

以上、1-3-2 における結果を Table 1-4 にまとめた。これらの結果から、MA は MB の機能を代替できること、MB は MA の機能を一部代替できるが、完全には代替できないこと、CA 及び CB は相互に機能を代替できないことが示唆された。

1-3-3　融合タンパク質 MBCA 及び MACB の菌糸内局在

融合タンパク質 MBCA 及び MACB の菌糸内局在について解析するため、*csmA* 破壊株において MBCA-HA を生産する株、あるいは *csmB* 破壊株において MACB-FLAG を生産する株を作製した (MBCA-HAΔA 株、MACB-FLAGΔB 株) (Table 1-1) 。これらの株は、YGuu 固体培地で生育させた場合、タグを付加していない MBCA あるいは MACB を生産する株 (MBCAΔA 株あるいは MACBΔB 株) と同様に、*csmA* 破壊あるいは *csmB* 破壊による表現型の異常が一部または完全に抑圧されていることを確認した。また、これらの株の細胞抽出液を用い

た抗 HA 抗体あるいは抗 FLAG 抗体によるウェスタン解析の結果、MBCA-HA 及びMACB-FLAG が安定に生産されていることが確認された (Fig. 1-12 A and D) 。MBCA-HAΔA 株あるいはMACB-FLAGΔB 株の細胞抽出液を用いて遠心分離による細胞内分画を行い、抗 HA 抗体あるいは抗 FLAG 抗体によるウェスタン解析を行なったところ、MBCA-HA 及び MACB-FLAG は形質膜画分と考えられる P10 画分において主として検出され、P100 画分にも僅かに検出された (Fig. 1-12 B and E)。また、MBCA-HAΔA 株あるいは MACB-FLAGΔB 株を用いて、抗 HA 抗体あるいは抗 FLAG 抗体、及び抗アクチン抗体を用いた間接蛍光抗体法により MBCA-HA あるいは MACB-FLAG、アクチンの染色、同時に CFW によるキチンの三重染色を行ない、局在を観察した。その結果、MBCA-HA 及び MACB-FLAG は共に菌糸先端及び隔壁形成部位のアクチン、キチン近傍に局在が観察された (Fig. 1-12 C and F, 矢頭) 。

1-3-4　CsmA 及び CsmB の可溶化条件の検討

CsmA と CsmB の機能的差異と各ドメインの互換性について更に検討するため、両者は膜タンパク質であることから界面活性剤による可溶化条件について検討した。CsmA-HA 及び CsmB-FLAG を同時に生産する株 (AHBF 株) (Table 1-1) の細胞抽出液に対し、界面活性剤 CHAPs、Triton X-100、デオキシコール酸ナトリウム、SDS を別個に用いて膜の可溶化処理を行なった。可溶化後のサンプルを遠心分離により上清画分と沈殿画分に分画し、抗 HA 抗体、抗 FLAG 抗体によるウェスタン解析を行なった (Fig. 1-13) 。その結果、Triton X-100 あるいはデオキシコール酸ナトリウムにより可溶化処理を行なった場合、CsmB-FLAG の方が可溶化により上清画分で検出される割合が増加しており、CsmA-HA と CsmB-FLAG について顕著に可溶化条件に差が見られた。Triton X によって可溶化されにくい膜タンパク質はステロールやスフィンゴ脂質を豊富に含む膜環境に存在すると考えられている (Rajendran and Simons, 2005) ことから、Triton X-100 を用いた可溶化処理について詳細に検討した。AHBF 株の細胞抽出液を用いて、ショ糖密度勾配 5-40 %の範囲で遠心分離による分画を行い、抗 HA 抗体あるいは抗 FLAG 抗体によるウェスタン解析を行なった (Fig. 1-14) 。その結果、可溶化処理を行なわない場合、CsmA-HA と CsmB-FLAG は共に高密度の画分に検出され、両者の存在する画分に顕著な違いは見られなかった。一方、可溶化処理を行なった場合、CsmA-HA よりも CsmB-FLAG の方が

より低密度の画分においても検出された (Fig. 1-14) 。また、このような CsmA と CsmB の界面活性剤に対する可溶化条件の違いが MMD の有無に依存するかについて、*alcA* プロモーター下で CsmA の CSD のみ (アミノ酸、861-1852) 、あるいは CsmB の CSD のみ (アミノ酸、561-1739) を発現する株 (CSΔMHA 株、alc-CSΔMBF 株) (Table 1-1) を用いて検討した。CSΔMHA 株及び alc-CSΔMBF 株の細胞抽出液に対し、上記と同様の界面活性剤を用いて膜の可溶化処理を行なった。上記同様に遠心分離を行い、上清画分と沈殿画分に分画し、抗 HA 抗体、抗 FLAG 抗体によるウェスタン解析を行なった (Fig. 1-15) 。その結果、CSΔMA-HA の可溶化の割合は SDS を除いて低く、CsmA-HA と類似していた。また CSΔMB-FLAG の可溶化の割合は Triton X-100、デオキシコール酸ナトリウム、SDS を用いた場合高く、CsmB-FLAG と類似していた。

これらの結果から、CsmA と CsmB が存在する細胞内の微細な膜環境は異なっている可能性が考えられ、各々の膜環境の違いは MMD の有無に依存しないことが示された。

1-3-5　MBCA 及び MACB の可溶化条件の検討

融合タンパク質 MBCA 及び MACB の機能と可溶化条件の相関について検討するため、MBCA-HA 及び MACB-FLAG の可溶化条件について検討した。MBCA-HAΔA 株及び MACB-FLAGΔB 株の細胞抽出液を用いて、膜の可溶化処理を行い、遠心分離による分画後、抗 HA 抗体あるいは抗 FLAG 抗体によるウェスタン解析を行なった (Fig. 1-16) 。その結果、MBCA-HA の可溶化の割合は SDS を除いて低く、CsmA-HA と類似していた。一方、MACB-FLAG の可溶化の割合はデオキシコール酸ナトリウム、SDS を用いた場合 CsmB-FLAG と同程度に高かったが、Triton X-100 を用いた場合 CsmB-FLAG より有意に低かった (Fig. 1-16) 。これらの結果から、MB は CA の可溶化条件に影響を与えないが、MA は CB の可溶化条件を変化させることから、MA は CA あるいは CB の膜における存在状態を規定する機能をもつことが示唆された (Table 1-5) 。

1-4　考察

本章では、CsmB の機能における MMD の役割について解析し、CsmB の MMD 欠失株は *csmB* 全長破壊株と同様、生育遅延、バルーン構造等の菌糸の形態異常を示すこと (Fig. 1-5) 、CsmB の CSD のみを高発現させても *csmB* 破壊によ

る菌糸の形態異常が回復しないこと (Fig. 1-6) から、CsmB の機能に MMD が必要であることが示唆された。更に、MMD を欠失した CSΔMB-FLAG の間接蛍光抗体法による局在観察において、CSΔMB-FLAG は細胞内に顕著な蛍光の集中が観察されず、菌糸先端、隔壁形成部位に局在しないことが示された (Fig. 1-7) 。また、抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降実験により、*in vivo* において CsmB はアクチンと相互作用するが、CSΔMB-FLAG は相互作用しないことが示された (Fig. 1-8) 。これらの結果から、CsmB の正常な局在化と機能には MMD とアクチンとの相互作用が重要であることが示唆された (Tsuizaki *et al.*, 2009) 。

また、CsmA と CsmB の機能的相関について検討するため、*csmA* 破壊株、*csmB* 破壊株において、CsmA、CsmB の各ドメインを交換した融合タンパク質 MACB 及び MBCA を野生型 CsmA、CsmB の代わりに発現する株を作製しドメインの互換性について解析した。その結果、Table 1-4 及び Table 1-5 に示したように、CsmA の MMD は CsmB の MMD により機能の一部を代替できるが完全には代替できないこと、CsmB の MMD は CsmA の MMD により機能を代替できること、両者の CSD は相互に機能を代替できないことが示唆された。また、CsmA と CsmB は界面活性剤による膜からの可溶化の程度に差異がみられ、CsmB の方が可溶化され易く、その差異は両者の MMD に依存しないことが示された (Figs. 1-13 and 1-15) 。更に、ドメインを交換した融合タンパク質 MACB-FLAG 及び MBCA-HA は菌糸先端及び隔壁形成部位に正常に局在し (Fig. 1-12) 、MACB-FLAG は CsmA と CsmB の中間的な可溶化条件を示すのに対し、MBCA-HA は CsmA と同様の可溶化条件を示した (Fig. 1-16) 。これらの結果から、CsmA と CsmB は存在する微細な膜環境が異なり、CsmA の MMD は CSD の存在状態を規定する機能を持つことが示唆された。

以下に、CsmB の機能における MMD の役割、CsmA と CsmB の各ドメインの機能的差異について考察する。

1-4-1　CsmB の機能における MMD の役割

通常の *csmB* のプロモーター下で、MMD を欠失した CSΔMB を野生型 CsmB の代わりに発現させた場合、*csmB* 破壊株と同様に生育遅延、菌糸の形態異常を示し (Fig. 1-5) 、CSΔMB-FLAG がタンパク質レベルで検出されなかった (1-3-1-2) 。このことから、CsmB の MMD は CsmB のフォールディング及びタンパク質の安定性維持に機能する可能性が考えられる。

また序章でも述べたように、当研究室におけるこれまでの解析において、CsmA の機能における MMD の必要性について検討されており、MMD のモーター活性は CsmA の正常な局在化と機能には必須ではないが、アクチンとの結合は正常な局在化と機能に必要であることが示されている (Takeshita *et al.*, 2005) 。糸状菌が先端生長を行うためには、キチン合成酵素を菌糸先端に持続的に局在化させる必要があり、菌糸が伸長しても CsmA が菌糸先端に留まることができる機構として、MMD がアクチンとの相互作用を通して CsmA を菌糸先端の形質膜上へアンカーさせることに機能する可能性が指摘されている（Takeshita *et al.*, 2005） 。一方 CsmB についても、MMD に ATP 結合領域が保存されていないことから、MMD に分子モーターとしての活性がない可能性が高い。CsmB の MMD は *in vivo* においてアクチンと相互作用し、MMD が CsmB の正常な局在化と機能に必要であるという本章の解析結果から、CsmA の場合と同様、CsmB の形質膜上へのアンカーに MMD が機能している可能性が考えられる。MMD 欠失型 CsmB は、菌糸先端、隔壁形成部位の近傍までは輸送されるが、MMD とアクチンとの相互作用が生じないために、菌糸先端、隔壁形成部位に留まることができず、正常に機能できないのかも知れない。本研究では解析できていないが、このような CsmA、CsmB の局在化機構について更に検討するため、CsmB についても MMD におけるアクチン結合部位と局在化及び機能とにおける関わりや、CsmA、CsmB の MMD のモーター活性について検討する必要がある。

1-4-2　CsmA と CsmB の機能的差異

1-4-2-1　MMD の機能的差異

本章の序でも述べたように、CsmA の MMD はミオシンサブファミリーにおいて広く保存されている ATP 結合領域が存在するが、CsmB の MMD にはこの領域が存在しないこと、両者の CSD と比較して MMD の相同性が低いこと等から、両者の MMD が異なる機能を持つ可能性がある。融合タンパク質 MBCA は CsmA と同様に菌糸先端及び隔壁形成部位に正常に局在が見られ、可溶化条件は CsmA と同様であったが、*csmA* 破壊による表現型の異常等を完全には抑圧できなかったことから、MA は MB にはない機能を持つことが考えられる。CsmB の MMD は CsmB の CSD 部分の正常なフォールディングに寄与し、タンパク質の安定性に関わる可能性があることから (1-4-1) 、MA も CA のタンパク質の安定性に影

響する可能性がある。また、融合タンパク質 MACB は CsmB と同様に菌糸先端及び隔壁形成部位に正常に局在が見られ、CsmB より可溶化の程度は一部低かったが、*csmB* 破壊による表現型の異常等をほぼ抑圧できたことから、MA は CA あるいは CB の可溶化に影響を与えることにより、膜における存在状態を規定することが考えられる。CsmB と MACB の可溶化条件の差異が、両者の存在する膜環境の違いにどの程度影響するかは不明であるが、MACB は CsmB の機能を大部分相補できることから、CsmB と MACB の存在する膜環境は大きくは違わないのかもしれない。両者の MMD の機能について更に解析していくためには、1-4-1 で述べた MMD のモーター活性測定の他にも、*A. nidulans* におけるアクチン結合タンパク質 AbpA やクラス I ミオシン MyoA と CSD との融合タンパク質を作製し、その菌糸内局在や機能について検討する必要がある。

1-4-2-2　CSD の機能的差異

本章の解析から、CA 及び CB は相互に交換不可能であることが示唆され、両者の CSD の特異性が示唆された。CA 及び CB のアミノ酸配列から推定されるハイドロパシープロファイルは類似しており、6 つの膜貫通領域を含むと推定される (Fig. 1-9) 。また 2 つのシトクロム b_5 様ドメイン、glycosyl hydrolase family-2 (GH-2) ドメイン、DEK-C 末端ドメインといった特徴的ドメインを含む。シトクロム b_5 様ドメインはクラス IV、V 及び VI キチン合成酵素に共通して存在するドメインであり、*Botrytis cinerea* においてはこのドメインがプロテアーゼによる切断を受けることにより酵素のプロセシングに関わることが示唆されている (Choquer *et al.*, 2004) 。DEK タンパク質はクロマチン関連タンパク質であり、その C 末端側の領域 (DEK-C) が機能に重要であることが示唆されている (Wise-Draper *et al.*, 2005) 。DEK-C ドメインは MMD を持つキチン合成酵素の C 末端側にのみ存在し、他の糸状菌のクラス VI キチン合成酵素の中でも MMD を持たないものについては DEK-C ドメインの存在が確認されていないことから、CsmA 及び CsmB の機能に重要なドメインである可能性がある。そして当研究室における解析により、CsmA 及び CsmB の DEK-C ドメインの欠失株において、それぞれの全長破壊株と類似の表現型異常が一部観察されている (前田, 2010) 。GH-2 ドメインは他のクラスのキチン合成酵素にも保存された領域である酵素の活性中心部位 Con1 (Nagahashi *et al.*, 1995) を含み、CA 及び CB における GH-2 の相同性は高いが、両者は交換不可能であったことから、GH-2 にお

けるキチン合成酵素活性そのものが交換不可能である可能性が考えられる。*A. nidulans* のクラス II キチン合成酵素 *chsA* をクラス III キチン合成酵素 *chsB* のプロモーター下で発現させた場合、ChsB の機能を相補できなかったこと (Ichinomiya *et al*., 2002a) 、接合菌類の糸状菌 *Rhizopus oligosporus* のクラス II キチン合成酵素を *S. cerevisiae* で発現させても *S. cerevisiae* のクラス II キチン合成酵素の機能を代替できなかったこと (Motoyama *et al*., 1994) からも、キチン合成酵素は個々の酵素によってそれぞれ異なる機能を持つことが示唆される。

また、両者の CSD における可溶化条件の差異が機能的差異に関わる可能性がある。哺乳類及び出芽酵母において、Triton X によって可溶化されず、界面活性剤に耐性を示す特徴的な膜ドメイン (detergent-resistant membrane (DRM) domain) が存在し、DRM が集合して秩序液体相による微小膜ドメインを形成することが示唆されている (Simons and Van Meer, 1988) 。この微小膜ドメインにはステロールやスフィンゴ脂質が豊富に存在し、出芽酵母においてこのようなステロールを豊富に含む膜ドメイン (sterol-rich membrane domains (SRDs)) がエンドサイトーシスにおけるタンパク質のリサイクルやアクチン細胞骨格の形成に関わることが示されている (Rajendran and Simons, 2005) 。糸状菌においても、近年 SRDs がアクチン細胞骨格形成の足場として機能する可能性 (Steinberg, 2007) や、細胞端を認識するタンパク質 (cell-end marker proteins) の菌糸先端部における局在を決定するドメインである可能性が指摘されている (Takeshita *et al*., 2008) 。CsmA や MBCA が Triton X-100 やデオキシコール酸ナトリウムによって可溶化されにくいのに対し、CsmB や MACB が可溶化されやすいのは、両者が異なる微小膜ドメインに存在することを反映しているのかもしれない。

1-4-2-3　CsmA、CsmB の局在化、膜環境における差異

CsmA、CsmB は MMD と CSD の間、及び CSD の C 末端側に複数の膜貫通領域を持つと考えられる膜タンパク質であり (Fig. 1-9) 、本章における結果から異なる膜環境に存在する可能性が考えられる。これまでの解析から、*csmA*、*csmB* 一方の破壊株において他方は菌糸先端、隔壁形成部位に正常に局在すること (Takeshita *et al*., 2006; 對崎, 2007) 、CsmA、CsmB が *in vivo* において物理的に相互作用しない可能性が高いこと (竹下, 2005; 對崎, 2007) から、両者は独立した機構により局在化すると考えられる。酵母 *S. cerevisiae* 及び一部の糸

状菌における解析から、キチン合成酵素はキトソームと呼ばれる小胞に含まれ形質膜上に輸送されると考えられており (Valdia *et al*., 2002; Bartnicki-Garcia, 2006) 、CsmA、CsmB もキトソーム等の小胞に含まれた状態で形質膜へ輸送され、小胞と形質膜の膜融合により形質膜上に局在化する可能性が考えられる。MMD を欠失しても存在する微細な膜環境が顕著に変化しない理由として、CsmA と CsmB は CSD に起因して異なる小胞に含まれ、これらの小胞が輸送される形質膜が異なることにより、異なる膜ドメインに存在するようになることが考えられる。両者の局在する微細な膜ドメインについて解析するため、急速凍結割断法による免疫電子顕微鏡観察を試みたが、タンパク質の安定性を維持したまま菌糸の細胞壁を完全に溶解できないことや、切断面が菌糸のどの部位であるか同定できないといった技術的問題により明確な結果が得られなかった。

糸状菌において、微小管は特に菌糸先端部における速い菌糸の伸長を支持していると考えられており (Horio and Oakley, 2005) 、菌糸後方から Spitzenkörper までのキチン合成酵素の輸送に関わることが近年示唆されている (Zhang *et al*., 2003; Treitschke *et al*., 2010) 。さらに、アクチン細胞骨格は Spitzenkörper より更に菌糸の先端側に常に局在化しており、菌糸先端の形質膜において機能するキチン合成酵素はこのアクチン細胞骨格により形成された足場に輸送される必要がある。しかし、本章考察で述べたキチン合成酵素の輸送経路を直接的に示す結果は他の糸状菌においても得られていなかったことから、第 2 章では CsmA の菌糸先端への局在化機構を解析するため、微小管及びモータータンパク質であるキネシンの寄与、輸送における MMD の機能等について検討した。

Table 1-1. ***A. nidulans* strains used in this section.**

Strain	Genotype	Reference
FGSC A26	*biA*	FGSC*
FGSC A1149	*pyrG89 pyroA4 wA3* Δ*nkuA*::*argB*	FGSC*
ABPU1	*biA1 pyrG89 argB2 pyroA4 wA3*	Motoyama *et al.,* 1996
MBF	*biA1 pyrG89 argB2 pyroA4 wA3* Δ*csmB*::*csmB*-3x*FLAG*::*pyroA*	Takeshita *et al.,* 2006
A1149/pyrG	*pyrG89*::*pyrG pyroA4 wA3* Δ*nkuA*::*argB*	Uchida H, Ohta A, and Horiuchi H, unpublished
A1149/ΔB1, 2	*pyrG89 pyroA4 wA3* Δ*nkuA*::*argB* Δ*csmB*::*pyrG*	Tsuizaki *et al.*, 2009
CSΔMB1, 2	*pyrG89 pyroA4 wA3* Δ*nkuA*::*argB* Δ*csmB*::*pyrG-csmB*(p)-*csmB* (561-1739 a.a.)	Tsuizaki *et al.*, 2009
CSΔMBF1, 2	*biA1 pyrG89 argB2 pyroA4 wA3* Δ*csmB*::*pyrG-csmB*(p)-*csmB* (561-1739a.a.)-3x*FLAG-pyroA*	Tsuizaki *et al.*, 2009
alc-CSMB1, 2	*pyrG89 pyroA4* Δ*nkuA*::*argB* Δ*csmB*::*pyrG-alcA*(p)-*csmB*	Tsuizaki *et al.*, 2009
alc-CSΔMB1, 2	*pyrG89 pyroA4* Δ*nkuA*::*argB* Δ*csmB*::*pyrG-alcA*(p)-*csmB* (561-1739 a.a.)	Tsuizaki *et al.*, 2009
alc-CSMBF1, 2	*biA1 pyrG89 argB2 pyroA4 wA3* Δ*csmB*::*pyrG-alcA*(p)-*csmB*-3x*FLAG-pyroA*	Tsuizaki *et al.*, 2009
alc-CSΔMBF1, 2	*biA1 pyrG89 argB2 pyroA4 wA3* Δ*csmB*::*pyrG-alcA*(p)-*csmB*(561-1739 a.a.)-3xFLAG-*pyroA*	Tsuizaki *et al.*, 2009
pyroA/ΔA1, 2	*biA1 pyrG89 argB2 pyroA4 wA3* Δ*csmA*::*pyroA*	This study
ΔMB1	*biA1 pyrG89 argB2 pyroA4 wA3* Δ*csmB*::*pyroA*	Takeshita *et al.*, 2006
MACBΔA1, 2	*biA1 pyrG89 argB2 pyroA4 wA3* Δ*csmA*::*pyroA argB*::*csmA*(p)-*MACB*	This study
MBCAΔA1, 2	*biA1 pyrG89 argB2 pyroA4 wA3* Δ*csmA*::*pyroA argB*::*csmA*(p)-*MBCA*	This study

ΔcsmA/csmA1, 2	*pyrG89 argB2 pyroA4 wA3* Δ*csmA*::*pyroA argB*::*csmA*	This study
ΔcsmA/argB1, 2	*pyrG89 argB2 pyroA4 wA3* Δ*csmA*::*pyroA* [pSSI]	This study
MACBΔB1, 2	*biA1 pyrG89 argB2 pyroA4 wA3* Δ*csmB*::*pyroA argB*::*csmA*(p)-*MACB*	This study
MBCAΔB1, 2	*biA1 pyrG89 argB2 pyroA4 wA3* Δ*csmB*::*pyroA argB*::*csmA*(p)-*MBCA*	This study
ΔcsmB/csmA(p)-csmB	*biA1 pyrG89 argB2 pyroA4 wA3* Δ*csmB*::*pyroA argB*::*csmA*(p)-*csmB*	竹下 2005
ΔcsmB/argB	*biA1 pyrG89 argB2 pyroA4 wA3* Δ*csmB*::*pyroA* [pSS1]	竹下 2005
MACB-FLAGΔB 1, 2	*biA1 pyrG89 argB2 pyroA4 wA3* Δ*csmB*::*pyroA argB*::*csmA*(p)-*MACB*-3x*FLAG*	This study
MBCA-HAΔA1, 2	*biA1 pyrG89 argB2 pyroA4 wA3* Δ*csmA*::*pyroA argB*::*csmA*(p)-*MBCA*-9x*HA*	This study
AHBF	*biA1 pyrG89 argB2 pyroA4 wA3* Δ*csmA*::*csmA*-9x*HA*::*pyrG* Δ*csmB*::*csmB*-3x*FLAG*::*pyroA*	Takeshita *et al.,* 2006
CSΔMHA**	*biA1 pyrG89 argB2 pyroA4 wA3* Δ*csmA*::*pyrG-alcA*(p)-*csmA*(861-1852 a.a.)-9xHA	Takeshita *et al.*, 2005

* Fungal Genetics Stock Center, Kansas City, KN.

** This strain was renamed in this section.

Table 1-2. Colony diameters, conidiation efficiencies and chitin contents of MACBΔA, MBCAΔA and control strains.

Strain	Colony diameter [cm][*, a]	Conidiation efficiency [No. of conidia x10^6/colony][*, b]	Chitin content [GlcNAc/protein][*, c]
ΔcsmA/csmA	3.2 ± 0.2 (100)	5.6 ± 1 (100)	0.81 ± 0.01 (100)
ΔcsmA/argB	1.3 ± 0.2 (41)	0.37 ± 0.05 (6.6)	0.62 ± 0.05 (76)
MACBΔA	1.4 ± 0.1 (44)	0.31 ± 0.2 (5.5)	0.63 ± 0.05 (78)
MBCAΔA	3.1 ± 0.06 (99)	1.6 ± 0.6 (29)	0.69 ± 0.02 (85)

* The ratios of these data of the ΔcsmA/argB, MACBΔA, and MBCAΔA strains to those of the ΔcsmA/csmA strain were shown in parenthesis.

a. The data were shown as the mean ± S.D. (n=3).

b. The data were shown as the mean ± S.D. (n=6).

c. chitin content was determined by the amount of GlcNAc in alkali-insoluble fraction, which was normalized by the amount of protein in alkali-soluble fraction. The data were shown as the mean ± S.D. (n=3). Similar results were reproducibly obtained in several independent experiments.

Table 1-3. Colony diameters, conidiation efficiencies and chitin contents of MACBΔB, MBCAΔB and control strains.

Strain	Colony diameter [cm][*, a]	Conidiation efficiency [No. of conidia x10^6/colony][*, b]	Chitin content [GlcNAc/protein][*, c]
ΔcsmB/csmA(p)-csmB	3.5 ± 0.3 (100)	7.2 ± 3 (100)	0.75 ± 0.07 (100)
ΔcsmB/argB	2.2 ± 0.3 (63)	0.21 ± 0.02 (2.9)	0.62 ± 0.03 (83)
MACBΔB	3.5 ± 0.2 (100)	7.3 ± 2 (101)	0.71 ± 0.1 (95)
MBCAΔB	2.2 ± 0.3 (63)	0.26 ± 0.05 (3.6)	0.60 ± 0.05 (80)

* The ratios of these data of the ΔcsmB/argB, MACBΔB, and MBCAΔB strains to those of the ΔcsmB/csmA(p)-csmB strain were shown in parenthesis.

a. The data were shown as the mean ± S.D. (n=3).

b. The data were shown as the mean ± S.D. (n=6).

c. chitin content was determined by the amount of GlcNAc in alkali-insoluble fraction, which was normalized by the amount of protein in alkali-soluble fraction. The data were shown as the mean ± S.D. (n=3). Similar results were reproducibly obtained in several independent experiments.

Table 1-4. Summary of the results in this section*.

Strain	Growth	Phenotypes**	Conidiation	Chitin content
MACBΔA	-	-	-	-
MBCAΔA	+	±	±	±
MACBΔB	+	+	+	+
MBCAΔB	-	-	-	-

* +; almost suppressed, ±; partially suppressed, -; not suppressed. ** The phenotypes of these strains were valued by whether each strain could suppress or not the defects in *csmA* or *csmB* deletion mutant: formation of balloons, hyphal lysis, and brownish clumps (brownish clumps were valued particularly in *csmB* deletion mutant)

Table 1-5. Summary of the functionality of each domain of CsmA and CsmB[*1].

Proteins	Defects in Δ*csmA*	Defects in Δ*csmB*	Solubility
MACA (CsmA)	+	-	CsmA-type
MACB	-	+	CsmA and CsmB-intermediate type
CA (CSΔMA)	-[*2]	**	CsmA-type
MBCB (CsmB)	-	+	CsmB-type
MBCA	±	-	CsmA-type
CB (CSΔMB)	**	-[*3]	CsmB-type

*1 +; almost suppressed, ±; partially suppressed, -; not suppressed.

*2 Horiuchi *et al*., 1999

*3 Tsuizaki *et al*., 2009

** not analysed.

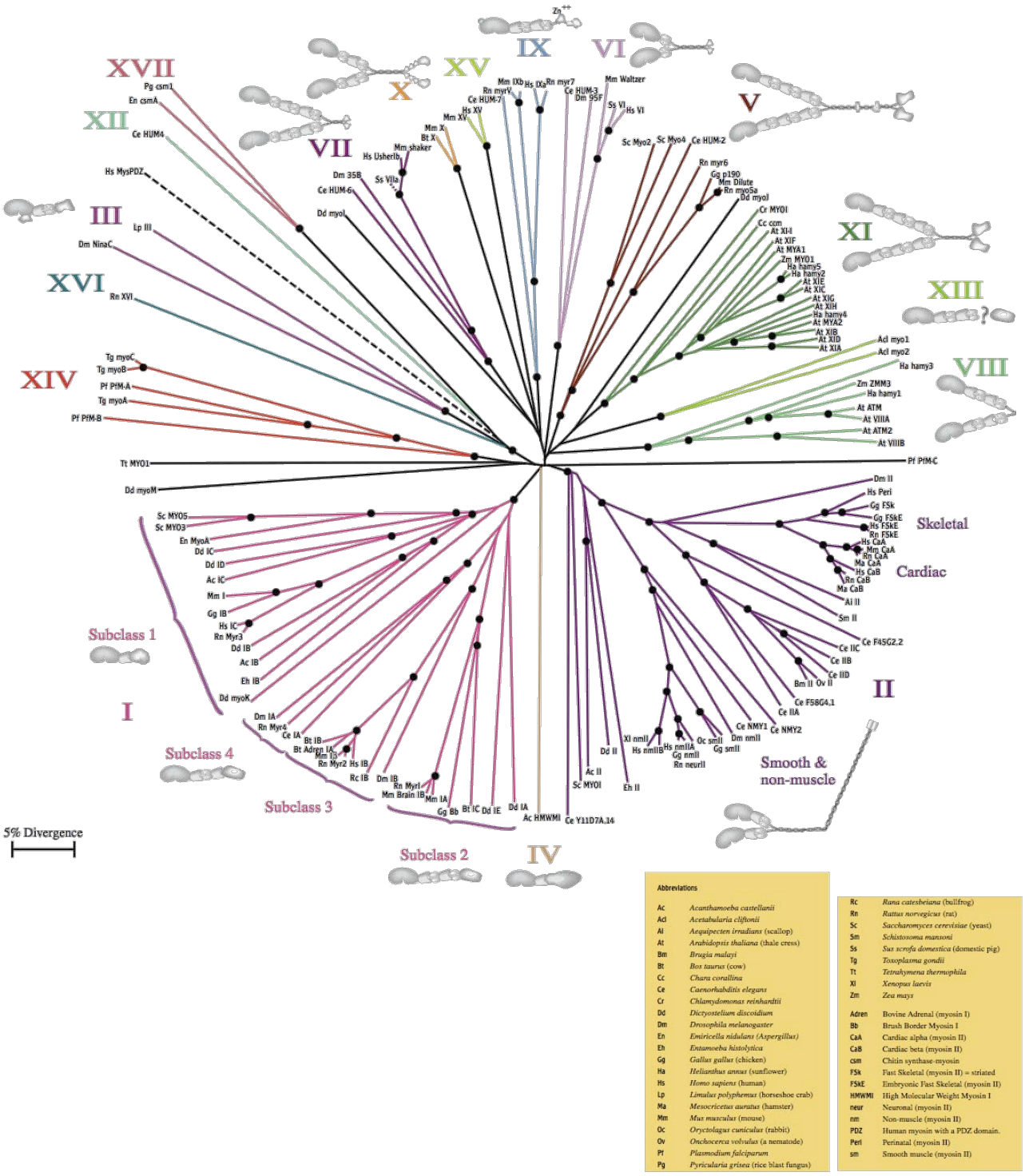


Figure 1-1. Unrooted phylogenetic tree of the myosin superfamily.
(Hodge and Cope, 2000)

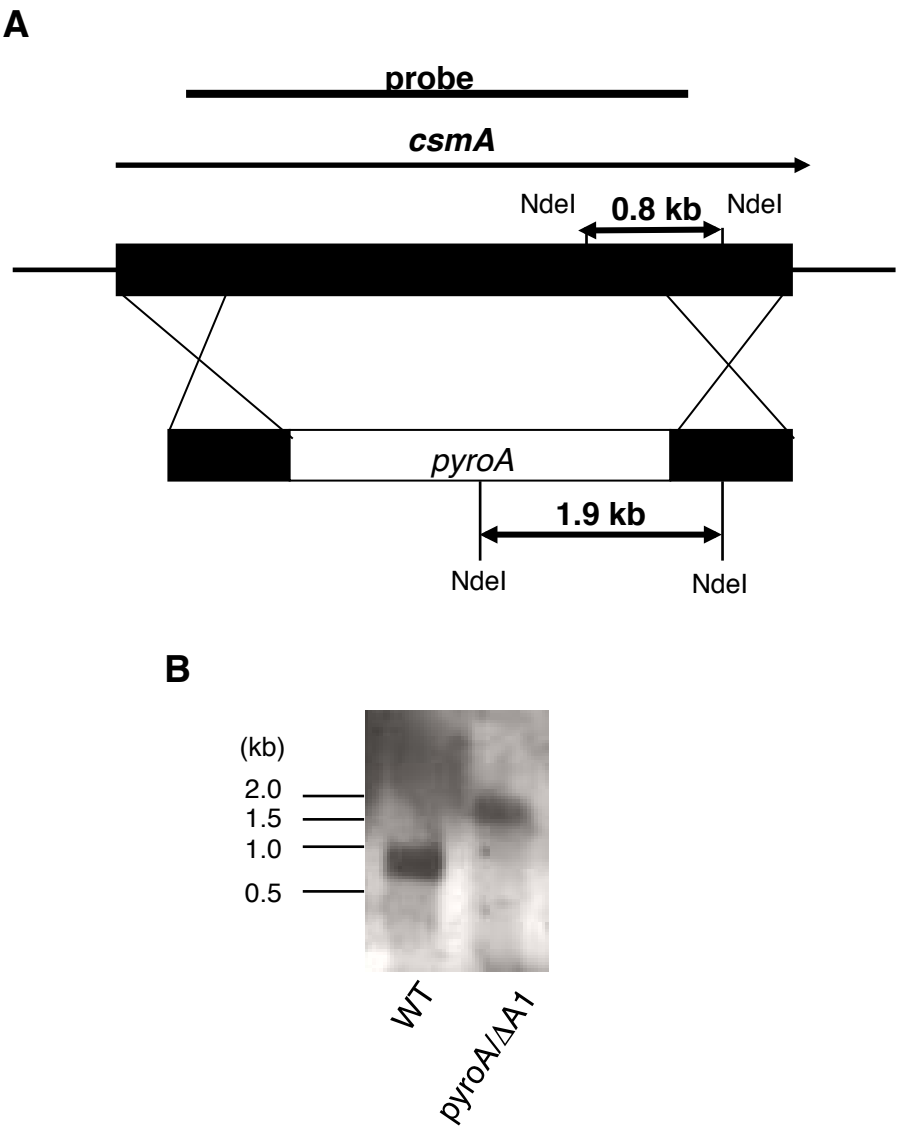


Figure 1-2. Construction of pyroA/ΔA strains .
(A) Scheme of construction.
(B) Southern blot analysis of NdeI digested total DNA of wild-type (WT) strain and pyroA/ΔA strain probed with the 7.0 kb XbaI fragment of pM3X2.

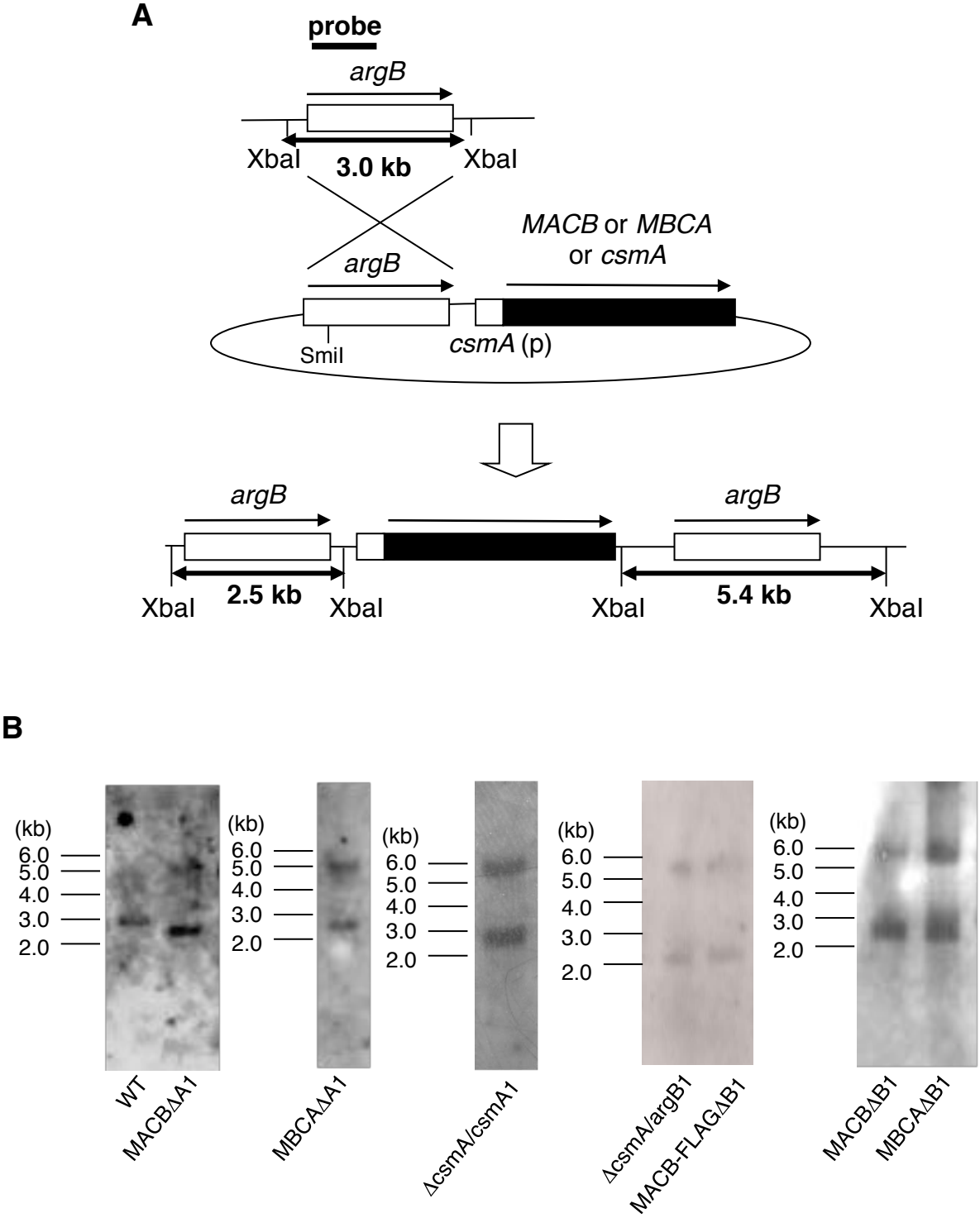


Figure 1-3.
(A) Scheme of construction of the strains that produce MACB, MBCA or CsmA.
(B) Southern blot analysis of the strains that produce MACB, MBCA or control strains. XbaI-digested total DNA of these strains was used for the hybridization. The 1.1 kb HindIII fragment from pSS1 was used as a probe.

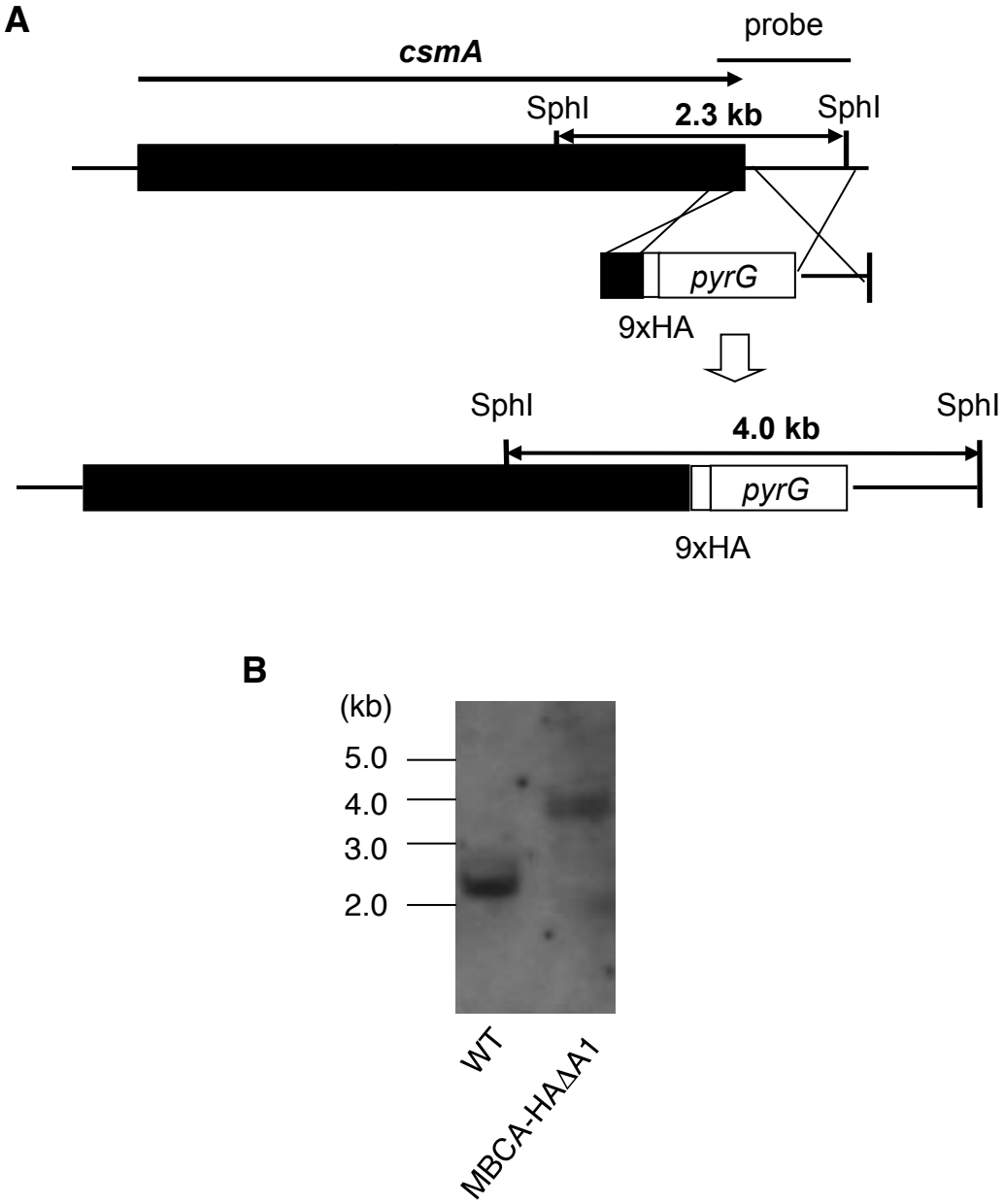


Figure 1-4.
(A) Scheme of construction of the strains that produce MBCA-HA in *csmA* deletion background (MBCA-HAΔA1, 2).
(B) Southern blot analysis of the MBCA-HAΔA1 strain. SphI-digested total DNA of the strains was used for the hybridization. The 1.2 kb NdeI-SphI fragment from pMK10 was used as a probe.

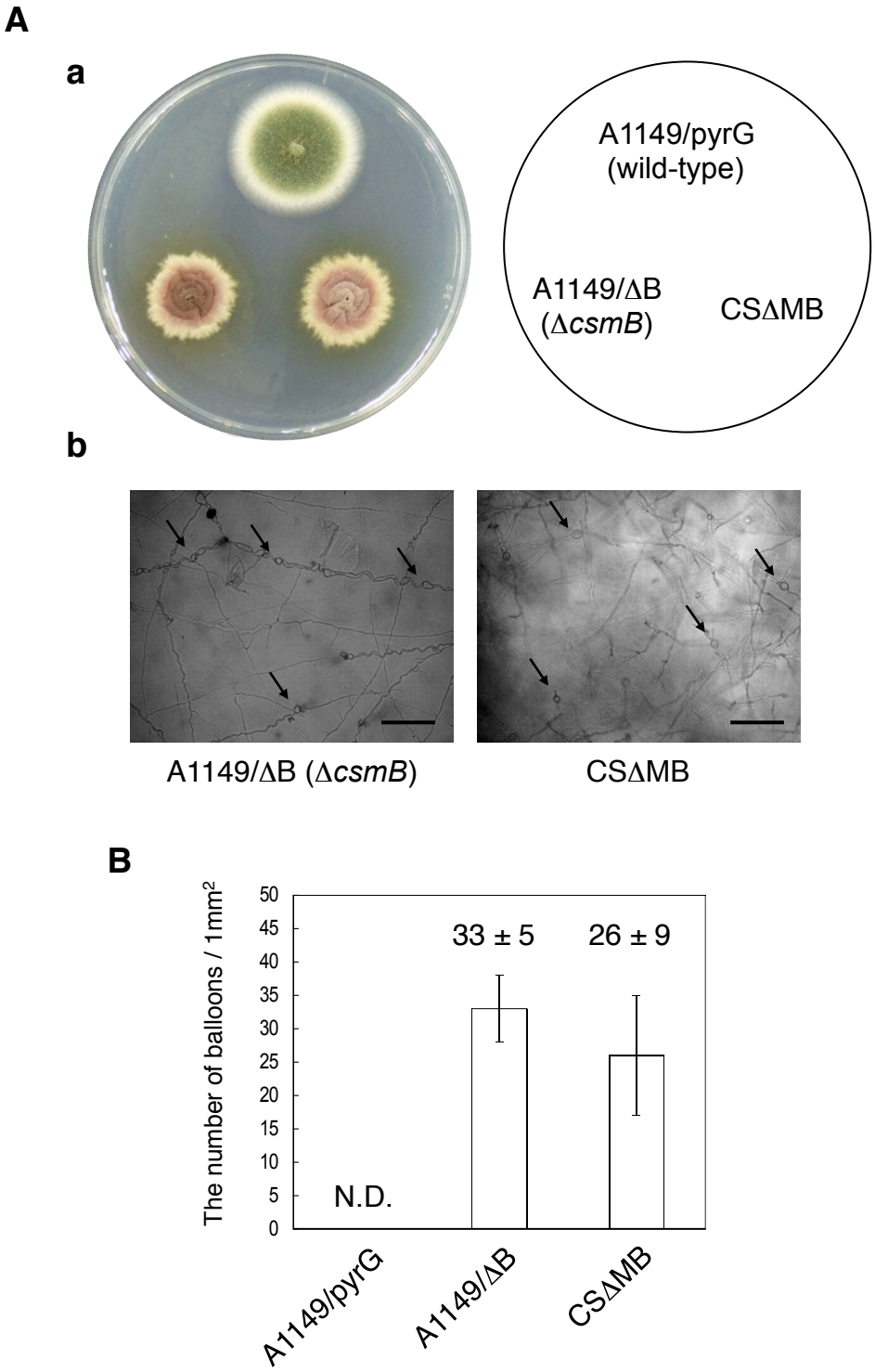


Figure 1-5. Colony and hyphal morphologies of the CSΔMB strain.
(A) (a) Colonies of the A1149/pyrG (wild-type), A1149/ΔB (Δ*csmB*), and CSΔMB strains. 1×10^3 conidia of each strain were spotted and incubated on a YG plate for 3 days. (b) Hyphal morphologies of the A1149/ΔB and CSΔMB strains on an MMG plate. Arrows indicate balloons formed in the hyphae of these strains. Scale Bars, 100 μm. (B) The number of balloons of each strain grown on an MMG plate for 2 days. The data are expressed as the mean ± S.D. (n=5). N.D., not detected.

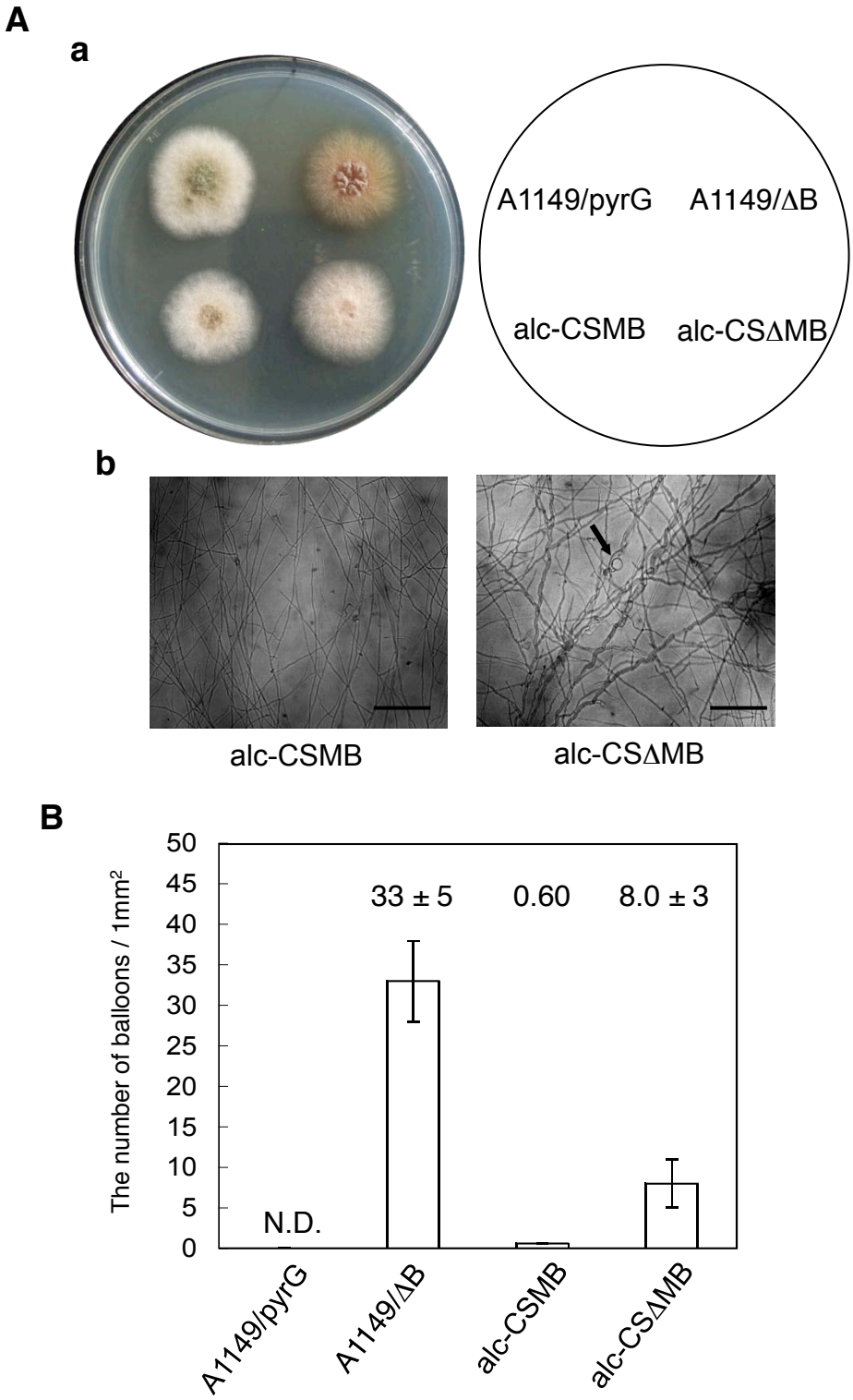


Figure 1-6. Colony and hyphal morphologies of the alc-CSMB and alc-CSΔMB strains.
(A)(a) Colonies of the A1149/pyrG, A1149/ΔB, alc-CSMB (*alcA*(p)-*csmB*), and alc-CSΔMB (*alc*A(p)-*CSΔMB*) strains. 1×10^3 conidia of each strain were spotted and incubated on a YTF plate for 3 days. (b) Hyphal morphologies of the alc-CSMB and the alc-CSΔMB strains on an MMTF plate. The arrow indicates a balloon formed in the hyphae of the alc-CSΔMB strain. Scale Bars, 100 μm. (B) The number of balloons of the various strains grown on an MMTF plate for 2 days. The data are expressed as the mean ± S.D. (n=5). N.D., not detected .

