

一般財団法人杉山産業化学研究所 2021 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

生体膜は細胞や真核細胞の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る。近年、糸状の細胞を形成する真核微生物である糸状菌の生体膜制御は、モデル生物である出芽酵母と大きく異なることが報告されてきた。本研究では、モデル糸状菌 *A. nidulans* におけるリン脂質輸送による生体膜制御機構に着目し、モデル酵母とその他の生物で重要性が異なることが報告されてきている Sec14 ファミリータンパク質に着目した。

研究成果

各 Sec14 ファミリータンパク質遺伝子欠失株の様々なストレスに対する耐性

A. nidulans のゲノム中に存在する 9 種の Sec14 ファミリータンパク質をコードする遺伝子 *sfhA* ~ *sfhI* の各欠失株を作製し、これまでに、 $\Delta sfhA$ 株のみが顕著な生育悪化を示すことが分かっていた。今回、これらの株を様々なストレス存在下 (1.0 M KCl, 1.0 M NaCl, 1.2 M Sorbitol, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Congo Red, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Calcofluor white) で培養したところ、新たに $\Delta sfhB$ 株が Congo Red と Calcofluor white に一定の耐性を示すことが明らかとなった。

sfhA 欠失株の表現型の詳細な解析

[A] 主要リン脂質組成の網羅的解析

顕著な生育悪化を示す $\Delta sfhA$ 株において、主要リン脂質である PC、PE、PI、PS の組成を網羅的に解析した。各リン脂質の構成比率を算出したところ、 $\Delta sfhA$ 株は野生型株と比較して有意に PE が減少し、PI が増加していることが示された。主要リン脂質の新規合成経路において、PS と PI は CDP-DAG から合成され、PS はさらに PE、PC へと順に変換される。上記の結果から、 $\Delta sfhA$ 株では PS から PE への変換が阻害され、PS が過剰に蓄積しないように PI の方へと合成が進んでいる可能性が考えられる。

[B] 異常な分生子形成器官の観察

$\Delta sfhA$ 株は無性孢子である分生子の形成効率が極めて低かった。そこで、走査型電子顕微

鏡を用いた観察したところ、分生子形成器官が極めて異常な形態となっていることが示された (図1)。しかしながら、低温で培養すると、分生子形成数がやや回復する可能性があることが示された。

Wild-type $\Delta sfhA$

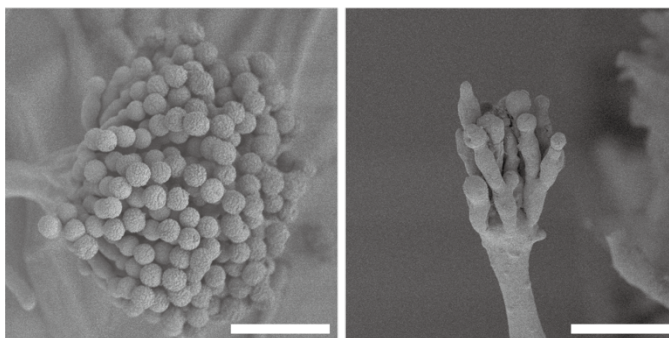


図1. $\Delta sfhA$ 株の分生子形成器官 37°C で3日間培養した野生型株と $\Delta sfhA$ 株の分生子形成器官を走査型電子顕微鏡で観察した。Bars: 10 μ m

[C] SfhA の機能を欠損させない電子顕微鏡用タグの導入と電子顕微鏡観察

SfhA の局在解析を試みたこれまでの解析から、SfhA のC末端に蛍

光タンパク質を導入すると SfhA の機能が失われることが示されていた。さらに、N末端に蛍光タンパク質を導入した場合には、SfhA が正常に機能することが示唆されていたが、蛍光シグナルが非常に弱い問題があった。今回、電子顕微鏡観察用のタグとして使用できると報告されている MTn をC末端に導入したところ、融合 SfhA は機能することが示唆された。この株を用いて、透過型電子顕微鏡観察を行ったところ、細胞内にシグナルが観察されることが示されたが、MTn タグを使用に至るまでの前処理条件が複雑になり、明瞭な細胞内構造と同時に観察する段階までに至っていない。

その他の *sfh* 欠失株の分生子内のリン脂質解析

これまでの解析から、 $\Delta sfhA$ 株の分生子はほとんど発芽しないこと、 $\Delta sfhE$ 株と $\Delta sfhG$ 株の分生子は低温での長期保存で発芽率が顕著に低下することが示されていた。そこで、分生子形成数が著しく低い $\Delta sfhA$ 株を除いた、各 *sfh* 欠失株の分生子の主要リン脂質の網羅的解析を行った。低温での発芽率維持に影響が出ることから、リン脂質を構成するアシル鎖に着目した (図2)。 $\Delta sfhG$ 株はその他の破壊株とは異なるパターンを示したが、 $\Delta sfhE$ 株は PC1 と PC2 との観点において、 $\Delta sfhF$ 株、 $\Delta sfhH$ 株、 $\Delta sfhI$ 株と類似したグループに属することが分かった。これらの結果から、 $\Delta sfhE$ 株と $\Delta sfhG$ 株は異なる理由で分生子の発芽能維持に関わっている可能性がある。

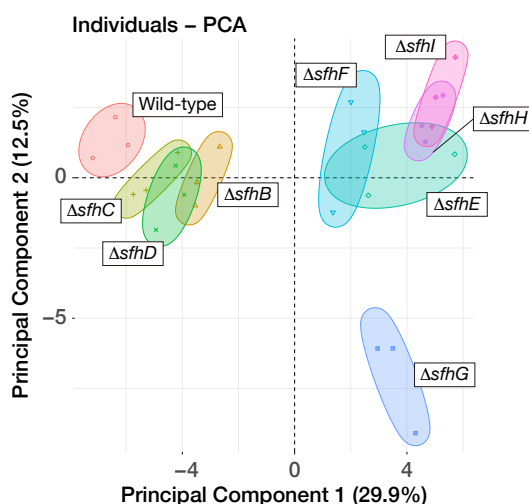


図2. 各 *sfh* 欠失株の分生子のリン脂質組成パターン それぞれの欠失株の分生子から抽出したリン脂質を解析し、主要リン脂質のアシル鎖組成を用いて主成分分析を行った。