一般財団法人杉山産業化学研究所 2020 年度研究助成

研究課題:

糸状菌 Aspergillus nidulans における Sec14 ファミリータンパク質による局所的リン脂質バランス維持機構の解析

東京大学 大学院農学生命科学研究科 応用生命工学専攻 岩間亮

研究概要

生体膜は細胞やオルガネラを区画化するものであり、主にリン脂質二重層により構成されている。近年、糸状の細胞を持つ糸状菌の生体膜制御は、モデル生物として精力的に研究されてきた出芽酵母と大きく異なることが報告されている。また、生体膜の局所的な制御に、リン脂質を輸送するタンパク質の重要性が示唆されているが、糸状菌における研究はほとんど進んでいない。本研究では、リン脂質輸送機能を持つタンパク質群の1つとして、Sec14ファミリータンパク質に着目し、モデル糸状菌 A. nidulans における機能を解析することを目的とした。

研究成果

各 Sec14 ファミリータンパク質遺伝子破壊株の 表現型

A. nidulans のゲノム中には Sec14 のオルソログを含め 9種の Sec14 ファミリータンパク質をコードする遺伝子が存在しており、これらをsfhA ~ sfhI と命名した(図 1)。これらの単独破壊株を作製し、完全培地あるいは最少培地における生育を確認したところ、ΔsfhA 株のみが顕著な生育悪化を示した。しかしながら、菌糸先端の細胞形態を観察したところ、いずれの破壊株においても菌糸先端付近が波打つような構造を取るか、菌糸先端の分岐が多くなっている傾向が観察された。以上の結果から、S. cerevisiaeの SEC14/SFHI オルソログにあたる sfhA は A. nidulans においても重要な細胞機能を持つことが示された。また、その他の Sec14 ファミリー

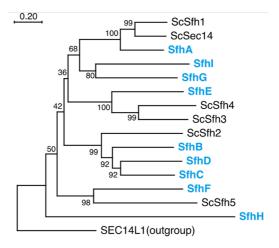


図 1. Sec14 ファミリータンパク質の

系統樹 S. cerevisiae の Sec14 ファミリータンパク質 (ScSfh1、ScSfh2、ScSfh3、ScSfh4、ScSfh5)と A. nidulans の推定 Sec14 ファミリータンパク質、外群としてヒト SEC14L1 を使用した。

タンパク質遺伝子についても、生育に必須ではないものの何らかの機能を果たしていること が示唆された。

各 Sec14 ファミリータンパク質遺伝子破壊株の分生子の性質

次に、各破壊株の分生子発芽率の低 温(4°C)保管時における経時的な変化 を測定した。分生子取得直後では、 ΔsfhA 株は極めて低い発芽率であった のに対して、その他の破壊株は野生型 株と顕著な差は見られなかった。一方 で、AsfhE 株とAsfhG 株は 31 日経過後 の発芽率が大幅に低下し、ΔsfhF 株と ΔsfhI 株は 62 日経過後の発芽率が大幅 に低下した。長期保存時に、発芽率が低 下した $\Delta sfhE$ 株と $\Delta sfhG$ 株に着目し、分 生子内部を電子顕微鏡により観察した ところ、ΔsfhE 株の分生子は野生型株よ りミトコンドリアの数が多い傾向が観 察され、ΔsfhE 株とΔsfhG 株の分生子は 細胞核周辺に電子密度の高い構造が多 数存在していた(図2)。これらの破壊 株では、何らかのストレスを受けてお り、野生型株と比較して発芽率が有意 に低下すると考えられる。

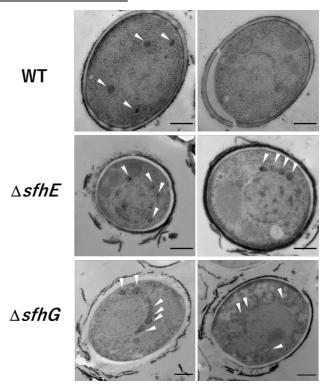


図 2. $\Delta sfhE$ 株と $\Delta sfhG$ 株の分生子の電子顕微鏡観察像 4° C で 31 日間保存した $\Delta sfhE$ 株と $\Delta sfhG$ 株の分生子を透過型電子顕微鏡により観察した。矢頭は細胞核周辺に存在する電子密度の高い構造を示す。Bars: 500 nm

SfhA と SfhE の局在観察の試み

遺伝子の破壊により生育や分生子形成効率に最も重篤な影響を与える sfhA に着目し、その産物である SfhA の局在を観察することを試みた。しかしながら、sfhA 破壊株において、SfhA の C 末端に mNeonGreen を付加したタンパク質を発現させたところ、 $\Delta sfhA$ 株ほどではないが野生型株と比較して生育が悪化しており、SfhA-mNeonGreen は SfhA の一部の機能を失っていることが示唆された。SfhA-mNeonGreen は液胞と思われる部分に強い蛍光が観察され、かなりの部分が分解されていると予想された。一方で、N 末端に付加したmNeonGreen-SfhA は正常に機能すると示唆されたが、mNeonGreen-SfhA のシグナルが弱く、野生型株における自家蛍光との明確な差が観察できなかった。