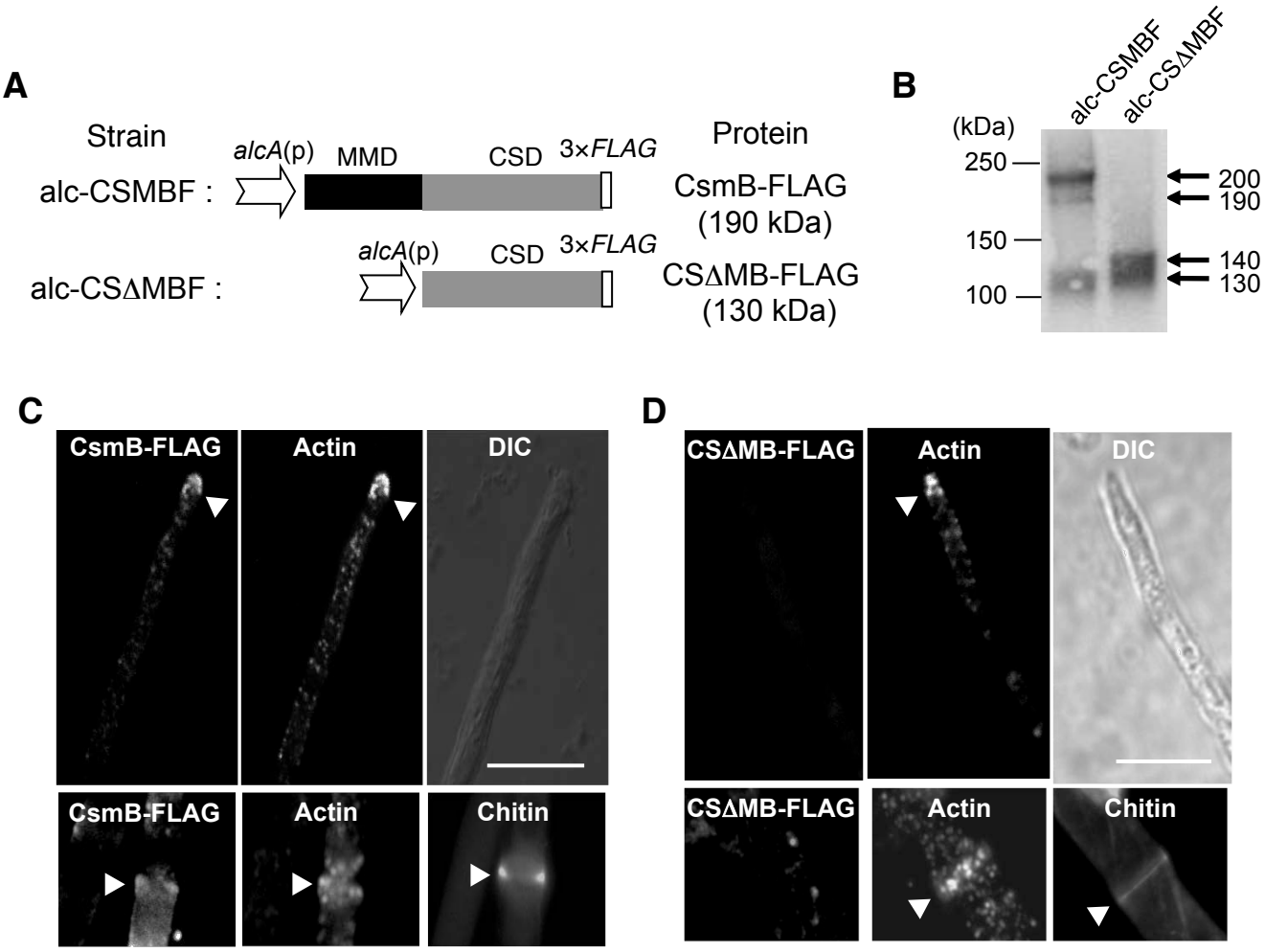


Figure 1-7. Localization of CsmB-FLAG and CSΔMB-FLAG.
(A) Structures of CsmB-FLAG and CSΔMB-FLAG produced in the alc-CSMBF and the alc-CSΔMBF strains respectively. (B) Western blot analysis of the cell extracts of the alc-CSMBF and the alc-CSΔMBF strains grown in YTF liquid medium using anti-FLAG antibody. Arrows indicate CsmB-FLAG (200 kDa and 190 kDa), and CSΔMB-FLAG (140 kDa and 130 kDa), respectively. (C and D) Hyphae of the alc-CSMBF (C) and the alc-CSΔMBF (D) strains grown in YTF liquid medium were stained with anti-FLAG and anti-actin antibodies and visualized by indirect immunofluorescence microscopy. These hyphae were stained simultaneously with calcofluor white. The images observed at hyphal tips (each upper panel and forming septa (each lower panel) are shown. Aroowheads indicate the sites with strong fluorescence. Scale bars, 5 μm.

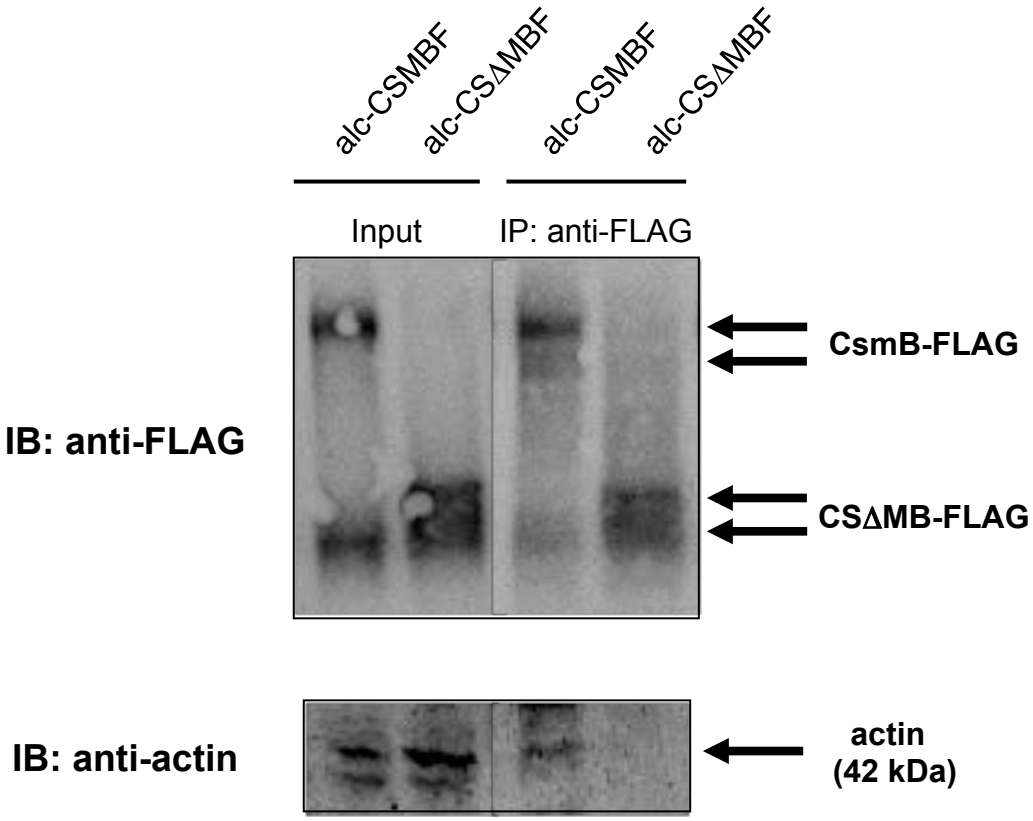


Figure 1-8. Co-immunoprecipitation of CsmB-FLAG with actin *in vivo*.
Cell extracts of the alc-CSMBF and the alc-CSΔMBF strains were immunoprecipitated with anti-FLAG antibody. Cell extracts (Input) and immunoprecipitates (IP; anti-FLAG) were subjected to Western blot analysis using the anti-FLAG and the anti-actin antibodies.

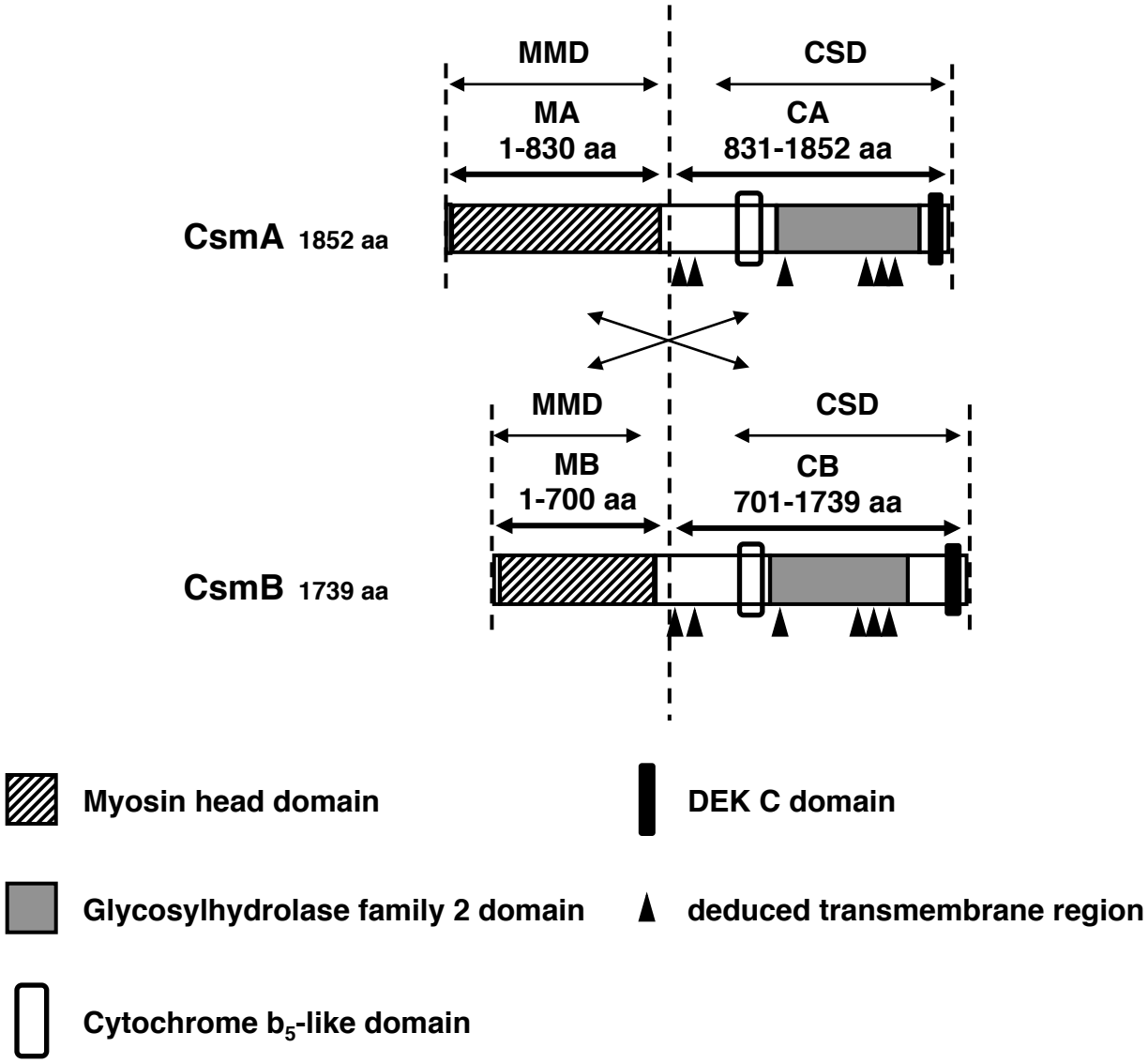


Figure 1-9. Constructions of MACB and MBCA.

CsmA consists of 1852 amino acid residues, and contains an N-terminal myosin head domain (approximately 770 amino acids, shown by hatched box) and a C-terminal chitin synthase domain (approximately 530 amino acids, shown by grey box). CsmB consists of 1739 amino acid residues, and contains an N-terminal myosin head domain (approximately 570 amino acids) and a C-terminal chitin synthase domain (approximately 500 amino acids). Both chitin synthases also contain cytochrome b_5-like domains (shown by open boxes), C-terminal domain of DEK (DEK C domains, shown by black boxes) , and the deduced six transmembrane regions (shown by arrowheads). The position of each domain and region is determined using Conserved Domain Database in NCBI (National Center for Biotechnology Information) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml).

MMD (Myosin-Motor-like Domain: 1-800 a.a. of CsmA or 1-600 a.a. of CsmB) and CSD (Chitin Synthase Domain: 1000-1852 a.a. of CsmA or 900-1739 a.a. of CsmB) described in the text are included in MA (1-830 a.a.) or MB (1-700 a.a.), and CA (831-1852 a.a.) or CB (701-1739 a.a.), respectively. MACB and MBCA were constructed by the fusion of MA and CB, and MB and CA, respectively.

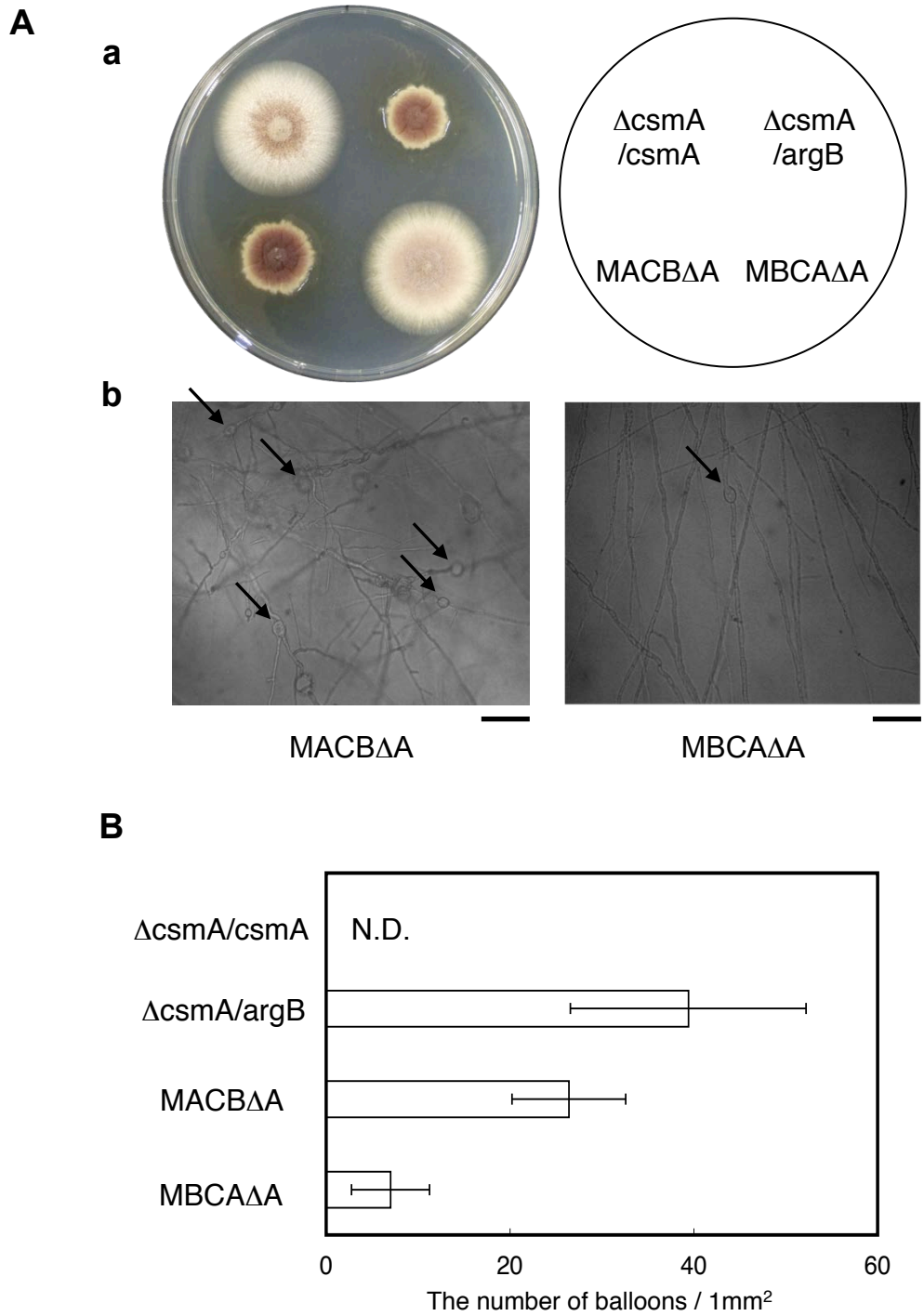


Figure 1-10. Colony and hyphal morphologies of the MACBΔA and MBCAΔA strains.
(A) (a) Colonies of the ΔcsmA/csmA, ΔcsmA/argB, MACBΔA, and MBCAΔA strains. 1 x 10^3 conidia of each strain were spotted and incubated on a YGuu plate for 3 days. (b) Hyphal morphologies of the MACBΔA and MBCAΔA strains on MMGuu plates. Arrows indicate balloons formed in the hyphae of these strains. Scale bars, 100 μm. (B) The number of balloons of each strain grown on MMGuu plates for 2 days. The data are expressed as the mean ± S.D. (n=5). N.D.; not detected.

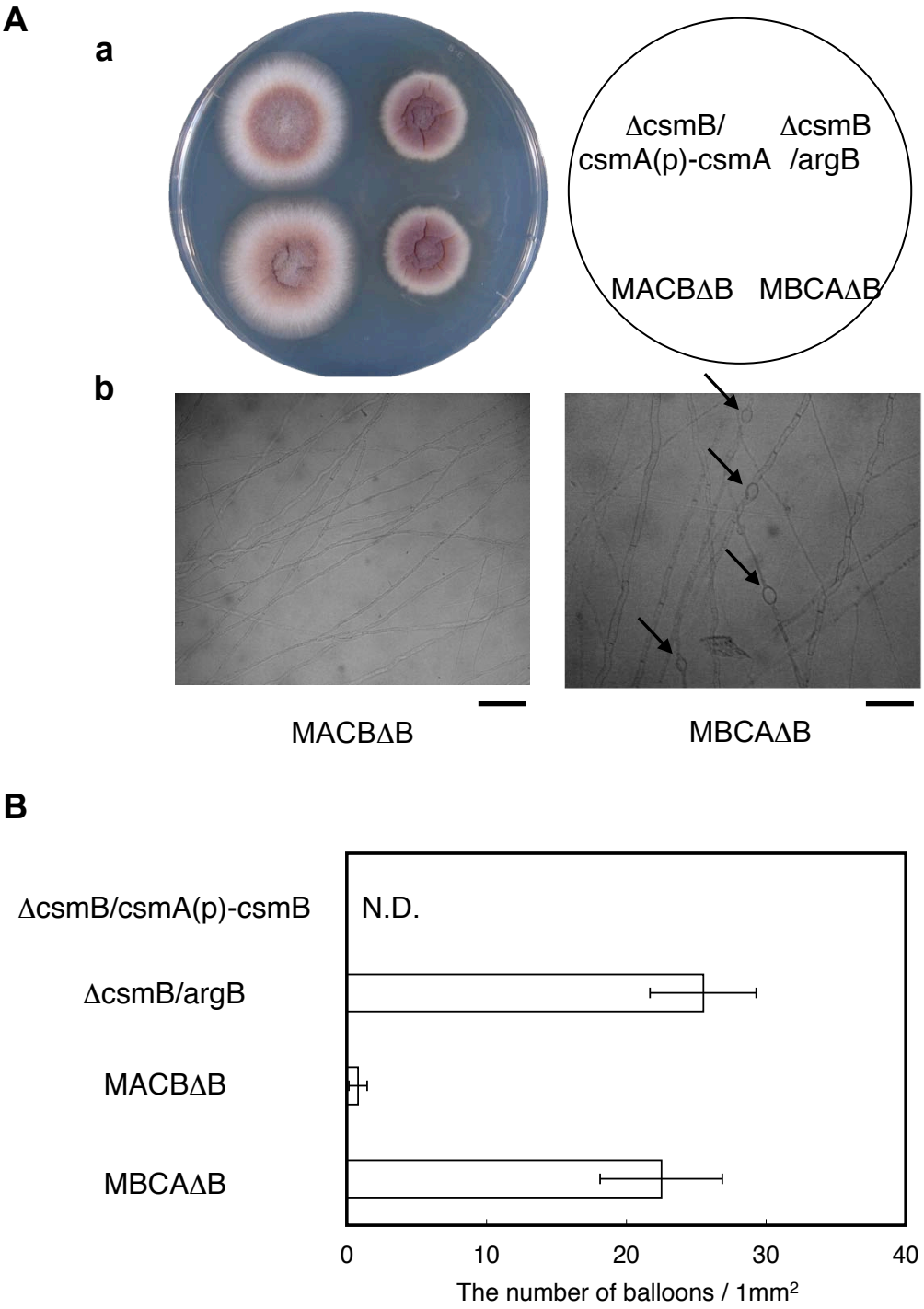


Figure 1-11. Colony and hyphal morphologies of the MACBΔB and MBCAΔB strains.
(A) (a) Colonies of the ΔcsmB/csmA(p)-csmB, ΔcsmB/argB, MACBΔB, and MBCAΔB strains. 1 x 10^3 conidia of each strain were s potted and incubated on a YGuu plate for 3 day s. (b) Hyphal morphologies of the MACBΔB and MBCAΔB strains on MMGuu plates. Arrows indicate balloons formed in the hyphae of the MBCAΔB strain. Scale bars, 100 μm. (B) The number of balloons of each strain grown on MMGuu plates for 2 days. The data are expressed as the mean ± S.D. (n=5). N.D.; not detected.

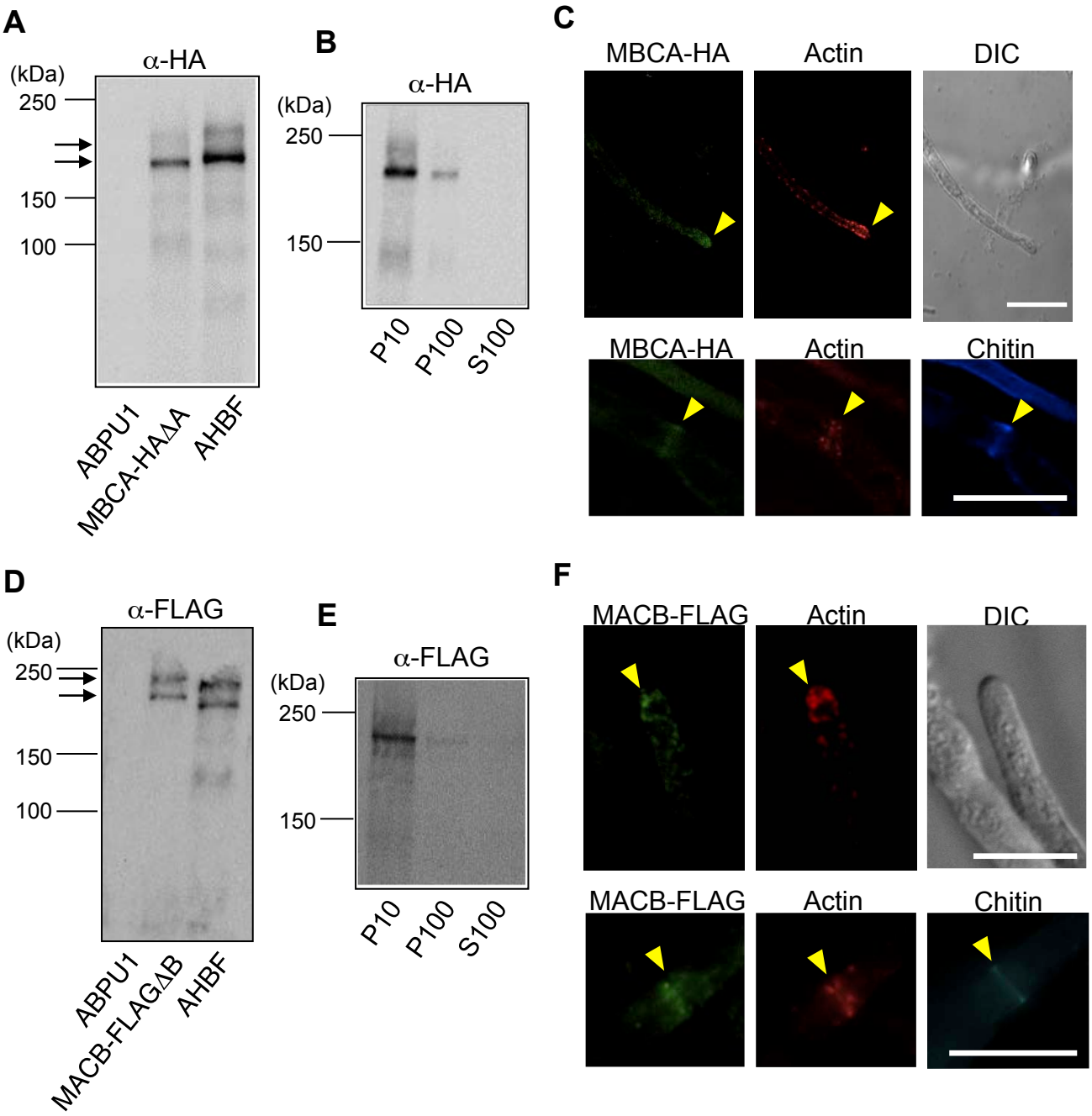


Figure 1-12. Localization of MBCA-HA and MACB-FLAG.
(A and D) Western blotting analysis of th e cell extracts of ABPU1 (wild-type), MBCA-HAΔA (produced MBCA-HA), and AHBF (produced CsmA-HA and CsmB-FLAG) strains grown in YGuu liquid medium using anti-HA antibody (A), and that of ABPU1, MACB-FLAGΔB (produced MACB-FLAG), and AHBF strains using anti-FLAG antibody (D). Arrows indicate the signals in the cell extracts of MBCA-HAΔA (A) and MBCA-FLAGΔB (D). (B and E) Western blotting analysis of the 10,000 xg pellet (P10), 100,000 xg pellet (P100), and 100,000 xg supernatant (S100) of cell extracts of the MBCA-HAΔA (B) and MACB-FLAGΔB (E) strains using anti-HA (B) or anti-FLAG antibody. (C and F) Hyphae of the MBCA-HAΔA (C) and MACB-FLAGΔB (F) strains grown in YGuu liquid medium were stained with anti-HA (C) or anti-FLAG (F), and anti-actin antibodies, and visualized by indirect immunofluorescence microscopy. Each upper and lower panel shows hyphal tips and forming septa, respectively. These hyphae were stained simultaneously with calcofluor white. Arrowheads indicate the sites with strong fluorescence. Scale bars, 10 μm.

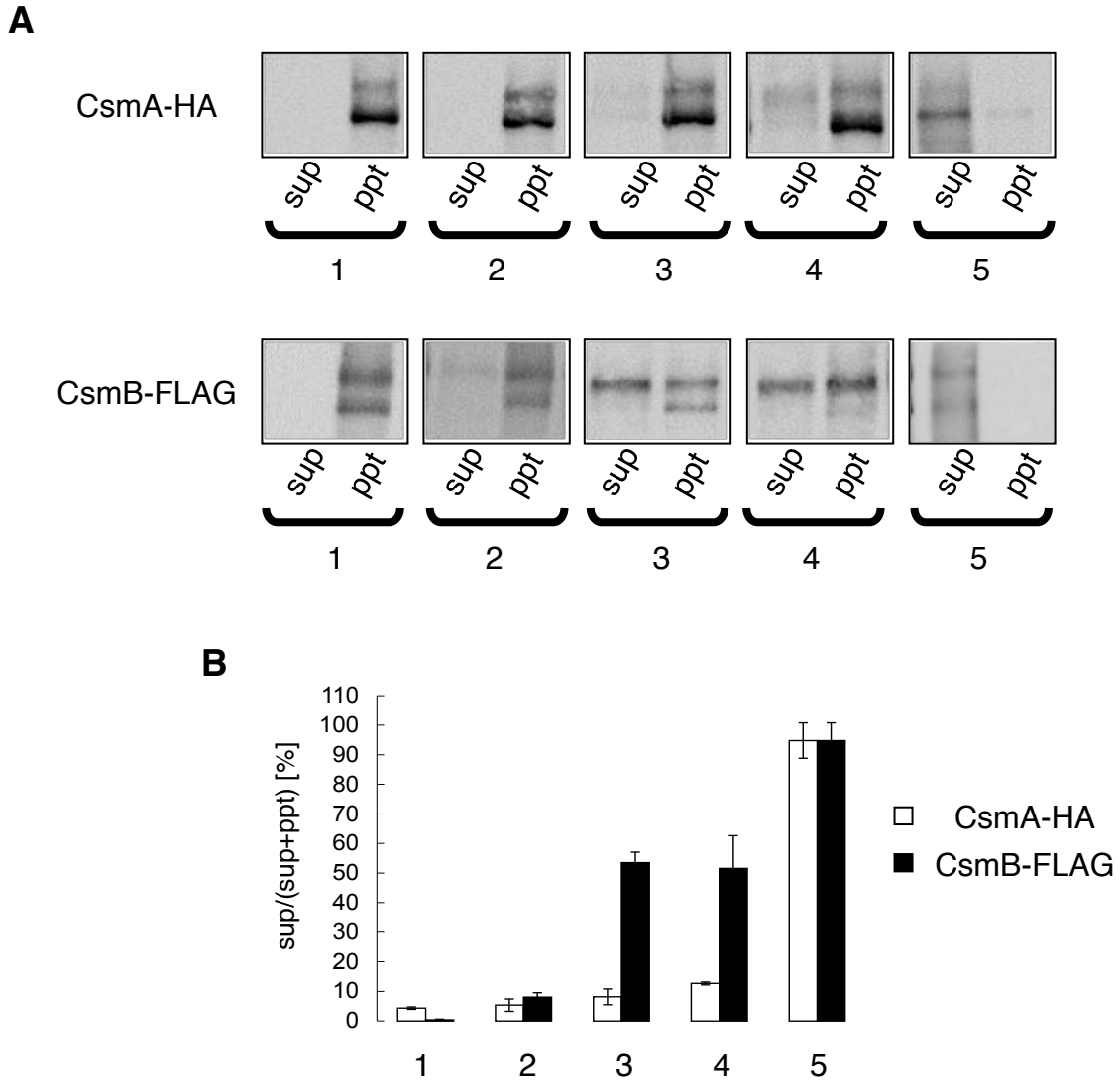


Figure 1-13. Solubilization of CsmA-HA and CsmB-FLAG.
(A) Western blot analysis of 100,000 xg supernatants (sup) and pellets (ppt) of the AHBF strain cell extracts solubilized with detergents using anti-HA and anti-FLAG antibodies. The detergent added none (lane 1), CHAPS (lane 2), Triton X-100 (lane 3), sodium deoxycholate (lane 4), and SDS (lane 5). (B) Scanning densitometry analysis of the amounts of the solubilized CsmA-HA and CsmB-FLAG detected by Western blotting (A). Signals were displayed as percentages. The graphs were shown as the mean ± S.D. calculated from the results of three independent experiments.

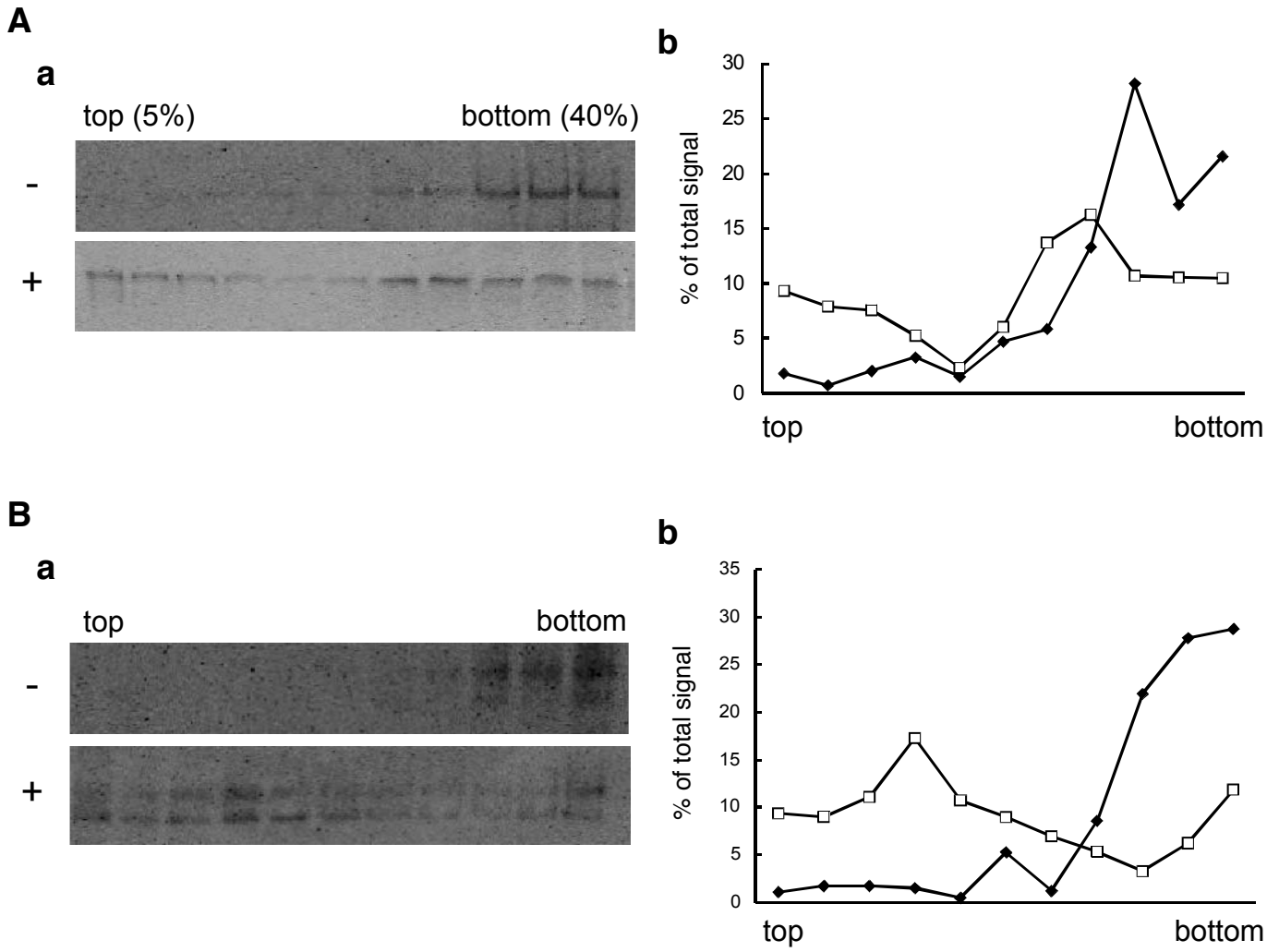


Figure 1-14. Solubilization of CsmA-HA (A) **and CsmB-FLAG** (B) **with Triton X-100**.
The cell extracts of the AHBF (produced CsmA-HA and CsmB-FLAG) strain solubilized with Triton X-100 or not solubilized were fractionated by sucrose gradient (5-40%) centrifugation at 100,000 xg. Western blot analysis of each fractions using anti-HA (A) or anti-FLAG (B) antibody. Each upper panel shows the results from the fractions without soulubilization (-); lower panel shows the results from the fractions solubilized with Triton X-100. (A-b, B-b) Scanning densitometry analysis of signals in each fraction detected by Western blottIng. Black rhomboids; without solubilization, Open squares; solubilized with Triton X-100.

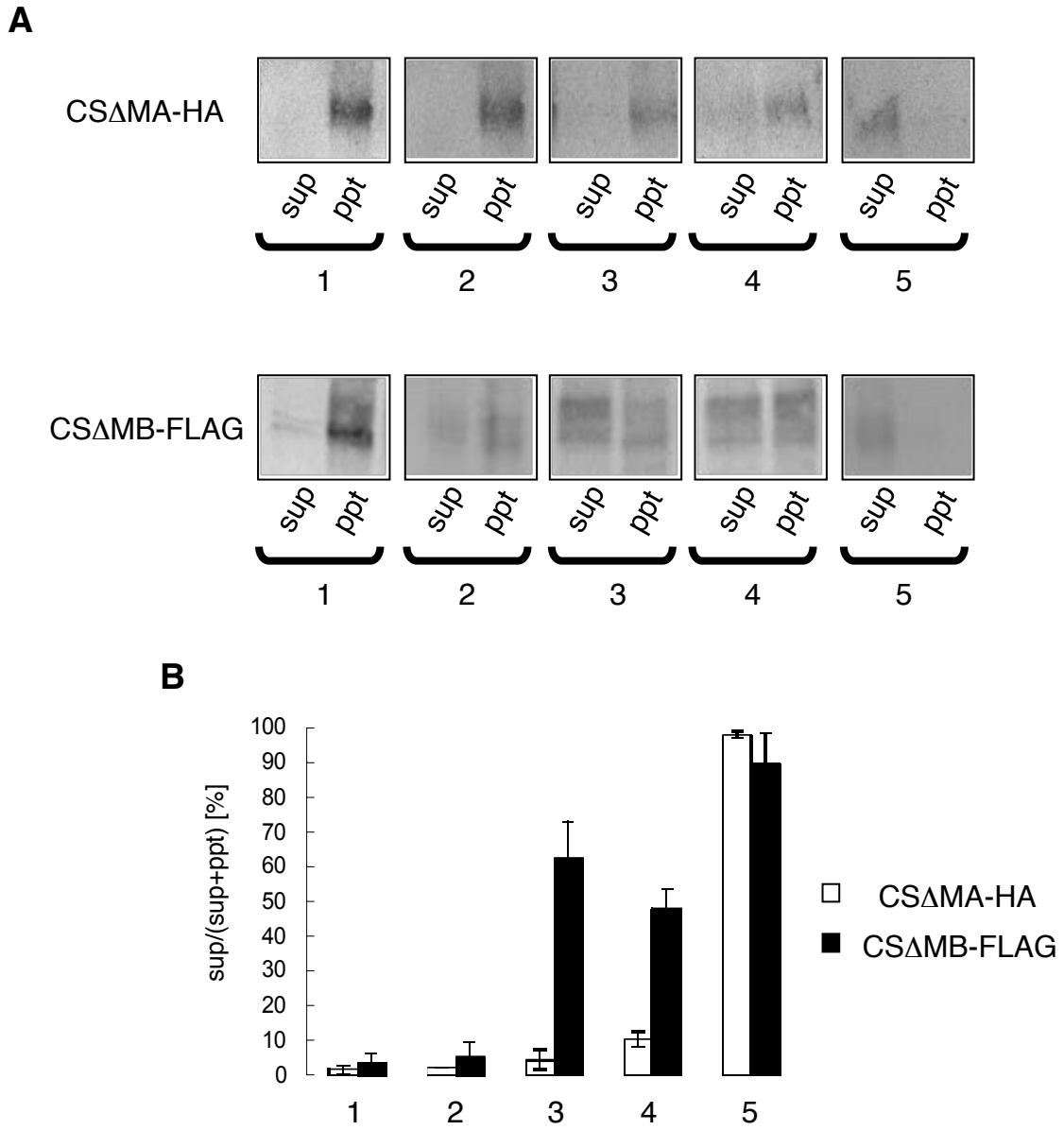


Figure 1-15. Solubilization of CSΔMA-HA and CSΔMB-FLAG.
(A) Western blot analysis of 100,000 xg supernatants (sup) and pellets (ppt) of the CSΔMHA (upper panel) or alc-CSΔMBF strains (lower panel) cell extracts solubilized with detergents using anti-HA or anti-FLAG antibodies. The detergent added none (lane 1), CHAPS (lane 2), Triton X-100 (lane 3), sodium deoxycholate (lane 4), and SDS (lane 5). (B) Scanning densitometry analysis of the amounts of the solubilized CsmA-HA and C smB-FLAG detected by Western blotting (A). Signals were displayed as percentages.

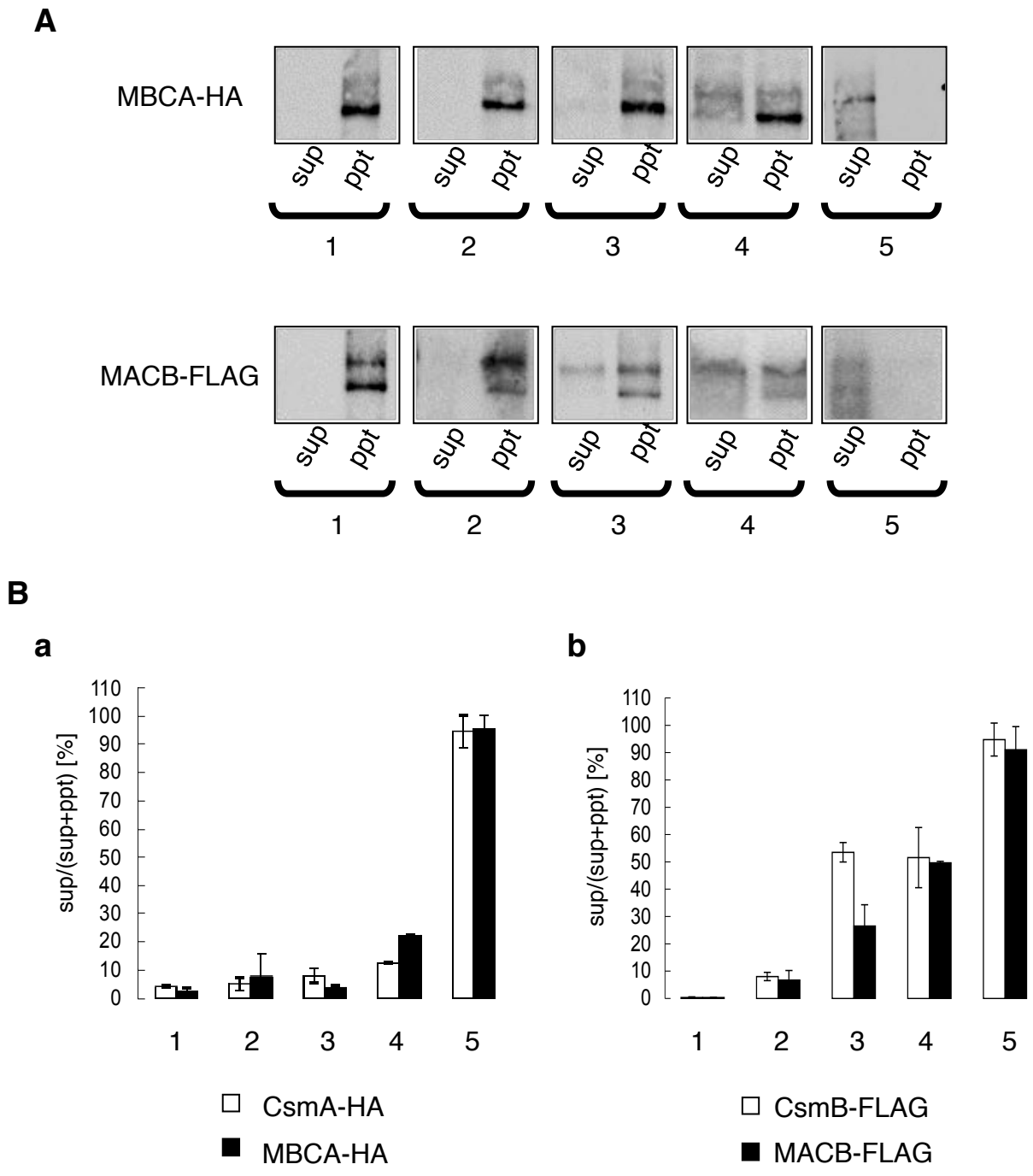


Figure 1-16. Solubilization of MBCA-HA and MACB-FLAG .
(A) Western blot analysis of 100,000 xg supernatants (sup) and pellets (ppt) of the MBCA-HA (upper panel) or MACB-FLAG strains (lower panel) cell extracts solubilized with detergents using anti-HA or anti-FLAG antibodies. The detergent added none (lane 1), CHAPS (lane 2), Triton X-100 (lane 3), sodium deoxycholate (lane 4), and SDS (lane 5). (B) Scanning densitometry analysis of the amounts of the solubilized CsmA-HA and MBCA-HA (a) or CsmB-FLAG and MACB-FLAG (b) detected by Western blotting (Fig. 1-11A and Fig. 1-13A). Signals were displayed as percentages.

第 2 章　CsmA の菌糸内局在化機構

2-1　序

キチンは糸状菌細胞壁の主要構成成分の一つであり、キチンの生合成及び分解による細胞壁のリモデリングは菌糸型の形態形成に必須の機構である。糸状菌の例として、*A. fumigatus* の場合、細胞壁外側はアルカリ可溶性のα-1,3-グルカン、細胞壁内側はアルカリ不溶性のβ-1,3-グルカン、β-1,4-グルカン、β-1,6-グルカン、キチン等から構成されている (Latge, 2007) 。病原菌である *C. albicans*、*M. grisea*、*Histoplasma capsulatum* 等の宿主への感染時、細胞壁外側のマンナンやα-1,3-グルカンが細胞壁内側のβ-1,3-グルカンやキチンをマスクすることにより宿主側の防御機構を抑制し、宿主への感染が行なわれることが示唆されている (Rappleye *et al.*, 2007; Netea *et al.*, 2008; Fujikawa *et al.*, 2009) 。また、多くの病原菌において細胞壁合成酵素遺伝子の破壊株では宿主への感染能が低下することも明らかになっており、細胞壁主要構成成分の一種であるキチンは病原菌の感染における宿主への侵入及び浸潤にも特に重要な役割を果たすと考えられる (Lenardon *et al.*, 2010) 。これまでに明らかとなっているキチン合成酵素は全て複数の膜貫通領域を含むタンパク質であることから小胞輸送により菌糸先端へ局在化すると推定されており (Roncero, 2002) 、糸状菌においては菌糸先端の形質膜上で機能し、菌糸先端における極性的な細胞壁合成に重要な役割を果たすと考えられるが、その局在化のメカニズムに関する報告例は少ない。そこで本章では MMD を持つキチン合成酵素 CsmA の局在化機構について、特に局在化における微小管及びモータータンパク質であるキネシンの機能、MMD の役割について解析した。以下に、クラス V あるいは VI に属するミオシン融合型のキチン合成酵素の局在に関する報告例と、微小管系モータータンパク質であるキネシンの分類と小胞輸送における機能についての知見を述べる。

2-1-1　糸状菌及び二形性酵母におけるクラス V 及び VI キチン合成酵素の局在

植物の炭疽病菌で子嚢菌類に属する *Colletotrichum graminicola* のクラス VI キチン合成酵素 ChsA は生細胞における観察により、分岐した菌糸先端、鎌形あるいは楕円型の分生子の形質膜上、形成初期の隔壁、分生子柄等に局在が観察された (Ammuaykanjanasin and Epstein, 2006) 。またヒトの病原菌であり子嚢菌類に属する二形性酵母 *Wangiella dermatitidis* のクラス V キチン合成酵素

Chs5p は間接蛍光抗体法による観察により、菌糸先端に局在が見られた (Abramczyk *et al*., 2009) 。植物病原菌であり、担子菌類に属する二形性酵母 *Ustilago maydis* には 8 つのキチン合成酵素 Chs1-7 及び Mcs1 が存在し、クラス V に属する Mcs1 は酵母型、菌糸型の形態に関わらず隔壁形成部位に局在が観察された。また、菌糸型細胞の先端部の形質膜上に局在が観察された (Weber *et al*., 2006) 。ごく最近、Mcs1 についてはその MMD が菌糸後方から先端部への輸送に不要であることが示されている (Treitschke *et al*., 2010) 。

A. nidulans のキチン合成酵素のうち、MMD を有する CsmA、CsmB については当研究室において間接蛍光抗体法による局在観察が行なわれ、共に菌糸先端及び形成中の隔壁部位においては局在が観察された (Takeshita *et al*., 2005; Takeshita *et al*., 2006) 。CsmA、CsmB は隔壁形成時、アクチンと同様に X 字型に局在する様子が観察され、その後隔壁の形成に伴って 2 本に分離した構造として局在する様子も観察された (Takeshita *et al*., 2005; Takeshita *et al*., 2006) 。

2-1-2　キネシンの分類と小胞輸送における機能

微小管はアクチンと共に生体内の様々な現象に必須の細胞骨格である。微小管と相互作用し、微小管上を移動するモータータンパク質であるキネシンは、小胞やオルガネラの輸送、分裂期の紡錘糸形成、染色体動態の制御、細胞の形態形成等の多様な機能を担っており、そのアミノ酸配列に基づき 14 個のサブファミリーに分類されている (Fig. 2-1) (Schoch *et al*., 2003) 。出芽酵母 *S. cerevisiae* のゲノム中には 6 個、*A. nidulans* のゲノム中には 10 個のキネシンをコードする遺伝子が存在する (Table 2-1) 。出芽酵母において orphan (未分類) 以外の 5 個のキネシンは全て有糸分裂に機能するのに対し、*A. nidulans* の場合、有糸分裂以外にもクラス I、III、VII に分類される KinA、KipA、UncA がオルガネラや小胞の輸送に関わることで菌糸先端生長に機能することが示唆されている (Fischer *et al*., 2008) 。*A. nidulans* の 10 個のキネシンをコードする遺伝子のうち、クラス V に属する *bimC* は必須遺伝子であるが、他の 9 個は全て単独破壊が致死とならない (Enos and Morris, 1990) 。出芽酵母においてもクラス V に属する *cin8*Δ及び *kip1*Δの二重破壊は致死となる。BimC は形成された紡錘極体 (SPB: spindle pole body) の核内両極への移動に機能することが示唆されている (O' Connell *et al*., 1993) 。KinA (クラス I) 及び UncA、UncB (クラス III) は

S. cerevisiae には存在しないクラスのキネシンであり、動物細胞の神経ニューロンやメラノソームなどの色素細胞においても、小胞輸送に機能することが示唆されている (Ross *et al.*, 2008) 。*kinA* 破壊株は野生型株と比較して生育が遅延し、微小管マイナス端方向への細胞内輸送に関わるダイニン (NudA) が微小管先端に局在化できなくなること、菌糸先端付近に小胞の異常蓄積が見られることが報告されている (Requena *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2003; Abenza *et al.*, 2009) 。*uncA* 破壊株及び *uncB* 破壊株では生育遅延が見られ、通常の生育条件下では顕著な菌糸の形態異常は観察されないが、高温条件下で菌糸の多分岐や湾曲が観察された (Zekert and Fischer, 2009) 。UncA は微小管上をプラス端方向へ移動する様子が観察され、モータードメインのアミノ酸置換により微小管上の移動が不能となった変異型 KinA 及び変異型 UncA (KinA^{rigor} and UncA^{rigor}) はフィラメント状に局在が観察され、微小管のフィラメントとの共局在が観察された (Zekert and Fischer, 2009) 。

S. cerevisiae におけるクラス VII キネシン Kip2p は、細胞分裂時、SPB あるいは細胞質微小管上に局在し、微小管の伸長と収縮の動態に関わる微小管プラス端集積因子 (+TIPs) の一種であるである Bik1p や、ダイニン Dyn1p を微小管プラス端に局在化させることにより、核及び SPB の位置決定に関わっている (Maekawa *et al.*, 2003; Sheeman *et al.*, 2003; Carvalho *et al.*, 2004) 。一方 *A. nidulans* のクラス VII キネシン KipA は微小管プラス端に常に局在化し、Bik1p のホモログである ClipA、及び、細胞端を認識し+TIPs の局在化に関わる cell end marker タンパク質 TeaA の正常な局在化に機能している (Efimov *et al.*, 2006; Takeshita *et al.*, 2008) 。また出芽酵母の場合と異なり KipA はダイニン NudA の局在化には関わらないことが示唆されている (Zhang *et al.*, 2003) 。*kipA* 破壊株では微小管は菌糸先端方向へ伸長できるが、野生型株のように菌糸先端で一本に収束せず、その結果菌糸の湾曲が頻繁に観察される (Konzack *et al.*, 2005) 。クラス VIII キネシン Kip3p（*S. cerevisiae*）及び KipB (*A. nidulans*) は共に微小管の脱安定化に機能すること、クラス XIV キネシン Kar3p (*S. cerevisiae*) 及び KlpA (*A. nidulans*) は共に微小管マイナス端への運動能を持つことなどが明らかとなっているが、*A. nidulans* のクラス IV、VI、X に属するキネシンを含め、小胞輸送における機能は不明である。

糸状菌におけるキチン合成酵素は、菌糸先端あるいは隔壁形成部位に局在化

し、菌糸先端生長に重要な役割を果たすと考えられる。小胞体からゴルジ体へのタンパク質輸送を阻害するブレフェルディン、微小管重合阻害剤であるベノミル及びノコダゾール、アクチン細胞骨格重合阻害剤であるサイトカラシン等の薬剤処理によるキチン合成酵素の局在変化から、菌糸先端への輸送経路が示唆されているが (Takeshita *et al.*, 2005; Riquelme *et al.*, 2007; Abramczyk *et al.*, 2009; Treitschke *et al.*, 2010) 、その詳細については不明な点が多い。そこで本章では、*A. nidulans* の CsmA について、生細胞を用いた局在解析を行い、微小管上を移動するモータータンパク質として知られるキネシンとの機能的相関、相互作用等について検討し、菌糸先端への局在化機構を解析した。

2-2　材料と方法

2-2-1　菌株

Escherichia coli :
DH5α (第 1 章 1-2-1 参照)

Aspergillus nidulans :
本章で用いた *A. nidulans* 菌株を Table 2-2 に示した。

2-2-2　培地

2-2-3　DNA の取り扱い法

2-2-4　塩基配列の決定法

2-2-5　*E. coli* の形質転換法と *E. coli* からのプラスミド抽出法

以上の項目については第 1 章「1-2　材料と方法」と同様に行なった。ただし、「2-2-2　培地」については *alcA* プロモーターを用いて発現を誘導する際、必要に応じて炭素源を glucose から 2% (v/v) glycerol に変更した培地 (MMGly 培地) も使用した。

2-2-6　プラスミドの構築

本章で用いたオリゴヌクレオチドを Table 2-3 に示した。

本章で使用したプラスミドを以下のように構築あるいは利用した。
pNZ59: TlgB の N 末端側に mRFP を付加した mRFP-TlgB を *alcA* プロモーター下で発現し生産する株の作製に使用した (Zekert and Fischer, 2009) 。

pMAEC: CsmA の N 末端側に EGFP を付加した EGFP-CsmA を *alcA* プロモーター下で発現し生産する株の作製に使用した (竹下, 2005) 。

pM-ALK-CHS5: EGFP-CsmA を *alcA* プロモーター下で発現し生産する株の作製の際、サザン解析のプローブとして使用した (Horiuchi *et al*., 1999) 。

pNZ13: *uncA* 破壊株の作製に使用した (Zekert and Fischer, 2009) 。

pCS5-NZ: KinA の N 末端側に mRFP を付加し、KinA の ATPase ドメイン中の 59 番目のグリシン (G) をグルタミン酸 (E) に置換した mRFP-KinA^{rigor} を *alcA* プロモーター下で発現し生産する株の作製に使用した (Zekert and Fischer, 2009) 。

pEGFP-ΔMA: N 末端側に EGFP を付加し、MMD を欠失した CsmA (EGFP-ΔMA) を *alcA* プロモーター下で発現し生産する株の作製に使用した。

AP1 (第 1 章 1-2-6 参照) 及び 3-DMA-EGFP をプライマーとして、EGFP-CsmA1 株 (Table 2-2 参照) の total DNA を鋳型として用い、*csmA* のプロモーター領域、*argB* マーカー、*alcA* プロモーター領域、及び EGFP をこの順に連結してコードする約 4.3 kb の断片を PCR により増幅した。また、5-EGFP-DMA 及び 3-DMA をプライマーとして、同様の鋳型を用いて CsmA の 861 番目以降のアミノ酸の一部をコードする約 1 kb の断片を増幅した。これらの断片を Double-joint PCR 法 (1-2-7 参照) により連結し kination 後、SmaI 消化し BAP 処理を行なった pUC18 に連結し、pEGFP-ΔMA を作製した。

pEGFP-D10A: N 末端側に EGFP を付加し、MMD 中のアクチンとの結合に必要な 347 番目から 356 番目の 10 アミノ酸を欠失した CsmA (D10A) を *alcA* プロモーター下で発現し生産する株の作製に使用した。

AP1 及び A-5-for-EGFP-r をプライマーとして、EGFP-CsmA1 の total DNA を鋳型として用い、*csmA* のプロモーター領域、*argB* マーカー、*alcA* プロモーター領域、及び EGFP をこの順に連結してコードする約 4.3 kb の断片を PCR により増幅した。また、A-5-for 及び A-3-rev をプライマーとして、D10AHA 株

(Table 2-2 参照) の total DNA を鋳型として用い、D10A の MMD の 10 アミノ酸欠失部分の前後をコードする約 2.0 kb の断片を PCR により増幅した。これらの断片を Double-joint PCR 法により連結し末端の平滑化処理後、SmaI 消化し BAP 処理を行なった pUC18 に連結し、pEGFP-D10A を作製した。

pmDsRed-CsmA: CsmA の N 末端側に mDsRed を付加した mDsRed-CsmA を *alcA* プロモーター下で発現し生産する株の作製に使用した。

AP1 及び DR-alcA-rev をプライマーとして、EGFP-CsmA1 の total DNA を鋳型として用い、*csmA* のプロモーター領域、*argB* マーカー、及び *alcA* プロモーター領域をこの順に連結してコードする約 3.6 kb の断片を PCR により増幅した。また、DR-csmA1-for 及び csmA1-rev をプライマーとして、同様の鋳型を用い、CsmA の MMD をコードする約 1.0 kb の断片を増幅した。また、DR-for 及び DR-rev をプライマーとして、pDsRed-Monomer (Clontech) を鋳型として用い、mDsRed をコードする約 0.7 kb の断片を PCR により増幅した。これらの断片を Double-joint PCR 法により連結し末端の平滑化処理後、SmaI 消化し BAP 処理を行なった pUC18 に連結し、pmDsRed-CsmA を作製した。

pANAF: CsmA の C 末端側に 3xFLAG を付加した CsmA-FLAG を *argB* 部位において発現し生産する株の作製に使用した (前田, 2010) 。

2-2-7　*A. nidulans* の形質転換法
2-2-8　*A. nidulans* の全 DNA 抽出法
2-2-9　サザン解析
以上の項目については第 1 章「1-2　材料と方法」と同様に行なった。

2-2-10　本章で用いた株の作製
EGFP-CsmA/mRFP-TlgB1, 2: *csmA* 及び *tlgB* の本来の部位で *alcA* プロモーター下で EGFP-CsmA 及び mRFP-TlgB を発現し生産する株を作製するため、pNZ59 (2-2-6 参照) 由来の約 5.1 kb の EcoRI-BglII 断片を用いて、EGFP-CsmA1 株を親株として形質転換し、ピリドキシン要求性の回復した形質転換体を取得した。これらの株の全 DNA を調製し、サザン解析を行い目的の株が 2 株以上得られたことを確認し (Fig. 2-2 A and B) 、これらのうち 2 株を

EGFP-CsmA/mRFP-TlgB1, 2 株と命名した。なお、サザン解析に用いたプローブは、TlgB-up1kb-for 及び TlgB-1kb-rev をプライマーとして、ABPU1 株 (Table 2-2 参照) total DNA を鋳型として用い、*tlgB* の上流及び *tlgB* のコード領域を含む約 2.0 kb の断片を PCR により増幅して作製した。また、これら 2 株及び親株である EGFP-CsmA1 株の細胞抽出液を 2-2-11 (1-2-14) で述べた方法で調製し、2-2-14 (1-2-17) で述べた方法で抗 mDsRed 抗体によるウェスタン解析を行なった。その結果、これら 2 株について mRFP-TlgB と予想される約 68 kDa にシグナルが検出され、mRFP-TlgB が安定に生産されていることを確認した (Fig. 2-1 C、結果は 1 株についてのみ示し、以下株作製の際のウェスタン解析については結果は同様に 1 株についてのみ示す) 。

EGFP-CsmAΔkinA1, 2, EGFP-CsmAΔkipA1, 2: *kinA* 破壊株あるいは *kipA* 破壊株において *alcA* プロモーター下で EGFP-CsmA を発現し生産する株を作製するため、pMAEC (2-2-6 参照) 由来の約 4.1 kb の SmaI 断片を用いて、SNR1 株 (Δ*kinA* 株) あるいは SSK44 株 (Δ*kipA* 株) (Table 2-2) を親株として形質転換を行い、アルギニン要求性の回復した形質転換体を取得した。これらの株の全 DNA を調製し、pM-ALK-CHS5 (2-2-6 参照) 由来の約 1.0 kb の SpeI-XhoI 断片をプローブとしてサザン解析を行い、目的の株がそれぞれ 2 株以上得られたことを確認した (Fig. 2-3) 。これらのうち 2 株を EGFP-CsmAΔkinA1, 2 株あるいは EGFP-CsmAΔkipA1, 2 株と命名した。

EGFP-CsmAΔuncA1, 2: *uncA* 破壊株において *alcA* プロモーター下で EGFP-CsmA を発現し生産する株を作製するため、pNZ13 (2-2-6 参照) を鋳型として UncA-LB-fwd 及び UncA-RB-rev (Table 2-3) をプライマーとして PCR により増幅した約 4.0 kb の断片を用いて、EGFP-CsmA1 株を親株として形質転換を行ない、ピリドキシン要求性の回復した形質転換体を取得した。これらの株の全 DNA を調製し、サザン解析を行い目的の株が 2 株以上得られたことを確認し (Fig. 2-4) 、これらのうち 2 株を EGFP-CsmAΔuncA1, 2 株と命名した。なお、サザン解析に用いたプローブは UncA-RB-Sfi-fwd 及び UncA-RB-rev をプライマーとして、ABPU1 株 total DNA を鋳型として用い、*uncA* の下流領域をコードする約 1.0 kb の断片を PCR により増幅して作製した。

EGFP-CsmA/mRFP-KinA^{rigor}1, 2: *alcA* プロモーター下で EGFP-CsmA を生産する株において、*kinA* の本来の部位において、N 末端側に mRFP を付加し、59 番目の G を E に置換した mRFP-KinA^{rigor} を *alcA* プロモーター下で発現し生産する株を作製するため、pCS5-NZ (2-2-6 参照) 由来の約 5.1 kb の EcoRI-BglII 断片を用いて、EGFP-CsmA1 株を親株として形質転換し、ピリドキシン要求性の回復した形質転換体を取得した。これらの株の全 DNA を調製し、サザン解析を行い目的の株が 2 株以上得られたことを確認し (Fig. 2-5 A and B) 、これらのうち 2 株を EGFP-CsmA/mRFP-KinA^{rigor}1, 2 株と命名した。なお、サザン解析に用いたプローブは、KinA-up1kb-for 及び KinA-1kb-rev をプライマーとして、ABPU1 株 total DNA を鋳型として用い、*kinA* の上流及び *kinA* のコード領域を含む約 2.0 kb の断片を PCR により増幅して作製した。また、これら 2 株及び親株である EGFP-CsmA1 株の細胞抽出液を 2-2-11 で述べた方法で調製し、2-2-14 で述べた方法で抗 mDsRed 抗体によるウェスタン解析を行なった。その結果、これら 2 株について mRFP-KinA^{rigor} と予想される約 131 kDa にシグナルが検出され、mRFP-KinA^{rigor} が安定に生産されていることを確認した (Fig. 2-5 C) 。

EGFP-ΔMA1, 2: N 末端側に EGFP を付加し、MMD を欠失した CsmA (EGFP-ΔMA) を *alcA* プロモーター下で発現し生産する株を作製するため、pEGFP-DMA (2-2-6 参照) 由来の約 5.3 kb の SmaI 断片を用いて、ABPU1 株を親株として形質転換を行い、アルギニン要求性の回復した形質転換体を取得した。これらの株の全 DNA を調製し、pM-ALK-CHS5 (2-2-6 参照) 由来の約 1.0 kb の SpeI-XhoI 断片をプローブとしてサザン解析を行い、目的の株がそれぞれ 2 株以上得られたことを確認した (Fig. 2-6 A and B) 。これらのうち 2 株を EGFP-ΔMA1, 2 株と命名した。また、これら 2 株、親株である ABPU1 株、及び EGFP-CsmA1 株の細胞抽出液を 2-2-11 で述べた方法で調製し、2-2-14 で述べた方法で抗 GFP 抗体によるウェスタン解析を行なった。その結果、これら 2 株について EGFP-ΔMA と予想される約 165 kDa にシグナルが検出され、EGFP-ΔMA が生産されていることを確認した (Fig. 2-6 C) 。

EGFP-D10A1, 2: N 末端側に EGFP を付加し、MMD 中のアクチンとの結合に必要な 10 アミノ酸を欠失した CsmA (EGFP-D10A) を *alcA* プロモーター下で発現し生産する株を作製するため、pEGFP-D10A (2-2-6 参照) 由来の約 6.3 kb の

SmaI 断片を用いて、ABPU1 株を親株として形質転換を行い、アルギニン要求性の回復した形質転換体を取得した。これらの株の全 DNA を調製し、pM-ALK-CHS5 由来の約 1.0 kb の SpeI-XhoI 断片をプローブとしてサザン解析を行い、目的の株がそれぞれ 2 株以上得られたことを確認した (Fig. 2-7 A and B) 。これらのうち 2 株を EGFP-D10A1, 2 株と命名した。また、これら 2 株、親株である ABPU1 株、及び EGFP-CsmA1 株の細胞抽出液を 2-2-11 で述べた方法で調製し、2-2-14 で述べた方法で抗 GFP 抗体によるウェスタン解析を行なった。その結果、これら 2 株について EGFP-D10A と予想される約 240 kDa にシグナルが検出され、EGFP-D10A が生産されていることを確認した (Fig. 2-7 C) 。

EGFP-ΔMA/mRFP-TlgB1, 2, EGFP-D10A/mRFP-TlgB1, 2: EGFP-ΔMA あるいは EGFP-D10A と mRFP-TlgB を *alcA* プロモーター下で発現し生産する株を作製するため、pNZ59 由来の約 5.1 kb の EcoRI-BglII 断片を用いて、EGFP-ΔMA1 株あるいは EGFP-D10A1 株を親株として形質転換を行い候補株を取得し、EGFP-CsmA/mRFP-TlgB1 と同様のサザン解析により目的の株をそれぞれ 2 株作製した。これらの株を EGFP-ΔMA/mRFP-TlgB1, 2 あるいは EGFP-D10A/mRFP-TlgB1, 2 株と命名した。

EGFP-ΔMA/mRFP-KinA^{rigor}1, 2: EGFP-ΔMA 及び mRFP-KinA^{rigor} を *alcA* プロモーター下で発現し生産する株を作製するため、pCS5-NZ 由来の約 5.1 kb の EcoRI-BglII 断片を用いて、EGFP-ΔMA1 株を親株として形質転換を行い候補株を取得し、EGFP-CsmA/mRFP-KinA^{rigor}1 と同様のサザン解析により目的の株を 2 株作製した (Fig. 2-5) 。これらの株を EGFP-ΔMA/mRFP-KinA^{rigor}1, 2 株と命名した。

EGFP-D10A/mRFP-KinA^{rigor}1, 2: EGFP-D10A 及び mRFP-KinA^{rigor} を *alcA* プロモータ下で発現し生産する株を作製するため、pCS5-NZ 由来の約 5.1 kb の EcoRI-BglII 断片を用いて、EGFP-D10A1 株を親株として形質転換を行い候補株を取得し、EGFP-CsmA/mRFP-KinA^{rigor}1 と同様のサザン解析により目的の株を 2 株作製した (Fig. 2-5) 。これらの株を EGFP-D10A/mRFP-KinA^{rigor}1, 2 株と命名した。

ABPU1/mRFP-KinA^{rigor}1, 2: mRFP-KinA^{rigor}を *alcA* プロモーター下で発現し生産する株を作製するため、pCS5-NZ 由来の約 5.1 kb の EcoRI-BglII 断片を用いて、ABPU1 株を親株として形質転換を行い候補株を取得し、EGFP-CsmA/mRFP-KinA^{rigor}1 と同様のサザン解析により目的の株を 2 株作製した (Fig. 2-5) 。これらの株を ABPU1/mRFP-KinA^{rigor}1, 2 株と命名した。

CsmA-HA/mRFP-KinA^{rigor}1, 2: CsmA-HA 及び mRFP-KinA^{rigor}を発現し生産する株を作製するため、pCS5-NZ 由来の約 5.1 kb の EcoRI-BglII 断片を用いて、CA2 株 (Takeshita *et al*., 2002) (Table 2-2) を親株として形質転換を行い候補株を取得し、EGFP-CsmA/mRFP-KinA^{rigor}1 と同様のサザン解析により目的の株を 2 株作製した (Fig. 2-5) 。これらの株を CsmA-HA/mRFP-KinA^{rigor}1, 2 株と命名した。

CSΔMHA/mRFP-KinA^{rigor}1, 2: MMD 欠失型 CsmA-HA (CSΔMA-HA) 及び mRFP-KinA^{rigor}を発現し生産する株を作製するため、pCS5-NZ 由来の約 5.1 kb の EcoRI-BglII 断片を用いて、CSΔMHA 株 (Takeshita *et al*., 2005) (Table 2-2) を親株として形質転換を行い候補株を取得し、EGFP-CsmA/mRFP-KinA^{rigor}1 と同様のサザン解析により目的の株を 2 株作製した (Fig. 2-5) 。これらの株を CSΔMHA/mRFP-KinA^{rigor}1, 2 株と命名した。

D10AHA/mRFP-KinA^{rigor}1, 2: 10 アミノ酸欠失型 CsmA-HA (D10A-HA) 及び mRFP-KinA^{rigor}を発現し生産する株を作製するため、pCS5-NZ 由来の約 5.1 kb の EcoRI-BglII 断片を用いて、D10AHA 株 (Takeshita *et al*., 2005) (Table 2-2) を親株として形質転換を行い候補株を取得し、EGFP-CsmA/mRFP-KinA^{rigor}1 と同様のサザン解析により目的の株を 2 株作製した (Fig. 2-5) 。これらの株を D10AHA/mRFP-KinA^{rigor}1, 2 と命名した。

mDsRed-CsmA/EGFP-KipA^{rigor}1, 2: N 末端側に mDsRed を付加した mDsRed-CsmA、及び N 末端側に EGFP を付加し、223 番目の G を E に置換した EGFP-KipA^{rigor}を *csmA* 及び *kipA* の本来の位置で *alcA* プロモーター下で発現し生産する株を作製するため、pmDsRed-CsmA (2-2-6 参照) 由来の約 5.3 kb の SmaI 断片を用いて、SSK114 株 (Konzack *et al*., 2005) (Table 2-2) を親株として形質転換を行い、アルギニン要求性の回復した形質転換体を取得した。これ

らの株の全 DNA を調製し、pM-ALK-CHS5 由来の約 1.0 kb の SpeI-XhoI 断片をプローブとしてサザン解析を行い、目的の株がそれぞれ 2 株以上得られたことを確認した (Fig. 2-8 A and B) 。これらのうち 2 株を mDsRed-CsmA/EGFP-KipA^{rigor}1, 2 株と命名した。また、これら 2 株及び親株である SSK114 株の細胞抽出液を 2-2-11 で述べた方法で調製し、2-2-14 で述べた方法で抗 mDsRed 抗体によるウェスタン解析を行なった。その結果、これら 2 株について mDsRed-CsmA と予想される約 240 kDa にシグナルが検出され、mDsRed-CsmA が安定に生産されていることを確認した (Fig. 2-8 C) 。

CsmA-FLAG/EGFP-KipA^{rigor}1, 2: EGFP-KipA^{rigor} を *kipA* 本来の位置で *alcA* プロモーター下で発現し生産し、C 末端側に 3xFLAG を付加した CsmA-FLAG を *argB* 部位で *csmA* のプロモーター下で発現し生産する株を作製するため、pANAF (2-2-6 参照) 由来の約 12.0 kb の SmiI 断片を用いて、SSK114 株を親株として形質転換を行い、アルギニン要求性の回復した形質転換体を取得した。これらの株の全 DNA を調製し、第 1 章 MACBΔA1 株と同様のサザン解析 (Fig. 1-3) により目的の株を 2 株作製した。これらの株を CsmA-FLAG/EGFP-KipA^{rigor}1, 2 株と命名した。

mRFP-KinA^{rigor}/EGFP-KipA^{rigor}1, 2: mRFP-KinA^{rigor} 及び EGFP-KipA^{rigor} を *alcA* プロモーター下で発現し生産する株を作製するため、pCS5-NZ 由来の約 5.1 kb の EcoRI-BglII 断片を用いて、SSK114 株を親株として形質転換を行い候補株を取得し、EGFP-CsmA/mRFP-KinA^{rigor}1 と同様のサザン解析により目的の株を 2 株作製した (Fig. 2-5) 。これらの株を mRFP-KinA^{rigor}/EGFP-KipA^{rigor}1, 2 株と命名した。

mRFP-KinA^{rigor}ΔkipA1, 2: *kipA* 破壊株において、mRFP-KinA^{rigor} を *alcA* プロモーター下で発現し生産する株を作製するため、pCS5-NZ 由来の約 5.1 kb の EcoRI-BglII 断片を用いて、A1149/ΔkipA 株 (Table 2-2) を親株として形質転換を行い候補株を取得し、EGFP-CsmA/mRFP-KinA^{rigor}1 と同様のサザン解析により目的の株を 2 株作製した (Fig. 2-5) 。これらの株を mRFP-KinA^{rigor}/ΔkipA1, 2 株と命名した。

以上、本章で作製し命名したそれぞれの株 1 番、2 番の 2 株については、YTFuu 固体完全培地及び MMTFuu 最少培地上で生育させ、生育速度及び表現型に顕著な違いが見られないことを確認し、以降の解析では全て 1 番の株を用い、番号を省略して表記した。

2-2-11　*A. nidulans* の細胞抽出液の調製

2-2-12　細胞抽出液の分画

2-2-13　タンパク質の定量

2-2-14　ウェスタン解析

以上の項目については第 1 章「1-2　材料と方法」と同様に行なった。ただし、抗 mDsRed 抗体、抗 GFP 抗体、及び抗α-tubulin 抗体によるウェスタン解析を行なう際は、総タンパク質量が約 20 μg となるように調製し、SDS-PAGE、トランスファー後、Can Get Signal (TOYOBO) により 1:1000 に希釈したラビット由来の抗 mDsRed 抗体 (Clontech) 、1:500 に希釈したマウス由来の抗 GFP 抗体 (Clontech) 、1:1000 に希釈したマウス由来の抗α-tubulin 抗体 (SIGMA) を含む溶液中で一次抗体処理を行い、Can Get Signal により 1:5000 に希釈した HRP が連結した mouse IgG 抗体 (SIGMA) あるいは 1:1000 に希釈した HRP が連結した rabbit IgG 抗体 (SIGMA) を含む溶液中で二次抗体処理を行なった。

2-2-15　蛍光顕微鏡による観察

MMTFuu 液体培地で 14-16 h 生育させた菌体の形質膜の染色には DMSO 中に溶解させた N-(3-triethylammoniumpropyl)-4-(6-(4-(diethylamino)phenyl)hexatrienyl)pyridinium dibromide (FM4-64, Molecular Probes) を終濃度で 4 μM となるように添加し (1.6 mM の濃度のものを 1:400 に希釈して使用した) 、37℃で 5 分間静置し、その後液体培地で数回洗浄し、顕微鏡観察に供した。微小管重合阻害剤であるベノミルによる菌体処理は、MMTFuu 液体培地で 14-16 h 生育させた菌体にエタノール中に溶解させたベノミル (ALDRICH) を終濃度で 2.4 μM となるように添加し (2.4 mM の濃度のものを 1:1000 に希釈して使用した) 、37℃で 10 分あるいは 30 分静置し、その後液体培地で数回洗浄し、顕微鏡観察に供した。MMTFuu 液体培地あるいは固体培地で 8-10 h 生育させた菌体の CFW による染色は、第 1 章「1-2-18　間接蛍光抗体法による観察」に示した終濃度で行なったが、染色時間は 2 分とした。

2-2-16　ショ糖密度勾配遠心法及び分画

2-2-17　免疫沈降法

以上の項目については第 1 章「1-2　材料と方法」と同様に行なった。ただし、必要に応じて 2-2-12 (1-2-15) の方法により分画したサンプルに菌体破砕用緩衝液 200 μl を加えて免疫沈降を行なった。また、抗 HA 抗体による免疫沈降の際は抗 HA 抗体を 1:150 に希釈される濃度で用いた。

2-3　結果

2-3-1　生細胞における CsmA の菌糸内局在

CsmA の菌糸内局在について生細胞を用いて検討するため、*alcA* プロモーター下で EGFP-CsmA を発現し生産する株 (EGFP-CsmA1 株) (Table 2-2) を用いた。EGFP-CsmA1 株を *alcA* プロモーターによる発現を誘導する条件として炭素源にスレオニンを含む固体培地で生育させた場合、低頻度でバルーン構造が観察されるが (竹下, 2005) 、それ以外に野生型株と比較して顕著な表現型の異常が観察されなかったことから、*alcA* プロモーター下で高発現させた EGFP-CsmA は機能的であると判断した。EGFP-CsmA1 株をスレオニンを含む培地で生育させ、形質膜のマーカーである FM4-64 による染色を行い、両者の局在部位を観察した (Fig. 2-9 A) 。観察の結果、EGFP-CsmA の蛍光は菌糸先端部を含む形質膜上に観察され、FM4-64 による形質膜上の蛍光と一部近接した部位に見られた (Fig. 2-9 A and Table 2-4) 。EGFP-CsmA の蛍光は菌糸先端部に最も強く観察されたが、先端から後方の菌糸内においてもドット状の蛍光が観察されたことから、このドット状の蛍光の局在について解析した。*S. cerevisiae* の t-SNARE の一種である Tlg2 の *A. nidulans* におけるホモログ TlgB をエンドソームマーカータンパク質として用い (Zekert and Fischer, 2009) 、EGFP-CsmA 及び mRFP-TlgB を同時に生産する株 (EGFP-CsmA/mRFP-TlgB 株) (Table 2-2) を用いて、両者の局在を観察したところ、菌糸先端部及び先端からやや後方の菌糸内において両者のドット状の蛍光が近接した部位に観察された (Fig. 2-9 B) 。また、観察した菌糸先端のうち 10%以下の低頻度ではあるが (n=100) 、EGFP-CsmA の菌糸最先端部の Spk 付近における局在や先端からやや後方の形質膜上における局在が観察された (Fig. 2-9 B, Tips, 上段 2 つ) 。Spk 付近における局在は mRFP-TlgB と近接した部位に観察されたが、先端からやや後方の形質膜上における局在は mRFP-TlgB の局在部位と近接していなかっ

た（Fig. 2-9 B, Tips, 下段）。また、菌糸先端から後方の菌糸内における EGFP-CsmA のドット状の蛍光の一部は mRFP-TlgB のドット状の蛍光と近接した部位に観察された（Fig. 2-9 B, Basal）。これらの観察結果から、EGFP-CsmA は菌糸先端付近の形質膜上及び一部菌糸内のエンドソームに局在することが示された。

なお、*alcA* プロモーターにおける発現を誘導する条件として炭素源にスレオニンを用いたことによる高発現の影響が考えられたため、炭素源にグリセロールを用い、*alcA* プロモーターによる発現誘導を抑えた場合についても局在観察を行なったが、局在に顕著な違いが見られなかったことから、以降の解析では *alcA* プロモーターによる発現を誘導する条件として炭素源にスレオニンを用いた。

2-3-2　ベノミル処理による CsmA の局在変化

CsmA の菌糸先端への局在化における微小管の役割について検討するため、微小管重合阻害剤であるベノミルによる EGFP-CsmA1 株の菌糸処理を行い、EGFP-CsmA の菌糸先端における局在を観察した（Fig. 2-10 A）。観察の結果、菌糸先端部の細胞質においてドット状の局在となるもの（punctate)、菌糸先端部の細胞質全体に弱い蛍光が拡散するもの（dispersed)、殆ど蛍光が観察できないもの（no signal）といった局在異常が見られ、観察した菌糸先端の約 70 %についてこのような局在異常が見られた（Fig. 2-10 A and Table 2-4）。

2-3-3　キネシン遺伝子破壊株における CsmA の局在

前項 2-3-2 の結果から、CsmA の菌糸先端への正常な局在化に微小管が関わることが予想されたので、微小管上を移動するモータータンパク質であるキネシンの役割について検討した。*A. nidulans* のゲノム中には 11 個のキネシンをコードする遺伝子が存在し、それらのうちキネシン *kinA*、*kipA*、*uncA* は小胞輸送による菌糸先端生長に関わることが示唆されている（Requena *et al.*, 2001; Konzack *et al.*, 2005; Zekert and Fischer, 2009）。そこで、これらのキネシンをコードする遺伝子が破壊された遺伝学的背景において、*alcA* プロモーター下で EGFP-CsmA を発現し生産する株（EGFP-CsmAΔkinA 株、EGFP-CsmAΔkipA 株、EGFP-CsmAΔuncA 株）（Table 2-2）を作製し、EGFP-CsmA の菌糸内局在を観察した。観察の結果、*kinA* 破壊株及び *kipA* 破壊株においてはベノミル処理

の場合と同様に、EGFP-CsmA の菌糸先端における局在異常が見られた (Fig. 2-10 B and Table 2-4) 。*kipA* 破壊株においては *kinA* 破壊株よりも更に菌糸先端における蛍光が殆ど観察されなくなる菌糸の割合が高かった (Table 2-4, no signal) 。一方、*uncA* 破壊株においては野生型株と比較してやや局在異常が見られる割合が高いものの、*kinA* 破壊株あるいは *kipA* 破壊株の場合やベノミル処理の場合ほどの顕著な局在の異常は見られなかった (Fig. 2-10 B and Table 2-4) 。また、EGFP-CsmA は形成中の隔壁部位における局在が観察されており (竹下, 2005; Fig. 2-10 B, WT) 、これらのキネシンの破壊株においても隔壁形成部位における局在は正常に観察された (Fig. 2-10 B) 。更に、EGFP-CsmA1 株、EGFP-CsmAΔkinA 株、EGFP-CsmAΔkipA 株、EGFP-CsmAΔuncA 株の細胞抽出液を用いて遠心分離による細胞内分画を行い、抗 GFP 抗体によるウェスタン解析を行なったところ、全ての株の細胞抽出液について主として P10 画分に EGFP-CsmA のシグナルが検出され、キネシン遺伝子の破壊により存在する画分に顕著な違いは見られなかった (Fig. 2-10 C) 。これらの結果から、菌糸先端における CsmA の局在化に少なくとも微小管及びキネシン KinA 及び KipA が関与することが示唆された。

2-3-4　CsmA の局在化におけるクラス I キネシン KinA の機能

前項 2-3-3 の結果から、CsmA の菌糸先端における局在化にキネシンの分類上クラス I に属する KinA が関わることが示唆された。クラス I に属するキネシンはいわゆる conventional kinesin であり、一部の糸状菌においては微小管プラス端方向への小胞輸送に関わることが予想されており (Steinberg, 2007) 、次に CsmA と KinA との機能的相関について検討した。

2-3-4-1　CsmA と KinA との局在比較

CsmA と KinA の局在を比較するため、EGFP-CsmA 及び mRFP-KinA^{rigor} を同時に生産する株を作製した (EGFP-CsmA/mRFP-KinA^{rigor} 株) (Table 2-2) 。KinA^{rigor} は KinA のモーター活性を持つとされる N 末端側の ATPase ドメインにアミノ酸置換を導入した変異型タンパク質であり、モーター機能の欠損により微小管上を移動できず、微小管に沿った形でフィラメント状の局在を示す (Zekert and Fischer, 2009) 。mRFP-KinA^{rigor} を生産する株 (ABPU1/mRFP-KinA^{rigor} 株) (Table 2-2) を作製し、抗α-tubulin 抗体を用いた間接

蛍光抗体法による観察を行ない、mRFP-KinA^{rigor}がチューブリンと共局在し、微小管上に局在することを確認した。EGFP-CsmA/mRFP-KinA^{rigor}株の観察の結果、mRFP-KinA^{rigor}を発現し生産させる影響により菌糸先端部におけるEGFP-CsmAの局在異常が一部観察されたが、*kinA*破壊株あるいはベノミル処理の場合ほどの顕著な局在の異常は見られなかった (Table 2-4) 。菌糸先端付近においてはmRFP-KinA^{rigor}のフィラメント状の局在の先端部にEGFP-CsmAの局在が見られた (Fig. 2-11 A, tip, 矢頭) 。また、菌糸先端から後方の菌糸内においてはEGFP-CsmAとmRFP-KinA^{rigor}のフィラメント状の共局在が観察された (Fig. 2-11 A, basal, 矢印) 。また分生子形成器官において、CsmAは頂嚢の表層、頂嚢とメトレの間、メトレの先端、メトレとフィアライドの間、フィアライドの先端、フィアライドと分生子の間、分生子の表層等に局在が観察されている (竹下, 2005) 。EGFP-CsmA/mRFP-KinA^{rigor}株の分生子形成器官の観察の結果、EGFP-CsmAの局在はフィアライド、メトレ、及び分生子の形質膜上、及びこれらの細胞質内にドット状に観察され、細胞質においてはmRFP-KinA^{rigor}とのフィラメント状の共局在が観察された (Fig. 2-11 B、矢印) 。

2-3-4-2　CsmAとKinA^{rigor}との物理的相互作用の検討

CsmAとKinA^{rigor}との共局在が観察されたことから、*in vivo*における両者の物理的相互作用について検討するため、CsmA-HA及びmRFP-KinA^{rigor}を同時に生産する株 (CsmA-HA/mRFP-KinA^{rigor}株) (Table 2-2) を作製し、この株の細胞抽出液を用いて抗HA抗体による免疫沈降実験を行なった。細胞抽出液の粗抽出液あるいは遠心分離によって分画したP10画分を用いて免疫沈降を行なった場合、両者の相互作用は検出されなかった (データは示さない) 。遠心分離により分画したP100画分を用いた場合、抗mDsRed抗体によるウェスタン解析の結果、抗HA抗体で免疫沈降した画分においてmRFP-KinA^{rigor}のシグナルが検出されたことから、両者の相互作用が示された (Fig. 2-12) 。これらの結果から、CsmAは直接的または間接的にKinAと相互作用すること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。

2-3-5　CsmAの微小管上の輸送におけるMMDの役割

CsmAのMMDはアクチンと相互作用し、アクチンとの結合能はCsmAの菌糸先端及び隔壁形成部位における正常な局在化と機能に必要であることが示さ

れている (Takeshita *et al.*, 2005) 。そこで MMD 欠失型 CsmA (ΔMA) あるいは MMD におけるアクチンとの結合能の欠損した 10 アミノ酸欠失型 CsmA (D10A) の生細胞における局在、KinA との関わりについて検討した。

2-3-5-1　EGFP-ΔMA あるいは EGFP-D10A の菌糸内局在

EGFP-ΔMA あるいは EGFP-D10A を *alcA* プロモーター下で発現し生産する株を作製した (EGFP-ΔMA 株、EGFP-D10A 株) (Table 2-2 and Fig. 2-13 A) 。これらの株の細胞抽出液を用いて抗 GFP 抗体によるウェスタン解析を行なったところ、同じタンパク量の細胞抽出液をロードした場合、EGFP-ΔMA あるいは EGFP-D10A の存在量は EGFP-CsmA と比較して少なかったことから、安定性が低下していると考えられた (Figs. 2-6 C and 2-7 C) 。これらの株を用いて菌糸内局在観察を行なった結果、EGFP-ΔMA 及び EGFP-D10A は菌糸先端部の形質膜表層には集中した蛍光はほとんど観察されず、菌糸先端部及び先端から後方の細胞質内に拡散した蛍光やドット状の蛍光が多く見られた (Fig. 2-13 B) 。これらの局在の比較として、mRFP-TlgB と EGFP-ΔMA あるいは EGFP-D10A とを同時に生産する株 (EGFP-ΔMA/mRFP-TlgB 株、EGFP-D10A/mRFP-TlgB 株) (Table 2-2) を作製し、両者の局在を観察した。観察の結果、菌糸先端及び先端から後方の細胞質に見られた EGFP-ΔMA あるいは EGFP-D10A のドット状の蛍光の一部は mRFP-TlgB の蛍光と近接した部位に観察されたことから (Fig. 2-13 C, 矢頭、データは EGFP-D10A/mRFP-TlgB 株の局在について示した) 、EGFP-ΔMA あるいは EGFP-D10A の一部はエンドソームに局在することが示唆された。EGFP-ΔMA 及び EGFP-D10A の微小管上の輸送について検討するため、EGFP-ΔMA あるいは EGFP-D10A と mRFP-KinA^{rigor} とを同時に生産する株 (EGFP-ΔMA/mRFP-KinA^{rigor} 株、EGFP-D10A/mRFP-KinA^{rigor} 株) (Table 2-2) を作製し、両者の局在を観察した。これらの株の観察の結果、EGFP-ΔMA 及び EGFP-D10A は共に菌糸先端からやや後方の菌糸内において mRFP-KinA^{rigor} のフィラメント状の局在と近接した部位に同様にフィラメント状の蛍光が観察された (Fig. 2-13 D and E, 矢印) 。

2-3-5-2　ΔMA あるいは D10A と KinA との物理的相互作用の検討

ΔMA あるいは D10A と mRFP-KinA^{rigor} との物理的相互作用について検討するため、CSΔMA-HA あるいは D10A-HA と mRFP-KinA^{rigor} を同時に生産する株

(CSΔMHA/mRFP-KinA^{rigor}株、D10AHA/mRFP-KinA^{rigor}株) (Table 2-2) を作製し、これらの株の細胞抽出液を遠心分離により分画し、P100 画分を用いて抗 HA 抗体による免疫沈降実験を行なった。抗 mDsRed 抗体によるウェスタン解析の結果、抗 HA 抗体により免疫沈降した画分において mRFP-KinA^{rigor}のシグナルが検出されたことから、ΔMA あるいは D10A と KinA^{rigor}との相互作用が示された (Fig. 2-14) 。これらの結果から、MMD は KinA による菌糸後方からの微小管上の輸送には必須ではないことが示唆された。

2-3-6　CsmA の局在化におけるクラス VII キネシン KipA の機能

CsmA の菌糸先端における輸送には、キネシンの分類上クラス VII に属するキネシン KipA も関わることが示唆されたので (2-3-3) 、KipA による CsmA の局在化について検討した。

2-3-6-1　CsmA と KipA との局在比較

両者の局在について検討するため、mDsRed-CsmA 及び EGFP-KipA^{rigor}を同時に生産する株を作製した (mDsRed-CsmA/EGFP-KipA^{rigor} 株) (Table 2-2) 。KipA^{rigor}は KinA^{rigor}同様、モータードメインにおける点変異を含む変異型タンパク質であり、微小管に沿った形でフィラメント状の局在を示す (Konzack *et al.*, 2005) 。KinA^{rigor}の局在するフィラメント状構造が菌糸最先端部へ到達している頻度は低いが (Zekert and Fischer, 2009; 本論文 (10%, n=100)) 、EGFP-KipA^{rigor} の局在するフィラメント状構造はほぼ全て菌糸最先端部に局在が見られた (Konzack *et al.*, 2005; 本論文) 。mDsRed-CsmA/EGFP-KipA^{rigor}株の菌糸内局在観察の結果、菌糸先端部及び先端から後方の菌糸内において、mDsRed-CsmA と EGFP-KipA^{rigor} とのフィラメント状の共局在が観察された (Fig. 2-15 A、矢印)。菌糸最先端部においては両者の共局在が一点に集中して観察された (Fig. 2-15 A、矢頭) 。

2-3-6-2　CsmA と KipA^{rigor}との物理的相互作用の検討

CsmA と KipA^{rigor}の共局在が観察されたことから、CsmA と KipA^{rigor}との *in vivo* における物理的相互作用について検討するため、CsmA-FLAG と EGFP-KipA^{rigor}を同時に生産する株 (CsmA-FLAG/EGFP-KipA^{rigor}株) (Table 2-2) を作製した。この株の細胞抽出液を遠心分離により分画し、P100 画分を用いて

抗 FLAG 抗体による免疫沈降実験を行なった。抗 GFP 抗体によるウェスタン解析の結果、抗 FLAG 抗体による免疫沈降画分において EGFP-KipA^{rigor} のシグナルが検出されたことから、両者の相互作用が示された (Fig. 2-15 B) 。これらの結果から、CsmA は KinA だけでなく KipA との直接的あるいは間接的な相互作用によっても微小管上を菌糸先端付近へ輸送され局在化することが示唆された。

2-3-7　KinA と KipA の機能的相関

CsmA は KinA 及び KipA との相互作用によって微小管上を菌糸先端付近まで輸送されることが示唆されたので、KinA と KipA の局在の相違、機能的相関等について検討した。mRFP-KinA^{rigor} と EGFP-KipA^{rigor} を同時に生産する株 (mRFP-KinA^{rigor}/EGFP-KipA^{rigor} 株) (Table 2-2) を作製し、両者の菌糸内局在部位を観察したところ、菌糸先端部及び菌糸先端から後方の菌糸内において、KinA^{rigor} は複数本のフィラメント状に局在が観察され、その一部が KipA^{rigor} と共局在して観察されたが (Fig. 2-16 A、矢印) 、共局在していないフィラメント状構造も観察された (Fig. 2-16 A, Basal, 点線矢印) 。また、菌糸最先端においては両者の局在が一点に集中して観察された (Fig. 2-16, Tip, 矢頭) (70%, n=100) 。mRFP-KinA^{rigor}/EGFP-KipA^{rigor} 株の細胞抽出液を用いて遠心分離による分画を行ない、抗 mDsRed 抗体、抗 EGFP 抗体、抗α-tubulin 抗体によるウェスタン解析を行なったところ、mRFP-KinA^{rigor} は P10、P100、S100 全ての画分において検出されたのに対し、EGFP-KipA^{rigor} は P10 画分及び P100 画分にのみ検出された (Fig. 2-16 B) 。また、α-チューブリンは P100 画分及び S100 画分に主に検出されたことから (Fig. 2-16 B) 、mRFP-KinA^{rigor} と EGFP-KipA^{rigor} は一部異なる微小管上に存在することが示唆された。更に、*kipA* 破壊株において mRFP-KinA^{rigor} を生産する株 (mRFP-KinA^{rigor}ΔkipA 株) (Table 2-2) を作製し、mRFP-KinA^{rigor} の局在観察を行なった (Fig. 2-17) 。ベノミル処理により、菌糸先端及び先端から後方の菌糸内において、mRFP-KinA^{rigor} は切断された短いフィラメント状に観察された。一方、mRFP-KinA^{rigor}ΔkipA 株においては *kipA* が破壊されていない場合と比較して菌糸内における mRFP-KinA^{rigor} のフィラメント状の局在に顕著な異常は観察されなかった (Fig. 2-17) 。*kinA* と *kipA* の二重破壊株はそれぞれの破壊株の表現型の相加的な表現型を示すことが明らかとなっており (Konzack *et al.*, 2005) 、本論文の結果と合わせて、KinA と KipA は一部重複した機能を果たすが、互いに独立して機能すると考えられた。

2-4　考察

本章では、主に生細胞を用いて CsmA の菌糸内局在化機構について解析した。CsmA は生細胞において菌糸先端を含む形質膜上及び形成中の隔壁部位に局在が観察され、一部菌糸内においてもエンドソームと考えられるドット状の局在が観察された (Fig. 2-9) 。また微小管重合阻害剤やキネシン *kinA* あるいは *kipA* 遺伝子の破壊により CsmA の菌糸先端における局在は異常となり (Fig. 2-10 and Table 2-4) 、KinA^{rigor} 及び KipA^{rigor} と CsmA は菌糸後方においてフィラメント状の共局在が観察された (Figs. 2-11 and 2-15) 。また KinA^{rigor} 及び KipA^{rigor} は CsmA と *in vivo* において相互作用することが示された (Figs. 2-12 and 2-15) 。MMD 欠失型 CsmA (ΔMA) 及びアクチンとの結合能を欠失した CsmA (D10A) は菌糸後方から先端付近において KinA^{rigor} のフィラメント状の局在との共局在が観察され (Fig. 2-13) 、ΔMA 及び D10A と KinA^{rigor} との *in vivo* における相互作用が示された (Fig. 2-14) 。これらの結果から、CsmA は微小管上を菌糸先端付近へ輸送され、その輸送には少なくとも KinA 及び KipA が関わること、微小管上の輸送には MMD が不要であること等が示唆された。KinA^{rigor} 及び KipA^{rigor} の局在する微小管は一部重なりが見られたが (Fig. 2-16) 、*kipA* 破壊株において KinA^{rigor} は正常に微小管上に局在が観察された (Fig. 2-17) 。*kinA kipA* の二重破壊株の表現型はそれぞれの破壊株の表現型を足し合わせたものに類似していることから (Konzack *et al.*, 2005) 、本研究における結果と合わせて、両者の機能は独立していると考えられた。以下に、CsmA の局在化機構について、(1) 菌糸内後方から菌糸先端付近への輸送、(2) 菌糸先端付近から菌糸最先端部への輸送、(3) 隔壁形成部位への輸送に大別して考察する。なお、分生子形成器官における局在化機構については第 3 章で ChsB の局在化機構と合わせて考察した。

2-4-1　菌糸内後方から菌糸先端付近への輸送

序章で述べたように、糸状菌の菌糸内には複数本の微小管がプラス端を菌糸の伸長方向に向けて菌糸先端まで伸長しており、細胞内輸送を介して菌糸先端生長に寄与している。*A. nidulans* を始めとする数種類の糸状菌において、菌糸後方から先端部までの微小管プラス端方向へのタンパク質輸送にはクラス I、III、VII に属するキネシンが関わり、菌糸先端から後方への微小管マイナス端方向への輸送にはダイニンが関わることが示唆されている (Steinberg, 2007; Fischer *et al.*, 2008) 。*A. nidulans* のクラス I キネシン KinA はエンドソーム及びダイニ

ンの微小管プラス端方向への輸送、局在化に機能しており (Zhang *et al.*, 2003) 、本章における解析から、CsmA を含む小胞の輸送にも機能することが示唆された。*kinA* 破壊株では菌糸先端付近にエンドソームの異常蓄積が観察され、その理由の一つとしてダイニンが微小管プラス端に局在化できず、マイナス端方向への輸送が異常となることが考えられている (Zhang *et al.*, 2003; Abenza *et al.*, 2008) 。*kinA* 破壊株において CsmA の菌糸先端における局在が異常となるのは、CsmA の菌糸先端方向への輸送に KinA が直接関わるためである可能性、及びダイニンが正常に局在化できなくなることによる間接的影響による可能性が考えられる。KinA が CsmA の輸送に直接関わると考えた場合でも CsmA の半分程度は菌糸先端に正常に局在化している (Table 2-4) こと、*kinA* の破壊による菌糸状の形態形成への影響は *csmA* の破壊の場合ほど重篤でないことから、CsmA の輸送における KinA の役割は他のキネシン等のタンパク質によっても一部代替できると考えられる。一方、*A. nidulans* の唯一のダイニンをコードする *nudA* は生育に必須な遺伝子であり、*nudA* の条件変異株や温度感受性株が作製されている (Xiang *et al.*, 1995; Abenza *et al.*, 2009) 。これらの株において、*nudA* の発現を抑制する条件では、エンドソームの菌糸先端付近における異常蓄積が観察された (Abenza *et al.*, 2009) 。CsmA の局在化におけるダイニンの関わりについて、今後 *nudA* の条件変異株等における CsmA の局在について解析する必要がある。

A. nidulans のクラス III キネシン UncA も、KinA 同様に微小管上の小胞輸送に機能することが示唆されているが (Zekert and Fischer, 2009) 、*uncA* 破壊株において CsmA の局在に顕著な異常が見られなかったことから、CsmA の菌糸先端への局在化への寄与は小さいと考えられた。モータードメインのアミノ酸置換を行い、微小管上の移動が行なわれなくなる変異型 $KinA^{rigor}$ 及びクラス VII キネシン KipA の変異型 $KipA^{rigor}$ は複数本の微小管上に局在が観察されるが (Konzack *et al.*, 2005; Zekert and Fischer, 2009; 本論文 Fig. 2-15) 、$UncA^{rigor}$ はそれらのうち一本の微小管上に局在が観察され、この $UncA^{rigor}$ の局在する微小管はその構成成分であるα-tubulin の C 末端が脱チロシン化されるという翻訳後修飾を受けていることが示唆された (Zekert and Fischer, 2009) 。微小管の脱チロシン化の生理的意義は不明であるが、$KinA^{rigor}$ 及び $KipA^{rigor}$ では局在する微小管にそのような特異性は見られず、*kinA* と *uncA* の単独破壊株の表現型は異なることなどから、KinA 及び UncA の輸送における機能は完全には重複しない

と考えられている (Zekert and Fischer, 2009) 。

A. nidulans のクラス VII キネシン KipA は微小管プラス端に常に局在化し、微小管プラス端集積因子 (+TIPs) の一種である ClipA、及び cell end marker タンパク質 TeaA の正常な局在化に機能している (Efimov *et al.*, 2006; Takeshita *et al.*, 2008) 。小胞輸送に関わると考えられるクラス I 及びクラス III キネシンと比較して、これまでに明らかとなっている多くのクラス VII キネシンは微小管プラス端の先端にタンパク質を輸送し係留する機能を果たすと考えられている (Steinberg, 2007; Fischer *et al.*, 2008) 。*kipA* 破壊株において CsmA の菌糸先端における局在は *kinA* 破壊株と比較して更に顕著な異常を示し、CsmA は KipA によっても菌糸先端部へ輸送されることが本章における解析から示唆されたが、KipA は菌糸最先端部における Spk の位置決定に関わることから (Konzack et al., 2005) 、CsmA の局在異常は *kipA* 破壊による先端生長異常の間接的影響である可能性も考えられる。

MMD 欠失型 CsmA (ΔMA) 及びアクチンとの結合能の欠損した D10A は $KinA^{rigor}$ の局在する微小管上にフィラメント状に共局在が観察され (Fig. 2-13) 、$KinA^{rigor}$ との物理的相互作用が検出されたことから (Fig. 2-14) 、MMD とアクチンとの相互作用は菌糸後方から先端付近までの KinA による輸送には必須ではないことが示唆された。本章の序でも述べたが *U. maydis* においても、クラス V キチン合成酵素 Mcs1 の MMD 欠失型 Mcs1 は菌糸後方から先端付近へ輸送されうることから、微小管上の輸送に MMD は不要であることがごく最近示された (Treitschke *et al.*, 2010) 。本章における解析から、CsmA は KinA だけでなく KipA によっても菌糸先端付近へ輸送され局在化する可能性が考えられたことから、今後、$KipA^{rigor}$ を生産する株における MMD 欠失型 CsmA の局在等についても検討する必要がある。

2-4-2　菌糸先端付近から菌糸最先端部への輸送

生細胞における CsmA の局在観察の結果及び *A. nidulans* における先端生長に必要なタンパク質群の輸送経路の解析から、CsmA は一度菌糸最先端部の Spk 付近に輸送され、先端部の形質膜と融合し、その後菌糸の先端生長に伴って形質膜上を先端からやや後方まで移動し局在すると予想される (Fig. 2-18, upper panel) 。Spk 付近における局在は 10%以下の低頻度でしか観察されないことから、Spk 付近への局在は一時的であり、その後速やかに菌糸先端の形質膜とそ

の後方の形質膜上へ局在部位を変化させると考えられる。菌糸先端付近（Spk付近）から最先端部へのタンパク質の輸送には先端部に形成されたアクチンケーブル及びその上を移動するモータータンパク質であるミオシンが関与すると考えられている（Fig. 0-2) (Steinberg, 2007）。CsmA のように MMD を持つキチン合成酵素の場合、この菌糸先端部のアクチンケーブル上をアクチンと MMD との相互作用により輸送される可能性があり（Treitschke *et al.*, 2010）、この可能性について検討するためΔMA 及び D10A の局在を解析したが、元来これらの改変体はタンパク質としての安定性が低く、更に菌糸先端付近で局在が拡散して観察されるものが多く、Spk 付近に局在するか明確な結果を得られなかった。また、CsmA の MMD は菌糸先端からやや後方の形質膜上のアクチンリングにおけるアンカーリングに機能する可能性もあり、ΔMA あるいは D10A は一度 Spk 付近まで輸送されるが、先端の形質膜と融合後、MMD とアクチンとの結合能が欠失しているため先端からやや後方の形質膜上のアクチンリングに留まれないのかもしれない（Fig. 2-18, lower panel）。*A. nidulans* のゲノム中にはクラス I、II、V、XVII (CsmA) (Fig. 1-1 参照）に属するミオシンをコードする遺伝子が存在する。クラス I ミオシン MyoA をコードする *myoA* は必須遺伝子であり (McGoldrick *et al.*, 1995）、MyoA は菌糸先端及び隔壁形成部位に局在するが、ミオシンとしてのモーター活性は機能に必須ではなく、アクチンの局在化に関わることが示唆されている（Yamashita *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2001）。クラス II 及びクラス V ミオシンについては解析が報告されていないが、出芽酵母 *S. cerevisiae* のクラス V ミオシン Myo2p はアクチンケーブルに沿ったオルガネラやクラス IV キチン合成酵素 Chs3p を含む小胞の輸送に機能し（Santos and Snyder, 1998; Pruyne *et al.*, 2004）、分裂酵母のクラス V ミオシン Myo52 もβ-1,3-グルカン合成酵素の細胞端における正常な局在化に関わる（Mulvihill *et al.*, 2006）。糸状菌においても、ごく最近、子嚢菌類に属する青カビ *Penicillium marneffei* のクラス II ミオシン MyoB が菌糸先端及び隔壁形成部位におけるキチンの形成に関わる可能性が示された（Canovas *et al.*, 2011）。*U. maydis* のクラス V ミオシンが宿主への感染に必要であり、菌糸先端部の Spk に局在すること (Weber *et al.*, 2003; Schuchardt *et al.*, 2005) なども明らかとなっている。これらのことから、*A. nidulans* においても菌糸先端におけるアクチンケーブル上の輸送にクラス II あるいはクラス V に属するミオシンが機能する可能性がある。

生細胞における EGFP-CsmA の観察の結果、菌糸先端からやや後方の形質膜

上において局在が見られるものは観察した菌糸先端の 10%以下の頻度であったが、間接蛍光抗体法による観察ではこの後方の形質膜上における局在が 40%程度の菌糸先端において観察された (第 3 章) 。*A. nidulans* や他の糸状菌において、アクチン、アクチン結合タンパク質、エンドサイトーシス関連タンパク質等がこの菌糸先端からやや後方の形質膜上に局在することから、この部位が菌糸先端におけるエンドサイトーシスの足場として機能すると考えられている (Penalva, 2010) 。このことから CsmA が菌糸先端から後方の形質膜上に局在化することと、この形質膜上の部位における CsmA のエンドサイトーシスによる膜からの取り込みについて、機能的関連があることも予想される。一方、*csmA* の破壊株では低浸透圧培地において菌糸先端よりやや後方の菌糸において頻繁に溶菌が見られることから、CsmA はこの部位で機能している可能性が考えられる。これらのことを含めて、CsmA の局在の経時的変化及び局在化部位について、第 3 章で元来 MMD を持たないキチン合成酵素 ChsB との比較により検討し考察した。

2-4-3　隔壁形成部位への輸送

kinA 破壊株及び *kipA* 破壊株において、菌糸先端における CsmA の局在異常が観察されたが、隔壁部位においては形成中の隔壁に CsmA の局在が観察されたことから正常に局在化していると考えられた (Fig. 2-10 B) 。このことから CsmA の菌糸先端への局在化機構と隔壁形成部位への局在化機構は一部異なり、隔壁形成部位への局在化における微小管及びキネシンの寄与は小さいと考えられる。CsmA の MMD は隔壁における局在化にも必要であることから (Takeshita *et al*., 2005) 、CsmA は MMD とアクチンとの相互作用により隔壁部位に形成されたアクチンリングを足場として局在化すると考えられる。隔壁形成部位への局在化に関わる因子については不明であるが、F-アクチンプラス端に局在化しアクチンフィラメントの伸長を介助する formin タンパク質である *A. nidulans* の SepA は、菌糸先端及び隔壁形成部位におけるアクチン形成に関わることから (Sharpless and Harris, 2002) 、CsmA の局在化にも機能する可能性がある。

本章における解析から、MMD を持つキチン合成酵素の局在化機構について、微小管及び一部のキネシンにより MMD 非依存的に菌糸後方から先端付近へ輸送されることが示唆された (Fig. 2-18, upper panel) 。しかし菌糸先端部の Spk

付近への局在化及びその後の形質膜上への局在化における MMD の役割については検討できなかった (Fig. 2-18, lower panel) 。そこで次章では、CsmA の局在化機構との比較として、元来 MMD を持たず菌糸型の形態形成を行なう真菌類にのみ存在するクラス III キチン合成酵素 ChsB、及び GPI アンカー型タンパク質であるキチン分解酵素 ChiA の局在化機構について検討した。

Table 2-1. Kinesin family in *S. cerevisiae* and *A. nidulans*.

Kinesin class (name of class)	*S. cerevisiae*	*A. nidulans*
I (KHC)	-	KinA
III (Unc104/Kif1)	-	UncA, UncB
IV (Chrom-KIN/Kif4)	-	AN6875
V (BimC)	Cin8p, Kip1p	BimC
VI (MKLP1)	-	AN3124
VII (CENP-E)	Kip2p	KipA
VIII (Kip3)	Kip3p	KipB
X (KID)	-	AN3721
XIV (C-terminal motor)	Kar3p	KlpA
orphan	Smy1p	AN3970

There are no kinesin-encording genes classified into classes II, IX, XI, and XII in both *S. cerevisiae* and *A. nidulans* genome. -; not exsisted.

Table 2-2. *A. nidulans* strains used in this section.

Strain	Genotype	Source
EGFP-CsmA1	*biA1 pyrG89 argB2 pyroA4 wA3* Δ*csmA*::*argB-alcA*(p)-*egfp-csmA*	竹下, 2005
EGFP-CsmA/mRFP-TlgB 1, 2	*biA1 pyrG89 argB2 pyroA4 wA3* Δ*csmA*::*argB-alcA*(p)-*egfp-csmA* Δ*tlgB*::*pyroA4-alcA*(p)-*mrfp-tlgB*	This Study
ABPU1	*biA1 pyrG89 argB2 pyroA4 wA3*	Motoyama *et al.*, 1996
SNR1	Δ*argB*::*trpC*Δ*B* Δ*kinA*::*pyr4 pyrG89 pyroA4 yA2*	Requena *et al.*, 2001
SSK44	*pabaA1* Δ*argB*::*trpC*Δ*B* Δ*kipA*::*pyr4 wA3 veA1*	Konzack *et al.*, 2005
EGFP-CsmAΔkipA 1, 2	*pabaA1* Δ*argB*::*trpC*Δ*B* Δ*kipA*::*pyr4 wA3 veA1* Δ*csmA*::*argB-alcA*(p)-*egfp-csmA*	This Study
EGFP-CsmAΔkinA 1, 2	Δ*argB*::*trpC*Δ*B* Δ*kinA*::*pyr4 pyrG89 pyroA4 yA2* Δ*csmA*::*argB-alcA*(p)-*egfp-csmA*	This Study
EGFP-CsmAΔuncA 1, 2	*biA1 pyrG89 argB2 pyroA4 wA3* Δ*csmA*::*argB-alcA*(p)-*egfp-csmA* Δ*uncA*::*pyroA*	This Study
EGFP-CsmA/mRFP-KinA^{rigor} 1, 2	*biA1 pyrG89 argB2 pyroA4 wA3* Δ*csmA*::*argB-alcA*(p)-*egfp-csmA* Δ*kinA*::*pyroA4-alcA*(p)-*mrfp-kinA*^{rigor}	This Study
EGFP-ΔMA 1, 2	*biA1 pyrG89 argB2 pyroA4 wA3* Δ*csmA*::*argB-alcA*(p)-*egfp-csmA* (861-1852 aa)	This Study
EGFP-D10A 1, 2	*biA1 pyrG89 argB2 pyroA4 wA3* Δ*csmA*::*argB-alcA*(p)-*egfp-csmA* (Δ347-356)	This Study
EGFP-ΔMA/mRFP-TlgB 1, 2	*biA1 pyrG89 argB2 pyroA4 wA3* Δ*csmA*::*argB-alcA*(p)-*egfp-csmA* (861-1852 aa) Δ*tlgB*::*pyroA4-alcA*(p)-*mrfp-tlgB*	This Study
EGFP-D10A/mRFP-TlgB 1, 2	*biA1 pyrG89 argB2 pyroA4 wA3* Δ*csmA*::*argB-alcA*(p)-*egfp-csmA* (Δ347-356) Δ*tlgB*::*pyroA4-alcA*(p)-*mrfp-tlgB*	This Study
EGFP-ΔMA/ mRFP-KinA^{rigor} 1, 2	*biA1 pyrG89 argB2 pyroA4 wA3* Δ*csmA*::*argB-alcA*(p)-*egfp-csmA* (861-1852 aa)	This Study

	Δ*kinA*::*pyroA4-alcA*(p)-*mrfp-kinA*^{rigor}	
EGFP-D10A/ mRFP-KinA^{rigor} 1, 2	*biA1 pyrG89 argB2 pyroA4 wA3*	This Study
	Δ*csmA*::*argB-alcA*(p)-*egfp-csmA* (Δ347-356)	
	Δ*kinA*::*pyroA4-alcA*(p)-*mrfp-kinA*^{rigor}	
ABPU1/mRFP-KinA^{rigor} 1, 2	*biA1 pyrG89 argB2 pyroA4 wA3*	This Study
	Δ*kinA*::*pyroA4-alcA*(p)-*mrfp-kinA*^{rigor}	
CA2	*biA1 pyrG89 argB2 pyroA4 wA3*	Takeshita *et al*., 2002
	Δ*csmA*::*pyrG-csmA*::*9HA*	
CsmA-HA/mRFP-KinA^{rigor} 1, 2	*biA1 pyrG89 argB2 pyroA4 wA3*	This Study
	Δ*csmA*::*pyrG-csmA*::*9HA*	
	Δ*kinA*::*pyroA4-alcA*(p)-*mrfp-kinA*^{rigor}	
CSΔMHA	*biA1 pyrG89 argB2 pyroA4 wA3*	Takeshita *et al*., 2005
	Δ*csmA*::*pyrG-csmA* (861-1852 aa)::*9HA*	
D10AHA*	*biA1 pyrG89 argB2 pyroA4 wA3*	Takeshita *et al*., 2005
	Δ*csmA*::*pyrG-csmA* (Δ347-356)::*9HA*	
CSΔMHA/ mRFP-KinA^{rigor} 1, 2	*biA1 pyrG89 argB2 pyroA4 wA3*	This Study
	Δ*csmA*::*pyrG-csmA* (861-1852 aa)::*9HA*	
	Δ*kinA*::*pyroA4-alcA*(p)-*mrfp-kinA*^{rigor}	
D10AHA/ mRFP-KinA^{rigor} 1, 2	*biA1 pyrG89 argB2 pyroA4 wA3*	This Study
	Δ*csmA*::*pyrG-csmA* (Δ347-356)::*9HA*	
	Δ*kinA*::*pyroA4-alcA*(p)-*mrfp-kinA*^{rigor}	
SSK114	Δ*argB*::*trpC*Δ*B pyrG89*	Konzack *et al*., 2005
	Δ*kipA*::*pyr4-alcA*(p)-*egfp-kipA*^{rigor} *pyroA4 veA1*	
mDsRed-CsmA/EGFP-KipA^{rigor} 1, 2	Δ*argB*::*trpC*Δ*B pyrG89*	This Study
	Δ*kipA*::*pyr4-alcA*(p)-*egfp-kipA*^{rigor} *pyroA4 veA1*	
	Δ*csmA*::*argB-alcA*(p)-*mdsred-csmA*	
CsmA-FLAG/EGFP-KipA^{rigor} 1, 2	Δ*argB*::*trpC*Δ*B pyrG89*	This Study
	Δ*kipA*::*pyr4-alcA*(p)-*egfp-kipA*^{rigor} *pyroA4 veA1*	
	Δ*csmA*::*argB-csmA-3xflag*	
mRFP-KinA^{rigor}/EGFP-KipA^{rigor} 1, 2	Δ*argB*::*trpC*Δ*B pyrG89*	This Study
	Δ*kipA*::*pyr4-alcA*(p)-*egfp-kipA*^{rigor}	
	Δ*kinA*::*pyroA4-alcA*(p)-*mrfp-kinA*^{rigor} *veA1*	

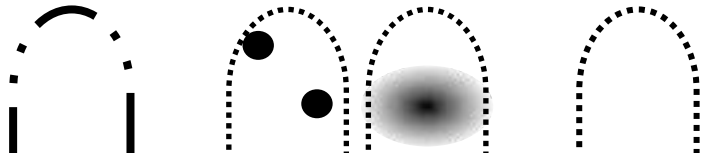
A1149/ΔkipA	Δ*kipA*::*pyr4 pyroA4 wA3* Δ*nkuA*::*argB*	Maeda, H., personal comm.
mRFP-KinA^{rigor}/ΔkipA 1, 2	Δ*kipA*::*pyr4* Δ*kinA*::*pyroA4-alcA*(p)-*mrfp-kinA*^{rigor} *wA3* Δ*nkuA*::*argB*	This Study

* This strain was renamed in this section.

Table 2-3. The oligonucleotides used in this section.

Primer name	Sequence (5' to 3')
UncA-LB-fwd	CGTCGATGGAAGGCATATACTACTCGC
3-DMA-EGFP	AGTTGTGAAACATATCGCCCCTTGTACAGCTCGTCCATGC
5-EGFP-DMA	GCATGGACGAGCTGTACAAGGGGCGATATGTTTCACAACT
3-DMA	CACATGGCCGACAATGAACA
A-5-for-EGFP-r	GCTGGCAAAGTCCCAACCATTGCCGAGAGTGATCCCGGCG
A-5-for	CGCCGGGATCACTCTCGGCAATGGTTGGGACTTTGCCAGC
A-3-rev	CAGTCCGTTACCTTGTTTCA
DR-alc-rev	ACGTCCTCGGTGTTGTCCATGGTACCGCTAATTAACTGAG
DR-csmA1-for	CCCGCCACTCCGGCTCCCAGATGGTTGGGACTTTGCCAGC
csmA1-rev	CGAGGAACGCGGCGATGATG
DR-for	ATGGACAACACCGAGGACGT
DR-rev	CTGGGAGCCGGAGTGGCGGG
TlgB-up1kb-for	TTCAGCTCACCAATGCTCGT
TlgB-1kb-rev	CATCGGTGTTCATTCTCTCC
UncA-RB-Sfi-fwd	CGGCCTGAGTGGCCTCTATGTCTTCG
UncA-RB-rev	CATCCACGTCCCCATAACTAATACCACC
KinA-up1kb-for	AATCAGTTTACTCAATGATC
KinA-1kb-rev	CTCAGACTCTTGTTGATCTT

Table 2-4. Localization patterns of EGFP-CsmA.

EGFP-CsmA			
	normal	punctate or dispersed	no signal
WT	77	17	7
WT+benomyl *	28	44	28
Δ*kinA*	43	50	7
Δ*kipA*	33	48	19
Δ*uncA*	56	36	8
mRFP-KinA^{rigor}	53	32	15

The localization patterns of EGFP-CsmA at more than 100 hyphal tips were investigated and categorized into three groups (normal, punctate or dispersed, and no signal). The number indicates the percentage of tips of each group. WT, the EGFP-CsmA 1 strain; Δ*kinA*, the EGFP-CsmAΔkinA strain; Δ*kipA*, the EGFP-CsmAΔkipA strain; Δ*uncA*, the EGFP-CsmAΔuncA strain; mRFP-KinA^{rigor}, the EGFP-CsmA/mRFP-KinA^{rigor} strain. * Hyphae of the EGFP-CsmA 1 strain was treated with 2.4 μg/ml benomyl for 10 min at 37℃.

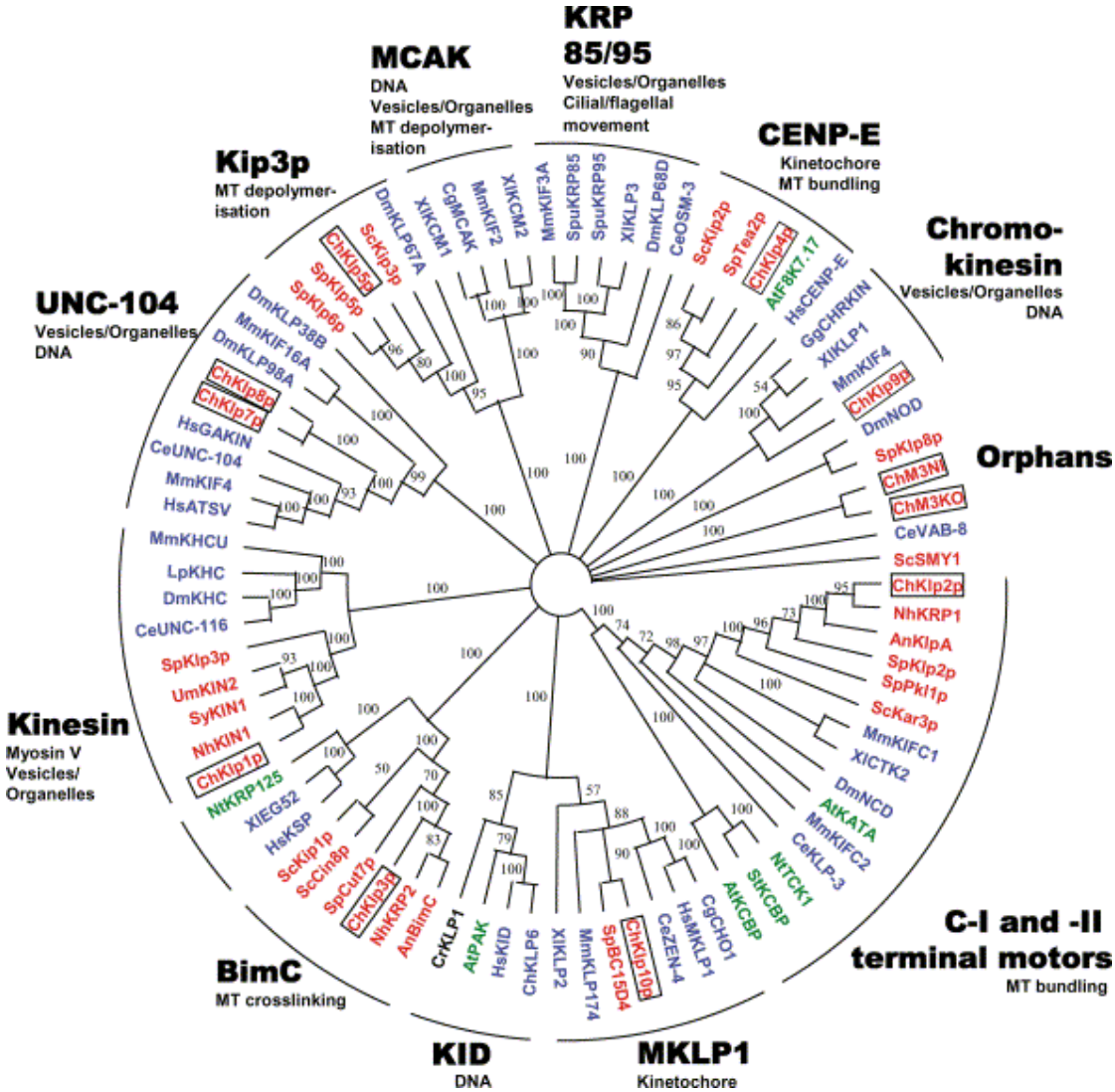


Figure 2-1. Unrooted phylogenetic tree of the kinesin superfamily. (Schoch *et al*., 2003) The percentage of trees co ntaining specific branches is shown. Kinesins of metazoans are shown in blue, from plants in green, protests in black, and fungi in red. The classes IX, XI, and XII kineisins are not shown.

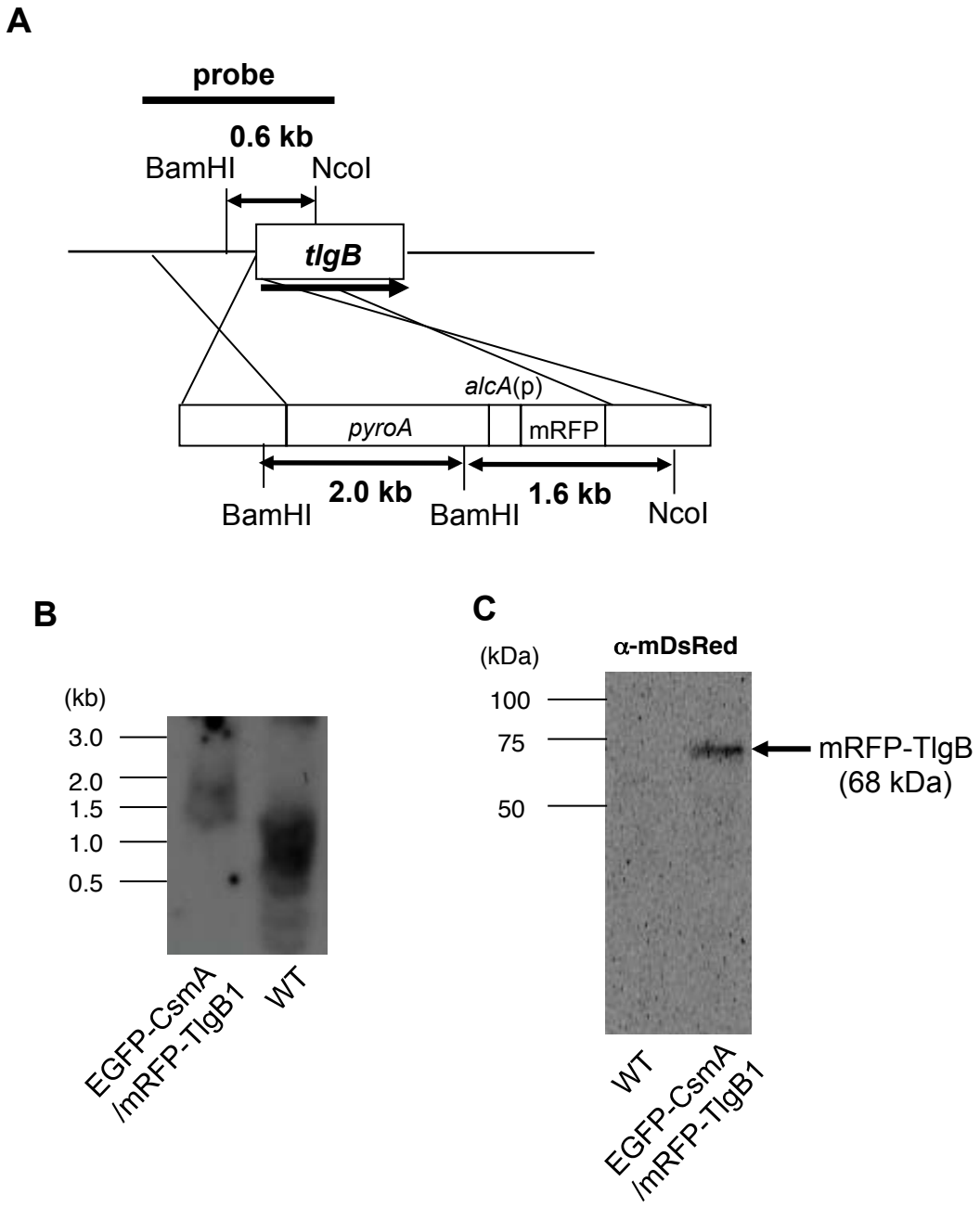


Figure 2-2. Construction of the mRFP-TlgB producing strains.
(A) Scheme of construction.
(B) Southern blot analysis of BamHI-NcoI digested total DNA of the mRFP-TlgB producing strain probed with the 2.0 kb fragment amplyfied by PCR.
(C) Western blot analysis of the cell extracts of mRFP-TlgB producing strain using anti-mDsRed antibody. The cell extract containing the same amount of proteins was loaded into each lane.

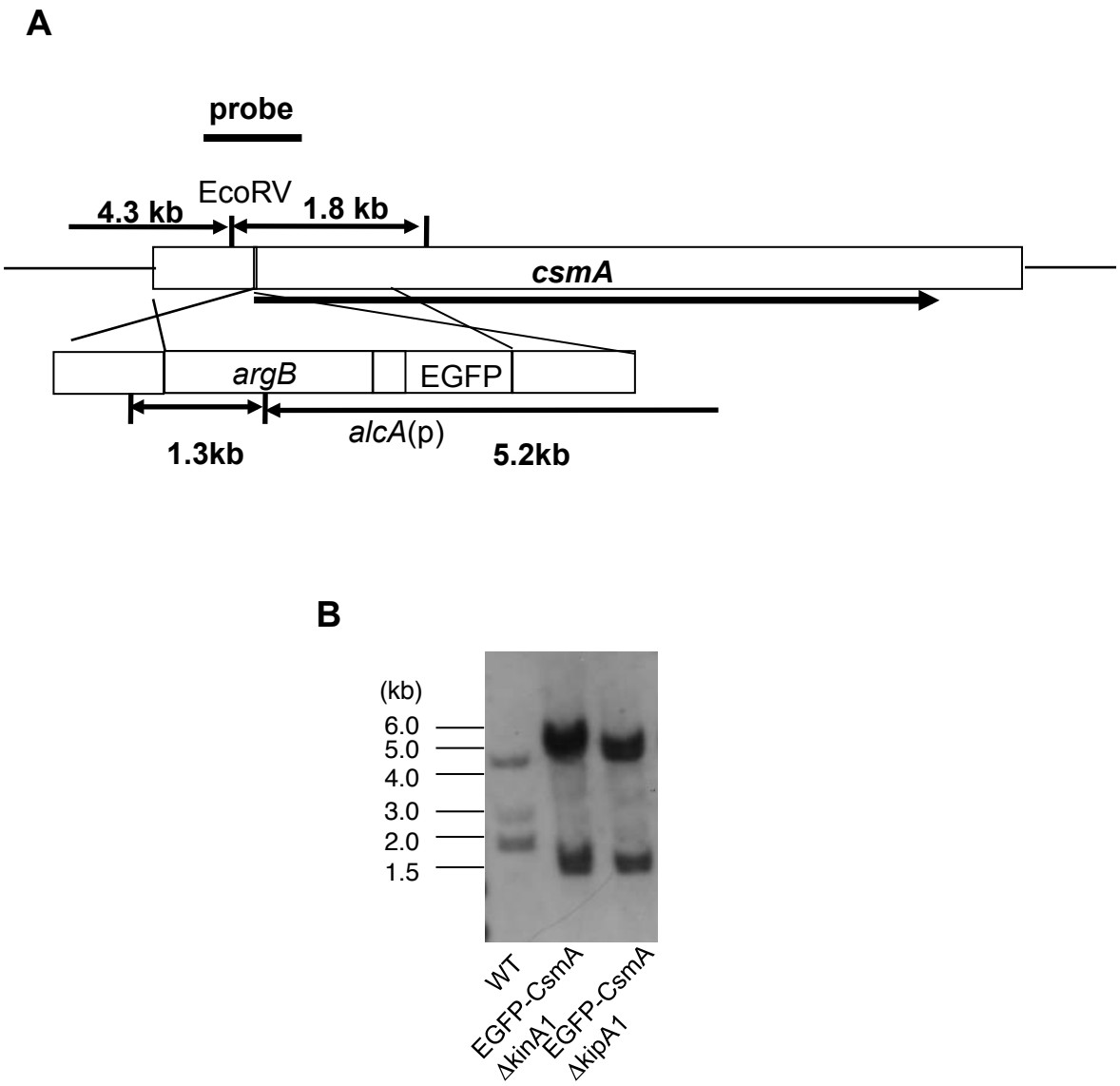


Figure 2-3. Construction of the EGFP-CsmA producing strains
(A) Scheme of construction.
(B) Southern blot analysis of EcoRV digested total DNA of the EGFP-CsmAΔkinA strain and the EGFP-CsmAΔkipA strain using the 1.0 kb SpeI-XhoI fragment of pM-ALK-CHS5 as a probe.

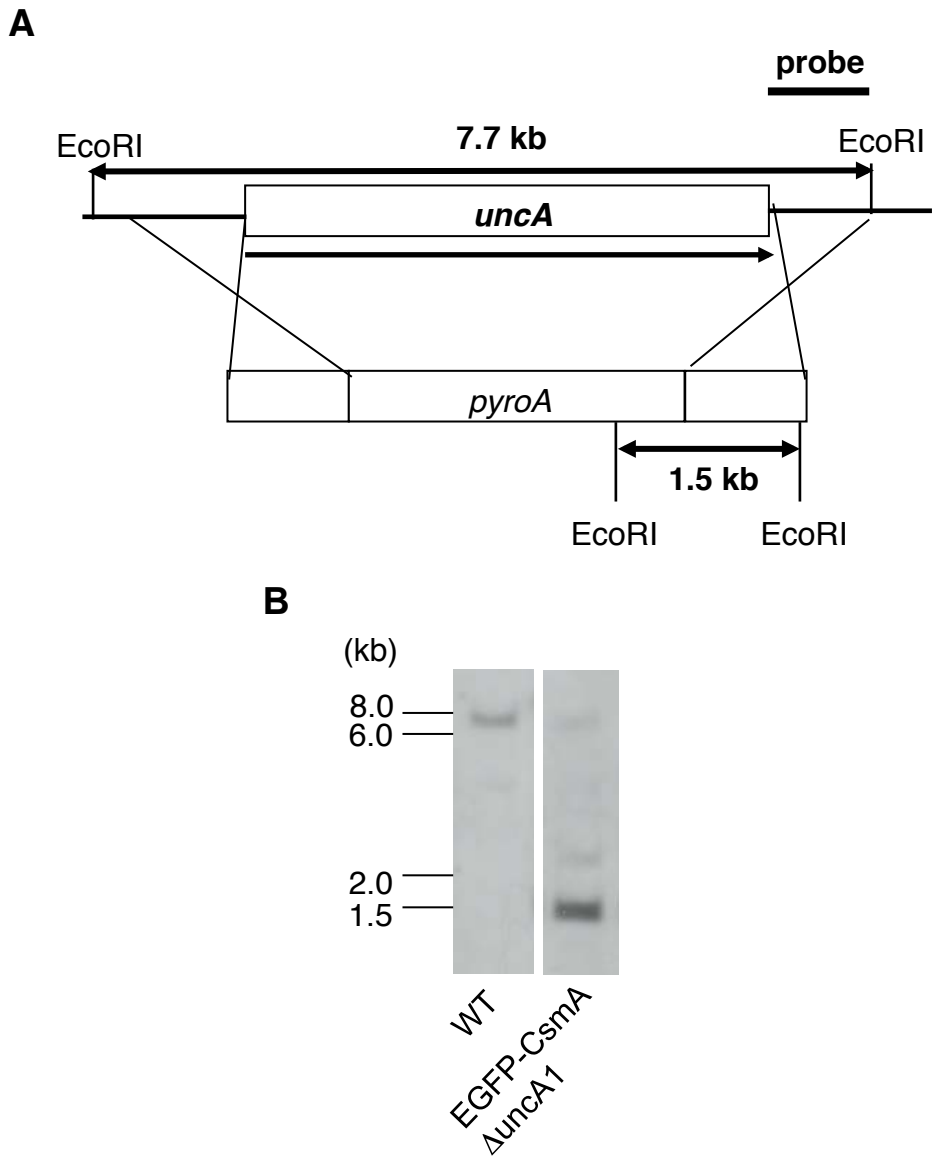


Figure 2-4. Construction of the Δ*uncA* strains.
(A) Scheme of construction.
(B) Southern blot analysis of EcoRI digested total DNA of the Δ*uncA* strain using the 1.0 kb fragment amplified by PCR as a probe.

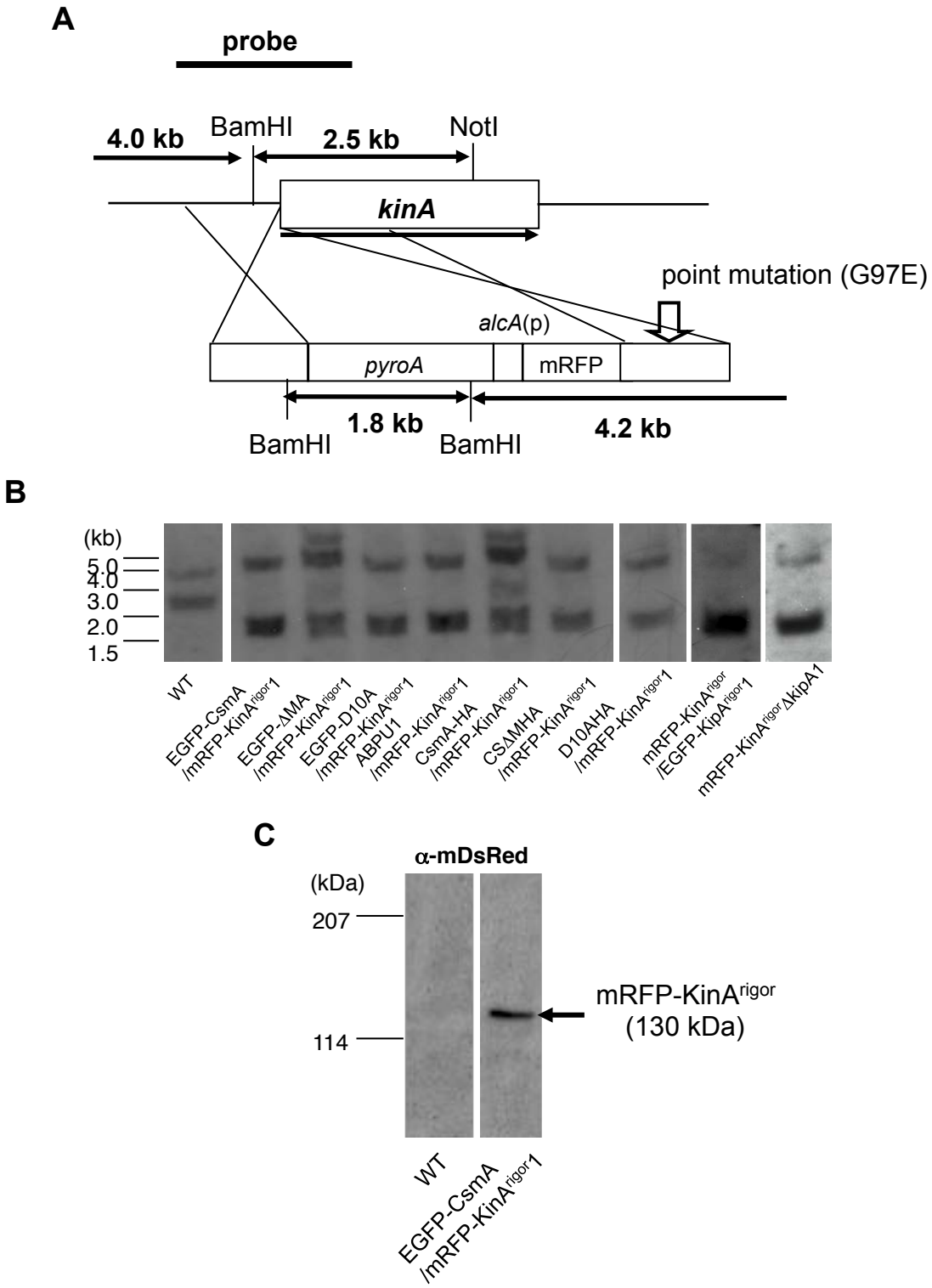


Figure 2-5. Construction of the mRFP-KinA^{rigor} producing strains.
(A) Scheme of construction.
(B) Southern blot analysis of BamHI-NotI digested total DNA of the mRFP-KinA^{rigor}producing strain probed with the 2.0 kb fragment amplyfied by PCR.
(C) Western blot analysis of the cell extract of the mRFP-KinA^{rigor} produceing strain using anti-mDsRed antibody. The cell extract containing the same amount of proteins was loaded into each lane.

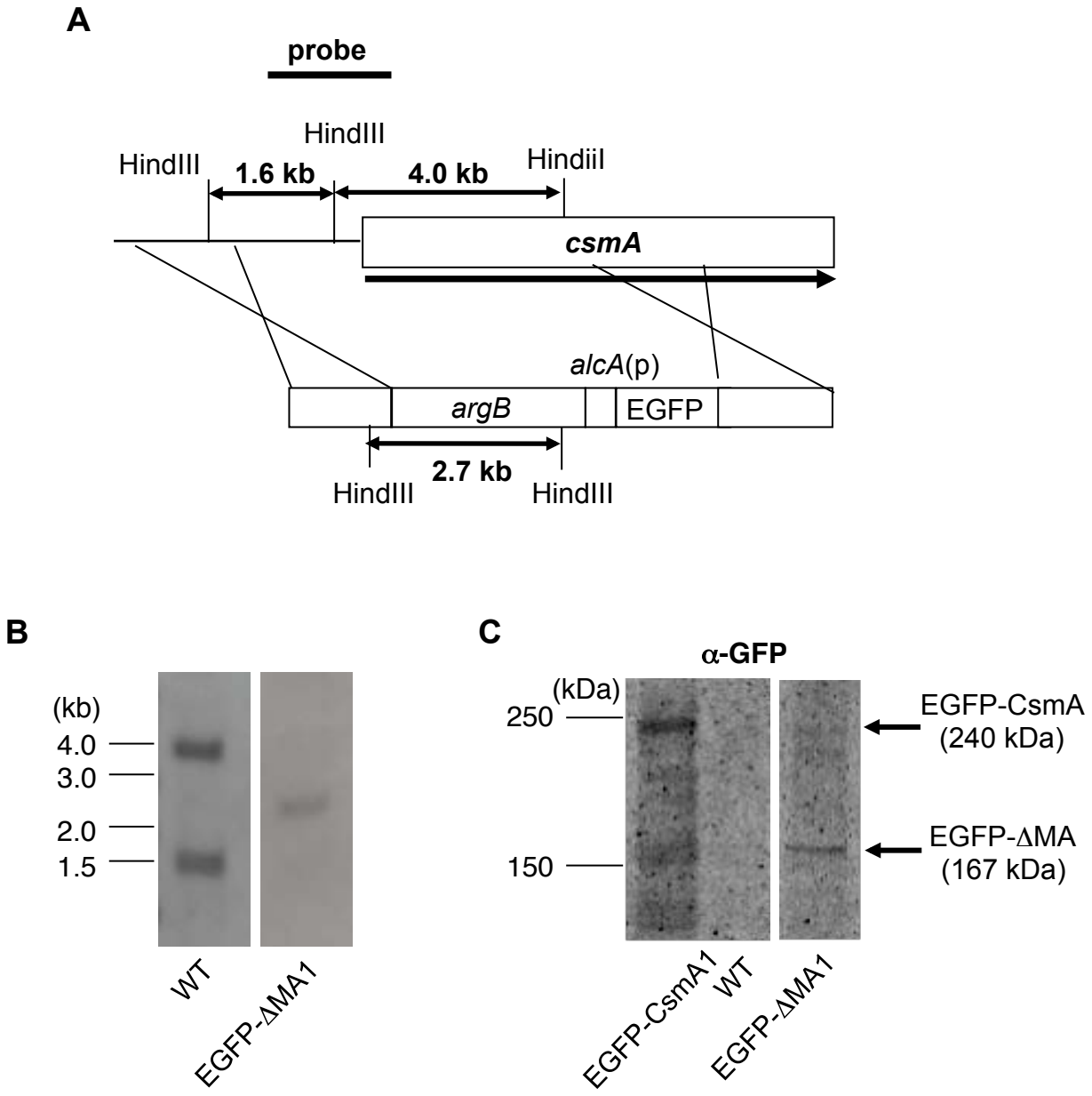


Figure 2-6. Construction of the EGFP-ΔMA producing strains.
(A) Scheme of construction.
(B) Southern blot analysis of HindIII digested total DNA of the EGFP-ΔMA producing strain using the 1.0 kb SpeI-XhoI fragment of pM-ALK-CHS5 as a probe.
(C) Western blot analysis of the cell extract of the EGFP-ΔMA produceing strain using anti-GFP antibody. The cell extract containing the same amount of proteins was loaded into each lane.

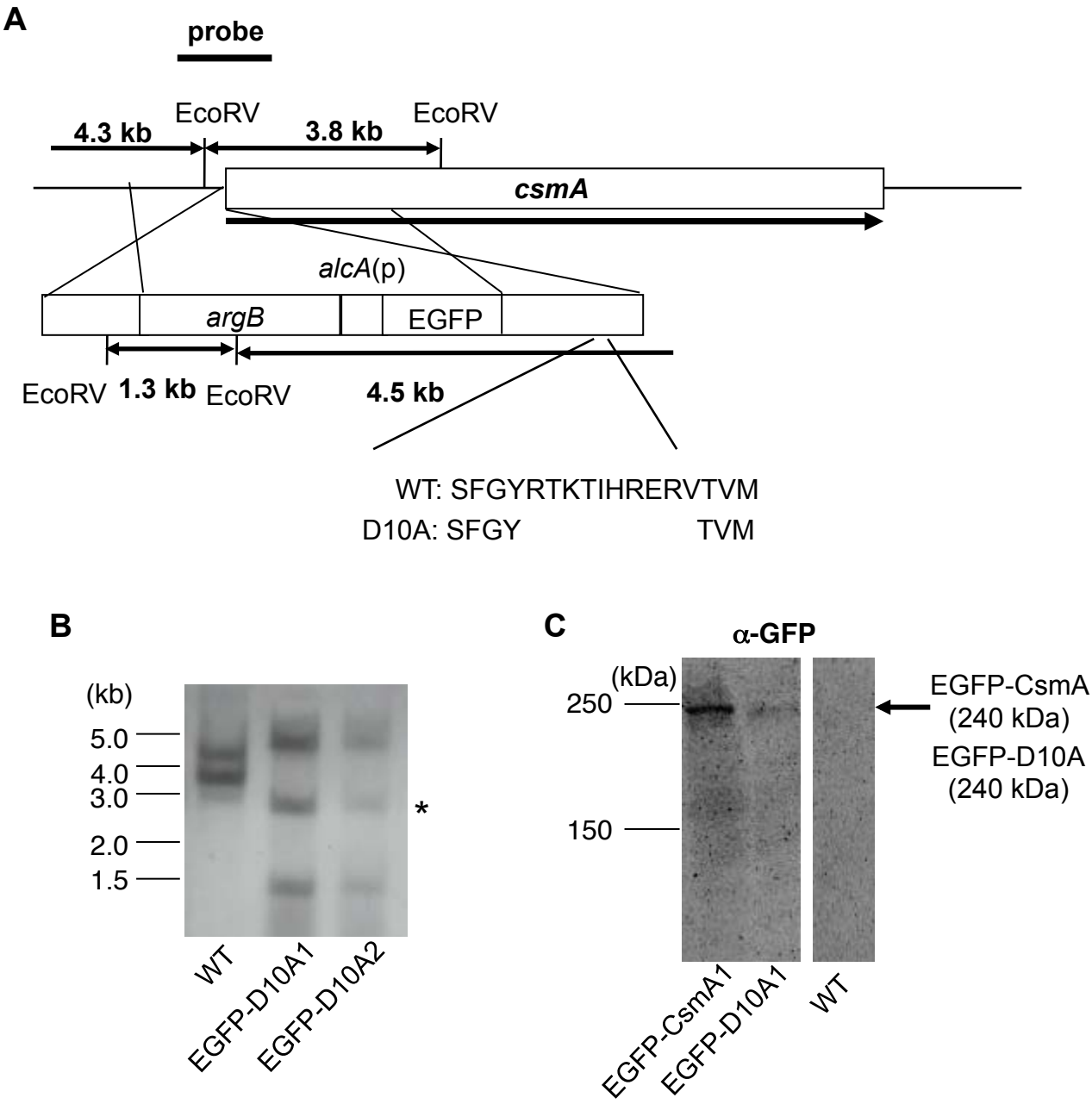


Figure 2-7. Construction of the EGFP-D10A producing strains.
(A) Scheme of construction.
(B) Southern blot analysis of EcoRV digested total DNA of the EGFP-D10A producing strains using the 1.0 kb SpeI-XhoI fragment of pM-ALK-CHS5 as a probe. *; non-specific band.
(C) Western blot analysis of the cell extract of EGFP-D10A produceing strain using anti-GFP antibody. The cell extract containing the same amount of proteins was loaded into each lane.

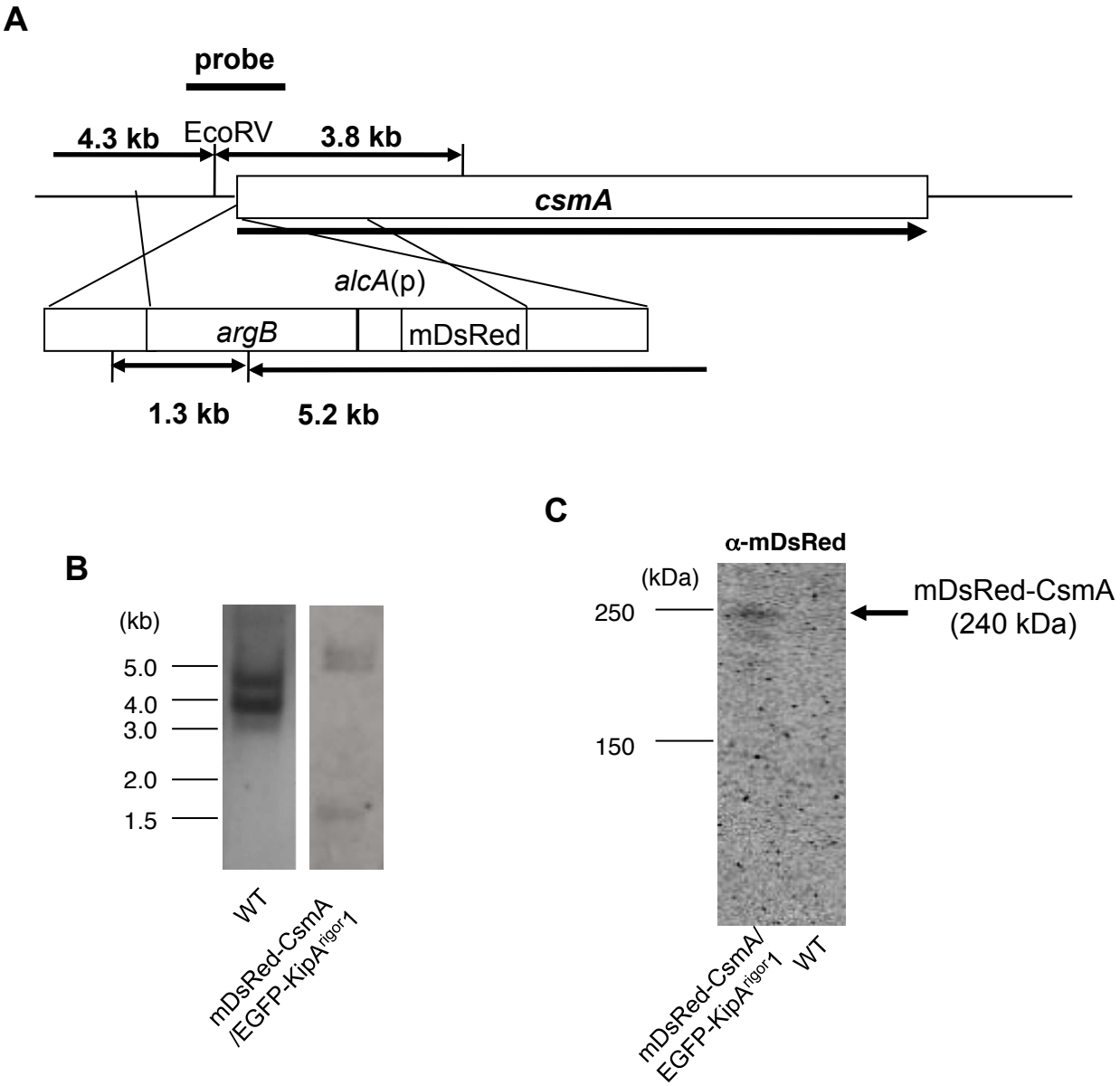


Figure 2-8. Construction of the mDsRed-CsmA producing strains.
(A) Scheme of construction.
(B) Southern blot analysis of EcoRV digested total DNA of the mDsRed-CsmA producing strain using the 1.0 kb SpeI-XhoI fragment of pM-ALK-CHS5 as a probe.
(C) Western blot analysis of the cell extract of the mDsRed-CsmA produceing strain using anti-mDsRed antibody. The cell extract containing the same amount of proteins was loaded into each lane.

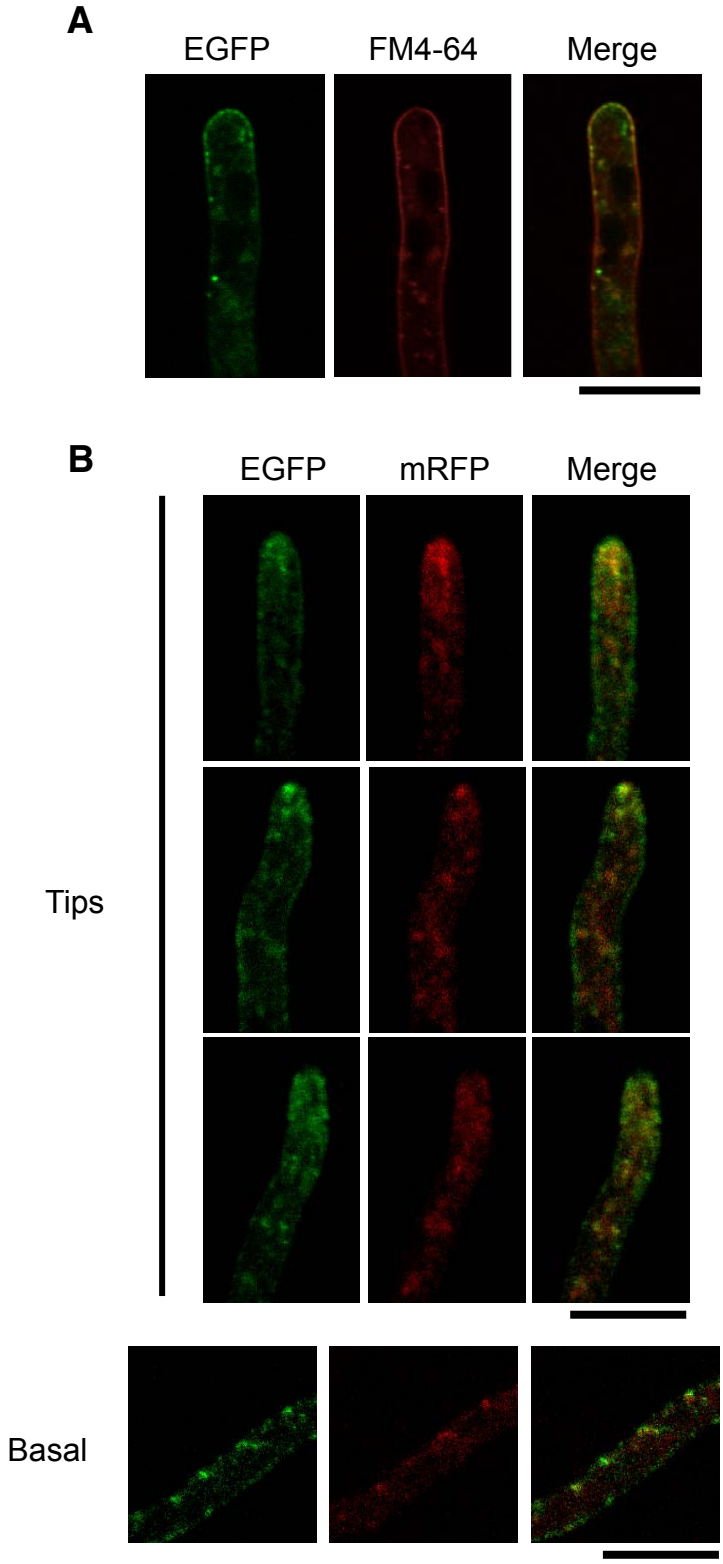


Figure 2-9. Localization of EGFP-CsmA in hyphae.
Hyphae of the EGFP-CsmA1 strain (A) and the EGFP-CsmA/mRFP-TlgB strain (B) grown in the MMTFuu liquid medium for 14-16 h at 37℃ were observed by fluorescence microscopy. Scale bars, 5 μm. (A) Hyphae of the EGFP-CsmA1 strain were stained with FM4-64. The fluorescence of EGFP and FM4-64 were merged. (B) The fluorescence images of EGFP and mRFP were merged. The upper two panels show hyphal tips; the lower panel shows ths basal region of a hypha.

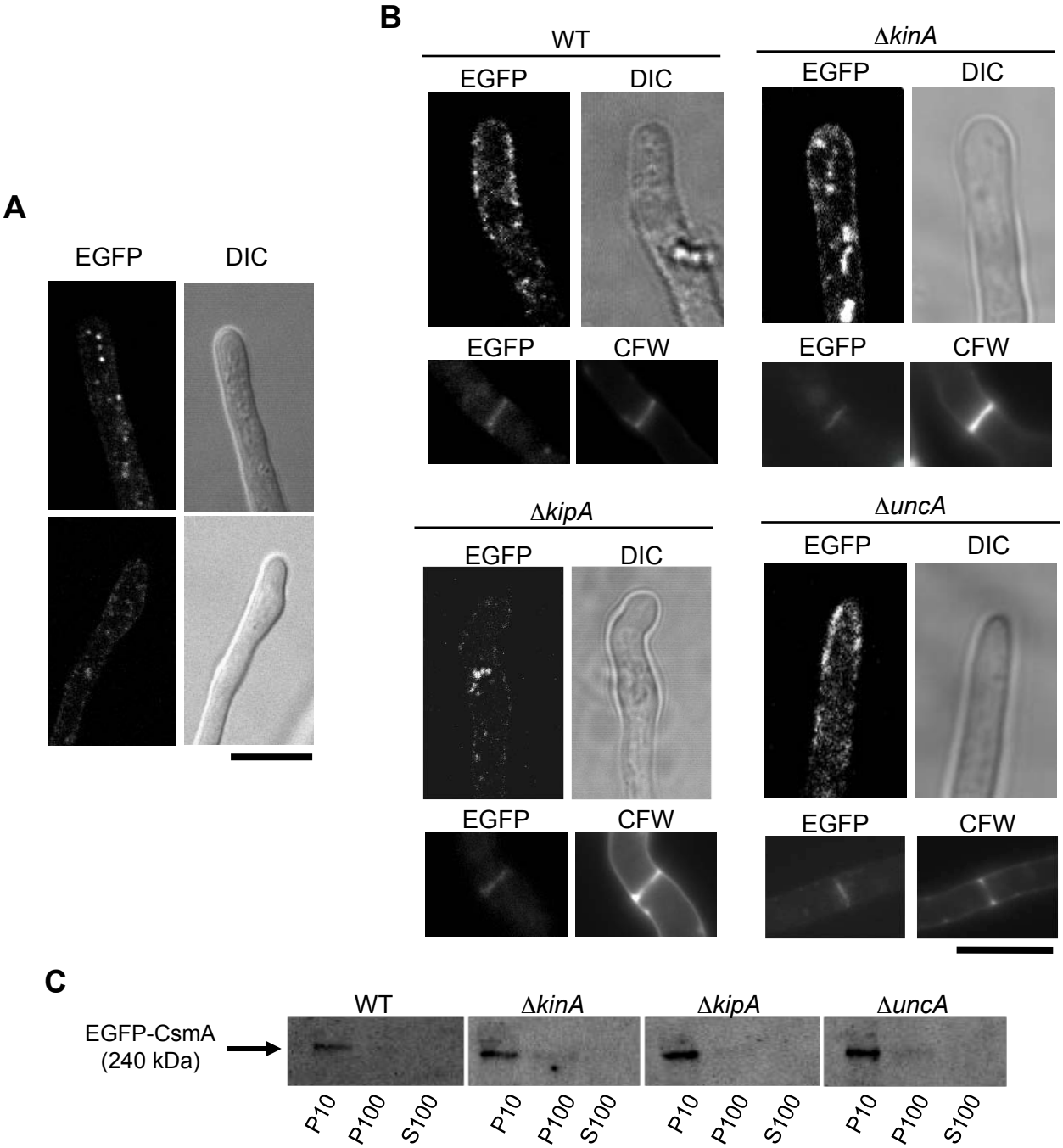


Figure 2-10. The effect of benomyl treatment or the deletion of kinesin genes on the localization of EGFP-CsmA.

(A) Localization of EGFP-CsmA1 after benomyl treatment. Hyphae of the EGFP-CsmA strain grown in the MMTFuu liquid medium for 14-16 h at 37℃ were treated with 2.4 μg/ml benomyl for 10 min and were observed by fluorescence microscopy after washing out benomyl. The fluorescence of EGFP at hyphal tips was observed as punctate (upper panel) or dispersed (lower panel) (see also Table 2-3). Scale bar, 5 μm. (B) Localization of EGFP-CsmA at hyphal tips and forming septa in the wild-type, *kinA*, *k ipA* and *u ncA* deletion mutants. Hyphae of the E GFP-CsmAΔkinA, the EGFP-CsmAΔkipA, and the EGFP-CsmAΔuncA strains grown under the same condition as descrived above (each upper panel) and septa of these strains grown on the MMTFuu solid medium and stained with CFW were observed. Scale bar, 5 μm. (C) Western blot analysis of the cell extracts of the strains mentioned above using anti-GFP antibody. P10, the 10,000 xg pellet; P100, the 100,000 xg pellet; S100, the 100,000 xg supernatant .

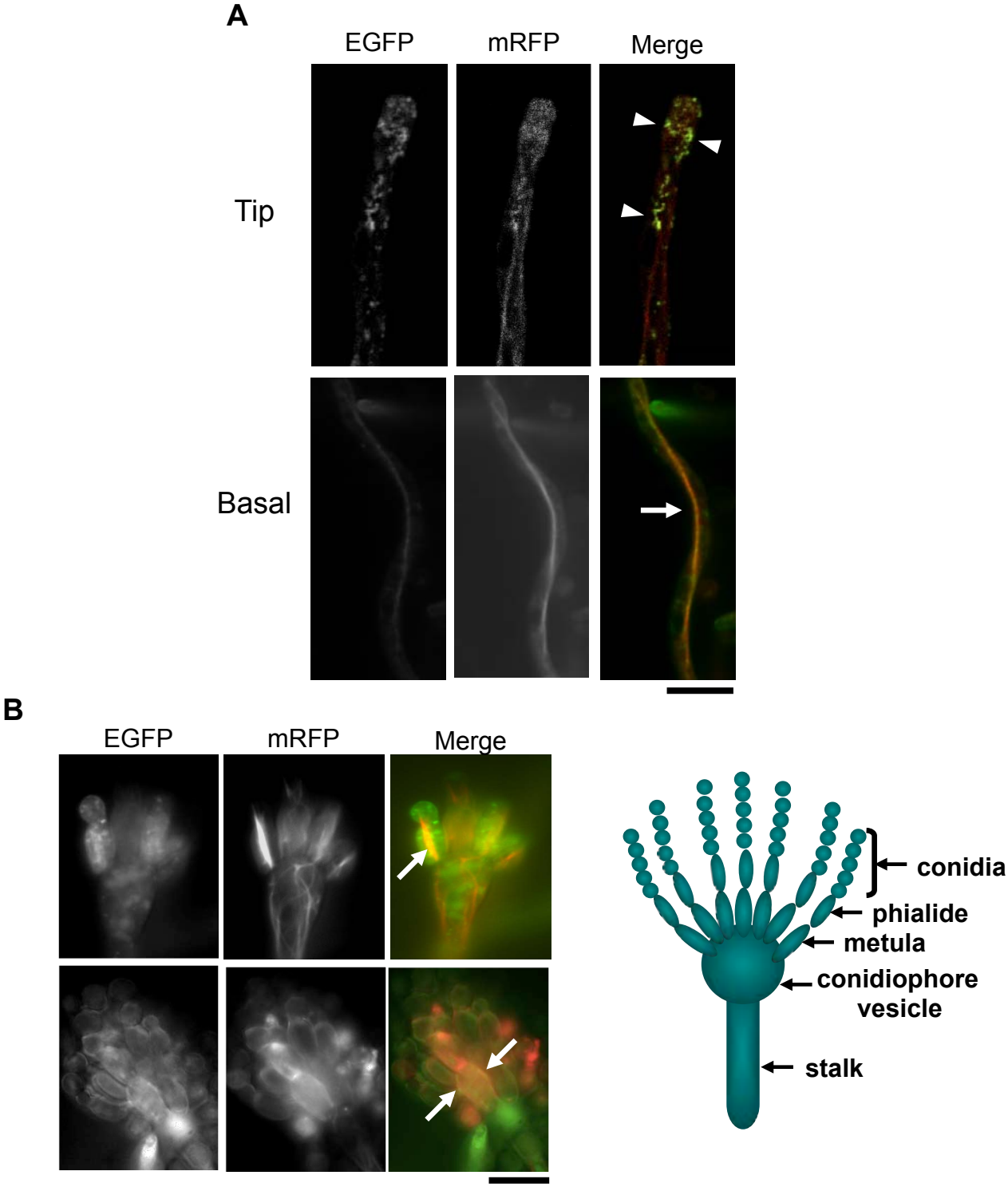


Figure 2-11. Localization of EGFP-CsmA of the mRFP-KinA^{rigor} producing strain in hyphae (A) and in conidiophore (B).
Localization of EGFP-CsmA and mRFP-KinA^{rigor} at a hyphal tip (A, upper panel), at basal region of a hypha (A, lower panel), and in conidiophores (B). Hyphae of the EGFP-CsmA/mRFP-KinA^{rigor} strain grown under the same condition as descrived in Fig. 2-8 (A) or grown on the MMTFuu solid medium for 18-20 h at 37℃ (B) were observed by fluorescence microscopy. Arrowheads or arrows indicate the co-localizations of EGFP and mRFP at the ends of tubular structures (arrowheads) or along tubular structures (arrows). Scale bars, 5 μm .

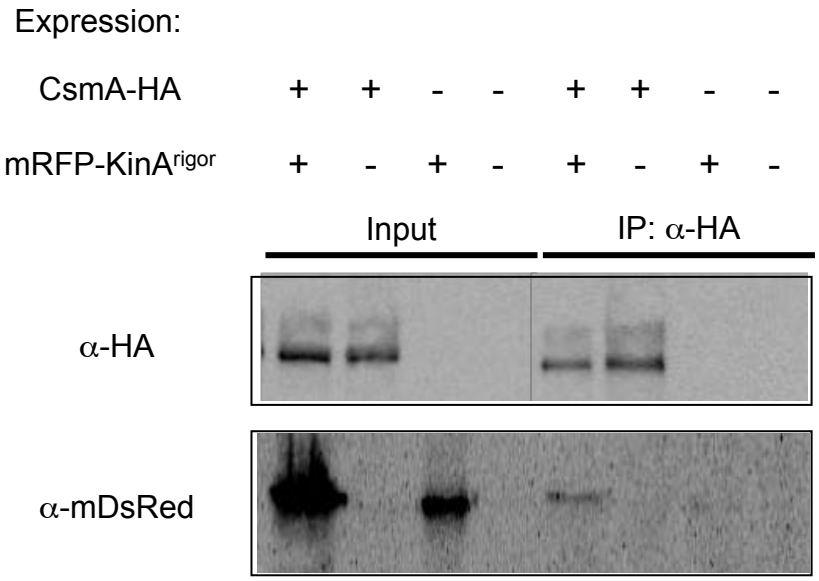


Figure 2-12. Co-immunoprecipitation of CsmA-HA with mRFP-KinA^{rigor} *in vivo*.
100,000 xg pellets (P100) of the cell extracts of the strains producing CsmA-HA and mRFP-KinA^{rigor}, CsmA-HA, or mRFP-KinA^{rigor} were immunoprecipitated with anti-HA antibody. P100 (Input) and immunoprecipitates (IP: α-HA) were subjected to Western blotting using anti-HA or anti-mDsRed antibody.

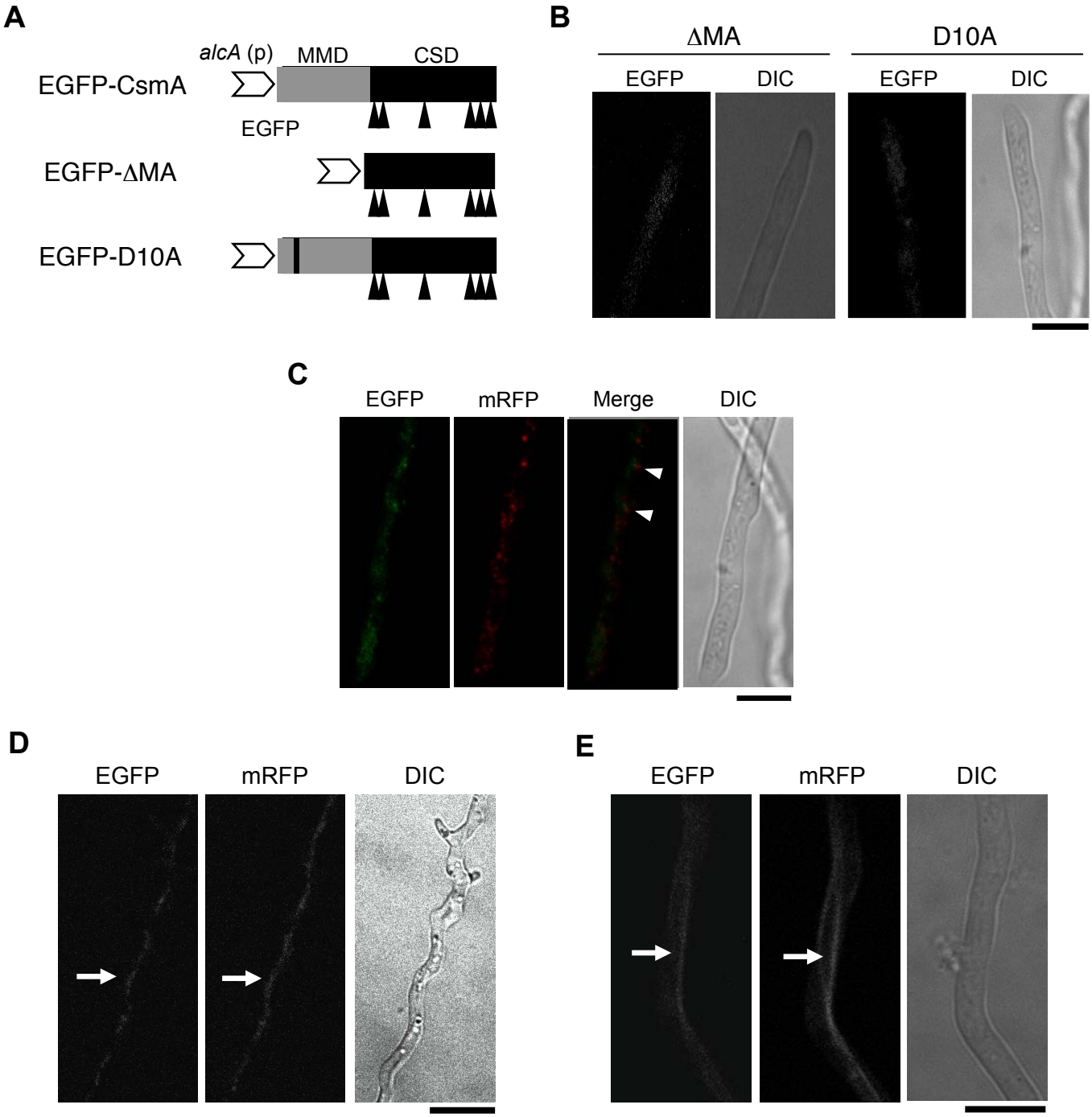


Figure 2-13. Localization of EGFP-ΔMA and EGFP-D10A in hyphae.
(A) Structures of EGFP-CsmA, EGFP-ΔMA, and EGFP-D10A. Arrowheads indicate the deduced transmenbrane regions. (B) Localization of EGFP-ΔMA and EGFP-D10A at hyphal tips. (C) Localization of EGFP-D10A and mRFP-TlgB at the basal region of a hypha. Arrowheads indicate the co-localization of the fluorescence of EGFP and mRFP. (D and E) Localization of EGFP-ΔMA, EGFP-D10A, and mRFP-KinA^{rigor} at the basal region of a hyphae. Arrows indicate the co-localization of EGFP and mRFP at tubular structures. All strains were grown under the same condition as described in Fig. 2-8. Scale bars, 5 μm.

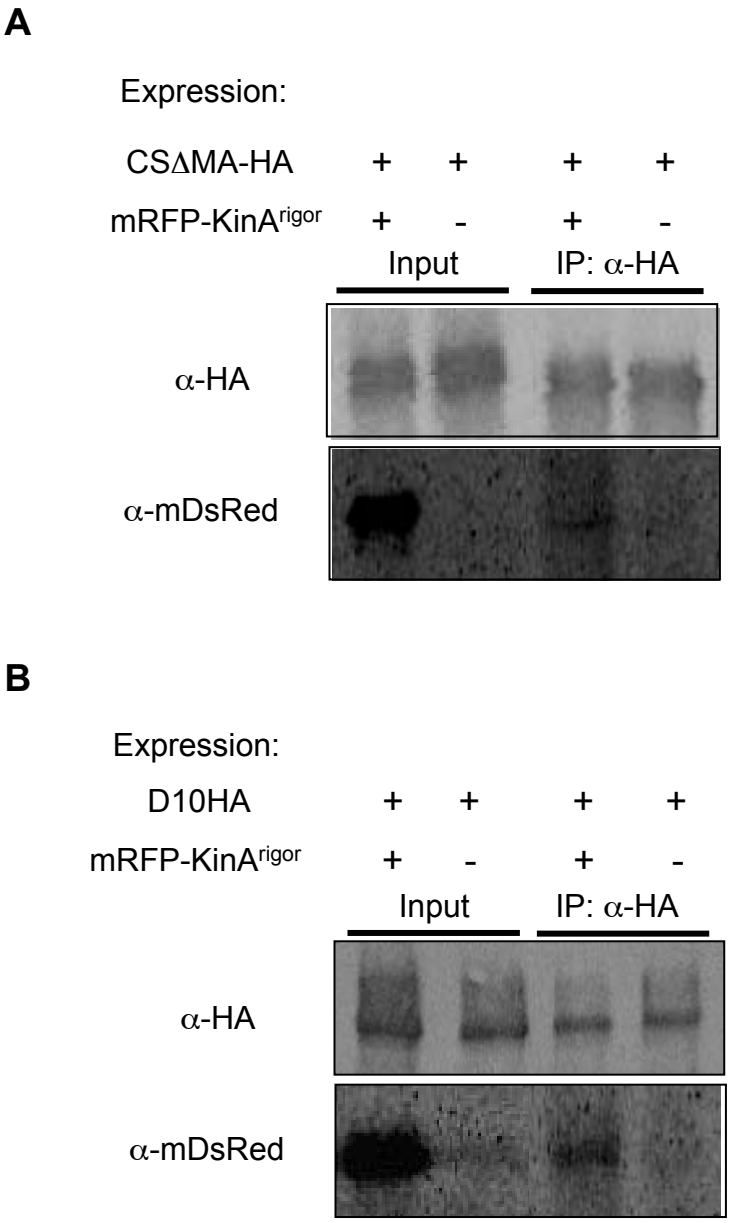


Figure 2-14. Co-immunoprecipitation of either CSΔMA-HA or D10A-HA with mRFP-KinA^{rigor} *in vivo*.
100,000 xg pellet (P100) of the cell extracts of the strains producing CSΔMA-HA (A) or D10A-HA (B) and mRFP-KinA^{rigor,} CSΔMA-HA, or D10A-HA were immunoprecipitated with anti-HA antibody. P100 (Input) and immunoprecipitates (IP: α-HA) were subjected to Western blotting using anti-HA or anti-mDsRed antibody.

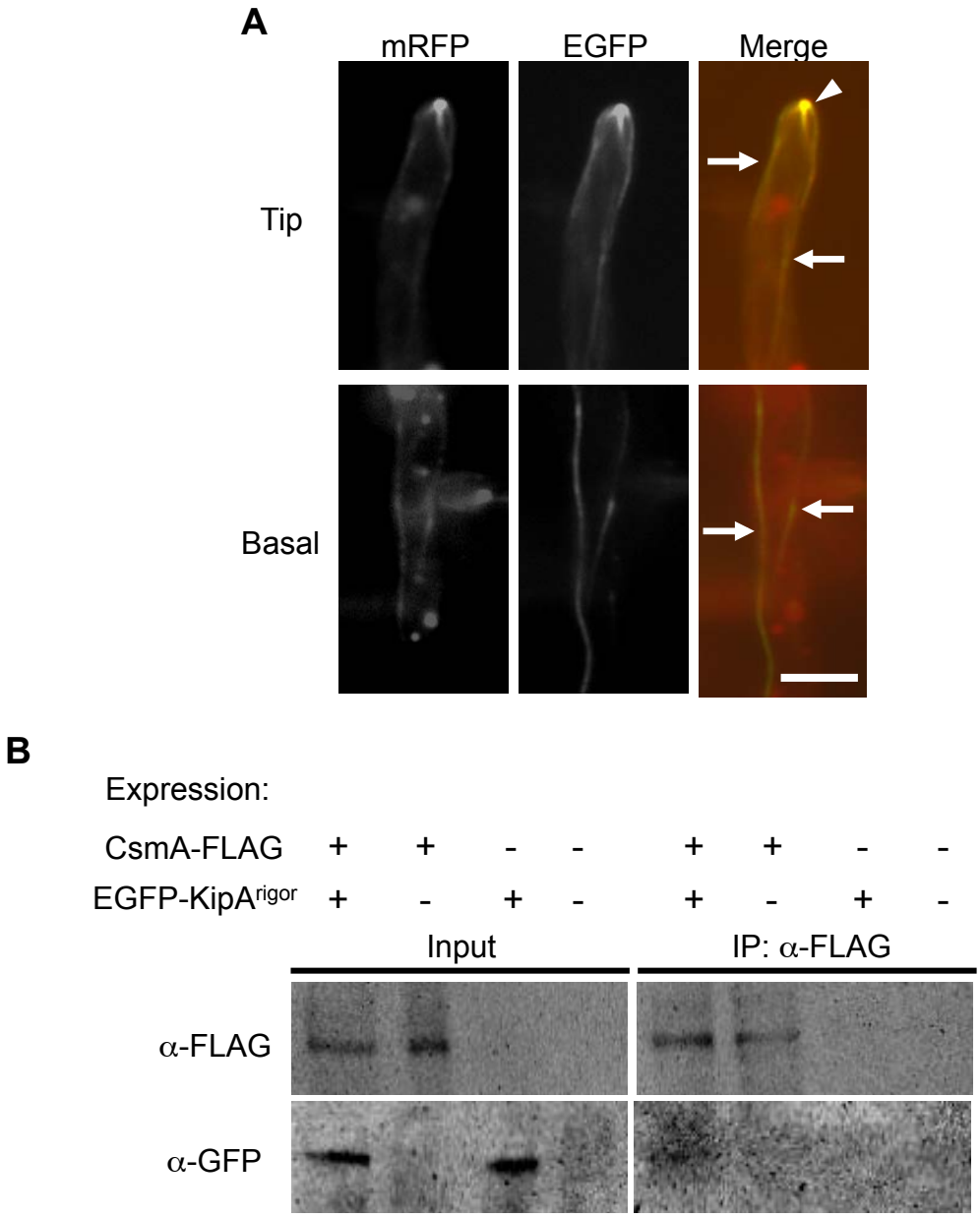


Figure 2-15.
(A) Localization of mDsRed-CsmA and EGFP-KipA^{rigor} at a hyphal tip (the upper panel) and at the basal region of a hypha (the lower panel). Hyphae of the mDsRed-CsmA/EGFP-KipA^{rigor} strain grown under the same condition as descrived in Fig. 2-8 were observed. Arrowheads and arrows indicate the co-localization of EGFP and mRFP at a hyphal apex (arrowheads) and at tubular structures (arrows), respectively. Scale bar, 5 μm.
(B) Co-immunoprecipitation of CsmA-FLAG with EGFP-KipA^{rigor} *in vivo*. 100,000 xg pellet (P100) of the cell extracts of the strains producing CsmA-FLAG and EGFP-KipA^{rigor} or only CsmA-FLAG or EGFP-KipA^{rigor} were immunoprecipitated with anti-FLAG antibody. P100 (Input) and immunoprecipitates (IP: α-FLAG) were subjected to Western blotting using anti-FLAG or anti-GFP antibody.

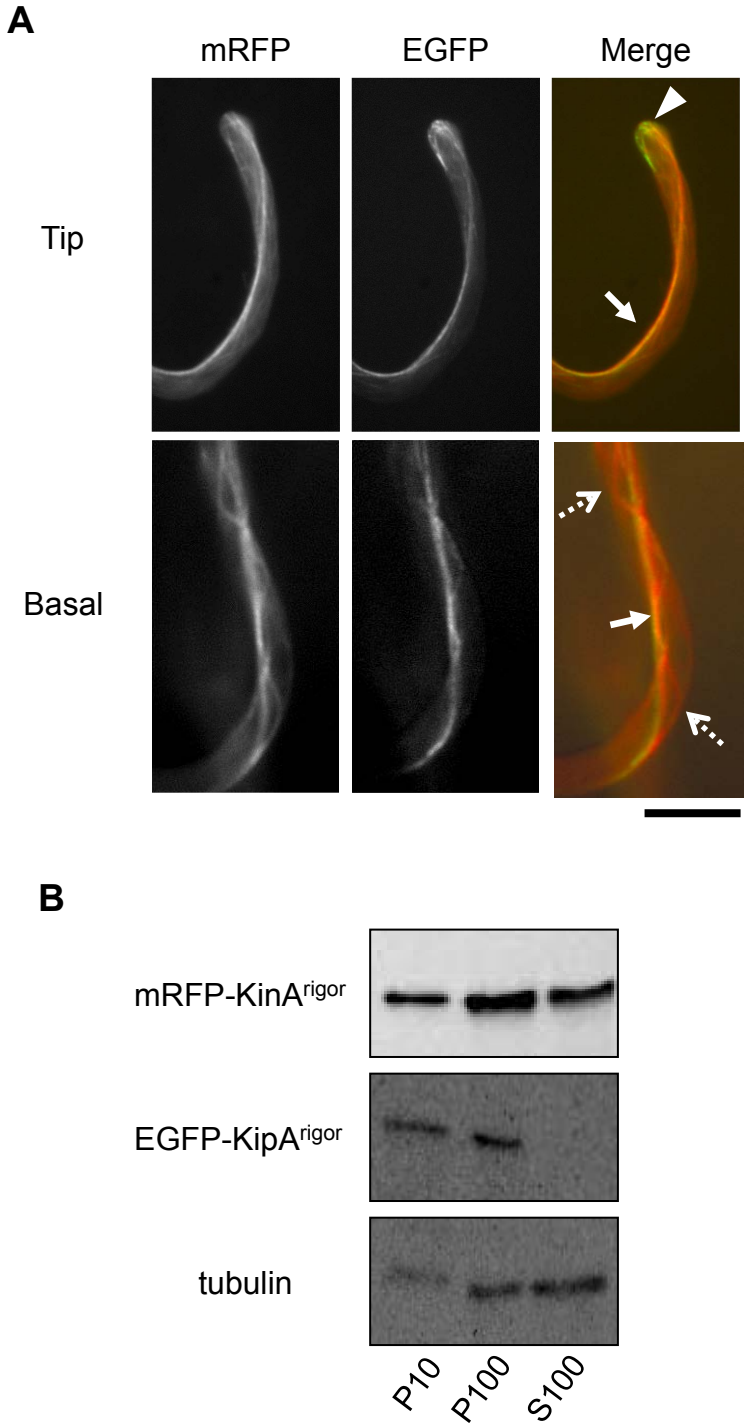


Figure 2-16.
(A) Localization of mRFP-KinA^{rigor} and EGFP-KipA^{rigor} at a hyphal tip (the upper panel) and at the basal region of hypha (the lower panel). Arrowhead and arrows indicate the co-localization of mRFP and EGFP at hyphal apex (arrowhead) and at tubular structures (arrows), respectively. Dotted arrows indicate the specific tubular structures of mRFP-KinA^{rigor}. Scale bars, 5 μm.
(B) Western blot analysis of the cell extracts of the mRFP-KinA^{rigor}/EGFP-KipA^{rigor} strain using anti-mDsRed, anti-GFP, and anti-α-tubulin antibodies. P10, the 10,000xg pellet; P100, the 100,000xg pellet; S100, the 100,000xg supernatant.

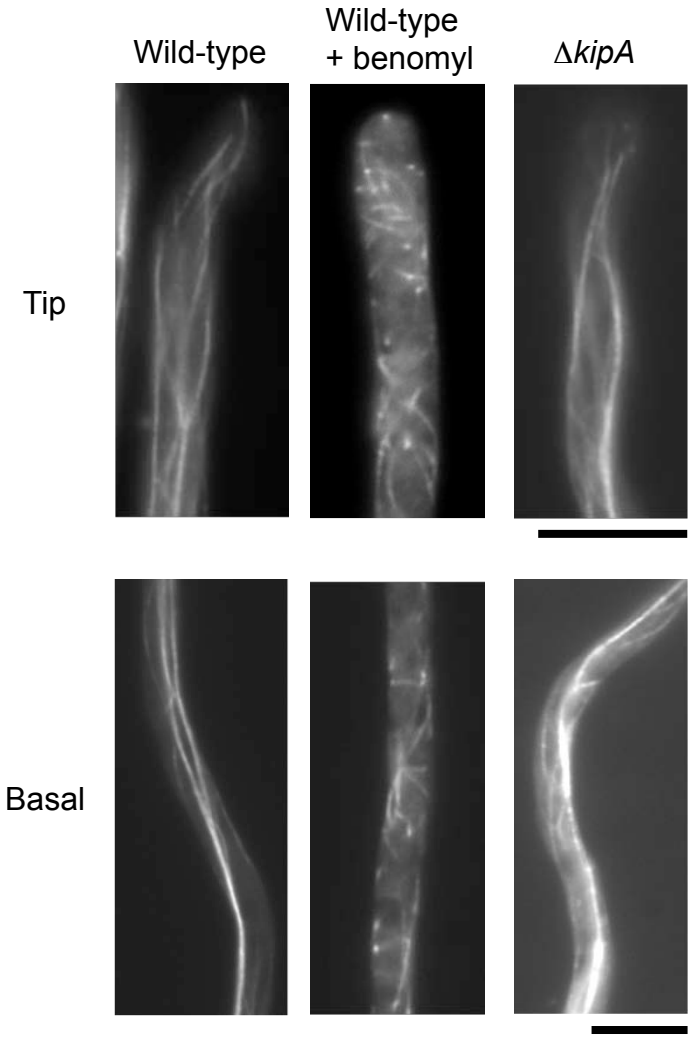


Figure 2-17. Localization of mRFP-KinA^{rigor} in *kipA* deletion mutant.
A Hypha of the ABPU1/mRFP-KinA^{rigor} strain (Wild-type) and that treated with benomyl for 30 min (Wild-type+ benomyl), and that of the mRFP-KinA^{rigor}ΔkipA (Δ*kipA*) strain grown under the same condition as described in Fig. 2-8 were observed by fluorescence microscopy. Each upper panel and lower panel indicate the tip region of hyphae and the basal region of the hyphae, respectively. Scale bars, 5 μm.

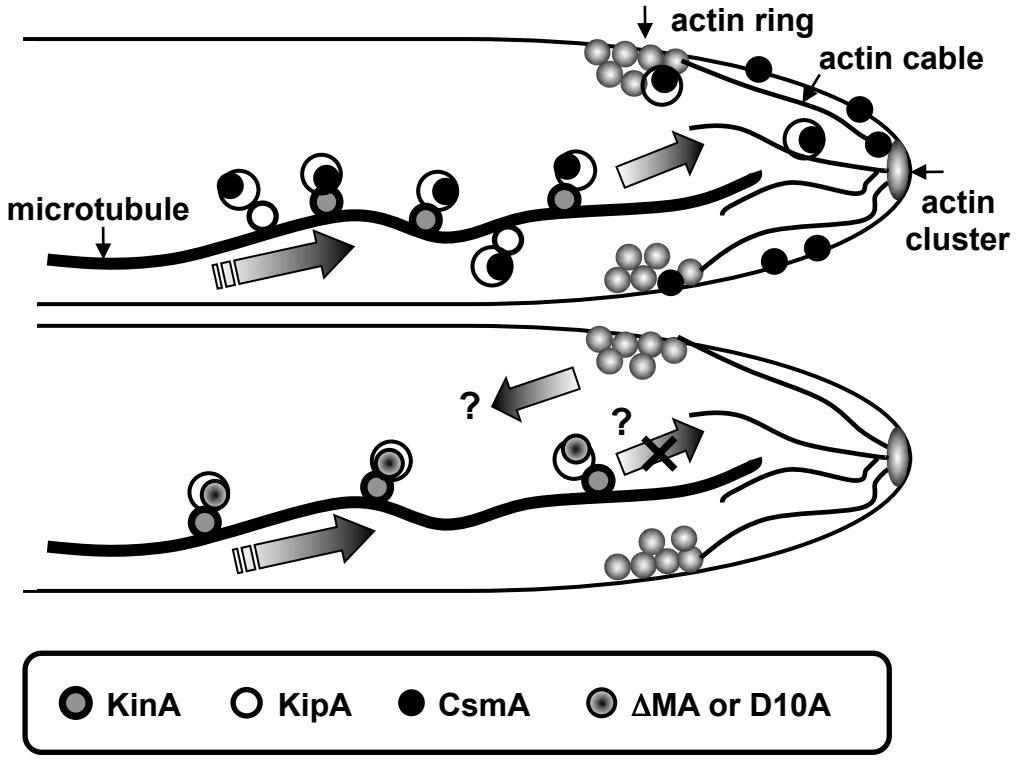


Figure 2-18. The model of the localization mechanism of CsmA to hyphal tips.
In the hyphae of *A. nidulans*, linear microtubules extend to the hyphal tips, an actin cluster is formed at the hyphal apex, actin cables extended predominantly from the actin cluster, and actin ring are formed near subapical membrane regions. CsmA would be transported to the hyphal tip region on microtubules in KinA and/or KipA dependent manner and to hyphal cortex on actin cables. In this and our previous studies, it is suggested that a portion of CsmA localizes at subapical region near actin ring (upper panel). Since it is indicated that CsmA without its MMD (ΔMA) or without its actin-interacting amino acids (D10A) is transported to hyphal tips on microtubules through the interaction with KinA as wild-type CsmA, it is possible that the MMD is required for the transport on actin cable or the anchoring on the subapical region near actin ring (lower panel). See the text for details.

第 3 章　CsmA と ChsB の菌糸内局在化機構の比較

3-1　序

序章でも述べたように、菌類のキチン合成酵素のうち、クラス III、V、VI、VII に属するキチン合成酵素をコードする遺伝子は *S. cerevisiae* や *S. pombe*、*C. albicans* 等のゲノム中には存在せず、菌糸型の形態形成に重要な役割を果たすと予想される。*A. nidulans* のクラス III キチン合成酵素 ChsB は菌糸の生長に必須の機能を持ち、菌糸先端、形成中の隔壁部位、分生子形成器官等に局在が観察されている (Fukuda *et al*., 2009) 。特に生長速度の速い菌糸先端においては ChsB の Spk 付近における局在が観察され、Spk は菌糸の生長方向の決定に関わることから、先端生長において ChsB は菌糸先端における極性的なキチン合成に関わる可能性が考えられる。本論文第 2 章において MMD を持つキチン合成酵素 CsmA の局在化機構の解析を行なったが、更に元来 MMD を持たない ChsB の菌糸内局在化機構を解析することによりキチン合成酵素全般の局在化機構の解明に繋がると予想された。そこで本章では ChsB 及び GPI アンカー型の修飾を受けるキチン分解酵素である ChiA の菌糸内局在化における微小管及びキネシンの役割について解析し、CsmA の局在化機構との比較を行なった。以下に、本章における解析と関わりの深い糸状菌における極性生長についての知見、菌類のクラス III キチン合成酵素及び GPI アンカー型タンパク質についての知見を述べる。

3-1-1　糸状菌における極性生長

糸状菌において、菌糸の伸長は微小管及びアクチンによる極性の確立と維持によって支持されている。極性の確立は、small GTPase である ModA 及び RacA (*S. cerevisiae* の Cdc42 のホモログ) による極性部位の決定、アクチン細胞骨格の形成、分泌小胞の局在化といったプロセスで進行する (Virag *et al*., 2007) 。極性の確立に関わる因子については *S. cerevisiae* と共通性が見られるが、*S. cerevisiae* では *cdc42*Δは致死であるが、*A. nidulans* においてはこれらのホモログの破壊は致死とならない (Mahlert *et al*., 2006; Virag *et al*., 2007) 。一方、極性の維持に関しては、アクチンだけでなく微小管の形成と伸長が必須であり、微小管は主に (1) キネシンによる細胞内輸送 (2) 細胞端マーカータンパク質 (cell end marker) の菌糸先端への到達 (3) 先端生長に必要なタンパク質群が機能するための構造的基盤といった役割により極性の確立に機能すると考えられ

る (Fischer *et al.*, 2008) 。このことは *S. cerevisiae* において細胞内輸送が主としてアクチン及びミオシンによって行なわれ、微小管及びキネシンは主に細胞分裂時の核の位置の決定に機能することと大きく異なる。

序章でも述べたように、糸状菌において活発に伸長している菌糸先端には細胞内の小胞が周囲に比べて顕著に蓄積している Spk と呼ばれる領域が観察される (Virag and Harris, 2006) 。Spk の形成と維持には微小管が必要であり、*A. nidulans* において、Spk にはアクチン、アクチン重合に関わる formin である SepA、cell end marker である TeaA 及び TeaR、キチン合成酵素 ChsB、exocysit complex のタンパク質等が局在化することが明らかとなっている (Sharpless and Harris, 2002; Takeshita *et al.*, 2008; Taheri-Talesh *et al.*, 2008; Fukuda *et al.*, 2009) 。Spk は菌糸後方から輸送されてきた小胞を集積し、更に菌糸の最先端部の形質膜上へ小胞を輸送する際の中心部 (VSC: vesicle supply center) として機能し、菌糸先端における伸長方向の決定に関わると考えられることから、Spk に局在するタンパク質群の菌糸先端生長における機能の重要性が示唆されている (Virag and Harris, 2006) 。

3-1-2　クラス III キチン合成酵素

子嚢菌類に属する *N. crassa* のクラス III キチン合成酵素 CHS-1 は *A. nidulans* の ChsB と 63%の相同性を持ち、CHS-1 をコードする遺伝子の機能欠失株では、生育遅延、菌糸の形態異常が観察され、キチン合成酵素の阻害剤である Nikkomycin Z に対する感受性の上昇、キチン合成酵素活性の低下等が報告された (Yarden *et al.*, 1991) 。*A. fumigatus* のクラスⅢキチン合成酵素 ChsC と ChsG は、*A. nidulans* の ChsB とそれぞれ 68%、89%の相同性を示す。*chsC* の単独破壊株では野生型株と比較して顕著な表現型異常は観察されなかったが、*chsG* の単独破壊株では生育遅延、菌糸の多分岐化、分生子形成効率の低下が見られた (Mellado *et al.*, 1996) 。さらに *chsC* と *chsG* の二重破壊株が作製されたが、*chsG* 単独破壊株と同様の表現型を示した。また、*chsG* とクラスⅤに属するキチン合成酵素をコードする *chsE* についても二重破壊株が作製され、その機能が大きくは重複しないことが示唆された (Mellado *et al.*, 2003) 。また、植物病原菌 *F. oxysporum* のクラス III キチン合成酵素 Chs3 をコードする遺伝子の破壊株取得が試みられたが、取得されなかったことから、*chs3* は生育に必須であることが示唆されている (Martín-Udíroz *et al.*, 2004) 。*W. dermatitidis* のク

ラス III キチン合成酵素遺伝子 *CHS3* はストレス状況下で高発現し、*CHS3* の発現は温度や時間による制御を受けることが示唆されている (Wang *et al.*, 2000) 。また *CHS3* 単独破壊株では表現型に顕著な異常は見られないものの、クラス II キチン合成酵素をコードする *CHS2* との二重破壊では植物に対する病原性が低下した (Wang *et al.*, 2001) 。*B. cinerea* の *chs3a* 破壊株は野生型株と比較して 39%のキチン含量の低下を示し、生育遅延が見られ、菌糸の多分岐化が観察された。またこの破壊株では植物体への感染能も低下した (Soulie *et al.*, 2006; Arbelet *et al.*, 2010) 。一方、*C. graminicola* のクラスIIIキチン合成酵素をコードする遺伝子 *Cgchs III*の破壊株においては、顕著な表現型異常が観察されなかった (Werner *et al.*, 2007) 。しかし、*Colletotrichum* にはクラスIIIキチン合成酵素が複数存在する可能性も考えられている。

接合菌類の糸状菌である *P. blakesleeanusi* にはクラスIIIキチン合成酵素をコードする遺伝子は存在しなかった (Miyazaki *et al.*, 1997) 。同様に接合菌類に属する *Rhizopus oryzae* のゲノム中にはクラスIIIに属するキチン合成酵素をコードする遺伝子は存在せず (阿部ら, 2006) 、*Benjaminiella poitrasii* でもクラスIIIに属するものをコードする遺伝子が見つかっていない (Chitnis *et al.*, 2002) 。これらのことから、接合菌類にはクラスIIIキチン合成酵素が存在しない可能性が高い。接合菌類の糸状菌は隔壁や分生子を形成しないこと、また序章でも述べたように *A. nidulans* の *chsB* 破壊株は分生子を全く形成しないことから、クラスIIIのキチン合成酵素はこれらに関連した細胞器官を形成する上で重要な役割を担っている可能性も考えられる。

クラス III キチン合成酵素の局在に関しては、子嚢菌類のモデル生物であるアカパンカビ *Neurospora crassa* のクラス III キチン合成酵素 CHS-1 は ChsB と同様に菌糸最先端部に局在が観察され、Spk の染色試薬である FM4-64 による染色部位との共局在が観察されたが (Verdin *et al.*, 2009) 、報告例は極めて少ない。

3-1-3　菌類における GPI アンカー型タンパク質

動物を含め一般に GPI (glycosylphosphatidylinositol) 付加による修飾を受けるタンパク質（GPI アンカー型タンパク質）は、GPI によるアンカーリングを通して形質膜に局在する (Brown and Rose, 1992) 。GPI アンカー型タンパク質の局在する形質膜上の領域はステロールやスフィンゴ脂質を豊富に含む微小な膜ドメインを形成し、菌類においてもエンドサイトーシス部位や細胞極性の確

立に必要なタンパク質群の局在化する足場となることが示唆されている (Steinberg, 2007; Fischer *et al*., 2008) 。菌類において、細胞壁に局在化し機能するタンパク質の一部も GPI アンカー型タンパク質であると推定されており、GPI により形質膜に留まるものと、GPI の糖鎖部分が切断されβ-1,6-グルカンと共有結合するものに大別される (Latge, 2007) 。*S. cerevisiae* の細胞壁形成に関わる GPI アンカー型タンパク質としては、Gas1p 及び Crh1p について解析されており、Gas1p は bud neck に局在し、β-1,3-グルカンの伸長及び bud neck におけるキチンリングの形成に機能すること (Mouyna *et al*., 2000; Rolli *et al*., 2009) 、Crh1p はβ-1,3-グルカンあるいはβ-1,6-グルカンとキチンの連結に機能することが示唆されている (Cabib, 2009) 。*A. nidulans* のキチン分解酵素 ChiA は全長で 961 アミノ酸からなり、タンパク質の N 末端側に分泌シグナル及び活性中心を含む配列、更に 620 アミノ酸からなるセリン、スレオニン、プロリンに富む領域 (STP 領域) 、更に C 末端側に GPI アンカーによる修飾を受けるとされるモチーフを持つ (Yamazaki *et al*., 2008) 。ChiA は菌糸の発芽部位先端、隔壁、分岐部位に局在が観察され、膜に留まるタイプの GPI アンカー型タンパク質として形質膜に局在することが示唆されている (Yamazaki *et al*., 2008) 。*N. crassa* における *chiA* のホモログも GPI アンカー型タンパク質をコードすると推定され (Browman *et al*., 2006) 、*C. albicans* においても GPI アンカー型キチン分解酵素をコードする *cht2* が存在し、Cht2 が特に酵母型細胞の細胞壁形成に機能すると考えられている (Dunkler *et al*., 2005; Sosinska *et al*., 2008) 。近年 2 つの研究グループから *A. nidulans* の GPI アンカー型タンパク質と推定されるものが探索された結果、82 個 (de Groot *et al*., 2009) あるいは 129 個 (Cao *et al*., 2009) の候補タンパク質が同定され、それらの中には *S. cerevisiae* の *gas*、*crh* のホモログ、ホスホリパーゼ、アスパラギン酸プロテアーゼ等が含まれていたが、その菌糸内局在化機構については ChiA も含めて明らかとなっていない。

以上のような背景から、本章では Spk に局在し菌糸先端生長に必須の役割を果たすキチン合成酵素 ChsB、及び GPI アンカー型タンパク質として細胞壁のリモデリングに機能すると考えられる ChiA について、菌糸内局在化機構を解析した。また、ChsB については第 2 章において解析した CsmA の局在化機構との差異についても検討した。

3-2　材料と方法

3-2-1　菌株

Escherichia coli :
DH5α (第 1 章 1-2-1 参照)

Aspergillus nidulans :
本章で用いた *A. nidulans* 菌株を Table 3-1 に示した。

3-2-2　培地

3-2-3　DNA の取り扱い法

3-2-4　塩基配列の決定法

3-2-5　*E. coli* の形質転換法と *E. coli* からのプラスミド抽出法

以上の項目については第 1 章「1-2　材料と方法」と同様に行なった。

3-2-6　プラスミドの構築

本章で用いたオリゴヌクレオチドを以下に示した。

AnKinAa: 5'-GTCCCACTTATGATGTCGC-3'
AnKin4: 5'-AGGTACCCGGTTTCACCACTGC-3'
KipA1: 5'-CAACGCACCGAATACTCAGC-3'
KipA4: 5'-GTGTTCAGAGTCTCTGTAGC-3'
FcBprobe2F: 5'-CCCACCCAACCTTCACTTCCCCT-3'
FcBprobe2R: 5'-CAGATGCAGACATACCTCGCTGAA-3'

本章で使用したプラスミドを以下のように構築あるいは利用した。

pNZ59, pNZ13, pCS5-NZ: 第 2 章 2-2-6 参照 (Zekert and Fischer, 2009) 。

pEB-argB, pFB-argB: ChsB の N 末端側に EGFP あるいは 3xFLAG を付加した EGFP-ChsB あるいは FLAG-ChsB を *chsB* 自身のプロモーター下で *argB* 部位において発現し生産する株の作製に使用した (Fukuda *et al*., 2009) 。

pSS1: 第 1 章 1-2-6 参照 (Motoyama *et al*., 1994) 。

pmDsRed-CsmA: 第 2 章 2-2-6 参照

pEGFP-ChsB: ChsB の N 末端側に EGFP を付加した EGFP-ChsB を *chsB* 自身のプロモーター下でゲノム上の *chsB* 本来の部位において発現し生産する株の作製に使用した (髙井, 2009) 。

3-2-7　*A. nidulans* の形質転換法
3-2-8　*A. nidulans* の全 DNA 抽出法
3-2-9　サザン解析
以上の項目については第 1 章「1-2　材料と方法」と同様に行なった。

3-2-10　本章で用いた株の作製
EGFP-ChsB1, 2: *argB* 部位で *chsB* 自身のプロモーター下で EGFP-ChsB を発現し生産する株を作製するため、pEB-argB (3-2-6 参照) 由来の約 6.0 kb の BglII 断片を用いて、ABPU1 株 (Table 3-1) を親株として形質転換を行い、アルギニン要求性の回復した形質転換体を取得した。これらの株の全 DNA を調製し、pSS1 (3-2-6 参照) 由来の約 1.7 kb の BamHI-SphI 断片をプローブとしてサザン解析を行い、目的の株がそれぞれ 2 株以上得られたことを確認した (Fig. 3-1) 。これらのうち 2 株を EGFP-ChsB1, 2 株と命名した。

EGFP-ChsB/mRFP-TlgB1, 2: *tlgB* の本来の部位で *alcA* プロモーター下で mRFP-TlgB を発現し、*argB* 部位で *chsB* 自身のプロモーター下で EGFP-ChsB を発現し生産する株を作製するため、pNZ59 (3-2-6 参照) 由来の 5.1 kb の EcoRI-BglII 断片を用いて、EGFP-ChsB1 株を親株として形質転換し、ピリドキシン要求性の回復した形質転換体を取得した。これらの株の全 DNA を調製し、第 2 章 Fig. 2-2 と同様のサザン解析を行い目的の株が 2 株以上得られたことを確認した。これらのうち 2 株を EGFP-ChsB/mRFP-TlgB1, 2 株と命名した。

EGFP-ChsBΔkinA1, 2, EGFP-ChsBΔkipA1, 2: *kinA* 破壊株あるいは *kipA* 破壊株において *argB* 部位で *chsB* 自身のプロモーター下で EGFP-ChsB を発現し生産する株を作製するため、pEB-argB 由来の約 6.0 kb の BglII 断片を用いて、SNR1 株 (Δ*kinA* 株) あるいは SSK44 株 (Δ*kipA* 株) (Table 3-1) を親株として形質転換を行い、アルギニン要求性の回復した形質転換体を取得した。これらの株の全

DNA を調製し、pSS1 由来の約 1.7 kb の BamHI-SphI 断片をプローブとしてサザン解析を行い、目的の株がそれぞれ 2 株以上得られたことを確認した (Fig. 3-1) 。これらのうち 2 株を EGFP-ChsBΔkinA1, 2 株あるいは EGFP-ChsBΔkipA1, 2 株と命名した。

EGFP-ChsBΔuncA1, 2: *uncA* 破壊株において *argB* 部位で *chsB* 本来のプロモーター下で EGFP-ChsB を発現し生産する株を作製するため、pNZ13 (3-2-6 参照) を鋳型として UncA-LB-fwd 及び UncA-RB-rev (Table 2-2) をプライマーとして PCR により増幅した約 4.0 kb の断片を用いて、EGFP-ChsB1 株を親株として形質転換を行ない、ピリドキシン要求性の回復した形質転換体を取得した。これらの株の全 DNA を調製し、第 2 章 Fig. 2-4 と同様のサザン解析を行い目的の株が 2 株以上得られたことを確認した。これらのうち 2 株を EGFP-ChsBΔuncA1, 2 株と命名した。

EGFP-ChsB/mRFP-KinA^{rigor}1, 2: *argB* 部位で *chsB* 自身のプロモーター下で EGFP-ChsB を発現し生産する株において、*kinA* の本来の部位において mRFP-KinA^{rigor} を *alcA* プロモーター下で発現し生産する株を作製するため、pCS5-NZ (3-2-6 参照) 由来の約 5.1 kb の EcoRI-BglII 断片を用いて、EGFP-ChsB1 株を親株として形質転換し、ピリドキシン要求性の回復した形質転換体を取得した。これらの株の全 DNA を調製し、第 2 章 Fig. 2-5 と同様のサザン解析を行い目的の株が 2 株以上得られたことを確認した。これらのうち 2 株を EGFP-ChsB/mRFP-KinA^{rigor}1, 2 株と命名した。

FLAG-ChsB/mRFP-KinA^{rigor}1, 2: *argB* 部位で *chsB* 自身のプロモーター下で FLAG-ChsB を発現し、*kinA* の本来の部位で *alcA* プロモーター下で mRFP-KinA^{rigor} を発現し生産する株を作製するため、pCS5-NZ 由来の約 5.1 kb の EcoRI-BglII 断片を用いて、FB-3 株 (Table 3-1) を親株として形質転換を行い候補株を取得し、EGFP-ChsB/mRFP-KinA^{rigor}1 と同様のサザン解析により目的の株を 2 株作製した。これらの株を FLAG-ChsB/mRFP-KinA^{rigor}1, 2 株と命名した。

FLAG-ChsB/EGFP-KipA^{rigor}1, 2: EGFP-KipA^{rigor} を *kipA* 本来の位置で *alcA* プロ

モーター下で発現し、*argB* 部位で *chsB* 自身のプロモーター下で FLAG-ChsB を発現し生産する株を作製するため、pFB-argB (3-2-6 参照) 由来の約 5.3 kb の BglII 断片を用いて、SSK114 株 (Table 3-1) を親株として形質転換を行い、アルギニン要求性の回復した形質転換体を取得した。これらの株の全 DNA を調製し、EGFP-ChsBΔkinA1 株と同様のサザン解析により目的の株を 2 株作製した (Fig. 3-1) 。これらの株を FLAG-ChsB/EGFP-KipA^{rigor}1, 2 株と命名した。

ChiA-EGFPΔkinA1, 2: *alcA* プロモーター下で ChiA の触媒領域と STP 領域との間に EGFP を付加した ChiA-EGFP を *chiA* 本来の部位で発現し生産する株 (ChiA-EGFP 株) (Table 3-1) (株名を alc-ChiA-EGFP (Yamazaki *et al*., 2008) より変更し記載した) において、*kinA* の破壊を行なった。AnKinAa 及び AnKin4 をプライマーとして、SNR1 株 (Δ*kinA*) の total DNA を鋳型として約 4.0 kb の断片を PCR により増幅し、ChiA-EGFP 株を親株として形質転換を行いウリジン-ウラシル要求性の回復した候補株を取得し、サザン解析 (Requena *et al*., 2001) により目的の株を 2 株作製した (Fig. 3-2) 。これらの株を ChiA-EGFPΔkinA1, 2 株と命名した。

ChiA-EGFPΔkipA1, 2: ChiA-EGFP 株 (Table 3-1) において、*kipA* の破壊を行なった。KipA1 及び KipA4 をプライマーとして、SSK44 株 (Δ*kipA*) の total DNA を鋳型として約 4.0 kb の断片を PCR により増幅し、ChiA-EGFP 株を親株として形質転換を行いウリジン-ウラシル要求性の回復した候補株を取得し、サザン解析 (Konzack *et al*., 2005) により目的の株を 2 株作製した (Fig. 3-2) 。これらの株を ChiA-EGFPΔkipA1, 2 株と命名した。

ChiA-EGFPΔuncA1, 2: ChiA-EGFP 株 (Table 3-1) において、*uncA* の破壊を行なった。pNZ13 を鋳型として UncA-LB-fwd 及び UncA-RB-rev をプライマーとして PCR により増幅した約 4.0 kb の断片を用いて、ChiA-EGFP 株を親株として形質転換を行いピリドキシン要求性の回復した候補株を取得し、第 2 章 Fig. 2-4 と同様のサザン解析により目的の株を 2 株作製した。これらの株を ChiA-EGFPΔuncA1, 2 株と命名した。

ChiA-EGFP/mRFP-KinA^{rigor}1, 2: ChiA-EGFP 株において、*kinA* の本来の部位で

alcA プロモーター下で mRFP-KinA^{rigor} を発現し生産する株を作製するため、pCS5-NZ 由来の約 5.1 kb の EcoRI-BglII 断片を用いて、ChiA-EGFP 株を親株として形質転換を行い候補株を取得し、EGFP-ChsB/mRFP-KinA^{rigor}1 と同様のサザン解析により目的の株を 2 株作製した。これらの株を ChiA-EGFP/mRFP-KinA^{rigor}1, 2 株と命名した。

mDsRed-CsmA1, 2: N 末端側に mDsRed を付加した mDsRed-CsmA を *csmA* 本来の位置で *alcA* プロモーター下で発現し生産する株を作製するため、pmDsRed-CsmA (3-2-6 参照) 由来の約 5.3 kb の SmaI 断片を用いて、ABPU1 (Table 3-1) を親株として形質転換を行い、アルギニン要求性の回復した形質転換体を取得した。これらの株の全 DNA を調製し、第 2 章 Fig. 2-7 と同様のサザン解析により目的の株を 2 株作製した。これらの株を mDsRed-CsmA1, 2 株と命名した。

EGFP-ChsB/mDsRed-CsmA1, 2: N 末端側に mDsRed を付加した mDsRed-CsmA を *csmA* 本来の位置で *alcA* プロモーター下で発現し、EGFP-ChsB を *chsB* の本来の位置で *chsB* 自身のプロモーター下で発現し生産する株を作製するため、pEGFP-ChsB (3-2-6 参照) 由来の約 8.0 kb の HindIII-SmaI 断片を用いて、mDsRed-CsmA1 株を親株として形質転換を行い、ピリドキシン要求性の回復した形質転換体を取得した。これらの株の全 DNA を調製し、サザン解析により目的の株を 2 株作製した (Fig. 3-3) 。これらの株を EGFP-ChsB/mDsRed-CsmA1, 2 株と命名した。なおサザン解析に用いたプローブは、FcBprobe2F 及び FcBprobe2R をプライマーとして、ABPU1 株の total DNA を鋳型として約 0.4 kb の断片を PCR により増幅して作製した (山田, 2008) 。

FLAG-ChsB/CsmA-HA1, 2: *argB* 部位で FLAG-ChsB を *chsB* 自身のプロモーター下で発現し、*csmA* の本来の部位で *csmA* 自身のプロモーター下で CsmA-HA を発現し生産する株を作製するため、pFB-argB 由来の約 5.3 kb の BglII 断片を用いて、CA2 株(Table 3-1) を親株として形質転換を行い候補株を取得し、EGFP-ChsBΔkinA1 株と同様のサザン解析により目的の株を 2 株作製した (Fig. 3-1) 。これらの株を FLAG-ChsB/CsmA-HA1, 2 株と命名した。

EGFP-ChsBΔcsmA1, 2: *csmA* が破壊された遺伝的背景において *chsB* 本来の部位で *chsB* 自身のプロモーター下で EGFP-ChsB を発現し生産する株を作製するため、pEGFP-ChsB 由来の約 8.0 kb の HindIII-SmaI 断片を用いて、M2-6 (Δ*csmA*) (Table 3-1) 株を親株として形質転換を行い候補株を取得し、EGFP-ChsB/mDsRed-CsmA1 株と同様のサザン解析により目的の株を 2 株作製した (Fig. 3-3) 。これらの株を EGFP-ChsBΔcsmA1, 2 株と命名した。

FLAG-ChsB/CsmA-HA/mRFP-KinA^{rigor}1,2: FLAG-ChsB/CsmA-HA1 株において、*kinA* の本来の部位において *alcA* プロモーター下で mRFP-KinA^{rigor} を発現し生産する株を作製するため、pCS5-NZ 由来の約 5.1 kb の EcoRI-BglII 断片を用いて、FLAG-ChsB/CsmA-HA1 株を親株として形質転換を行い候補株を取得し、EGFP-ChsB/mRFP-KinA^{rigor}1 と同様のサザン解析により目的の株を 2 株作製した。これらの株を FLAG-ChsB/CsmA-HA/mRFP-KinA^{rigor}1, 2 株と命名した。

以上、本章で作製し命名したそれぞれの株 1 番、2 番の 2 株については、YGuu あるいは YTFuu 固体完全培地及び MMGuu あるいは MMTFuu 最少固体培地上で生育させ、生育速度及び表現型に顕著な違いが見られないことを確認し、以降の解析では全て 1 番の株を用い、番号を省略して表記した。また、EGFP-ChsB あるいは FLAG-ChsB を *argB* 部位において別コピーで発現し生産する株については、上記の固体培地上で生育させた場合、それぞれの野生型株と比較して顕著な表現型の異常が見られなかったことから、野生型の *chsB* と *egfp-chsB* あるいは *flag-chsB* の 2 コピーを発現させることによる生育への影響は小さいと判断し、以降の解析に用いた。

3-2-11　*A. nidulans* の細胞抽出液の調製
3-2-12　細胞抽出液の分画
3-2-13　タンパク質の定量
3-2-14　ウェスタン解析
3-2-15　蛍光顕微鏡による観察
3-2-16　間接蛍光抗体法
以上の項目については第 1 章「1-2　材料と方法」及び第 2 章「2-2　材料と方法」と同様に行なった。ただし、蛍光顕微鏡による観察の際、アクチン重合阻

害剤であるサイトカラシン A による菌体処理は、MMGuu あるいは MMTFuu 液体培地で 14-16 h 生育させた菌体に DMSO 中に溶解させたサイトカラシン A (SIGMA) を終濃度で 2 μM となるように添加し (DMSO で 1 mg/ml に溶解したものを 1:500 に希釈して用いた) 、37℃で 10 分静置し、その後液体培地で数回洗浄し、顕微鏡観察に供した。また、強制光退色からの蛍光回復を観察する FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) 解析の際は、共焦点顕微鏡 (FV500、Olympus) を観察に用い、FLUOVIEW (Olympus) ソフトウェアを用いて解析した。プロトコルの作製は付属の説明書に従った。また、間接蛍光抗体法においてラビット由来の抗 FLAG 抗体 (SIGMA) を使用する際は、1:150 に希釈して用いた。

3-2-17　ショ糖密度勾配遠心法及び分画

3-2-18　免疫沈降法

以上の項目については第 1 章「1-2　材料と方法」及び第 2 章「2-2　材料と方法」と同様に行なった。

3-3　結果

3-3-1　ChsB と TlgB の局在部位の比較

EGFP-ChsB の菌糸先端における局在観察において、その局在部位の比較のためエンドソームマーカータンパク質 mRFP-TlgB を同時に生産する株を作製し (EGFP-ChsB/mRFP-TlgB 株) (Table 3-1) 、両者の局在部位の比較を行なった。EGFP-ChsB は観察した菌糸先端の約 50%において菌糸最先端部に三日月状の局在が観察され、残りの約 50%において Spk 付近における局在が観察された (Fukuda *et al.*, 2009; Fig. 3-4) 。また局在部位の比較の結果、EGFP-ChsB の局在の一部は mRFP-TlgB と近接した部位に観察されたことから (Fig. 3-4) 、ChsB は CsmA と同様に一部エンドソームに局在することが示唆された。

3-3-2　ChsB の菌糸先端への局在化における微小管及びアクチンの役割

ChsB の菌糸先端への局在化における微小管及びアクチンの役割について検討するため、EGFP-ChsB を生産する株 (EGFP-ChsB 株) (Table 3-1) を用いて微小管重合阻害剤であるベノミルあるいはアクチン重合阻害剤であるサイトカラシン A による菌糸処理を行い、EGFP-ChsB の菌糸先端における局在を観察し

た (Fig. 3-5 A) (データはベノミル処理の場合の菌糸について示した）。観察の結果、菌糸先端部の細胞質内においてドット状の局在となるもの (punctate)、菌糸先端部の細胞質内全体に弱い蛍光が拡散するもの (dispersed)、殆ど蛍光が観察できないもの (no signal) といった局在異常が見られ、ベノミル処理の場合観察した菌糸先端の 48%、サイトカラシン A 処理の場合 74% についてこのような局在異常が見られた (Fig. 3-5 A and Table 3-2) 。この結果から、ChsB の菌糸先端への局在化に微小管及びアクチンが寄与することが示唆された。また、ベノミル処理により菌糸先端における局在が異常となるものの割合は CsmA の場合よりも少なかった (Table 2-4 and Table 3-2) 。そこで次に、ChsB の菌糸先端への局在化におけるキネシンの役割について検討するため、CsmA の場合と同様に、キネシン *kinA*、*kipA*、*uncA* が遺伝学的に破壊された背景において EGFP-ChsB を生産する株 (EGFP-ChsBΔkinA 株、EGFP-ChsBΔkipA 株、EGFP-ChsBΔuncA 株) (Table 3-1) を作製し、EGFP-ChsB の菌糸内における局在を観察した。観察の結果、*kinA* 破壊株及び *kipA* 破壊株においてはベノミル処理の場合と同様に、EGFP-ChsB の菌糸先端における局在異常が見られた (Fig. 3-5 B and Table 3-2) 。*kipA* 破壊株においては *kinA* 破壊株よりも更に菌糸先端における局在がドット状となるものや細胞質に拡散して観察されるものの割合が高かった (Table 3-2) 。一方、*uncA* 破壊株においては野生型株の場合と比較してやや局在が異常となる菌糸の割合が高いものの、*kinA* 破壊株あるいは *kipA* 破壊株の場合やベノミル処理の場合ほどの顕著な局在の異常は観察されなかった (Fig. 3-5 B and Table 3-2) 。また、*kinA* 破壊株あるいは *kipA* 破壊株において菌糸先端における局在が異常となるものの割合は CsmA の場合よりも少なかった (Table 2-4 and Table 3-2) 。また、EGFP-ChsB は形成中の隔壁部位における局在が観察されているが (Fukuda *et al.*, 2009) 、これらのキネシンの破壊株において隔壁形成部位における局在は正常に観察された (Fig. 3-5 B)。更に、EGFP-ChsB 株、EGFP-ChsBΔkinA 株、EGFP-ChsBΔkipA 株、EGFP-ChsBΔuncA 株の細胞抽出液の遠心分離による細胞内分画を行い、抗 GFP 抗体によりウェスタン解析を行なったところ、全ての株の場合において P10 及び P100 画分に EGFP-ChsB のシグナルが検出され、キネシン遺伝子の破壊により存在する画分の顕著な変化は見られなかった (Fig. 3-5 C) 。これらの結果から、菌糸先端における ChsB の局在化に少なくとも微小管、アクチン及びキネシン KinA 及び KipA が関与することが示唆された。

3-3-3　ChsB の局在化における KinA の機能

CsmA と同様に、ChsB の菌糸先端における局在化に KinA が寄与する可能性について検討するため、両者の局在比較及び *in vivo* における物理的相互作用の検討を行なった。両者の局在を比較するため、EGFP-ChsB 及び mRFP-KinA^{rigor} を発現し生産する株を作製した (EGFP-ChsB/mRFP-KinA^{rigor} 株) (Table 3-1) 。EGFP-ChsB/mRFP-KinA^{rigor} 株の観察の結果、変異型 mRFP-KinA^{rigor} を発現し生産させる影響により菌糸先端部における EGFP-ChsB の局在異常が一部観察されたが、*kinA* 破壊株あるいはベノミル処理の場合ほどの顕著な局在の異常は見られなかった (Table 3-2) 。そして、菌糸先端付近及び菌糸先端から後方の菌糸内において mRFP-KinA^{rigor} のフィラメント状の局在と近接した部位に EGFP-ChsB のフィラメント状の局在が観察された (Fig. 3-6 A, 矢印) 。また分生子形成器官において、EGFP-ChsB の局在はフィアライド、メトレ、及び分生子の形質膜上に観察され (Fukuda et al., 2009; Fig. 3-6 B) 、細胞質においては mRFP-KinA^{rigor} とのフィラメント状の共局在が観察された (Fig. 3-6 B, 矢印) 。また、*in vivo* における両者の物理的相互作用について検討するため、FLAG-ChsB 及び mRFP-KinA^{rigor} を同時に生産する株 (FLAG-ChsB/mRFP-KinA^{rigor} 株) (Table 3-1) を作製し、この株の細胞抽出液を用いて抗 FLAG 抗体による免疫沈降実験を行なった (Fig. 3-6 C) 。細胞抽出液の粗抽出液あるいは遠心分離によって分画した P10 画分を用いて免疫沈降を行なった場合、両者の相互作用は検出されなかった (データは示さない) 。遠心分離により分画した P100 画分を用いた場合、抗 mDsRed 抗体によるウェスタン解析の結果、抗 FLAG 抗体で免疫沈降した画分において mRFP-KinA^{rigor} のシグナルが検出されたことから、両者の相互作用が示された (Fig. 3-6 C) 。これらの結果から、ChsB は直接的または間接的に KinA と相互作用すること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。

3-3-4　ChsB の局在化における KipA の機能

ChsB の菌糸先端付近への輸送には KipA も関わることが 3-3-2 における結果から示唆されたので、両者の局在比較及び *in vivo* における物理的相互作用の検討を行なった。両者の局在について検討するため、FLAG-ChsB 及び EGFP-KipA^{rigor} を同時に生産する株を作製した (FLAG-ChsB/EGFP-KipA^{rigor} 株) (Table 3-1) 。この株を用いた抗 FLAG 抗体による間接蛍光抗体法観察の結果、

菌糸先端及び先端から後方の菌糸内において、EGFP-KipA^{rigor}のフィラメント状の局在と近接した部位に FLAG-ChsB のフィラメント状の局在が観察された (Fig. 3-7 A, 矢印) 。また、この株の細胞抽出液を用いて遠心分離による分画を行ない、P100 画分を用いて抗 FLAG 抗体による免疫沈降実験を行なった (Fig. 3-7 B) 。抗 GFP 抗体によるウェスタン解析の結果、抗 FLAG 抗体による免疫沈降画分において EGFP-KipA^{rigor}のシグナルが検出されたことから、両者の相互作用が示唆された (Fig. 3-7 B) 。これらの結果から、ChsB は KinA だけでなく KipA との直接的あるいは間接的な相互作用によっても微小管上を菌糸先端付近へ輸送され局在化することが示唆された。

3-3-5　GPI アンカー型タンパク質 ChiA の菌糸内局在

キチン合成酵素の局在化機構との比較として、GPI アンカー型キチン分解酵素である ChiA について、菌糸内局在化機構を解析した。

3-3-5-1　ChiA の菌糸内局在化における微小管及びアクチンの役割

これまでの解析により、ChiA-EGFP は菌糸先端を含む形質膜上、隔壁形成部位、菌糸の分岐部位の根元等に局在が観察されている (Yamazaki *et al.*, 2008; Fig. 3-8 A) 。ChiA-EGFP 株 (Table 3-1) を用いて、ベノミルあるいはサイトカラシン A による菌体処理を行い ChiA-EGFP の局在を観察したところ、どちらの薬剤処理の場合も菌糸先端を含む形質膜上の蛍光が微弱になり、膜上の蛍光が一部不連続となるものや殆ど蛍光が観察されないものが同程度見られた (Fig. 3-8 B and C, Tips, 50% of hyphae (n=100))。また、どちらの薬剤処理の場合も一部の分岐部位において野生型株よりも高い頻度で局在が観察されなかった (Fig. 3-8 B and C, Basal, 矢印, 12% of branching region (benomyl) or 15% of branching region (cytochalasin A) ; 3.8% of branching region (wild-type) (n=200)) 。一方、どちらの薬剤処理の場合も隔壁形成部位における局在に顕著な異常は観察されなかった (Fig. 3-8 B and C, Basal, 矢頭) 。

3-3-5-2　ChiA の菌糸内局在化におけるキネシンの機能

ChiA の菌糸内局在化に微小管が関与することが示唆されたので、キネシン *kinA*、*kipA*、*uncA* の破壊された背景において ChiA-EGFP を生産する株 (ChiA-EGFPΔkinA 株、ChiA-EGFPΔkipA 株、ChiA-EGFPΔuncA 株) (Table 3-1) を

作製し、ChiA-EGFP が安定に生産されていることをこれらの株の細胞抽出液を用いた抗 GFP 抗体によるウェスタン解析により確認した (Fig. 3-9 A) 。これらの株の菌糸内における ChiA-EGFP の局在観察の結果、*kinA* 破壊株及び *uncA* 破壊株において ChiA-EGFP は菌糸先端を含む形質膜上、分岐部位、隔壁形成部位に局在し、顕著な局在の異常は観察されなかった (Fig. 3-9 B) 。しかし *kipA* 破壊株においては形質膜上及び隔壁形成部位には正常に局在が見られたが、一部の分岐部位において局在が観察されなかった (Fig. 3-9 B, 矢印, 9.7% of branching region (n=200)) 。

CsmA 及び ChsB は KinA による菌糸先端付近への輸送が示唆されていることから、ChiA についても $KinA^{rigor}$ との局在の比較を行なった。ChiA-EGFP 及び mRFP-$KinA^{rigor}$ を同時に生産する株を作製し (ChiA-EGFP/mRFP-$KinA^{rigor}$ 株) (Table 3-1) 、両者の局在を観察した (Fig. 3-9 C) 。観察の結果、変異型 mRFP-$KinA^{rigor}$ を発現し生産させる影響により形質膜上において ChiA-EGFP の蛍光が微弱となる異常が一部観察されたが、ベノミル処理の場合ほどの顕著な局在の異常は見られなかった。そして、菌糸内において mRFP-$KinA^{rigor}$ のフィラメント状の局在が観察されたのに対し、ChiA-EGFP のフィラメント状の蛍光は観察されなかった (Fig. 3-9 C) 。これらの結果から、ChiA の局在化における KinA、KipA 及び UncA の寄与は小さいが、分岐部位における正常な局在化には KipA が必要であることが示唆された。

3-3-6　ChsB と CsmA の菌糸内局在部位の比較

3-3-6-1　生細胞における ChsB と CsmA の局在部位の比較

ChsB と CsmA は共にキネシン KinA 及び KipA との相互作用により微小管上を菌糸先端付近まで輸送されることが示唆されたため、両者の局在化機構の差異について検討した。ChsB と CsmA の菌糸内局在部位を比較するため、EGFP-ChsB と mDsRed-CsmA を同時に生産する株 (EGFP-ChsB/mDsRed-CsmA 株) (Table 3-1) を作製し、両者の局在を観察した。分生子の発芽時 (培養後 6 h) から菌糸生長時 (培養後 12 h-14 h) までの経時的観察の結果、発芽前の無極性方向の膨張の際両者は異なる形質膜上あるいは細胞質に局在が観察された (Fig. 3-10, conidia) 。また、発芽時及び発芽してから菌糸生長に至るまでの間、菌糸先端部において両者の局在は近接した部位に観察された (Fig. 3-10, Tips, 矢頭) 。また隔壁形成部位においても両者の共局在が

観察された (Fig. 3-10, Septum, 矢頭) 。菌糸生長時、両者は菌糸先端部において近接した部位に局在が観察されたが、菌糸先端から後方の菌糸内においては、両者が共局在を示さず、mDsRed-CsmA のみが局在する部位が観察された (Fig. 3-10, Tips, 矢印) 。

菌糸先端部における両者の局在部位及び局在変化について更に詳細に検討するため、菌糸先端における FRAP 解析を行なった (Fig. 3-11) 。EGFP-ChsB 株 (Table 3-1) あるいは EGFP-CsmA1 株 (Table 2-1) を用いて、菌糸先端部における両者の退色からの蛍光の回復を経時的に観察したところ、EGFP-ChsB は菌糸先端部の Spk 付近を中心に蛍光が回復するのに対し、EGFP-CsmA は菌糸先端部の Spk 付近の蛍光が先に回復し、その後先端からやや後方の形質膜上に蛍光が回復する様子が観察された (Fig. 3-11, arrowheads) 。

3-3-6-2　間接蛍光抗体法による ChsB と CsmA の局在部位の比較

次に、両者の局在部位の経時的変化の比較を行なうこととしたが、EGFP-ChsB/mDsRed-CsmA 株における観察では、mDsRed-CsmA の蛍光が微弱であり観察時の退色の影響が大きかったことから、両者の局在の経時的変化の観察は困難であると考えられた。そこで FLAG-ChsB 及び CsmA-HA を同時に生産する株 (FLAG-ChsB/CsmA-HA 株) (Table 3-1) を作製し、抗 FLAG 抗体及び抗 HA 抗体を用いた間接蛍光抗体法により両者の菌糸内局在観察を行なった (Fig. 3-12) 。その結果、観察した菌糸先端のうち 63±3%について、菌糸最先端部における両者の三日月状の共局在が観察された (Fig. 3-12 A, left panel (n>100)) 。その蛍光強度を定量化した結果、両者は菌糸最先端部及び先端からやや後方の形質膜上に類似したピークが見られた (Fig. 3-12 B, upper panel) 。また観察した菌糸先端のうち 37±3%について、FLAG-ChsB 由来の蛍光が菌糸最先端部に観察されるのに対し、CsmA-HA 由来の蛍光が菌糸先端からやや後方の形質膜上に観察されるという局在部位の違いが見られた (Fig. 3-12 A, right panel (n>100)) 。蛍光強度の定量化の結果、菌糸最先端部及びやや後方の形質膜上に異なるピークが見られ、両者の局在部位が一部異なることが示唆された (Fig. 3-12 B, lower panel) 。また、ベノミルあるいはサイトカラシン A 処理により菌糸先端における両者の共局在は殆ど観察されなくなった (Fig. 3-12 C) 。

隔壁形成部位における両者の局在及びキチンの染色部位については、これまでに報告されている結果から、隔壁形成の経時的と思われる順に並べた (Fig.

3-13; Takeshita *et al*., 2005; Fukuda *et al*., 2009) 。この結果、FLAG-ChsB が隔壁形成の初期段階に先に形成予定部位に局在し、その後 CsmA-HA が局在することが示唆された。また、両者は一時的に近接した部位に局在が観察された (Fig. 3-13, 矢頭) 。CsmA-HA 由来の蛍光が X 字状あるいは二本のバンド状に見られる隔壁形成部位においても、FLAG-ChsB 由来の蛍光は一本のバンドとして観察された (Fig. 3-13) 。以上の結果から、菌糸先端部及び隔壁形成部位において ChsB と CsmA の局在部位は一部近接しているが少なくとも一部異なることが示された。

3-3-7　CsmA と ChsB の物理的相互作用及び機能的相関の検討

CsmA と ChsB の菌糸内局在部位は近接しているが一部異なることから、両者の機能的相関及び *in vivo* における物理的相互作用等について検討した。まず、生化学的な解析により両者の存在する細胞内部位について検討した。FLAG-ChsB/CsmA-HA 株の細胞抽出液を用いて、ショ糖密度勾配 5-40%の範囲で遠心分離による分画を行ない、抗 FLAG 抗体あるいは抗 HA 抗体によるウェスタン解析を行なった (Fig. 3-14) 。その結果、FLAG-ChsB と CsmA-HA は共に高密度の画分に検出され、両者の存在する画分に顕著な違いは見られなかった。更に、両者の *in vivo* における物理的相互作用について検討した。CsmA 及び ChsB は共に mRFP-KinA^{rigor} と相互作用すること、mRFP-KinA^{rigor} を生産する株では KinA の輸送する小胞が微小管上に固定されると考えられることから、mRFP-KinA^{rigor} を生産する株において CsmA-HA 及び FLAG-ChsB を同時に生産する株 (FLAG-ChsB /CsmA-HA/mRFP-KinA^{rigor} 株) (Table 3-1) を作製した。FLAG-ChsB/CsmA-HA 株及び FLAG-ChsB/CsmA-HA/mRFP-KinA^{rigor} 株の細胞抽出液を遠心分離により分画し、調製した P100 画分を用いて抗 FLAG 抗体あるいは抗 HA 抗体による免疫沈降実験を行なった (Fig. 3-15) 。その結果、抗 FLAG 抗体によるウェスタン解析では抗 HA 抗体による免疫沈降画分における FLAG-ChsB のシグナルは検出されず、抗 HA 抗体によるウェスタン解析では抗 FLAG 抗体による免疫沈降画分における CsmA-HA のシグナルは検出されなかった (Fig. 3-15) 。また、FLAG-ChsB/mRFP-KinA^{rigor} 株、CsmA-HA/mRFP-KinA^{rigor} 株 (Table 2-1)、及び FLAG-ChsB/CsmA-HA/mRFP-KinA^{rigor} 株の細胞抽出液から調製した P100 画分を用いて同様に免疫沈降実験を行い、FLAG-ChsB 及び CsmA-HA と mRFP-KinA^{rigor} が共沈することを確認したが、この場合も ChsB と CsmA と

の相互作用は検出されなかった（データは示さない）。また、*csmA* 破壊株において EGFP-ChsB を生産する株（EGFP-ChsBΔcsmA 株）（Table 3-1）を作製し、EGFP-ChsB の菌糸内局在を観察したが、菌糸先端部及び隔壁形成部位において EGFP-ChsB は多くの場合正常に局在し、*csmA* が破壊されていない EGFP-ChsB 株の場合と比較して顕著な局在の異常は観察されなかった（Table 3-2）。これらの結果から、CsmA と ChsB は互いに独立して菌糸先端付近へ輸送され一部異なる部位に局在化することが示唆された。

3-4　考察

本章ではまず、クラス III キチン合成酵素 ChsB の菌糸内局在化機構について解析した。ChsB はベノミル処理、及びキネシン *kinA* 破壊株あるいは *kipA* 破壊株において菌糸先端における局在異常が観察され（Fig. 3-5）、KinA^{rigor} あるいは KipA^{rigor} と菌糸先端から後方においてフィラメント状の共局在が観察された（Figs. 3-6 and 3-7）。また KinA^{rigor} あるいは KipA^{rigor} と ChsB との *in vivo* における物理的相互作用が検出された（Figs. 3-6 and 3-7）。これらの結果から、ChsB は CsmA と同様に、微小管及び少なくとも KinA と KipA によって菌糸先端に輸送され局在化することが示唆された。

GPI アンカー型タンパク質であるキチン分解酵素 ChiA は菌糸先端を含む形質膜上、菌糸の分岐部位の根元、隔壁形成部位等に局在することが既に明らかとなっていたが（Yamazaki *et al.*, 2008）、本章での阻害剤を用いた局在観察の結果、形質膜上あるいは菌糸の分岐部位への正常な局在化には微小管及びアクチンが必要であることが示唆された（Fig. 3-8）。またキネシン *kinA*、*kipA*、*uncA* の単独破壊株において形質膜上及び隔壁形成部位における局在の顕著な異常は観察されず、mRFP-KinA^{rigor} 生産株におけるフィラメント状の局在は観察されなかった（Fig. 3-9）。しかし *kipA* 破壊株において分岐部位における局在が見られない菌糸が一部観察されたことから（Fig. 3-9）、ChiA の分岐部位における局在化に KipA が関与することが示唆された。

CsmA と ChsB の局在化部位の比較のため、生細胞あるいは間接蛍光抗体法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、菌糸先端及び隔壁形成部位において一部共局在が観察されたが（Figs. 3-10, 3-12, and 3-13）、菌糸先端において ChsB は菌糸最先端部の Spk 付近に局在し、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が一部見られた（Fig.

3-12) 。また隔壁形成部位において ChsB は隔壁形成予定部位に CsmA よりも先に局在し、隔壁の形成に伴って常に一本のバンドとして観察されるのに対し、CsmA は一本のバンドから X 字状構造、更に二本のバンドへと局在が変化することが示唆され、これらの X 字状構造や二本のバンドは ChsB と共局在していなかった (Fig. 3-13) 。生化学的な解析により、ChsB と CsmA は近接した膜画分に存在することが示唆されたが (Fig. 3-14) 、*in vivo* における両者の物理的相互作用は検出されなかった (Fig. 3-15) 。また、*csmA* 破壊株において ChsB の顕著な局在異常は観察されなかった (Table 3-2) 。これらの結果から、ChsB と CsmA はキネシン KinA あるいは KipA との相互作用を介してそれぞれ独立して菌糸先端付近へ輸送されることが示唆された。本章における解析から、クラス III 及びクラス V キチン合成酵素、及び GPI アンカー型キチン分解酵素 ChiA の輸送機構及びその後の局在化機構を示唆する結果が得られた。以下に、それらについて考察する。

3-4-1　ChiA の菌糸内局在化機構

chiA 破壊株は顕著な表現型の異常を示さないが、ChiA-EGFP は菌糸先端を含む形質膜上、菌糸の分岐部位、隔壁形成部位に局在が見られ、これらの部位におけるキチンのリモデリングに機能すると考えられる (Yamazaki *et al.*, 2008) 。本章における結果から、ChiA の形質膜上及び隔壁形成部位への局在化における微小管及びキネシン KinA、KipA、UncA の寄与は小さいことが示唆された。一方、菌糸の分岐部位においてはベノミル処理あるいはサイトカラシン A 処理、及び *kipA* 破壊により一部局在が観察されなくなることから、分岐部位における局在化に微小管、アクチン、KipA が関与することが示唆された。分岐部位における ChiA の局在化機構について詳細は不明であるが、分岐部位においては分岐の先端に CsmA、CsmB、ChsB 等も局在が観察されることから (Takeshita *et al.*, 2005; Takeshita *et al.*, 2006; Fukuda *et al.*, 2009) 、分岐形成時 ChiA とこれらのキチン合成酵素が協調的に機能する可能性が考えられる。KipA は CsmA 及び ChsB の輸送、局在化に関わり、ChiA の局在にも間接的に影響しているのかもしれない。ChiA の形質膜上への局在化については以下に考察する (3-4-2) 。

3-4-2　ChsB、CsmA、ChiA の菌糸先端への輸送機構の比較

第 2 章及び本章における結果から、ChsB と CsmA は共に 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まで独立して輸送され、その後共に菌糸先端部のSpk付近に局在することが示唆された。*S. cerevisiae*において、キチン合成酵素はキトソームと呼ばれる小胞に含まれてbud neckの形質膜上に輸送されることが示唆されている (Bartnicki-Garcia, 2006) 。*N. crassa*においても、クラスIIIキチン合成酵素CHS-1とβ-1,3-グルカン合成関連酵素GS-1は共にSpkに局在が観察されたが、SpkにおいてGS-1はCHS-1の外側を取り囲むようにリング状に局在すること、阻害剤による解析から両者は異なる小胞輸送経路でSpkに局在化することが示唆されている (Verdin *et al.*, 2009) 。ChsBとCsmAについても、小胞輸送に関わるキネシンKinA及びKipAによる菌糸先端への輸送が示唆されたことから、キトソームのように小胞に含まれて輸送される可能性が高いと考えられる。一方、分泌シグナルを持ち、通常の分泌経路により形質膜上に局在すると考えられるChiAについては、KinAあるいはKipAによる形質膜上への輸送を示唆する結果は得られず、KinA^{rigor}を生産する株においても輸送途中のChiAの局在は観察されなかった。輸送途中のChiAが観察できなかった理由としては、ChiAの輸送にKinA、KipA、UncA以外のキネシンが関わる可能性、*chiA*のmRNAの翻訳が形質膜付近でのみ起こっている可能性、ChiA-EGFPについてはEGFPを内腔側で発現するように設計しているため形質膜に融合しないと蛍光を観察できない可能性等が考えられる。*kinA*あるいは*kipA*の単独破壊株及びこれらの二重破壊株においては野生型株と比較して生育遅延や菌糸の湾曲等の形態異常が一部観察されるが、菌糸型の形態形成に重篤な異常は見られないことから (Konzack *et al.*, 2005) 、KinA及びKipAが菌糸先端方向への通常の分泌経路によるタンパク質輸送の全てを担っている可能性は低いと考えられる。分泌シグナルにより形質膜上に局在化するタンパク質については、今後その輸送経路とKinAあるいはKipAとの関わりについて更に検討していく必要がある。

3-4-3　ChsB及びCsmAの菌糸先端及び隔壁形成部位における局在部位の比較

生細胞における経時的観察及び間接蛍光抗体法による観察により、両者は発芽部位の菌糸先端、発芽後数時間内の菌糸先端、先端生長を行なっている菌糸先端の約63%、形成中の隔壁において一時的に近接した部位に局在が観察されたことから、これらの部位における極性的なキチン合成に協調的に機能することが示唆された。菌糸先端及び隔壁形成部位における両者の局在部位の比較と

その機能的意義について以下に述べる。

3-4-3-1　菌糸先端における局在

生細胞における検討により、ChsB は菌糸最先端部の約半分については Spk 付近に、残り半分については三日月状に局在が観察された (Fukuda *et al.*, 2009) 。一方 CsmA は Spk 付近に局在が観察されるのは菌糸先端の 10%以下であり、残りの多くの場合菌糸先端を含む形質膜上に局在が観察された (第 2 章) 。FRAP 解析及び間接蛍光抗体法による局在観察の結果、ChsB は常に菌糸先端の Spk 付近あるいは最先端部の形質膜上に三日月状に局在するのに対し、CsmA は一時菌糸最先端部に局在するが、先端からやや後方の形質膜上にも一部局在するという局在部位の差異が見られた。*A. gossypii* において、菌糸先端部に局在し、極性の確立と維持に関わる複数のタンパク質について、伸長速度の速い菌糸では Spk 様の局在が高い割合で観察されたのに対し、遅い菌糸では三日月状の局在が高い割合で観察されたことから、局在が Spk 様であるか三日月状であるかという違いは菌糸の伸長速度に依存することが示唆されている (Kohli *et al.*, 2008) 。実際、*A. nidulans* より菌糸の伸長速度の速い *N. crassa* のクラス I、III、VII に属するキチン合成酵素は全て Spk 付近に常に局在化する様子が観察されている。ChsB と CsmA の菌糸先端における局在部位が三日月状で近接しているか、あるいは ChsB が Spk 付近で CsmA が先端からやや後方の形質膜上で異なっているかという違いは、各々の菌糸の伸長速度に依存しているのかもしれない。また、両者の局在部位が異なることについては、エンドサイトーシスによる膜からの取り込みが異なる段階で起こることによる可能性が考えられる。第 2 章の考察で述べたように、菌糸先端からやや後方の形質膜上には CsmA とアクチンが近接して局在し、このやや後方の形質膜上には、アクチン結合タンパク質である AbpA や FimA、出芽酵母のエンドサイトーシスにおいて小胞の切り離しに関わる Rvs167 のホモログ AmpA、アクチンとクラスリンのアダプタータンパクである Sla2 のホモログ SlaB 等のタンパク質が局在し、エンドサイトーシスによるタンパク質の取り込みに機能すると考えられている (Upadhyay and Shaw, 2008; Araujo-Bazan *et al.*, 2008; Taheri-Talesh *et al.*, 2008; Hervas-Aguilar and Penalva, 2010) 。また、菌糸先端へ輸送される exocyst complex のタンパク質の局在解析により、これらのタンパク質が菌糸最先端部へ輸送され、先端部の形質膜と融合し、その後形質膜上を先端からやや後方ま

で移動し、エンドサイトーシスにより菌糸内へ取り込まれるという輸送経路のモデルが提示されている (Fig. 0-3) (Taheri-Talesh *et al.*, 2008) 。ChsB は菌糸最先端部に常に局在が観察されることから、このモデルの経路と同様に輸送されると考えられる。一方 CsmA は、菌糸最先端部へ輸送され形質膜と融合した後、形質膜上をやや後方まで移動した後、そこに留まるように局在化することから、エンドサイトーシスを受けずにその部位に局在が維持されている可能性がある。元来 MMD を持たない ChsB においても微小管上を菌糸先端付近へ輸送された後は菌糸最先端部の形質膜に向けてアクチンケーブル上を輸送される可能性が高いことから、CsmA のように MMD を有するキチン合成酵素だけが菌糸最先端部の形質膜への輸送に自らの MMD の機能を利用しているとは考えにくい。従って CsmA の MMD は菌糸先端への輸送ではなく先端からやや後方のエンドサイトーシス部位における係留に機能する可能性が高いと考えられる。第 2 章の考察で述べたように、*csmA* の破壊株において低浸透圧培地で生育させた場合、菌糸の溶菌が先端からやや後方の菌糸において頻繁に見られることから CsmA が菌糸最先端よりやや後方の形質膜上で機能している可能性が考えられる。CsmA のこの部位への局在化に MMD が機能していると考えれば *csmA* 破壊株の表現型は矛盾なく説明できる。

一方、*A. nidulans* 及び *A. oryzae* においてエンドサイトーシスが欠損すると致死となり (Lee *et al.*, 2008; Higuchi *et al.*, 2009) 、*slaB* の発現を抑制しエンドサイトーシスを抑制した場合、菌糸先端に輸送されその後リサイクルされるタンパク質 SynA 及び AbpA が菌糸先端の形質膜の一部に過剰に蓄積するなどの異常が観察され (Higuchi *et al.*, 2009; Hervas-Aguilar and Penalva, 2010) 、エンドサイトーシスの阻害された菌糸先端部の細胞表層においては細胞壁成分の異常構造が観察された (Higuchi *et al.*, 2009) 。これらの結果から ChsB 及び CsmA の局在化機構とこれらのリサイクルとの関わりについて検討する意義が考えられ、タンパク質リサイクルを阻害するアジ化ナトリウム処理による両者の局在変化を観察したが、阻害剤による影響が多岐に及び、局在異常の類型化が困難であった。今後 ChsB 及び CsmA の局在化とエンドサイトーシスによるリサイクルとの関連について解析するため、*slaB* の条件変異株における ChsB あるいは CsmA の局在解析や SynA との局在部位の比較等を行なっていく必要がある。

3-4-3-2　隔壁形成部位における局在

隔壁形成部位においては、ChsB が隔壁形成予定部位に先に局在化し、続いて CsmA が局在化し、形成中の隔壁において両者は一時的に近接した部位に局在化することが示唆された。隔壁の形成に伴い、ChsB は一本のバンドが中央に収縮していく一方、CsmA は一本のバンドから X 字状構造、二本のバンドへと局在が変化すると考えられる。隔壁形成部位においてアクチンは CsmA よりも先に隔壁形成部位に局在化し、その後形成に伴って CsmA と同様の局在変化を示すことが示唆されている (Takeshita *et al.*, 2005) 。*csmA* 破壊株あるいは *chsB* 破壊株において隔壁は正常に形成されることから、両者は隔壁の形成に必須ではないことが示されている (Horiuchi *et al.*, 1999; Fukuda *et al.*, 2009)。菌糸の内部に新たに菌糸が生じる菌糸内菌糸は、*csmA* 破壊株及び *chsB* 破壊株に共通してみられるが、菌糸内菌糸は隔壁孔形成が正常に完了できないため起こる可能性が考えられる形態異常であり、ChsB と CsmA が隔壁形成において一部協調的に機能することが示唆されている (Horiuchi, 2009) 。詳細な解析は行なっていないが、ChsB は隔壁形成予定部位にアクチンを足場として CsmA よりも先に局在化し、その後両者は協調的に隔壁形成に機能するのかもしれない。

3-4-4　ChsB、CsmA、ChiA の存在する膜環境の比較

これまでに明らかとなっている *S. cerevisiae* の GPI アンカー型タンパク質の多くは形質膜上に局在が観察され、ステロール染色試薬である filipin による形質膜の染色部位と共局在を示す (Bagnat and Simons, 2002) 。第 1 章の考察 (1-4-2-3) で述べたように、GPI アンカー型タンパク質の局在する微小な膜ドメインは、ステロールやスフィンゴ脂質を豊富に含み (SRD)、界面活性剤に耐性を示す形質膜 (DRMs) を構成している。以下は予備的な実験であるが、発芽時や発芽後間もない一部の菌糸先端には ChiA-EGFP の蛍光が集中して観察され、fillipin による染色部位と近接した部位に局在が見られた。また第 2 章で用いた界面活性剤により ChiA-EGFP の可溶化条件を検討したところ、CsmA と同様に、SDS 以外の界面活性剤に対して可溶化の程度は低く、耐性を示した。一方、ChsB と CsmA は細胞内分画により近接した膜画分に存在することが示唆され、界面活性剤による ChsB の可溶化条件について検討したところ、CsmA と同様に可溶化の程度は SDS を除いて低く、耐性を示した。これらのことから、ChsB、CsmA、ChiA はいずれも類似した微小膜ドメイン、すなわち DRMs に存在し、SRD に局在する可能性が考えられる。*A. nidulans* において DRMs に存在するタ

ンパク質は明らかとなっていないが、cell end marker である TeaA 及び TeaR、アクチン、formin である SepA 等が菌糸先端における SRD に局在することが示唆されている (Pearson *et al*., 2004; Li *et al*., 2006; Takeshita *et al*., 2008) 。本章の序でも述べたように、*A. nidulans* には GPI アンカー型修飾を受けると予想される構造を持つタンパク質が 82 個、あるいは 129 個推定されている (de Groot *et al*., 2009; Cao *et al*., 2009) 。今後、ChiA やこれらの GPI アンカー型タンパク質を指標として、糸状菌における SRD 等の特徴的な微小膜ドメインの構造や役割が明らかになると考えられる。

3-4-5　分生子形成器官における ChsB 及び CsmA の局在

ChsB 及び CsmA は分生子形成器官において頂嚢の表層、頂嚢とメトレの間、メトレの先端、メトレとフィアライドの間、フィアライドの先端、フィアライドと分生子の間、分生子の表層等に局在が観察されている (竹下, 2005; Fukuda *et al*., 2009) 。詳細な解析は行なっていないが、本章及び第 2 章における解析から、ChsB と CsmA は KinA により微小管上をメトレ及びフィアライドの先端、あるいはこれらの器官の細胞表層に輸送され近接した部位に局在化することが考えられる。*A. nidulans* において、頂嚢からメトレの形成部位、あるいはメトレからフィアライドの形成部位先端にはアクチン結合タンパク質 AbpA、分生子形成に機能する転写因子 FlbB、セプチンタンパク質 AspB 等の局在が観察されている (Westfall and Momany, 2002; Etxebeste *et al*., 2009) 。セプチンタンパク質は *S. cerevisiae* において bud neck におけるクラス IV キチン合成酵素 Chs3p の局在化にかかわることから、分生子形成器官における ChsB 及び CsmA の局在化に AspB が関わる可能性がある。また、キチン分解酵素 ChiD 及び ChiH もフィアライド先端と分生子との間に局在が観察されたことから (小野, 2007) 、これらの部位において ChsB あるいは CsmA と ChiD 及び ChiH が協調的にキチンのリモデリングに機能する可能性が考えられる。

S. cerevisiae において、キチン合成酵素を含む小胞であるキトソームには β-1,3-グルカン合成酵素は含まれないが (Bartnicki-Garcia, 2006) 、接合時の膜融合に関わる膜タンパク質である Fus1p が含まれることが示唆されている (Barfield *et al*., 2009) 。菌糸先端及び隔壁形成部位における ChsB 及び CsmA によるキチンの生合成は菌糸型の形態形成に重要であり、今後 ChsB あるいは

CsmA を含むと考えられる小胞に含まれる他のタンパク質の同定や、キネシンを含め輸送に関わるタンパク質の探索を行うことにより、両者の局在化機構について更に詳細な解析を進めることができると考えられる。

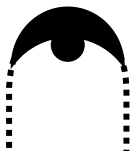
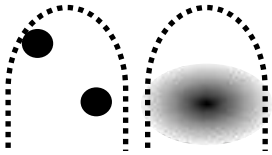
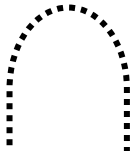
Table 3-1. *A. nidulans* strains used in this section.

Strain	Genotype	Source
EGFP-ChsB1, 2	*biA1 pyrG89 argB2 pyroA4 wA3* *argB*::*chsB*(p)-*egfp-chsB*	This Study
EB-5	*biA1 pyrG89 argB2 pyroA4 wA3* Δ*chsB*::*pyr4-alcA*(p)-*chsB argB*::*chsB*(p)-*egfp-chsB*	Fukuda *et al.*, 2009
EGFP-ChsB/mRFP-TlgB 1, 2	*biA1 pyrG89 argB2 pyroA4 wA3* *argB*::*chsB*(p)-*egfp-chsB pyroA4*::*alcA*(p)-*mrfp-tlgB*	This Study
SNR1	Δ*argB*::*trpC*Δ*B* Δ*kinA*::*pyr4 pyrG89 pyroA4 yA2*	Requena *et al.*, 2001 (第 2 章)
SSK44	*pabaA1* Δ*argB*::*trpC*Δ*B* Δ*kipA*::*pyr4 wA3 veA1*	Konzack *et al.*, 2005 (第 2 章)
EGFP-ChsBΔkinA 1, 2	Δ*argB*::*trpC*Δ*B* Δ*kinA*::*pyr4 pyrG89 pyroA4 yA2* *argB*::*chsB*(p)-*egfp-chsB*	This Study
EGFP-ChsBΔkipA 1, 2	*pabaA1* Δ*argB*::*trpC*Δ*B* Δ*kipA*::*pyr4 wA3 veA1* *argB*::*chsB*(p)-*egfp-chsB*	This Study
EGFP-ChsBΔuncA 1, 2	*biA1 pyrG89 argB2 pyroA4 wA3* *argB*::*chsB*(p)-*egfp-chsB* Δ*uncA*::*pyroA*	This Study
EGFP-ChsB/mRFP-KinA^{rigor} 1, 2	*biA1 pyrG89 argB2 pyroA4 wA3* *argB*::*chsB*(p)-*egfp-chsB* Δ*kinA*::*pyroA4-alcA*(p)-*mrfp-kinA*^{rigor}	This Study
FB-3	*biA1 pyrG89 argB2 pyroA4 wA3* Δ*chsB*::*pyr4-alcA*(p)-*chsB* *argB*::*chsB*(p)-*3xflag-chsB*	This Study
FLAG-ChsB/mRFP-KinA^{rigor} 1, 2	*biA1 pyrG89 argB2 pyroA4 wA3* Δ*chsB*::*pyr4-alcA*(p)-*chsB* *argB*::*chsB*(p)-*3xflag-chsB* Δ*kinA*::*pyroA4-alcA*(p)-*mrfp-kinA*^{rigor}	This Study
SSK114	Δ*argB*::*trpC*Δ*B pyrG89* Δ*kipA*::*pyr4-alcA*(p)-*egfp-kipA*^{rigor} *pyroA4 veA1*	Konzack *et al.*, 2005 (第 2 章)
FLAG-ChsB/EGFP-KipA^{rigor} 1, 2	Δ*argB*::*trpC*Δ*B pyrG89* Δ*kipA*::*pyr4*::*alcA*(p)-*egfp-kipA*^{rigor} *pyroA4 veA1*	This Study

	argB::*chsB*(p)-*3xflag-chsB*	
ChiA-EGFP1 (alc-ChiA-EGFP1) *	*biA1 pyrG89* Δ*chiA*::*sC-alcA*(p)-*chiA-egfp-argB argB2 pyroA4 sC114 wA3*	Yamazaki *et al*., 2008
ChiA-EGFPΔkinA1, 2	*biA1 pyrG89* Δ*chiA*::*sC-alcA*(p)-*chiA-egfp-argB argB2 pyroA4 sC114 wA3* Δ*kinA*::*pyr4*	This Study
ChiA-EGFPΔkipA1, 2	*biA1 pyrG89* Δ*chiA*::*sC-alcA*(p)-*chiA-egfp-argB argB2 pyroA4 sC114 wA3* Δ*kipA*::*pyr4*	This Study
ChiA-EGFPΔuncA1, 2	*biA1 pyrG89* Δ*chiA*::*sC-alcA*(p)-*chiA-egfp-argB argB2 pyroA4 sC114 wA3* Δ*uncA*::*pyroA*	This Study
ChiA-EGFP/mRFP-KinA^{rigor} 1, 2	*biA1 pyrG89* Δ*chiA*::*sC-alcA*(p)-*chiA-egfp-argB argB2 pyroA4 sC114 wA3* Δ*kinA*::*pyroA4-alcA*(p)-*mrfp-kinA*^{rigor}	This Study
ABPU1	*biA1 pyrG89 argB2 pyroA4 wA3*	Motoyama *et al*., 1996 (第 1 章)
mDsRed-CsmA1, 2	*biA1 pyrG89 argB2 pyroA4 wA3* Δ*csmA*::*argB-alcA*(p)-*mdsred-csmA*	This Study
EGFP-ChsB/mDsRed-CsmA1, 2	*biA1 pyrG89 argB2 pyroA4 wA3* Δ*csmA*::*argB-alcA*(p)-*mdsred-csmA* Δ*chsB*::*pyroA-chsB*(p)-*egfp-chsB*	This Study
CA2	*biA1 pyrG89 argB2 pyroA4 wA3* Δ*csmA*::*pyrG-csmA-9HA*	Takeshita *et al*., 2002 (第 2 章)
FLAG-ChsB/CsmA-HA1, 2	*biA1 pyrG89 argB2 pyroA4 wA3* Δ*csmA*::*pyrG-csmA-9HA argB*::*chsB*(p)-*3xflag-chsB*	This Study
M2-6	*biA1 pyrG89 argB2 pyroA4 wA3* Δ*csmA*::*argB*	Horiuchi *et al*., 1999
EGFP-ChsBΔcsmA1, 2	*biA1 pyrG89 argB2 pyroA4 wA3* Δ*csmA*::*argB* Δ*chsB*::*pyroA-chsB*(p)-*egfp-chsB*	This Study
FLAG-ChsB/CsmA-HA/ mRFP-KinA^{rigor} 1, 2	*biA1 pyrG89 argB2 pyroA4 wA3* Δ*csmA*::*pyrG-csmA-9HA argB*::*chsB*(p)-*3xflag-chsB* Δ*kinA*::*pyroA4-alcA*(p)-*mrfp-kinA*^{rigor}	This Study

* This strain was renamed in this section.

Table 3-2. Localization patterns of EGFP-ChsB.

EGFP-ChsB	 normal	 punctate or dispersed	 no signal
WT	97	3	0
WT+benomyl *	52	38	10
WT+cyotochalasin A *	26	66	8
Δ*kinA*	62	30	8
Δ*kipA*	50	49	1
Δ*uncA*	91	9	1
mRFP-KinA^{rigor}	70	30	0
Δ*csmA*	80	13	7

The localization patterns of EGFP-ChsB at more than 100 hyphal tips were investigated and categorized into three groups (normal, punctate or dispersed, and no signal). The number indicates the percentage of tips of each group. WT, the EGFP-ChsB1 strain; Δ*kinA*, the EGFP-ChsBΔkinA strain; Δ*kipA*, the EGFP-ChsBΔkipA strain; Δ*uncA*, the EGFP-ChsBΔuncA strain; mRFP-KinA^{rigor}, the EGFP-ChsB/mRFP-KinA^{rigor} strain; Δ*csmA*, EGFP-ChsBΔcsmA strain.
* Hyphae of the EGFP-ChsB1 strain was treated with 2.4 μg/ml benomyl or 2 μg/ml cytochalasin A for 10 min at 37℃.

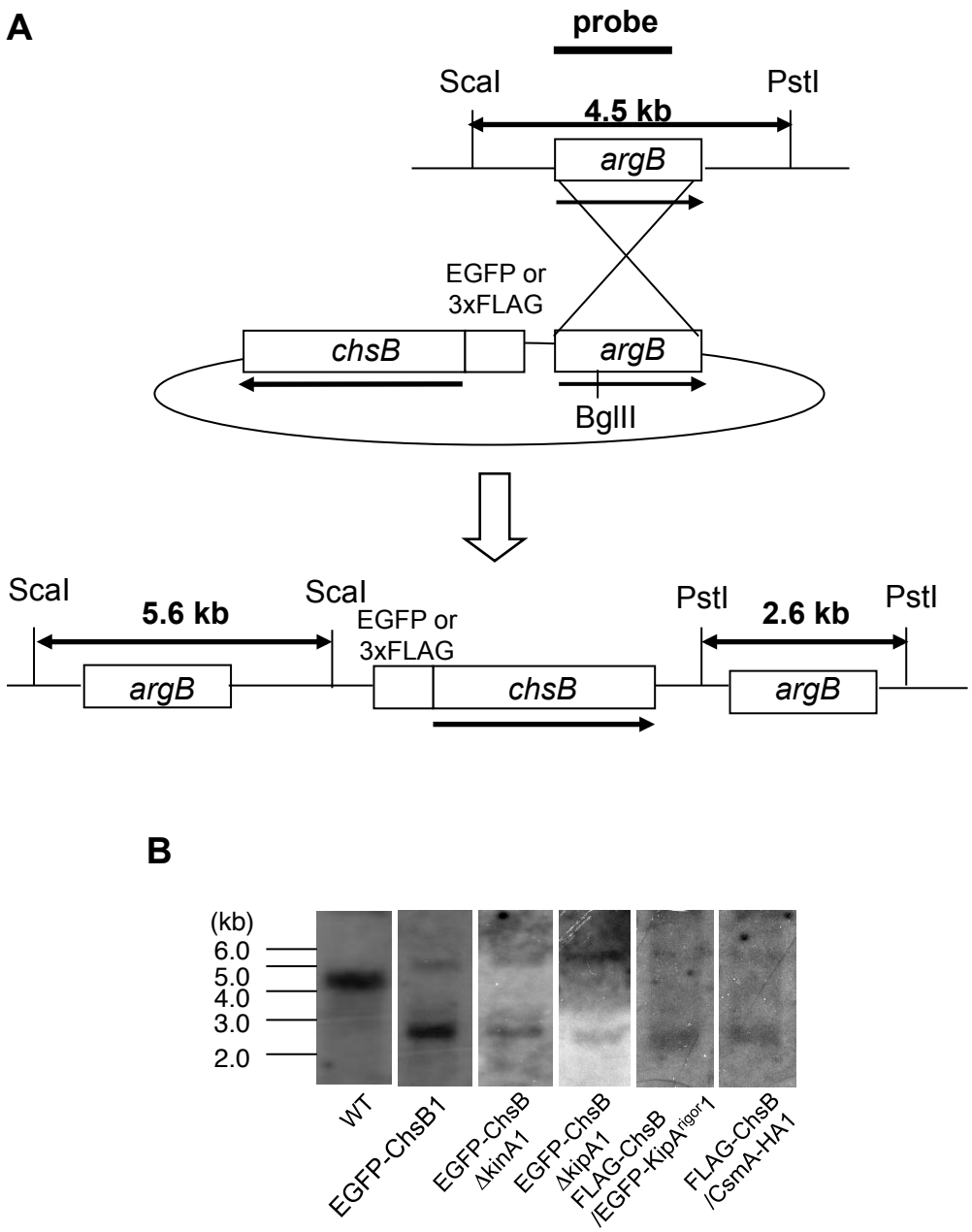


Figure 3-1. Constructions of the strains that produced EGFP-ChsB or FLAG-ChsB at *argB* locus.
(A) Scheme of construction.
(B) Southern blot analysis of PstI-ScaI digested total DNA of the strains that produced EGFP-ChsB or FLAG-ChsB at the *argB* locus probed with the 1.7 kb BamHI-SphI fragment of pSS1.

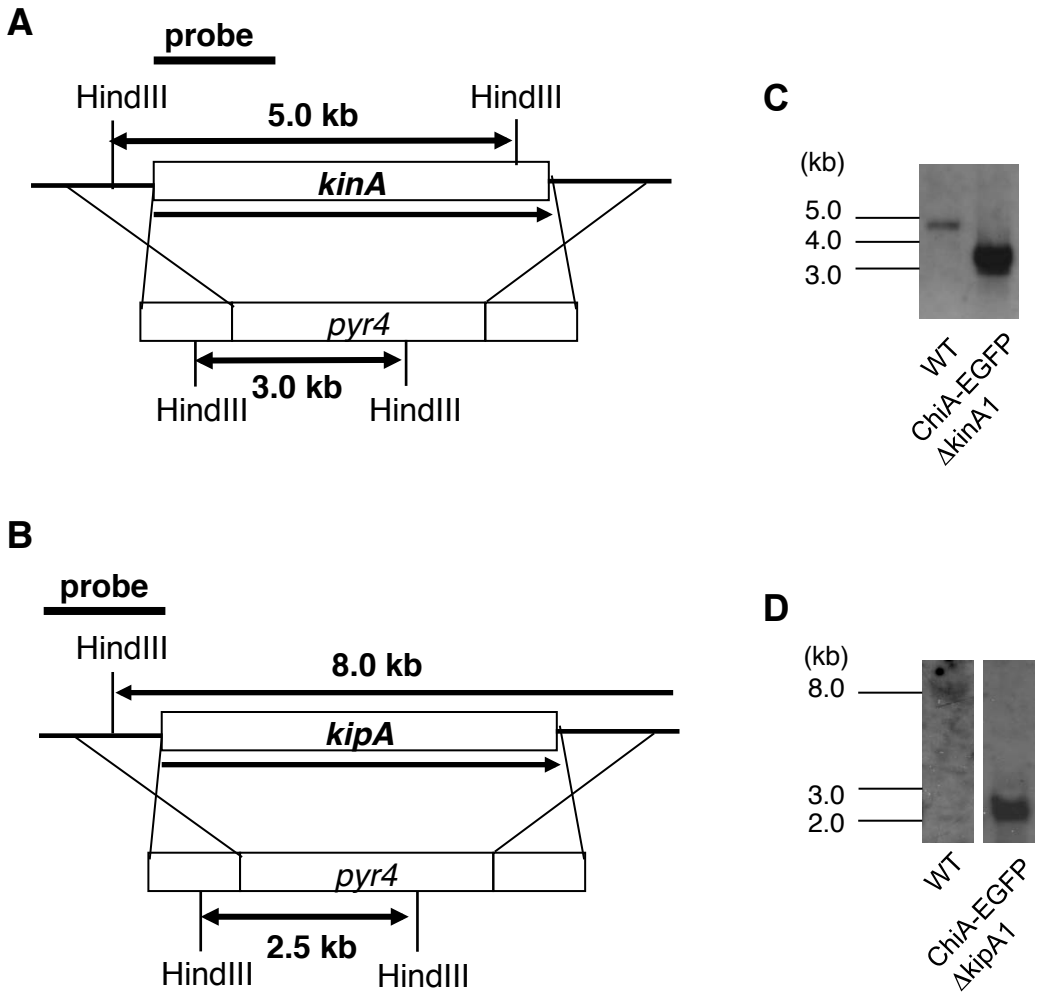


Figure 3-2. Construction of the Δ*kinA* strains and Δ*kipA* strains that produced ChiA-EGFP.
(A and B) Scheme of construction.
(C and D) Southern blot analysis of HindIII digested total DNA of the ChiA-EGFPΔkinA strain (C) and the ChiA-EGFPΔkipA strain (D) using the 1.0 kb fragment amplified by PCR as a probe.

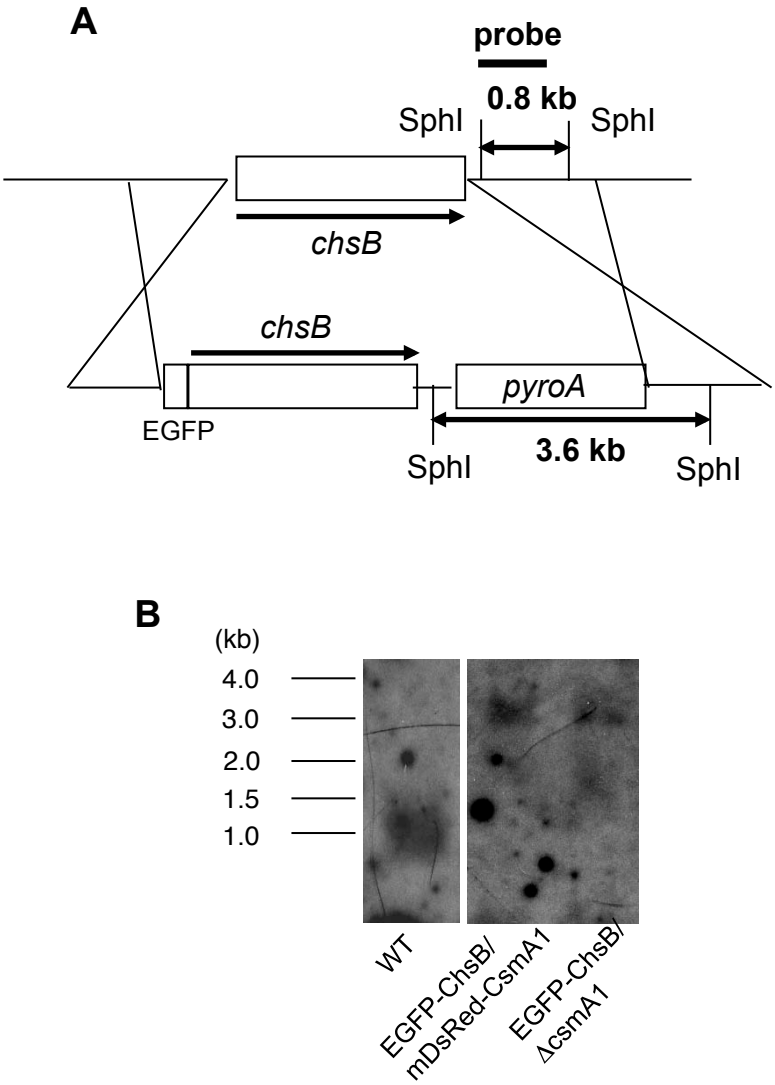


Figure 3-3. Constructions of the strains that produced EGFP-ChsB at *chsB* locus .
(A) Scheme of construction.
(B) Southern blot analysis of SphI digested total DNA of the strains that produced EGFP-ChsB at *chsB* locus probed with the 0.4 kb fragment amplified by PCR.

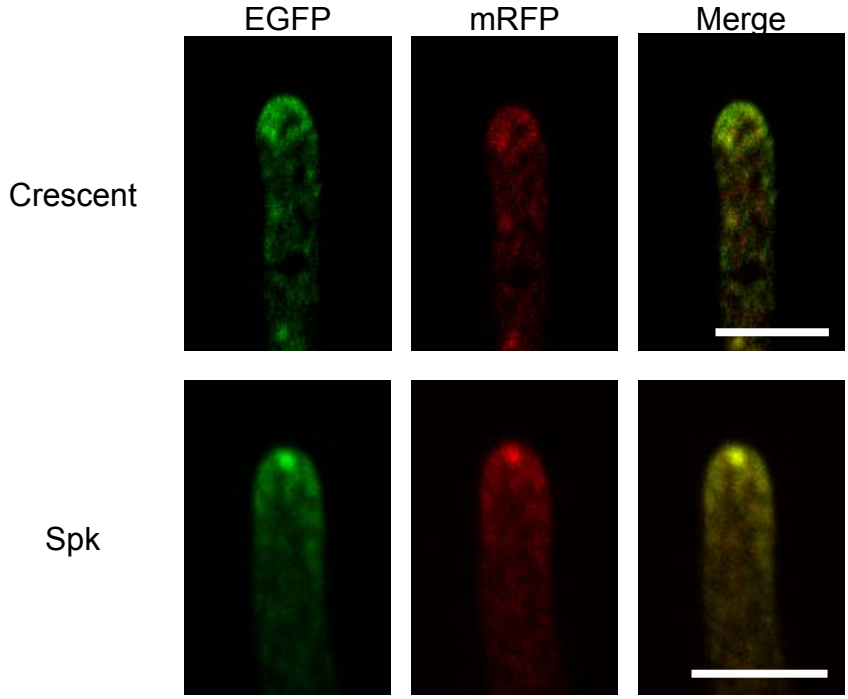


Figure 3-4. Localization of EGFP-ChsB and mRFP-TlgB at hyphal tips.
Hyphae of the EGFP-ChsB/mRFP-TlgB strain grown in the MMTFuu liquid medium for 14-16 h at 37℃ were observe d by fluorescence microscopy. The fluorescence of EGFP and mRFP were merged. The upper panel shows crescent structure of EGFP-ChsB at a hyphal tip; the lower panel shows the Spk structure of EGFP-ChsB. Scale bars, 5 μm .

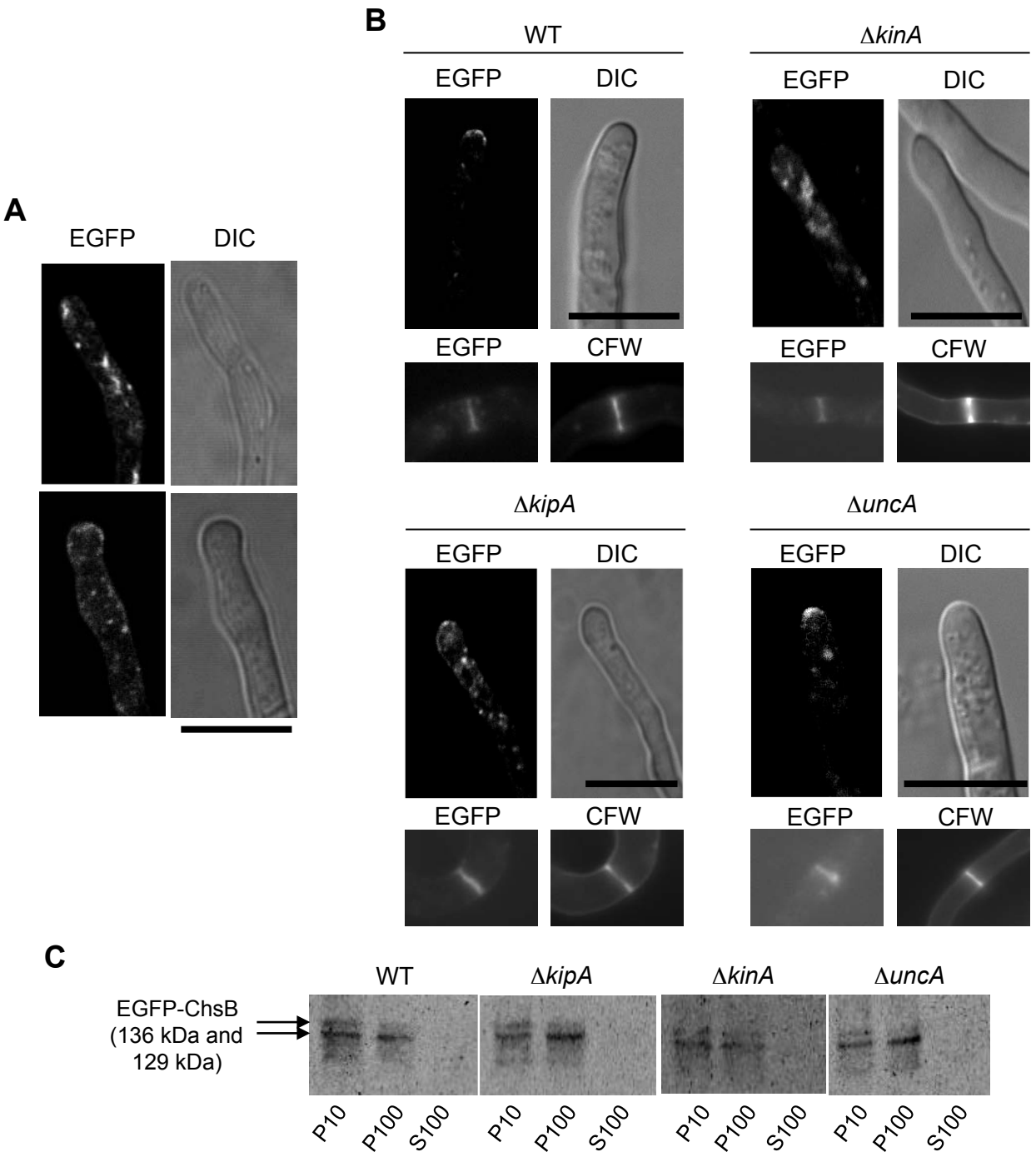


Figure 3-5. The effect of benomyl treatment or the deletion of kinesin genes on the localization of EGFP-ChsB.

(A) Localization of EGFP-ChsB after benomyl treatment. Hyphae of the EB-5 strain grown in the MMTFuu liquid medium for 14-16 h at 37℃ were treated with 2.4 μg/ml benomyl for 10 min and were observed by fluorescence microscopy after washing out benomyl. The fluorescence of EGFP at hyphal tips was observed as punctate (upper panel) or dispersed (lower panel) (see also Table 2-4). Scale bar, 5 μm. (B) Localization of EGFP-ChsB at hyphal tips and forming septa in the wild-type, *kinA*, *kipA* and *uncA* deletion mutants. Hyphae of the EGFP-ChsBΔkinA, the EGFP-ChsBΔkipA, and the EGFP-ChsBΔuncA strains grown under the same condition as descrived above (each upper panel) and septa of these strains grown on the MMTFuu solid medium and stained with CFW were observed. Scale bars, 5 μm. (C) Western blot analysis of the cell extracts of the strains mentioned above using anti-GFP antibody. P10, the 10,000 xg pellet; P100, the 100,000 xg pellet; S100, the 100,000 xg supernatant.

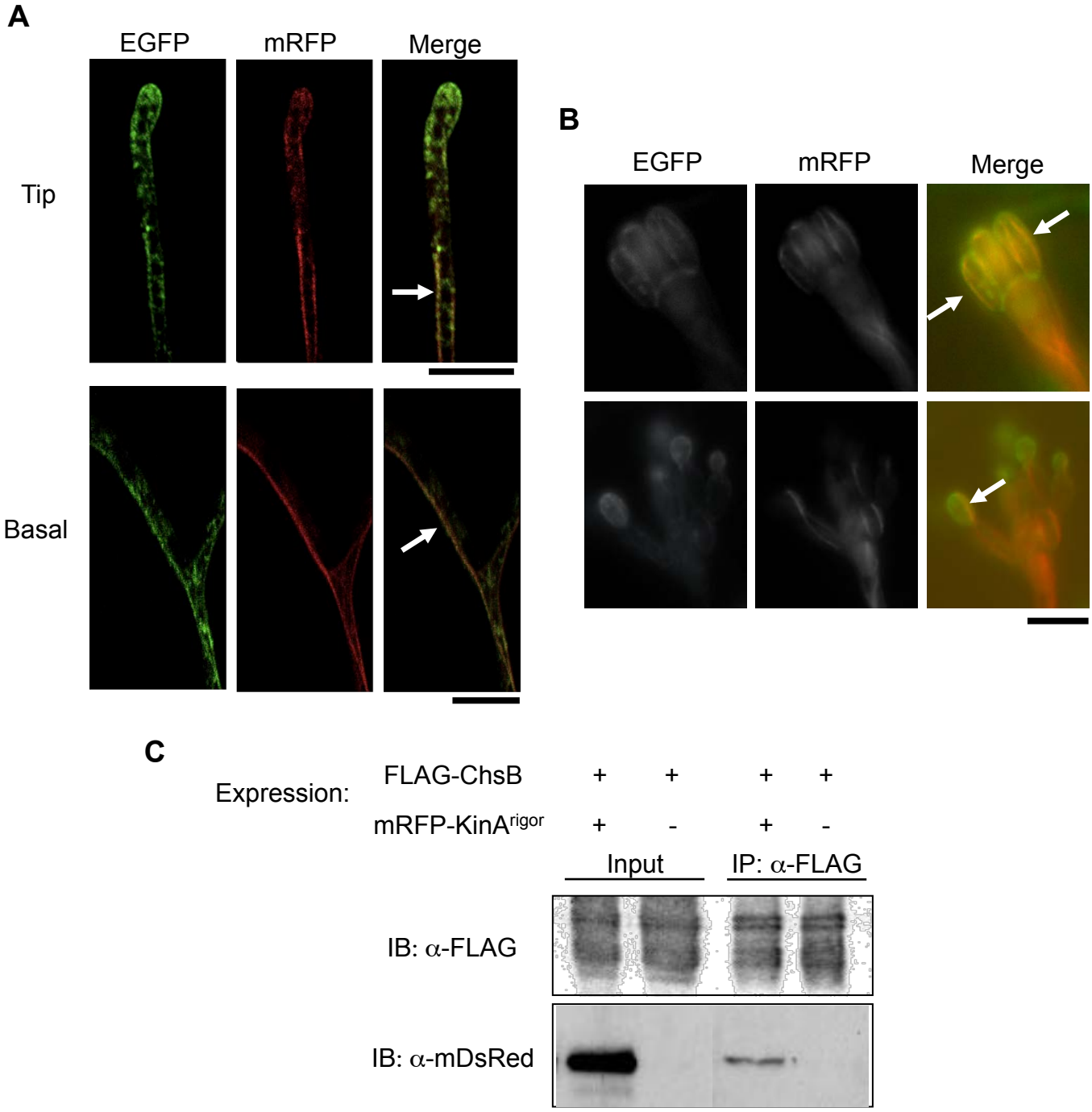
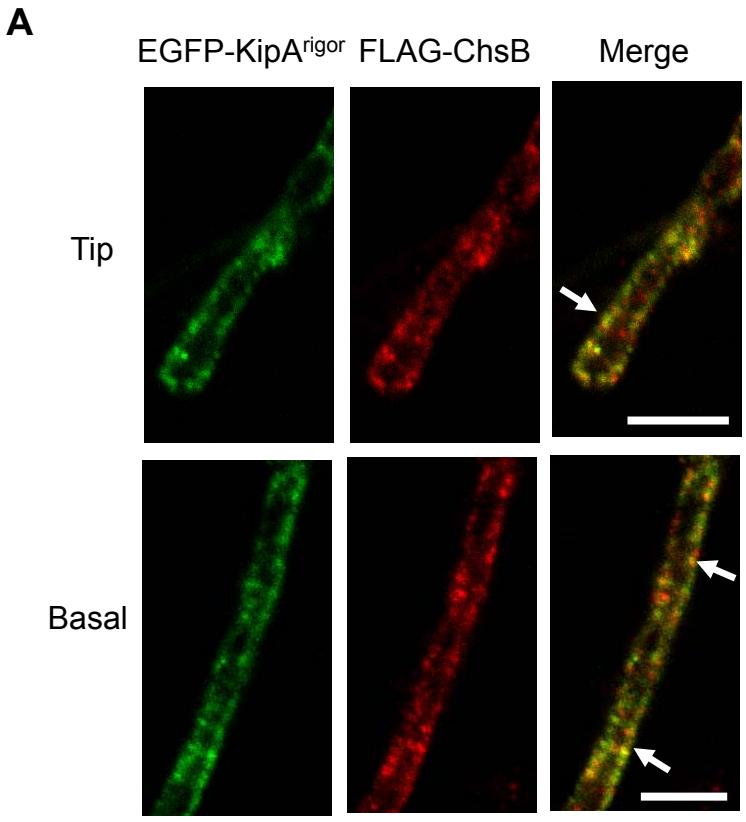


Figure 3-6.
(A and B) Localization of EGFP-ChsB of the mRFP-KinA^{rigor} producing strain in hyphae (A) and in conidiophores (B).
Localization of EGFP-ChsB and mRFP-KinA^{rigor} at a hyphal tip (A, upper panel), at basal region of a hypha (A, lower panel), and in conidiophores (B). Hyphae of the EGFP-ChsB/mRFP-KinA^{rigor} strain grown under the same condition as descrived in Fig. 3-4 (A) or grown on the MMTFuu solid medium for 18-20 h a t 37℃ (B) were observed by fluorescence microscopy. Arrows indicate the co-localizations of EGFP and mRFP along filamentous structures. Scale bars, 5 μm .
(C) Co-immunoprecipitation of FLAG-ChsB with mRFP-KinA^{rigor} *in vivo*.
100,000 xg pellets (P100) of the cell extracts of th e strains that produced F LAG-ChsB and m RFP-KinA^{rigor} or FLAG-ChsB were immunoprecipitated with anti-FLAG antibody. P100 (Input) a nd immunoprecipitates (IP: α-FLAG) were subjected to Western blotting using anti-FLAG or a nti-mDsRed antibody.



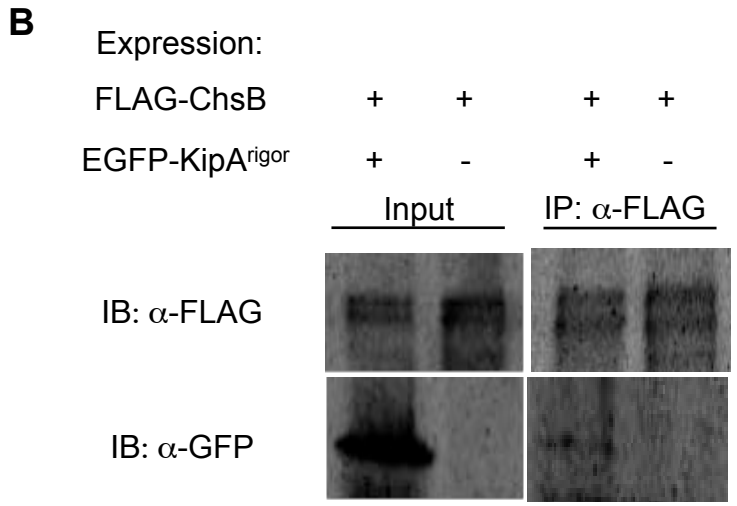


Figure 3-7.
(A) Localization of FLAG-ChsB and EGFP-KipA^{rigor} at a hyphal tip (the upper panel) and at the basal region of a hypha (the lower panel). Hyphae of the FLAG-ChsB/EGFP-KipA^{rigor} strain grown under the same condition as described in Fig. 3-4 were observed by indirect immunofluorescence microscopy using anti-FLAG antibody. Arrows indicate the co-localizations of EGFP and FLAG-ChsB along filamentous structures. Scale bars, 5 μm.
(B) Co-immunoprecipitation of FLAG-ChsB with EGFP-KipA^{rigor} *in vivo*. 100,000 xg pellets (P100) of the cell extracts of the strains producing FLAG-ChsB and EGFP-KipA^{rigor} or FLAG-ChsB were immunoprecipitated with anti-FLAG antibody. P100 (Input) and immunoprecipitates (IP: α-FLAG) were subjected to Western blotting using anti-FLAG or anti-GFP antibody.

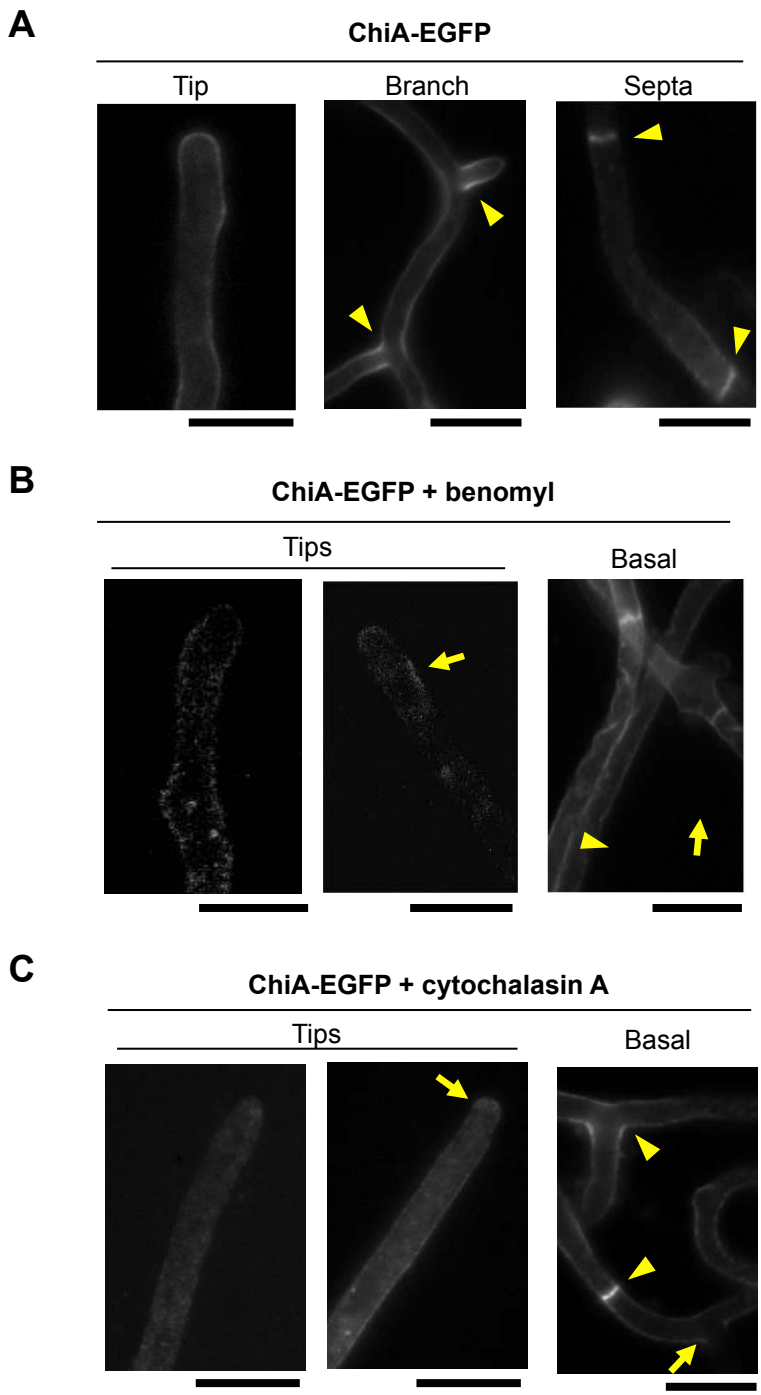


Figure 3-8. The effect of b enomyl or cytochalasin A t reatment on the localization of ChiA-EGFP.

(A) Localizations of ChiA-EGFP at plasma membrane of a hyphal tip (Tip), branching regions (Branch), and septa (Septa) were observed as described in Yamazaki *et al.* (Yamazaki *et al.*, 2008). Arrowheads indicate the strong fluorescence of ChiA-EGFP. (B and C) Hyphae of the ChiA-EGFP strain grown in the MMTFuu liquid medium for 14-16 h at 37℃ were treated with 2.4 μg/ml benomyl (B) or 2 μg/ml cytochalasin A (C) for 10 min and observed by fluorescence microscopy after washing out benomyl or cytochalasin A. The fluorescence of EGFP at the hyphal tips was dispersed (Tips: each left panel) or was observed only a part of plasma membrane (Tips: each right panel, arrow) and those at branching region of hyphae was not detected in 12% (in case of benomyl treatment) or 15% (in case of cytochalasin A treatment) of branching sites (n=200) (Basal: arrows). The fluorescence of EGFP was observed at septa after benomyl or cytochalasin A treatment (Basal: arrowhead). Scale bars, 5 μm.

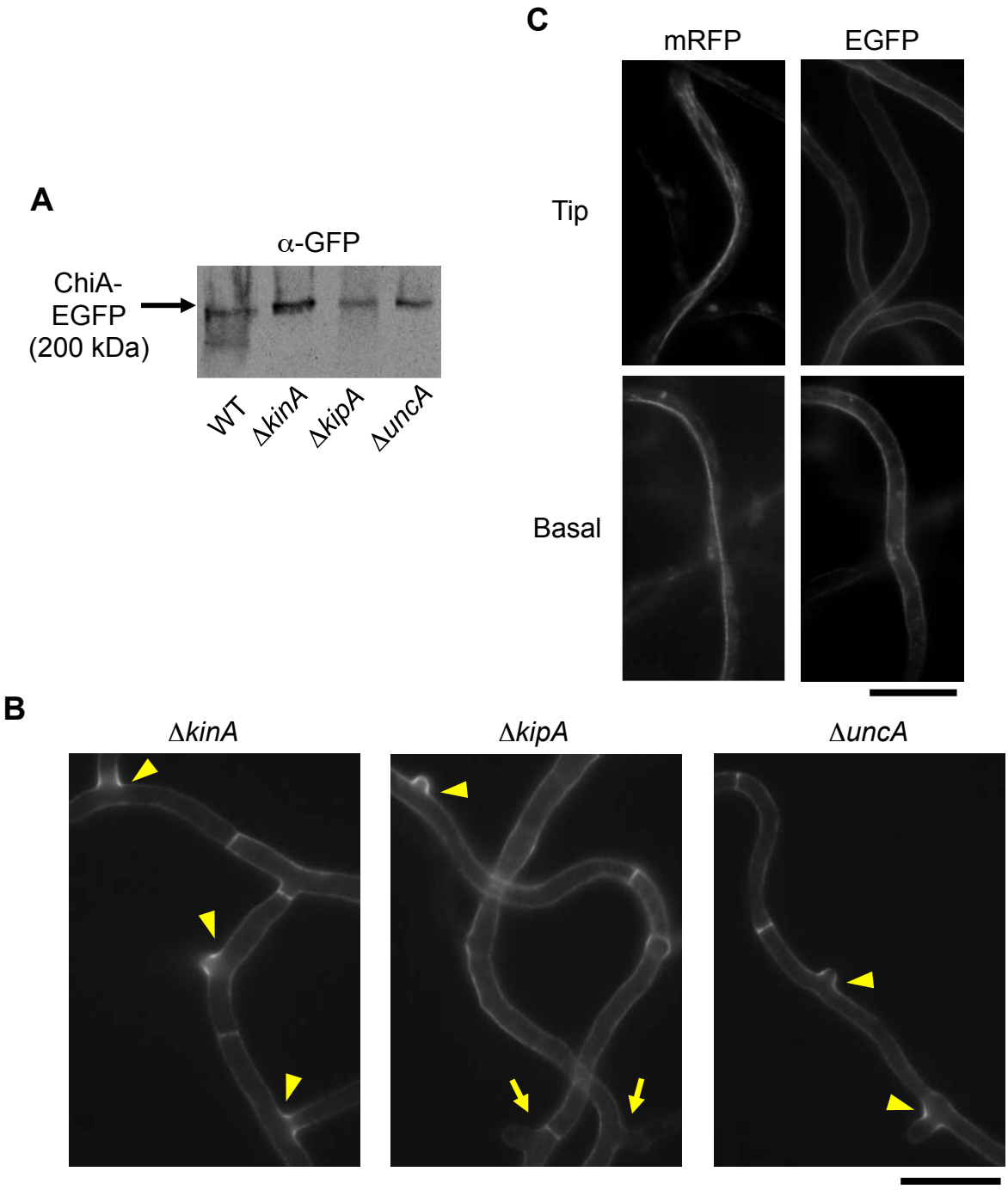


Figure 3-9.
(A) Western blot analysis of the cell extracts of the ChiA-EGFP strain (WT), the ChiA-EGFPΔkinA strain (Δ*kinA*), the ChiA-EGFPΔkipA strain (Δ*kipA*), and the ChiA-EGFPΔuncA strains (Δ*uncA*) using anti-GFP antibody. (B) Localization of ChiA-EGFP in the hyphae of the *kinA*, *kipA* and *uncA* deletion mutants. Hyphae of the strains grown on the MMTFuu solid medium for 14-16 h were observed. Arrowheads indicate the strong fluorescence of EGFP at branching regions. Arrows indicate the branching sites where the fluorescence of EGFP was not observed. Scale bar, 5 μm. (C) Localization of ChiA-EGFP and mRFP-KinA^{rigor} at a hyphal tip (the upper panel) and at the basal region of a hypha (the lower panel). Hyphae of the ChiA-EGFP/mRFP-KinA^{rigor} strain grown under the same condition as described above were observed by fluorescence microscopy. Scale bar, 5 μm.

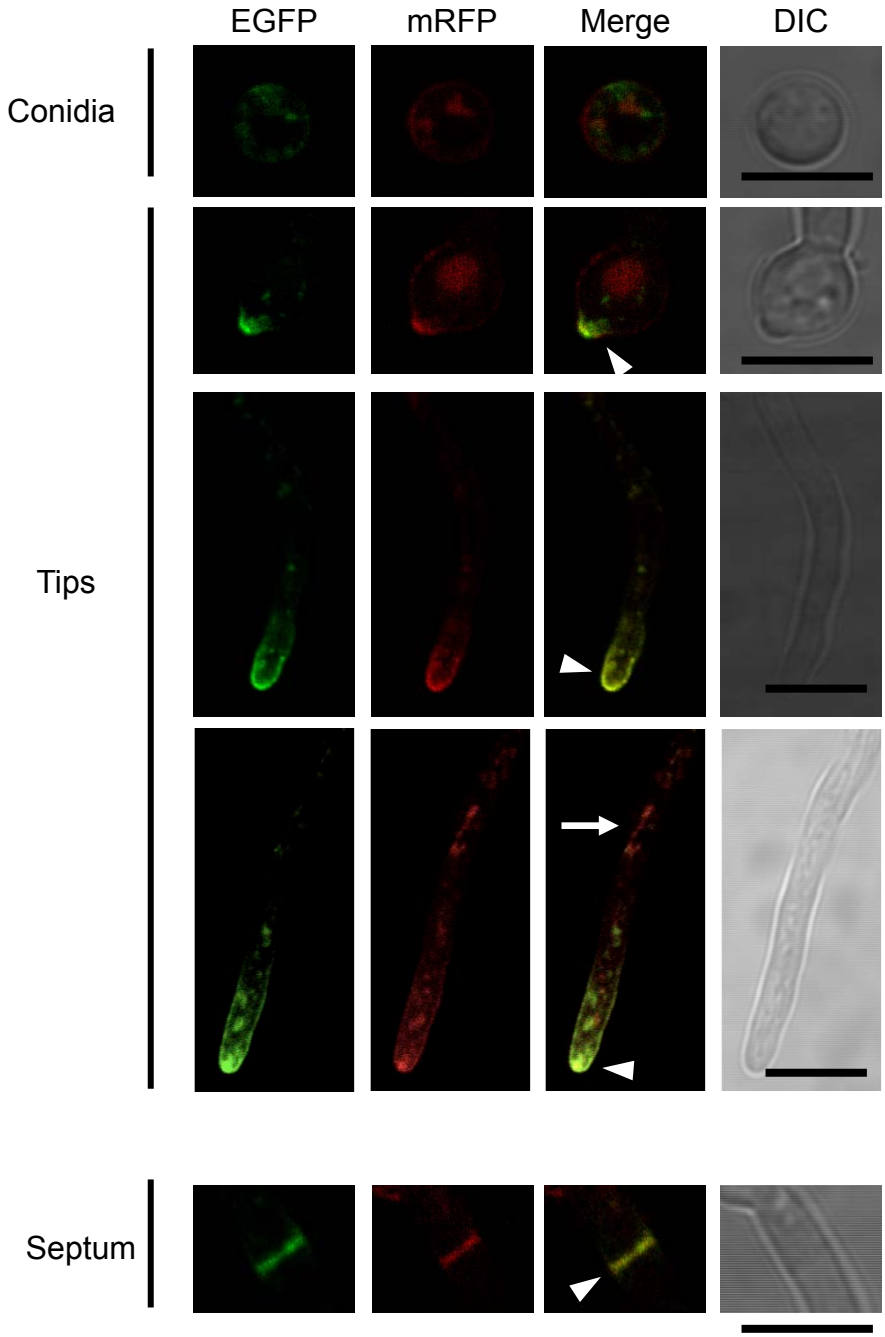


Figure 3-10. Localization of EGFP-ChsB and mDsRed-CsmA in the hyphae.
Hyphae of the EGFP-ChsB/mDsRed-CsmA strain grown in the MMTFuu liquid medium for 6-14 h were observed by fluorescence microscopy. Both the fluorescence of EGFP and mDsRed were observed at hyphal tips and forming septa (arrowheads). The arrow indicates the mDsRed-specific fluorescence. Scale bars, 5 μm .

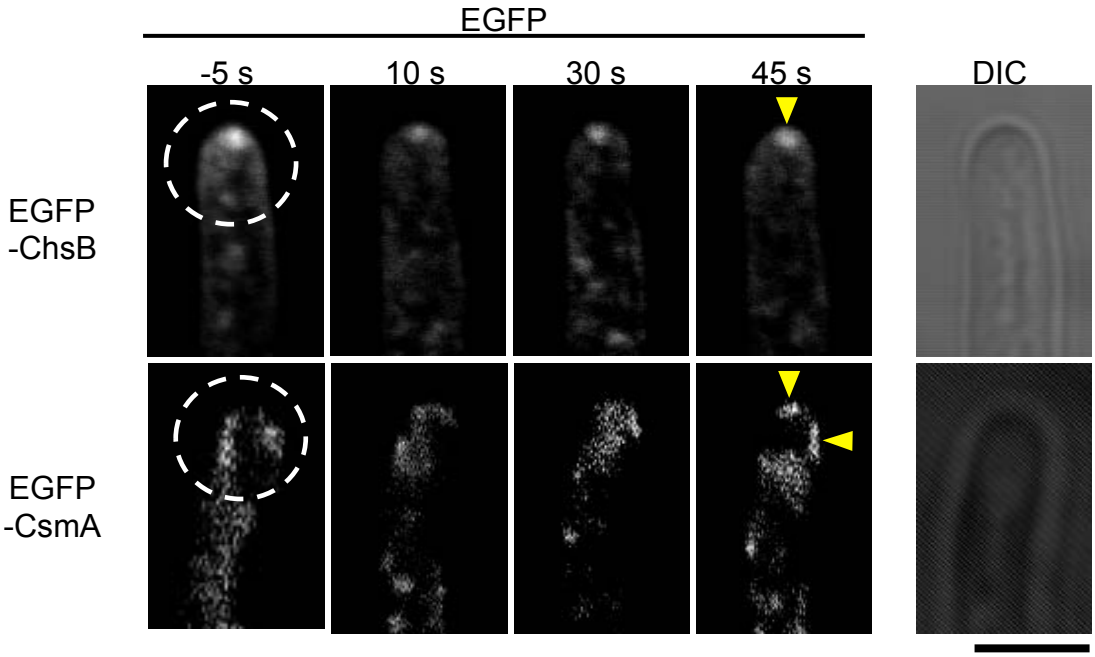


Figure 3-11. Time lapse of localization of EGFP-ChsB and EGFP-CsmA at hyphal tips by FRAP analysis.
Hyphae of the EGFP-ChsB strain and EGFP-CsmA1 strain grown in the MMTFuu liquid medium for 14-16 h at 37℃ were observed by fluorescence microscopy. Photobleaching was performed in the region shown as dotted circle (-5 s). The fluorescence recovery of EGFP-ChsB and EGFP-CsmA was observed at 10 s, 30 s, and 45 s after photobleaching. The arrowheads indicate the concentration of EGFP fluorescence (45 s). Scale bar, 5 μm .

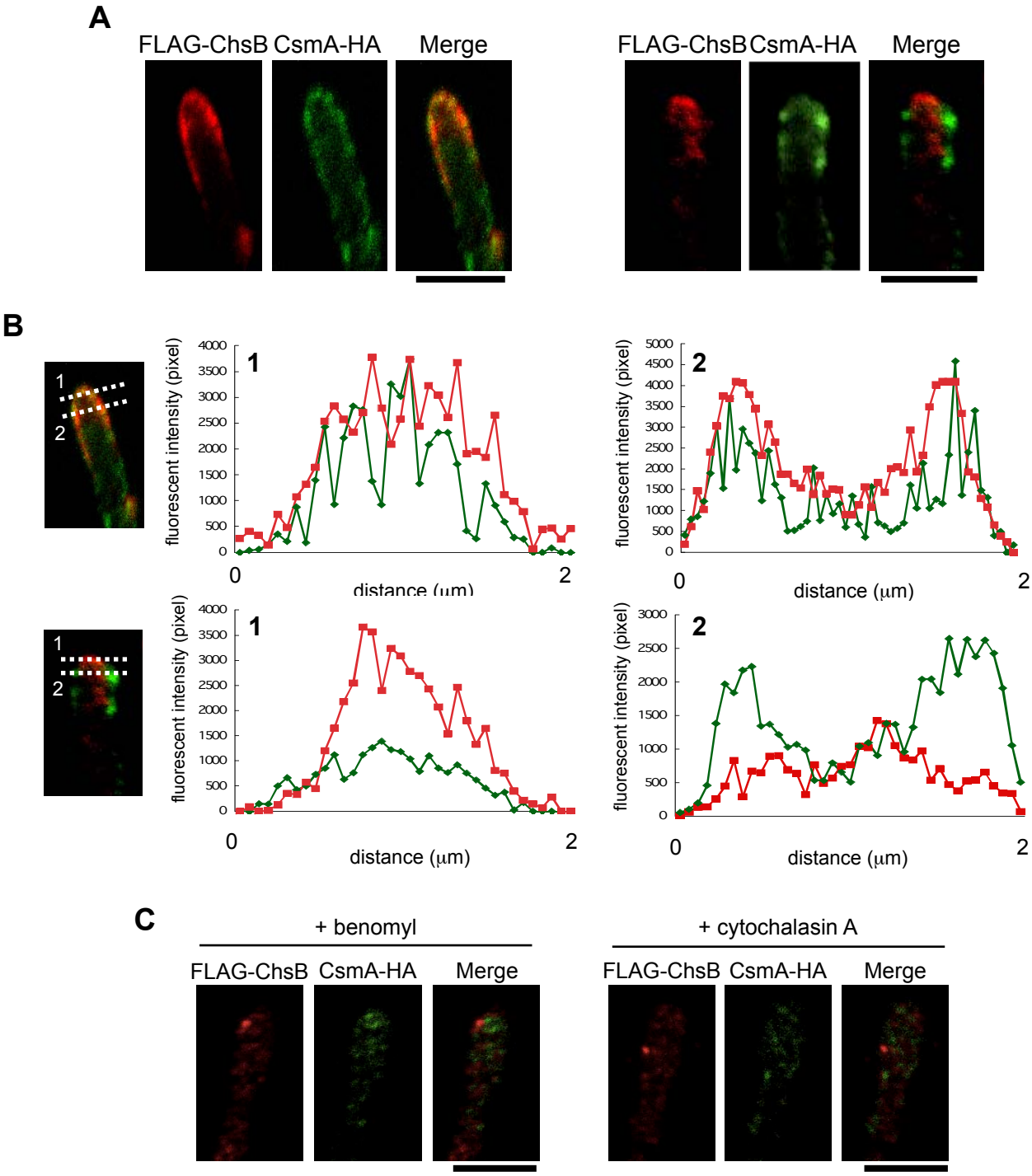


Figure 3-12. Localization of FLAG-ChsB and CsmA-HA at hyphal tips.
Hyphae of the strain that produced FLAG-ChsB and CsmA-HA grown in the MMGuu liquid medium for 14-16 h were stained with anti-FLAG and anti-HA antibodies and visualized by indirect immunofluorescence microscopy. (A) The localization patterns were divided into two categories: FLAG-ChsB and CsmA-HA colocalized at both hyphal apex and subapical region (the upper panels: 63±3% of the hyphal tips), and FLAG-ChsB was observed at the hyphal apex while CsmA-HA was observed at the subapical region (the lower panels: 37±3% of the hyphal tips) (n>100, the result of three independent experiments). Scale bars, 5 μm. (B) The fluorescence intensity of FLAG-ChsB and CsmA-HA were quantified along the dotted lines 1 and 2. (C) Localization of FLAG-ChsB and CsmA-HA after benomyl or cytochalasin A treatment. Scale bars, 5 μm .

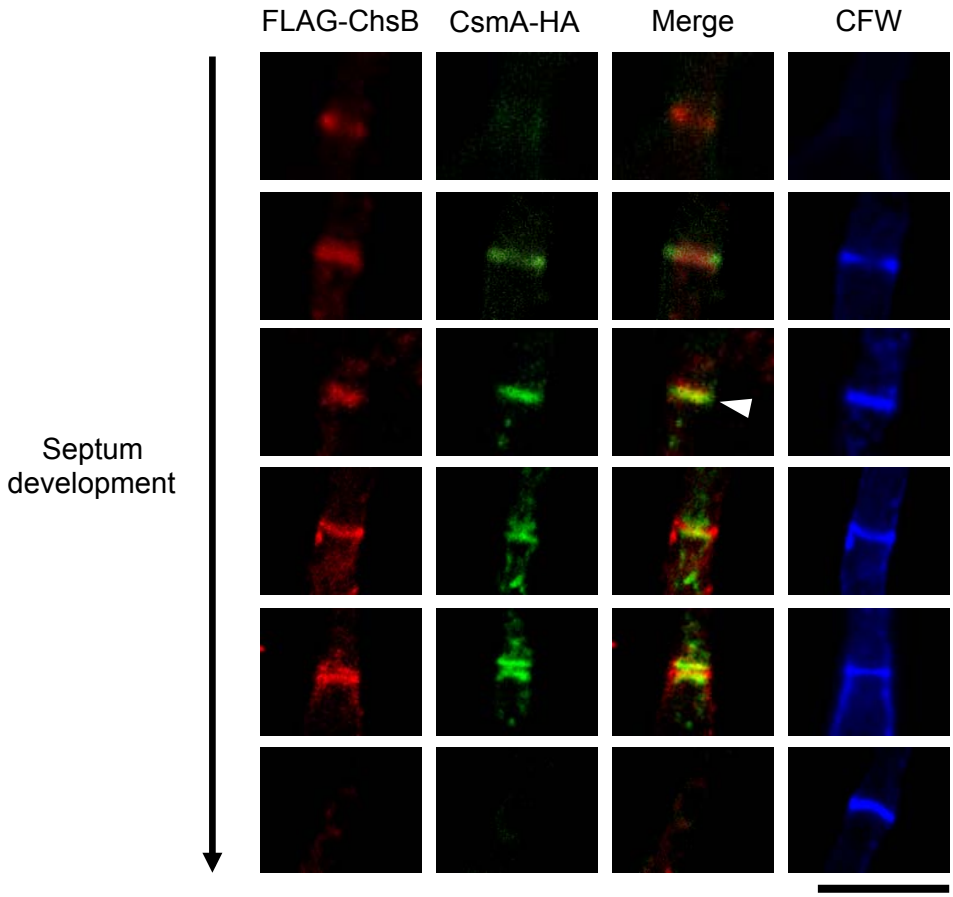


Figure 3-13. Localization of FLAG-ChsB and CsmA-HA at septa.
Hyphae of the strain that produced FLAG-ChsB and CsmA-HA grown in the MMGuu liquid medium for 14-16 h were stained with anti-FLAG and anti-HA antibodies and visualized by indirect immunofluorescence microscopy. The fluorescence images of FLAG-ChsB and CsmA-HA were merged. These hyphae were stained simultaneously with CFW. Each image was arranged in the order of the deduced time course of septum development. The arrow indicates the co-localization of the fluorescence of FLAG-ChsB and CsmA-HA. Scale bar, 5 μm .

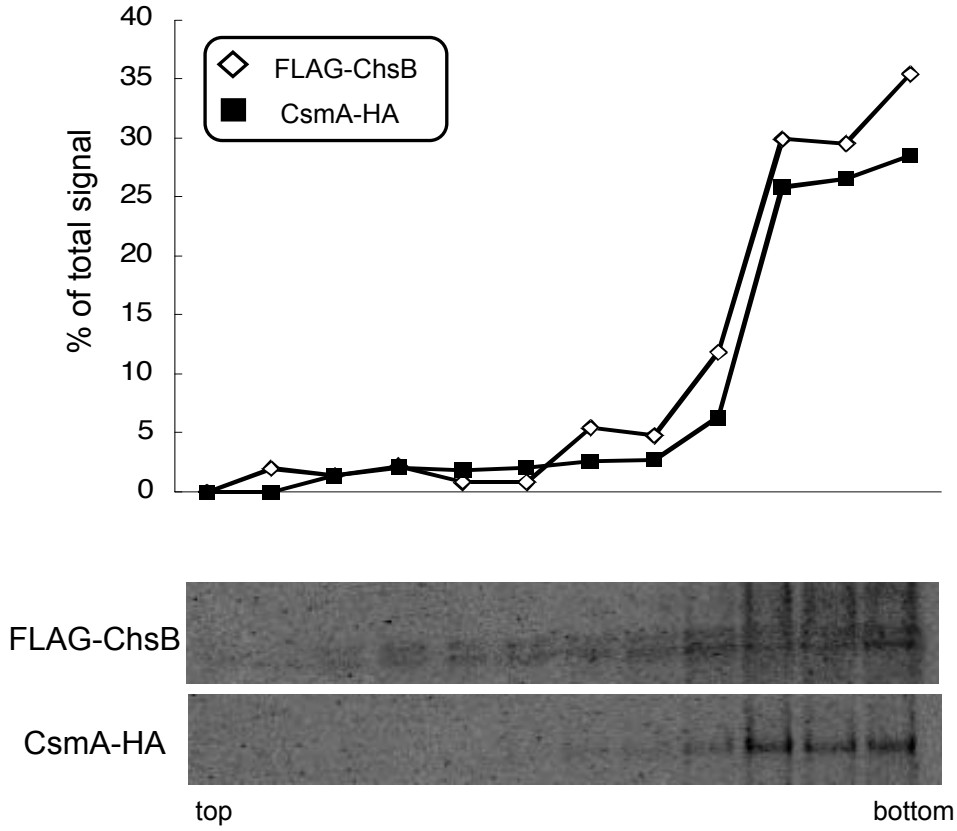


Figure 3-14. Subcellular fractionation of FLAG-ChsB and CsmA-HA.
The cell extract of the strain that produced FLAG-ChsB and CsmA-HA was fractionated by s ucrose gradient (5-40%) centrifugation at 100,000 xg. Western blot analysis of each fractions was performed using anti-FLAG or anti-HA antibody. The graph was drawn by scanning dens itometry analysis of signals in each fraction detected by Western blottIng.

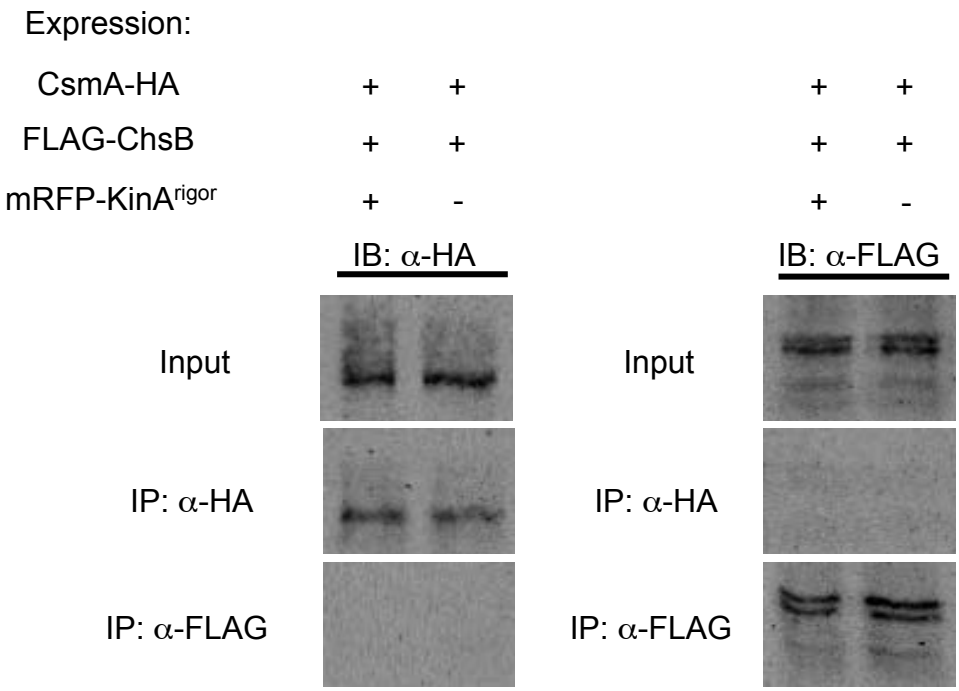


Figure 3-15. Co-immunoprecipitation analysis between FLAG-ChsB and CsmA-HA.
100,000 xg pellets (P100) of the cell extracts of the strain that produced FLAG-ChsB, CsmA-HA, and mRFP-KinA^{rigor} and the strain that produced FLAG-ChsB and CsmA-HA were immunoprecipitated with anti-FLAG or anti-HA antibody. P100 (Input) and immunoprecipitates (IP: α-FLAG or IP: α-HA) were subjected to Western blot analysis using the α-FLAG and α-HA antibody.

終章

一般的に糸状菌の細胞壁は出芽酵母 *S. cerevisiae*、分裂酵母 *S. pombe*、二形性酵母 *C. albicans* 等と比較してキチンの含量が高く、細胞壁キチンのリモデリングは菌糸型の形態形成に必須である。糸状菌の菌糸型の形態形成は菌糸先端における極性的な生長によって支持されており、菌糸先端の形質膜上において機能するキチン合成酵素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。また、菌類のキチン合成酵素のうち、クラス III、V、VI、VII に分類されるものは菌糸型の形態をとり得る真菌類にのみ存在し、クラス V 全てとクラス VI の一部のキチン合成酵素は N 末端側に MMD を有する特徴的酵素である。糸状菌のモデル生物である *A. nidulans* において、クラス III に属する ChsB、クラス V に属する CsmA、及びクラス VI に属する CsmB は菌糸の形態形成に特に重要な役割を果たすと考えられていたが、他の糸状菌を含めこれら菌糸型の形態をとり得る真菌類に特有のキチン合成酵素について、局在化機構や局在化に関わるタンパク質など、菌糸の先端生長との相関という観点からの解析は遅れていた。このような背景から、本研究では CsmA、CsmB 及び ChsB の先端生長における機能及び局在化機構に関する解析を行なった。

第 1 章では CsmB の機能における MMD の役割について解析し、CsmB の MMD はアクチンと相互作用すること、CsmB の正常な局在化と機能に必要であることが明らかとなった (Tsuizaki *et al.*, 2009) 。また、CsmA と CsmB のドメインの互換性について解析し、CsmA の MMD は CsmB の MMD と一部交換可能であるが機能を完全には代替できないこと、CsmB の MMD は CsmA の MMD と交換可能であること、両者の CSD は交換不可能であることが示唆された。第 2 章では CsmA の菌糸内局在化機構について解析し、CsmA が微小管上をキネシン KinA あるいは KipA との相互作用によって菌糸先端付近へ輸送されること、KinA との相互作用による輸送には少なくとも MMD が不要であることが示唆された。第 3 章では ChsB の菌糸内局在化機構について解析し、CsmA と同様に、ChsB は微小管上を KinA あるいは KipA との相互作用によって菌糸先端付近まで輸送されることが示唆された。また ChsB と CsmA の局在化機構の差異について検討し、両者は互いに独立して菌糸後方から先端付近まで微小管上を輸送され、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。本研究は糸状菌における細胞壁形成と極性的な先端生長をリンクさせると考えられるクラス III、V、VI キチン合成酵素について、クラス V と VI のドメインの

互換性と機能的相関を明らかにした点、またクラス III と V の菌糸先端への局在化機構を具体的に明らかにしたという点で新規であり、他の糸状菌においてこのような報告例は極めて少ない。

CsmA と CsmB のドメイン互換性の解析から、両者のキチン合成酵素としての活性は代替不可能であることが示唆され、これについては今後両者の酵素活性等を検討する必要性が考えられるが、CsmA や CsmB を含め、糸状菌におけるキチン合成酵素の酵素学的性質の解析は遅れている。近年 *W. dermatitidis* のクラス V キチン合成酵素の精製と活性測定が報告されたが、検出された活性は *S. cerevsiae* のクラス I キチン合成酵素 Chs1p の 5%程度であり、タンパク質全長は極めて不安定であった (Abramczyk and Szaniszlo, 2009) 。またごく最近の報告において、*S. cerevisiae* において *F. oxysporum* 及び *A. fumigatus* のクラス V キチン合成酵素を発現させ、その酵素活性の検討が試みられたが、これらのキチン合成酵素は *S. cerevisiae* の生体内では有意に活性が検出されなかった (Jimenez, *et al.*, 2010) 。また当研究室においても *A. nidulans* の CsmA 及び CsmB を *S. cerevisiae* において発現させる系の構築が進められたが、*S. cerevisiae* の生体内でこれらのタンパク質を安定に生産させることが難しく、活性の測定には至らなかった (前田, 2010) 。一方 *A. nidulans* のクラス III キチン合成酵素 ChsB 及び *W. dermatitidis* のクラス III キチン合成酵素については *S. cerevisiae* を用いた発現系の構築及び酵素活性測定が報告されている (Tatsuno *et al.*, 1997; Wang and Szaniszlo, 2002) 。クラス V 及び VI の一部のキチン合成酵素はクラス III と比較して N 末端側に MMD を持つ分全長の長いタンパク質であることから、全長を安定に発現させることが困難であると考えられる。菌糸型の形態をとり得る真菌類に特有のこれらのキチン合成酵素については、今後 *S. cerevisiae* 以外の発現系の構築等を検討し、酵素学的性質を解析していくことが必要であると思われる。

また、本研究では ChsB と CsmA の菌糸内局在化機構について解析し、両者が互いに独立して菌糸先端の一部異なる領域に局在化することが示唆されたことから、両者が菌糸先端の異なる領域におけるキチン合成に機能する可能性が考えられる。*C. albicans* において、クラス I に属する Chs8p とクラス IV に属する Chs3p をコードする *chs8* あるいは *chs3* の破壊株において、形成されるキチンには違いが見られ、Chs8p は長いキチン繊維 (chitin microfibril) の形成に関わり、Chs3p は短いキチンの桿状構造 (chitin rodlet) の形成に関わることが示唆

されている (Lenardon *et al.*, 2007) 。*chsB* と *csmA* の破壊株の表現型は大きく異なり、*alcA*(p)-*chsB* Δ*csmA* の条件抑制株では両者の破壊株の表現型を足し合わせた表現型が見られたことから、両者の機能的相関は低いと考えられる (廣井, 2001) 。特に、*chsB* 破壊株では微小なコロニーしか形成できず菌糸先端生長に重篤な異常が見られるのに対し、*csmA* 破壊株では先端生長について *chsB* 破壊株ほどの異常は見られず、低浸透圧条件下において菌糸先端のやや後方において頻繁に溶菌が見られるという表現型の違いは、両者の一部の局在部位の違い、更に両者の機能する領域の違いを反映しているのかもしれない。また隔壁形成部位において、第 3 章の考察でも述べたように *chsB* 破壊株及び *csmA* 破壊株では隔壁孔形成が正常に完了しないため起こると考えられる菌糸内菌糸が観察されるが、隔壁形成そのものは正常に行なわれることが示されている。一方クラス I 及びクラス II に属する *chsC* 及び *chsA* の二重破壊株では隔壁の構造や形成位置が異常となることから、ChsC 及び ChsA は隔壁形成そのものに機能し、ChsB や CsmA は隔壁孔形成におけるキチン合成の制御に機能するというように機能分化している可能性が考えられる。

A. nidulans におけるキチン合成酵素の機能解析については、今後その機能に関わるタンパク質を明らかにし、機能的相関を解析することも極めて重要であると考えられる。細胞内輸送に関する研究が糸状菌よりも進展している出芽酵母 *S. cerevisiae* については、bud neck における局所的なキチン合成に関わるキチン合成酵素 Chs3p について、序章にも述べたように相互作用するタンパク質、局在化のメカニズム等が具体的に明らかとなっている。Chs3p は菌類における分類上クラス IV に属し、クラス IV、V、VI (Division 2) に属するキチン合成酵素はアミノ酸配列から推定されるハイドロパシープロファイルが類似している。Chs3p の制御サブユニットであり、Chs3p の bud neck へのリクルート及び酵素の活性化に関わる Skt5p/Chs4p のホモログが *A. nidulans* には 3 個存在し (*AN1554*、*AN3445*、*AN8765*) 、Division 2 に属するキチン合成酵素も 3 個存在する (ChsD、CsmA、CsmB) ことから、これらのホモログが *A. nidulans* において Division 2 キチン合成酵素の機能因子として機能する可能性が考えられ、当研究室において現在解析が進められている (西出, 2009) 。また、酵母ツーハイブリッド法を用いたスクリーニングにより、CsmA と相互作用するタンパク質の解析も進められている (前田, 2010) 。

S. cerevisiae の場合と異なり、糸状菌は微小管によって細胞内輸送及び輸送

に伴う菌糸先端生長が確立されている。本研究における解析から、一部のキチン合成酵素が微小管によって菌糸先端方向へ輸送され、先端生長に寄与することが示唆された。これらのキチン合成酵素は菌糸先端や隔壁形成部位において局在部位及び局在時期が異なることにより、時間的、空間的にこれらの部位におけるキチンの生合成の異なる段階で機能する可能性が考えられる。キチン合成酵素を含む小胞に存在する他のタンパク質、輸送に関わるキネシン以外の因子等を今後明らかにし、その機能的相関を解析することにより、キチン合成酵素による菌糸の極性的な先端生長と細胞壁形成のメカニズムがより明確に示されると期待される。

参考文献

廣井淳　東京大学大学院農学生命科学研究科　2001 年度　修士論文

柳田哲博　東京大学大学院農学生命科学研究科　2004 年度　修士論文

竹下典男　東京大学大学院農学生命科学研究科　2005 年度　博士論文

福田一治　東京大学大学院農学生命科学研究科　2006 年度　修士論文

小野彩　東京大学大学院農学生命科学研究科　2007 年度　修士論文

盛威　東京大学大学院農学生命科学研究科　2007 年度　修士論文

對崎真楠　東京大学大学院農学生命科学研究科　2007 年度　修士論文

山田和成　東京大学大学院農学生命科学研究科　2008 年度　修士論文

髙井弘基　東京大学農学部　2009 年度　卒業論文

西出晶　東京大学大学院農学生命科学研究科　2009 年度　修士論文

前田隼見　東京大学大学院農学生命科学研究科　2010 年度　修士論文

阿部歩、浅野行蔵、曽根輝雄 (2006) *Rhizopus oryzae* のキチン合成酵素遺伝子の発現解析　第 6 回糸状菌分子生物学コンファレンス

Fungal Genetics Stock Center (FGSC) http://www.fgsc.net/

Abenza, J. F., Pantazopoulou, A., Rodriguez, J. M., Galindo, A. and Penalva, M. A. (2009). Long-distance movement of *Aspergillus nidulans* early endosomes on microtubule tracks. *Traffic* **10,** 57-75.

Abramczyk, D., Park, C. and Szaniszlo, P. J. (2009). Cytolocalization of the class V chitin synthase in the yeast, hyphal and sclerotic morphotypes of *Wangiella* (*Exophiala*) *dermatitidis*. *Fungal Genet Biol* **46,** 28-41.

Abramczyk, D. and Szaniszlo, P. J. (2009). Immunoaffinity purification of the class V chitin synthase of *Wangiella* (*Exophiala*) *dermatitidis*. *Prep Biochem Biotechnol* **39,** 277-88.

Amnuaykanjanasin, A. and Epstein, L. (2003). A class V chitin synthase gene, *chsA* is essential for conidial and hyphal wall strength in the fungus *Colletotrichum graminicola* (*Glomerella graminicola*). *Fungal Genet Biol* **38,** 272-85.

Amnuaykanjanasin, A. and Epstein, L. (2006). A class Vb chitin synthase in *Colletotrichum graminicola* is localized in the growing tips of multiple cell types, in nascent septa, and during septum conversion to an end wall after hyphal breakage. *Protoplasma* **227,** 155-64.

Antebi, A. and Fink, G. R. (1992). The yeast Ca(2+)-ATPase homologue, PMR1, is required for normal Golgi function and localizes in a novel Golgi-like distribution. *Mol Biol Cell* **3,** 633-54.

Araujo-Bazan, L., Penalva, M. A. and Espeso, E. A. (2008). Preferential localization of the endocytic internalization machinery to hyphal tips underlies polarization of the actin

cytoskeleton in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **67,** 891-905.

Arbelet, D., Malfatti, P., Simond-Cote, E., Fontaine, T., Desquilbet, L., Expert, D., Kunz, C. and Soulie, M. C. Disruption of the *Bcchs3a* chitin synthase gene in *Botrytis cinerea* is responsible for altered adhesion and overstimulation of host plant immunity. *Mol Plant Microbe Interact* **23,** 1324-34.

Bagnat, M. and Simons, K. (2002). Lipid rafts in protein sorting and cell polarity in budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biol Chem* **383,** 1475-80.

Banks, I. R., Specht, C. A., Donlin, M. J., Gerik, K. J., Levitz, S. M. and Lodge, J. K. (2005). A chitin synthase and its regulator protein are critical for chitosan production and growth of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* **4,** 1902-12.

Barfield, R. M., Fromme, J. C. and Schekman, R. (2009). The exomer coat complex transports Fus1p to the plasma membrane via a novel plasma membrane sorting signal in yeast. *Mol Biol Cell* **20,** 4985-96.

Bartnicki-Garcia, S. (2006). Chitosomes: past, present and future. *FEMS Yeast Res* **6,** 957-65.

Bartnicki-Garcia, S., Bartnicki, D. D., Gierz, G., Lopez-Franco, R. and Bracker, C. E. (1995). Evidence that Spitzenkorper behavior determines the shape of a fungal hypha: a test of the hyphoid model. *Exp Mycol* **19,** 153-9.

Browman, D. T., Resek, M. E., Zajchowski, L. D. and Robbins, S. M. (2006). Erlin-1 and erlin-2 are novel members of the prohibitin family of proteins that define lipid-raft-like domains of the ER. *J Cell Sci* **119,** 3149-60.

Brown, D. A. (1992). Interactions between GPI-anchored proteins and membrane lipids. *Trends Cell Biol* **2,** 338-43.

Bulawa, C. E., Slater, M., Cabib, E., Au-Young, J., Sburlati, A., Adair, W. L., Jr. and Robbins, P. W. (1986). The *S. cerevisiae* structural gene for chitin synthase is not required for chitin synthesis in vivo. *Cell* **46,** 213-25.

Cabib, E. (2009). Two novel techniques for determination of polysaccharide cross-links show that Crh1p and Crh2p attach chitin to both beta(1-6)- and beta(1-3)glucan in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Eukaryot Cell* **8,** 1626-36.

Cabib, E., Sburlati, A., Bowers, B. and Silverman, S. J. (1989). Chitin synthase 1, an auxiliary enzyme for chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **108,** 1665-72.

Cabib, E., Silverman, S. J. and Shaw, J. A. (1992). Chitinase and chitin synthase 1: counterbalancing activities in cell separation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microbiol* **138,** 97-102.

Canovas, D., Boyce, K. J. and Andrianopoulos, A. The fungal type II myosin in *Penicillium marneffei*, MyoB, is essential for chitin deposition at nascent septation sites but not actin localisation. *Eukaryot Cell*.

Cao, W., Maruyama, J., Kitamoto, K., Sumikoshi, K., Terada, T., Nakamura, S. and Shimizu, K. (2009). Using a new GPI-anchored-protein identification system to mine the protein databases of *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans*, and *Aspergillus oryzae*. *J Gen Appl Microbiol* **55,** 381-93.

Carvalho, P., Gupta, M. L., Jr., Hoyt, M. A. and Pellman, D. (2004). Cell cycle control of kinesin-mediated transport of Bik1 (CLIP-170) regulates microtubule stability and dynein activation. *Dev Cell* **6,** 815-29.

Chigira, Y., Abe, K., Gomi, K. and Nakajima, T. (2002). *chsZ*, a gene for a novel class of chitin synthase from *Aspergillus oryzae*. *Curr Genet* **41,** 261-7.

Chitnis, M. V., Munro, C. A., Brown, A. J., Gooday, G. W., Gow, N. A. and Deshpande, M. V. (2002). The zygomycetous fungus, *Benjaminiella poitrasii* contains a large family of differentially regulated chitin synthase genes. *Fungal Genet Biol* **36,** 215-23.

Choquer, M., Boccara, M., Goncalves, I. R., Soulie, M. C. and Vidal-Cros, A. (2004). Survey of the *Botrytis cinerea* chitin synthase multigenic family through the analysis of six euascomycetes genomes. *Eur J Biochem* **271,** 2153-64.

Cui, Z., Ding, Z., Yang, X., Wang, K. and Zhu, T. (2009). Gene disruption and characterization of a class V chitin synthase in *Botrytis cinerea*. *Can J Microbiol* **55,** 1267-74.

de Groot, P. W. J., Brandt, B. W., Horiuchi, H., Ram, A. F. J., de Koster, C. G. and Klis, F. M. (2009). Comprehensive genomic analysis of cell wall genes in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* **46**, S72-S81.

DeMarini, D. J., Adams, A. E., Fares, H., De Virgilio, C., Valle, G., Chuang, J. S. and Pringle, J. R. (1997). A septin-based hierarchy of proteins required for localized deposition of chitin in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *J Cell Biol* **139,** 75-93.

Dunkler, A., Walther, A., Specht, C. A. and Wendland, J. (2005). Candida albicans CHT3 encodes the functional homolog of the Cts1 chitinase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Fungal Genet Biol* **42,** 935-47.

Efimov, V. P., Zhang, J. and Xiang, X. (2006). CLIP-170 homologue and NUDE play overlapping roles in NUDF localization in *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell* **17,** 2021-34.

Enos, A. P. and Morris, N. R. (1990). Mutation of a gene that encodes a kinesin-like protein blocks nuclear division in *A. nidulans*. *Cell* **60,** 1019-27.

Esnault, V. L., Besnier, D., Testa, A., Coville, P., Simon, P., Subra, J. F. and Audrain, M. A. (1999). Effect of protein A immunoadsorption in nephrotic syndrome of various etiologies. *J Am Soc Nephrol* **10,** 2014-7.

Etxebeste, O., Herrero-Garcia, E., Araujo-Bazan, L., Rodriguez-Urra, A. B., Garzia, A., Ugalde, U. and Espeso, E. A. (2009). The bZIP-type transcription factor FlbB regulates distinct morphogenetic stages of colony formation in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **73,**

775-89.

Fischer, R., Zekert, N. and Takeshita, N. (2008). Polarized growth in fungi--interplay between the cytoskeleton, positional markers and membrane domains. *Mol Microbiol* **68,** 813-26.

Fujikawa, T., Kuga, Y., Yano, S., Yoshimi, A., Tachiki, T., Abe, K. and Nishimura, M. (2009). Dynamics of cell wall components of *Magnaporthe grisea* during infectious structure development. *Mol Microbiol* **73,** 553-70.

Fujiwara, M., Horiuchi, H., Ohta, A. and Takagi, M. (1997). A novel fungal gene encoding chitin synthase with a myosin motor-like domain. *Biochem Biophys Res Commun* **236,** 75-8.

Fukuda, K., Yamada, K., Deoka, K., Yamashita, S., Ohta, A. and Horiuchi, H. (2009). Class III chitin synthase ChsB of *Aspergillus nidulans* localizes at the sites of polarized cell wall synthesis and is required for conidial development. *Eukaryot Cell* **8,** 945-56.

Galagan, J. E., Calvo, S. E., Cuomo, C., Ma, L. J., Wortman, J. R., Batzoglou, S., Lee, S. I., Basturkmen, M., Spevak, C. C., Clutterbuck, J., Kapitonov, V., Jurka, J., Scazzocchio, C., Farman, M., Butler, J., Purcell, S., Harris, S., Braus, G. H., Draht, O., Busch, S., D'Enfert, C., Bouchier, C., Goldman, G. H., Bell-Pedersen, D., Griffiths-Jones, S., Doonan, J. H., Yu, J., Vienken, K., Pain, A., Freitag, M., Selker, E. U., Archer, D. B., Penalva, M. A., Oakley, B. R., Momany, M., Tanaka, T., Kumagai, T., Asai, K., Machida, M., Nierman, W. C., Denning, D. W., Caddick, M., Hynes, M., Paoletti, M., Fischer, R., Miller, B., Dyer, P., Sachs, M. S., Osmani, S. A. and Birren, B. W. (2005). Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature* **438,** 1105-15.

Garcera-Teruel, A., Xoconostle-Cazares, B., Rosas-Quijano, R., Ortiz, L., Leon-Ramirez, C., Specht, C. A., Sentandreu, R. and Ruiz-Herrera, J. (2004). Loss of virulence in *Ustilago maydis* by *Umchs6* gene disruption. *Res Microbiol* **155,** 87-97.

Harris, S. D., Morrell, J. L. and Hamer, J. E. (1994). Identification and characterization of *Aspergillus nidulans* mutants defective in cytokinesis. *Genetics* **136,** 517-32.

Hervas-Aguilar, A. and Penalva, M. A. Endocytic machinery protein SlaB is dispensable for polarity establishment but necessary for polarity maintenance in hyphal tip cells of *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* **9,** 1504-18.

Higuchi, Y., Shoji, J. Y., Arioka, M. and Kitamoto, K. (2009). Endocytosis is crucial for cell polarity and apical membrane recycling in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Eukaryot Cell* **8,** 37-46.

Hodge, T. and Cope, M. J. (2000). A myosin family tree. *J Cell Sci* **113 Pt 19,** 3353-4.

Holthuis, J. C., Nichols, B. J. and Pelham, H. R. (1998). The syntaxin Tlg1p mediates trafficking of chitin synthase III to polarized growth sites in yeast. *Mol Biol Cell* **9,** 3383-97.

Horio, T. and Oakley, B. R. (2005). The role of microtubules in rapid hyphal tip growth of

Aspergillus nidulans. *Mol Biol Cell* **16,** 918-26.

Horiuchi, H. (2009). Functional diversity of chitin synthases of *Aspergillus nidulans* in hyphal growth, conidiophore development and septum formation. *Med Mycol* **47 Suppl 1,** S47-52.

Horiuchi, H., Fujiwara, M., Yamashita, S., Ohta, A. and Takagi, M. (1999). 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,** 3721-9.

Horiuchi, H. and Takagi, M. (1999). Chitin Synthase Genes of *Aspergillus* Species in Brakhage, A. A., Jahn, B. and Schmidt, A. (Eds), *Aspergillus fumigatus*, KARGER, pp. 193-204.

Hynes, M. J., Corrick, C. M. and King, J. A. (1983). Isolation of genomic clones containing the *amdS* gene of *Aspergillus nidulans* and their use in the analysis of structural and regulatory mutations. *Mol Cell Biol* **3,** 1430-9.

Ichinomiya, M., Horiuchi, H. and Ohta, A. (2002a). Different functions of the class I and class II chitin synthase genes, *chsC* and *chsA*, are revealed by repression of *chsB* expression in *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet* **42,** 51-8.

Ichinomiya, M., Motoyama, T., Fujiwara, M., Takagi, M., Horiuchi, H. and Ohta, A. (2002b). Repression of *chsB* expression reveals the functional importance of class IV chitin synthase gene *chsD* in hyphal growth and conidiation of *Aspergillus nidulans*. *Microbiology* **148,** 1335-47.

Jimenez, C., Sacristan, C., Roncero, M. I. and Roncero, C. Amino acid divergence between the CHS domain contributes to the different intracellular behaviour of Family II fungal chitin synthases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Fungal Genet Biol* **47,** 1034-43.

Kim, J. E., Lee, H. J., Lee, J., Kim, K. W., Yun, S. H., Shim, W. B. and Lee, Y. W. (2009). *Gibberella zeae* chitin synthase genes, GzCHS5 and GzCHS7, are required for hyphal growth, perithecia formation, and pathogenicity. *Curr Genet* **55,** 449-59.

Kohli, M., Galati, V., Boudier, K., Roberson, R. W. and Philippsen, P. (2008). Growth-speed-correlated localization of exocyst and polarisome components in growth zones of *Ashbya gossypii* hyphal tips. *J Cell Sci* **121,** 3878-89.

Konzack, S., Rischitor, P. E., Enke, C. and Fischer, R. (2005). The role of the kinesin motor KipA in microtubule organization and polarized growth of *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell* **16,** 497-506.

Kota, J. and Ljungdahl, P. O. (2005). Specialized membrane-localized chaperones prevent aggregation of polytopic proteins in the ER. *J Cell Biol* **168,** 79-88.

Latge, J. P. (2007). The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Mol Microbiol* **66,** 279-90.

Lee, S. C., Schmidtke, S. N., Dangott, L. J. and Shaw, B. D. (2008). *Aspergillus nidulans* ArfB plays a role in endocytosis and polarized growth. *Eukaryot Cell* **7,** 1278-88.

Lenardon, M. D., Munro, C. A. and Gow, N. A. Chitin synthesis and fungal pathogenesis. *Curr Opin Microbiol* **13,** 416-23.

Lenardon, M. D., Whitton, R. K., Munro, C. A., Marshall, D. and Gow, N. A. (2007). Individual chitin synthase enzymes synthesize microfibrils of differing structure at specific locations in the *Candida albicans* cell wall. *Mol Microbiol* **66,** 1164-73.

Lesage, G. and Bussey, H. (2006). Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **70,** 317-43.

Li, S., Du, L., Yuen, G. and Harris, S. D. (2006). Distinct ceramide synthases regulate polarized growth in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell* **17,** 1218-27.

Liu, H., Kauffman, S., Becker, J. M. and Szaniszlo, P. J. (2004). *Wangiella* (*Exophiala*) *dermatitidis* WdChs5p, a class V chitin synthase, is essential for sustained cell growth at temperature of infection. *Eukaryot Cell* **3,** 40-51.

Liu, X., Osherov, N., Yamashita, R., Brzeska, H., Korn, E. D. and May, G. S. (2001). Myosin I mutants with only 1% of wild-type actin-activated MgATPase activity retain essential in vivo function(s). *Proc Natl Acad Sci U S A* **98,** 9122-7.

Madrid, M. P., Di Pietro, A. and Roncero, M. I. (2003). Class V chitin synthase determines pathogenesis in the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* and mediates resistance to plant defence compounds. *Mol Microbiol* **47,** 257-66.

Maekawa, H., Usui, T., Knop, M. and Schiebel, E. (2003). Yeast Cdk1 translocates to the plus end of cytoplasmic microtubules to regulate bud cortex interactions. *Embo J* **22,** 438-49.

Mahlert, M., Leveleki, L., Hlubek, A., Sandrock, B. and Bolker, M. (2006). Rac1 and Cdc42 regulate hyphal growth and cytokinesis in the dimorphic fungus *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **59,** 567-78.

Martin-Udiroz, M., Madrid, M. P. and Roncero, M. I. (2004). Role of chitin synthase genes in *Fusarium oxysporum*. *Microbiology* **150,** 3175-87.

Martin-Urdiroz, M., Roncero, M. I., Gonzalez-Reyes, J. A. and Ruiz-Roldan, C. (2008). ChsVb, a Class VII Chitin Synthase Involved in Septation, Is Critical for Pathogenicity in *Fusarium oxysporum*. *Eukaryot Cell* **7,** 112-21.

McGoldrick, C. A., Gruver, C. and May, G. S. (1995). *MyoA* of *Aspergillus nidulans* encodes an essential myosin I required for secretion and polarized growth. *J Cell Biol* **128,** 577-87.

Mellado, E., Aufauvre-Brown, A., Gow, N. A. and Holden, D. W. (1996). The *Aspergillus fumigatus chsC* and *chsG* genes encode class III chitin synthases with different functions. *Mol Microbiol* **20,** 667-79.

Mellado, E., Dubreucq, G., Mol, P., Sarfati, J., Paris, S., Diaquin, M., Holden, D. W.,

Rodriguez-Tudela, J. L. and Latge, J. P. (2003). Cell wall biogenesis in a double chitin synthase mutant (chsG-/chsE-) of *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genet Biol* **38,** 98-109.

Mifsud, W. and Bateman, A. (2002). Membrane-bound progesterone receptors contain a cytochrome *b5*-like ligand-binding domain. *Genome Biol* **3,** RESEARCH0068.

Miyazaki, A. and Ootaki, T. (1997). Multiple genes for chitin synthase in the zygomycete fungus *Phycomyces blakesleeanus*. *J Gen Appl Microbiol* **43,** 333-340.

Motoyama, T., Fujiwara, M., Kojima, N., Horiuchi, H., Ohta, A. and Takagi, M. (1996). The *Aspergillus nidulans* genes *chsA* and *chsD* encode chitin synthases which have redundant functions in conidia formation. *Mol Gen Genet* **251,** 442-50.

Motoyama, T., Kojima, N., Horiuchi, H., Ohta, A. and Takagi, M. (1994). Isolation of a chitin synthase gene (*chsC*) of *Aspergillus nidulans*. *Biosci Biotechnol Biochem* **58,** 2254-7.

Mouyna, I., Fontaine, T., Vai, M., Monod, M., Fonzi, W. A., Diaquin, M., Popolo, L., Hartland, R. P. and Latge, J. P. (2000). Glycosylphosphatidylinositol-anchored glucanosyltransferases play an active role in the biosynthesis of the fungal cell wall. *J Biol Chem* **275,** 14882-9.

Muller, C., Hjort, C. M., Hansen, K. and Nielsen, J. (2002a). Altering the expression of two chitin synthase genes differentially affects the growth and morphology of *Aspergillus oryzae*. *Microbiology* **148,** 4025-33.

Muller, C., McIntyre, M., Hansen, K. and Nielsen, J. (2002b). Metabolic engineering of the morphology of *Aspergillus oryzae* by altering chitin synthesis. *Appl Environ Microbiol* **68,** 1827-36.

Nagahashi, S., Sudoh, M., Ono, N., Sawada, R., Yamaguchi, E., Uchida, Y., Mio, T., Takagi, M., Arisawa, M. and Yamada-Okabe, H. (1995). Characterization of chitin synthase 2 of *Saccharomyces cerevisiae*. Implication of two highly conserved domains as possible catalytic sites. *J Biol Chem* **270,** 13961-7.

Nayak, T., Szewczyk, E., Oakley, C. E., Osmani, A., Ukil, L., Murray, S. L., Hynes, M. J., Osmani, S. A. and Oakley, B. R. (2006). A versatile and efficient gene-targeting system for *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **172,** 1557-66.

Nelson, W. J. (2003). Adaptation of core mechanisms to generate cell polarity. *Nature* **422,** 766-74.

Netea, M. G., Brown, G. D., Kullberg, B. J. and Gow, N. A. (2008). An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nat Rev Microbiol* **6,** 67-78.

Nino-Vega, G. A., Carrero, L. and San-Blas, G. (2004). Isolation of the *CHS4* gene of *Paracoccidioides brasiliensis* and its accommodation in a new class of chitin synthases. *Med Mycol* **42,** 51-7.

O'Connell, J. E., Jardine, A. G., Davies, D. L., McQueen, J. and Connell, J. M. (1993). Renal and

hormonal effects of chronic inhibition of neutral endopeptidase (EC 3.4.24.11) in normal man. *Clin Sci (Lond)* **85,** 19-26.

Oakley, C. E., Weil, C. F., Kretz, P. L. and Oakley, B. R. (1987). Cloning of the *riboB* locus of *Aspergillus nidulans*. *Gene* **53,** 293-8.

Orlean, P. (1997). Biogenesis of Yeast Wall and Surface Components in Pringle, J. R., Broach, J. R. and Jones, E. W. (Eds), *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces cerevisiae: cell cycle and cell biology*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Ortiz, D. and Novick, P. J. (2006). Ypt32p regulates the translocation of Chs3p from an internal pool to the plasma membrane. *Eur J Cell Biol* **85,** 107-16.

Pearson, C. L., Xu, K., Sharpless, K. E. and Harris, S. D. (2004). MesA, a novel fungal protein required for the stabilization of polarity axes in *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell* **15,** 3658-72.

Penalva, M. A. Endocytosis in filamentous fungi: Cinderella gets her reward. *Curr Opin Microbiol* **13,** 684-92.

Pruyne, D., Legesse-Miller, A., Gao, L., Dong, Y. and Bretscher, A. (2004). Mechanisms of polarized growth and organelle segregation in yeast. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20,** 559-91.

Rajendran, L. and Simons, K. (2005). Lipid rafts and membrane dynamics. *J Cell Sci* **118,** 1099-102.

Rappleye, C. A., Eissenberg, L. G. and Goldman, W. E. (2007). *Histoplasma capsulatum* alpha-(1,3)-glucan blocks innate immune recognition by the beta-glucan receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104,** 1366-70.

Reissig, J. L., Strominger, J. L. and Leloir, L. F. (1955). A modified colorimetric method for the estimation of *N*-acetylamino sugars. *J Biol Chem* **217,** 959-66.

Requena, N., Alberti-Segui, C., Winzenburg, E., Horn, C., Schliwa, M., Philippsen, P., Liese, R. and Fischer, R. (2001). Genetic evidence for a microtubule-destabilizing effect of conventional kinesin and analysis of its consequences for the control of nuclear distribution in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **42,** 121-32.

Riquelme, M., Bartnicki-Garcia, S., Gonzalez-Prieto, J. M., Sanchez-Leon, E., Verdin-Ramos, J. A., Beltran-Aguilar, A. and Freitag, M. (2007). Spitzenkorper localization and intracellular traffic of green fluorescent protein-labeled CHS-3 and CHS-6 chitin synthases in living hyphae of *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell* **6,** 1853-64.

Riquelme, M. and Bartnicki-Garcia, S. (2008). Advances in understanding hyphal morphogenesis: Ontogeny, phylogeny and cellular localization of chitin synthases. *Fungal Biol Rev* **22**, 56-70.

Roh, D. H., Bowers, B., Schmidt, M. and Cabib, E. (2002). The septation apparatus, an

autonomous system in budding yeast. *Mol Biol Cell* **13,** 2747-59.

Rolli, E., Ragni, E., Calderon, J., Porello, S., Fascio, U. and Popolo, L. (2009). Immobilization of the glycosylphosphatidylinositol-anchored Gas1 protein into the chitin ring and septum is required for proper morphogenesis in yeast. *Mol Biol Cell* **20,** 4856-70.

Roncero, C. (2002). The genetic complexity of chitin synthesis in fungi. *Curr Genet* **41,** 367-78.

Ross, J. L., Ali, M. Y. and Warshaw, D. M. (2008). Cargo transport: molecular motors navigate a complex cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* **20,** 41-7.

Rowlands, R. T. and Turner, G. (1973). Nuclear and extranuclear inheritance of oligomycin resistance in *Aspergillus nidulans*. *Mol Gen Genet* **126,** 201-16.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: a laboratory manual, 2nd ed.* Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sanchatjate, S. and Schekman, R. (2006). Chs5/6 complex: a multiprotein complex that interacts with and conveys chitin synthase III from the trans-Golgi network to the cell surface. *Mol Biol Cell* **17,** 4157-66.

Santos, B. and Snyder, M. (1997). Targeting of chitin synthase 3 to polarized growth sites in yeast requires Chs5p and Myo2p. *J Cell Biol* **136,** 95-110.

Schmidt, M., Bowers, B., Varma, A., Roh, D. H. and Cabib, E. (2002). In budding yeast, contraction of the actomyosin ring and formation of the primary septum at cytokinesis depend on each other. *J Cell Sci* **115,** 293-302.

Schoch, C. L., Aist, J. R., Yoder, O. C. and Gillian Turgeon, B. (2003). A complete inventory of fungal kinesins in representative filamentous ascomycetes. *Fungal Genet Biol* **39,** 1-15.

Schuchardt, I., Assmann, D., Thines, E., Schuberth, C. and Steinberg, G. (2005). Myosin-V, Kinesin-1, and Kinesin-3 cooperate in hyphal growth of the fungus *Ustilago maydis*. *Mol Biol Cell* **16,** 5191-201.

Sharpless, K. E. and Harris, S. D. (2002). Functional characterization and localization of the *Aspergillus nidulans* formin SEPA. *Mol Biol Cell* **13,** 469-79.

Shaw, J. A., Mol, P. C., Bowers, B., Silverman, S. J., Valdivieso, M. H., Duran, A. and Cabib, E. (1991). The function of chitin synthases 2 and 3 in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *J Cell Biol* **114,** 111-23.

Sheeman, B., Carvalho, P., Sagot, I., Geiser, J., Kho, D., Hoyt, M. A. and Pellman, D. (2003). Determinants of *S. cerevisiae* dynein localization and activation: implications for the mechanism of spindle positioning. *Curr Biol* **13,** 364-72.

Simons, K. and van Meer, G. (1988). Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry* **27,** 6197-202.

Sosinska, G. J., de Groot, P. W., Teixeira de Mattos, M. J., Dekker, H. L., de Koster, C. G., Hellingwerf, K. J. and Klis, F. M. (2008). Hypoxic conditions and iron restriction affect the cell-wall proteome of *Candida albicans* grown under vagina-simulative conditions.

Microbiology **154,** 510-20.

Soulie, M. C., Perino, C., Piffeteau, A., Choquer, M., Malfatti, P., Cimerman, A., Kunz, C., Boccara, M. and Vidal-Cros, A. (2006). *Botrytis cinerea* virulence is drastically reduced after disruption of chitin synthase class III gene (*Bcchs3a*). *Cell Microbiol* **8,** 1310-21.

Specht, C. A., Liu, Y., Robbins, P. W., Bulawa, C. E., Iartchouk, N., Winter, K. R., Riggle, P. J., Rhodes, J. C., Dodge, C. L., Culp, D. W. and Borgia, P. T. (1996). The *chsD* and *chsE* genes of *Aspergillus nidulans* and their roles in chitin synthesis. *Fungal Genet Biol* **20,** 153-67.

Steinberg, G. (2007). Hyphal growth: a tale of motors, lipids, and the Spitzenkorper. *Eukaryot Cell* **6,** 351-60.

Steinberg, G. and Perez-Martin, J. (2007). *Ustilago maydis*, a new fungal model system for cell biology. *Trends in Cell Biol* **18**, 61-67.

Sudbery, P. E. (2008). Regulation of polarised growth in fungi. *Fungal Biol Rev* **22**, 44-55.

Suzuki, M., Sakuda, S. and Nagasawa, H. (2007). Identification of chitin in the prismatic layer of the shell and a chitin synthase gene from the Japanese pearl oyster, *Pinctada fucata*. *Biosci Biotechnol Biochem* **71,** 1735-44.

Taheri-Talesh, N., Horio, T., Araujo-Bazan, L., Dou, X., Espeso, E. A., Penalva, M. A., Osmani, S. A. and Oakley, B. R. (2008). The tip growth apparatus of *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell* **19,** 1439-49.

Takeshita, N., Higashitsuji, Y., Konzack, S. and Fischer, R. (2008). Apical sterol-rich membranes are essential for localizing cell end markers that determine growth directionality in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell* **19,** 339-51.

Takeshita, N., Ohta, A. and Horiuchi, H. (2002). *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,** 103-9.

Takeshita, N., Ohta, A. and Horiuchi, H. (2005). 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**, 1961-70

Takeshita, N., Yamashita, S., Ohta, A. and Horiuchi, H. (2006). *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,** 1380-94.

Tatsuno, K., Yamada-Okabe, H., Takagi, M., Arisawa, M. and Sudoh, M. (1997). Properties of yeast expressed *Aspergillus nidulans* chitin synthase B which is essential for hyphal growth. *FEMS Microbiol Lett* **149,** 279-84.

Todd, R. B., Davis, M. A. and Hynes, M. J. (2007). Genetic manipulation of *Aspergillus nidulans*: meiotic progeny for genetic analysis and strain construction. *Nat Protoc* **2,** 811-21.

Trautwein, M., Schindler, C., Gauss, R., Dengjel, J., Hartmann, E. and Spang, A. (2006). Arf1p, Chs5p and the ChAPs are required for export of specialized cargo from the Golgi. *Embo J* **25,** 943-54.

Treitschke, S., Doehlemann, G., Schuster, M. and Steinberg, G. The myosin motor domain of fungal chitin synthase V is dispensable for vesicle motility but required for virulence of the maize pathogen *Ustilago maydis*. *Plant Cell* **22,** 2476-94.

Trilla, J. A., Duran, A. and Roncero, C. (1999). Chs7p, a new protein involved in the control of protein export from the endoplasmic reticulum that is specifically engaged in the regulation of chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **145,** 1153-63.

Tsuizaki, M., Takeshita, N., Ohta, A. and Horiuchi, H. (2009). Myosin motor-like domain of the class VI chitin synthase CsmB is essential to its functions in *Aspergillus nidulans*. *Biosci Biotechnol Biochem* **73,** 1163-7.

Upadhyay, S. and Shaw, B. D. (2008). The role of actin, fimbrin and endocytosis in growth of hyphae in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **68,** 690-705.

Valdivia, R. H., Baggott, D., Chuang, J. S. and Schekman, R. W. (2002). The yeast clathrin adaptor protein complex 1 is required for the efficient retention of a subset of late Golgi membrane proteins. *Dev Cell* **2,** 283-94.

Valdivia, R. H. and Schekman, R. (2003). The yeasts Rho1p and Pkc1p regulate the transport of chitin synthase III (Chs3p) from internal stores to the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100,** 10287-92.

Verdin, J., Bartnicki-Garcia, S. and Riquelme, M. (2009). Functional stratification of the Spitzenkorper of *Neurospora crassa*. *Mol Microbiol* **74,** 1044-53.

Virag, A. and Harris, S. D. (2006). The Spitzenkorper: a molecular perspective. *Mycol Res* **110,** 4-13.

Virag, A., Lee, M. P., Si, H. and Harris, S. D. (2007). Regulation of hyphal morphogenesis by *cdc42* and *rac1* homologues in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **66,** 1579-96.

Wang, C. W., Hamamoto, S., Orci, L. and Schekman, R. (2006). Exomer: A coat complex for transport of select membrane proteins from the trans-Golgi network to the plasma membrane in yeast. *J Cell Biol* **174,** 973-83.

Wang, Z. and Szaniszlo, P. J. (2000). WdCHS3, a gene that encodes a class III chitin synthase in *Wangiella* (*Exophiala*) *dermatitidis*, is expressed differentially under stress conditions. *J Bacteriol* **182,** 874-81.

Wang, Z. and Szaniszlo, P. J. (2002). Characterization of WdChs3p, a class III chitin synthase, of *Wangiella* (*Exophiala*) *dermatitidis*, overexpressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Med*

Mycol **40,** 283-9.

Wang, Z., Zheng, L., Liu, H., Wang, Q., Hauser, M., Kauffman, S., Becker, J. M. and Szaniszlo, P. J. (2001). WdChs2p, a class I chitin synthase, together with WdChs3p (class III) contributes to virulence in *Wangiella* (*Exophiala*) *dermatitidis*. *Infect Immun* **69,** 7517-26.

Weber, I., Assmann, D., Thines, E. and Steinberg, G. (2006). Polar localizing class V myosin chitin synthases are essential during early plant infection in the plant pathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Plant Cell* **18,** 225-42.

Weber, I., Gruber, C. and Steinberg, G. (2003). A class-V myosin required for mating, hyphal growth, and pathogenicity in the dimorphic plant pathogen *Ustilago maydis*. *Plant Cell* **15,** 2826-42.

Werner, S., Sugui, J. A., Steinberg, G. and Deising, H. B. (2007). A chitin synthase with a myosin-like motor domain is essential for hyphal growth, appressorium differentiation, and pathogenicity of the maize anthracnose fungus *Colletotrichum graminicola*. *Mol Plant Microbe Interact* **20,** 1555-67.

Westfall, P. J. and Momany, M. (2002). *Aspergillus nidulans* septin AspB plays pre- and postmitotic roles in septum, branch, and conidiophore development. *Mol Biol Cell* **13,** 110-8.

Wise-Draper, T. M., Allen, H. V., Thobe, M. N., Jones, E. E., Habash, K. B., Munger, K. and Wells, S. I. (2005). The human DEK proto-oncogene is a senescence inhibitor and an upregulated target of high-risk human papillomavirus E7. *J Virol* **79,** 14309-17.

Xiang, X., Roghi, C. and Morris, N. R. (1995). Characterization and localization of the cytoplasmic dynein heavy chain in *Aspergillus nidulans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92,** 9890-4.

Yamada, E., Ichinomiya, M., Ohta, A. and Horiuchi, H. (2005). The class V chitin synthase gene *csmA* is crucial for the growth of the *chsA chsC* double mutant in *Aspergillus nidulans*. *Biosci Biotechnol Biochem* **69,** 87-97.

Yamashita, R. A., Osherov, N. and May, G. S. (2000). Localization of wild type and mutant class I myosin proteins in *Aspergillus nidulans* using GFP-fusion proteins. *Cell Motil Cytoskeleton* **45,** 163-72.

Yamazaki, H., Tanaka, A., Kaneko, J., Ohta, A. and Horiuchi, H. (2008). *Aspergillus nidulans* ChiA is a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored chitinase specifically localized at polarized growth sites. *Fungal Genet Biol* **45,** 963-72.

Yanai, K., Kojima, N., Takaya, N., Horiuchi, H., Ohta, A. and Takagi, M. (1994). Isolation and characterization of two chitin synthase genes from *Aspergillus nidulans*. *Biosci Biotechnol Biochem* **58,** 1828-35.

Yarden, O. and Yanofsky, C. (1991). Chitin synthase 1 plays a major role in cell wall biogenesis

in *Neurospora crassa*. *Genes Dev* **5,** 2420-30.

Yu, J. H., Hamari, Z., Han, K. H., Seo, J. A., Reyes-Dominguez, Y. and Scazzocchio, C. (2004). Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genet Biol* **41,** 973-81.

Zekert, N. and Fischer, R. (2009). The *Aspergillus nidulans* kinesin-3 UncA motor moves vesicles along a subpopulation of microtubules. *Mol Biol Cell* **20,** 673-84.

Zhang, G., Kashimshetty, R., Ng, K. E., Tan, H. B. and Yeong, F. M. (2006). Exit from mitosis triggers Chs2p transport from the endoplasmic reticulum to mother-daughter neck via the secretory pathway in budding yeast. *J Cell Biol* **174,** 207-20.

Zhang, J., Li, S., Fischer, R. and Xiang, X. (2003). Accumulation of cytoplasmic dynein and dynactin at microtubule plus ends in *Aspergillus nidulans* is kinesin dependent. *Mol Biol Cell* **14,** 1479-88.

Ziman, M., Chuang, J. S. and Schekman, R. W. (1996). Chs1p and Chs3p, two proteins involved in chitin synthesis, populate a compartment of the *Saccharomyces cerevisiae* endocytic pathway. *Mol Biol Cell* **7,** 1909-19.

Ziman, M., Chuang, J. S., Tsung, M., Hamamoto, S. and Schekman, R. (1998). Chs6p-dependent anterograde transport of Chs3p from the chitosome to the plasma membrane in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **9,** 1565-76.

謝辞

本研究を行なう場を与えてくださり、日々研究を進める上で多大なご指導、ご鞭撻を賜りました東京大学大学院農学生命科学研究科　太田明徳　教授に厚く御礼申し上げます。また当研究室の糸状菌研究グループにおいて、本研究の全てに携わり、日々ご指導ご鞭撻頂き、本論文の校閲にもご尽力頂きました東京大学大学院農学生命科学研究科　堀内裕之　准教授に厚く御礼申し上げます。また日々ご指導ご鞭撻頂き、研究に関する貴重なご助言を頂きました東京大学大学院農学生命科学研究科　福田良一　助教に厚く御礼申し上げます。三人の先生方からは研究に関するご指導、ご助言を頂いただけでなく、サイエンスに取り組む姿勢や研究者としての倫理など多くのことを勉強させて頂きましたことに深く感謝致します。

卒業研究時、実験の基礎、研究に取り組む姿勢、研究室における生活の全てに至るまでご指導頂きましたドイツ Karlsruhe 大学博士研究員　竹下典男氏に御礼申し上げます。株及びプラスミドをご分与頂きましたドイツ Karlsruhe 大学竹下典男博士、Nadine Zekert 氏、Reinhard Fischer 教授に御礼申し上げます。急速凍結割断法による免疫電子顕微鏡観察の手法についてご指導くださいました東京大学大学院農学生命科学研究科　木村聡　助教に御礼申し上げます。

最後になりますが、日々研究を進める上で貴重な意見を頂きました細胞遺伝学研究室の先輩、同期、後輩の皆様にこの場を借りて御礼申し上げます。

平成 22 年 12 月 20 日

論 文 の 内 容 の 要 旨

応用生命工学専攻
平成 20 年度博士課程進学
氏　　名　對崎　真楠
指導教員名　太田　明徳

論文題目　　糸状菌 *Aspergillus nidulans* の菌糸先端生長における
キチン合成酵素の機能と動態に関する研究

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り、先端生長はあらゆる生物の細胞において普遍的に見られる現象である。糸状菌の細胞表層は細胞壁によって覆われており、キチンは糸状菌細胞壁の主要構成成分の一種である。糸状菌においてキチンの生合成は菌糸型の形態形成に必須であり、糸状菌のモデル生物である *Aspergillus nidulans* において、キチンの生合成を担うキチン合成酵素は 7 つのクラスに分類される 8 個が存在する。これらのキチン合成酵素のうち、クラス III に属する ChsB、クラス V に属する CsmA、クラス VI に属する CsmB をコードする遺伝子の破壊株は生育遅延や顕著な表現型の異常を示す。またこれらのキチン合成酵素は膜タンパク質であり、菌糸先端及び隔壁形成部位に局在し、菌糸先端生長並びに隔壁形成において重要な役割を果たしていると考えられる。クラス V 及び VI に属する CsmA と CsmB はタンパク質の N 末端側にアクチン細胞骨格上を移動す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 (myosin motor-like domain: MMD) を有する。クラス III、V、VI に属

するキチン合成酵素をコードする遺伝子は菌糸型の形態をとり得る真菌類のゲノム中にのみ存在し、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae*、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe*、二形性酵母 *Candida albicans* 等のゲノム中には存在しないことから、菌糸型の形態形成に重要であると考えられる。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。そこで本研究では、ChsB、CsmA、CsmB の菌糸先端生長における機能と、その局在化機構に関する解析を行なった。

1　CsmB の機能における MMD の役割及び CsmA とのドメイン互換性

CsmA の MMD はアクチンと相互作用し、CsmA の正常な局在化と機能に必要であることが示唆されている。本研究では CsmB についてもその機能における MMD の役割について検討した。CsmB の MMD 欠失株は *csmB* の全長破壊株と同様の表現型異常を示し、MMD 欠失型 CsmB は菌糸先端及び隔壁形成部位に局在が観察されなかった。また *in vivo* において野生型 CsmB はアクチンとの相互作用が確認されたが、MMD 欠失型 CsmB はアクチンとの相互作用が見られなかった。これらの結果から、CsmB の正常な局在化と機能には MMD とアクチンとの相互作用が必要であることが示唆された。

また、CsmA と CsmB のドメインの互換性について検討するため、*csmA* 破壊株あるいは *csmB* 破壊株において、CsmA 及び CsmB の MMD と酵素の活性部位を含む CSD (chitin synthase domain) を相互に交換した融合タンパク質を野生型 CsmA あるいは CsmB の代わりに生産する株を作製し、*csmA* あるいは *csmB* の破壊による生育遅延や表現型の異常を抑圧できるか解析した。その結果、CsmA の MMD は CsmB の MMD により機能の一部を代替できるが完全には代替できないこと、CsmB の MMD は CsmA の MMD により機能を代替できること、両者の CSD は相互に機能を代替できないことが示唆された。また、CsmA と CsmB は界面活性剤による膜の可溶化条件に差が見られ、CsmB の方が可溶化され易く、その差異は両者の MMD に依存しないことが示された。

2　CsmA の菌糸内局在化機構

CsmA は間接蛍光抗体法による観察により、菌糸先端及び隔壁形成部位における局在が観察され、細胞骨格形成阻害剤による局在変化の観察から正常な局在化に微小管及びアクチンが必要であることが示唆されていたが、その

局在化機構の詳細は不明であった。そこで本研究では CsmA の局在化における微小管及び微小管上を移動するモータータンパク質であるキネシンの機能、及び MMD の役割について解析した。

生細胞における CsmA の局在観察の結果、CsmA は菌糸先端を含む形質膜上及び形成中の隔壁部位に局在が観察され、一部菌糸内においてもエンドソームにおける局在が観察された。また微小管重合阻害剤による処理やキネシン *kinA* あるいは *kipA* 遺伝子の破壊により、菌糸先端付近において CsmA のドット状の局在や細胞質に拡散した局在等の異常が観察された。一方、*kinA* あるいは *kipA* 破壊株において隔壁形成部位における CsmA の局在には顕著な異常は観察されなかった。微小管に沿ってフィラメント状の局在を示す変異型 $KinA^{rigor}$ または $KipA^{rigor}$ と CsmA の局在部位を同一の株において比較した結果、菌糸先端から後方において CsmA とこれらの変異型キネシンとのフィラメント状の共局在が観察された。更に、$KinA^{rigor}$ 及び $KipA^{rigor}$ は CsmA と *in vivo* において相互作用することが示された。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。次にこの微小管上の輸送における MMD の役割について検討した。MMD 欠失型 CsmA (ΔMA) 及びアクチンとの結合能の欠失した CsmA (D10A) の局在観察の結果、菌糸先端から後方において $KinA^{rigor}$ のフィラメント状の局在との共局在が観察された。また、ΔMA 及び D10A と $KinA^{rigor}$ との *in vivo* における相互作用が示された。これらの結果から、菌糸先端付近へ向かう微小管上の CsmA の輸送には MMD が不要であることが示唆された。

3　CsmA と ChsB の菌糸内局在化機構の比較

ChsB は菌糸の生長に必須の機能を持ち、菌糸先端及び隔壁形成部位における局在が観察されている。ChsB は特に菌糸の最先端部において局在が観察され、先端生長において極性的なキチン合成に関わる可能性が考えられている。しかし ChsB についても CsmA と同様その局在化機構の詳細は不明であった。そこで ChsB の菌糸内局在化における微小管及びキネシンの役割について解析し、CsmA の局在化機構との比較を行なった。

ChsB は微小管重合阻害剤による処理や *kinA* あるいは *kipA* の破壊により菌糸先端における局在異常が観察され、菌糸先端から後方において $KinA^{rigor}$ あるいは $KipA^{rigor}$ とのフィラメント状の共局在が観察された。一方、*kinA* あるいは *kipA* 破壊株において隔壁形成部位における ChsB の局在に顕著な異常は観察されなかった。また、ChsB と $KinA^{rigor}$ あるいは $KipA^{rigor}$ との *in vivo* にお

ける相互作用が示された。これらの結果から、ChsB は 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、菌糸先端及び隔壁形成部位において一部共局在が観察されたが、菌糸先端において 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が一部観察された。隔壁形成部位においても両者の局在は隔壁形成の異なる時期に一部観察された。生化学的な解析により、両者は近接した膜画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。また、*csmA* 破壊株において ChsB の顕著な局在異常は観察されなかった。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それぞれ独立に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。

総括

糸状菌の菌糸型の形態形成は菌糸先端における極性的な生長によって支持されており、菌糸先端の形質膜上において機能するキチン合成酵素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。本研究における解析から、少なくとも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、菌糸先端の形質膜上の一部異なる領域に局在化し、先端生長に寄与することが示唆された。キチン合成酵素は菌糸先端や隔壁形成部位において局在部位及び局在時期が異なることにより、時間的、空間的に異なる段階でこれらの部位におけるキチンの生合成に機能する可能性が考えられる。今後これらのキチン合成酵素と相互作用するタンパク質や輸送に関わるキネシン以外の因子等を明らかにし、その機能的相関を解析することにより、キチン合成酵素による菌糸の極性的な先端生長と細胞壁形成のメカニズムがより明確に示されると期待される。