

平成21年 4月30日現在

研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19570181  
 研究課題名（和文） 細胞の極性成長を支える多分子間相互作用ネットワークの解析  
 研究課題名（英文） Analysis of interaction network of molecules involving in polarized cell growth.  
 研究代表者  
 紅 朋浩(TOMOHIRO AKASHI)  
 名古屋大学・大学院医学系研究科・助教  
 研究者番号：00222513

## 研究成果の概要：

細胞の極性成長は、多種多様な分子が協調して働くことによって達成される複雑な生命活動であり、高度に組織化された分子間相互作用ネットワークによって成り立っている。近年、細胞の極性成長に関わる分子の解明は著しいが、多数の分子が協調している様を総合的にとらえるのは容易ではない。本研究では、多数の遺伝子を簡便な方法で解析できる糸状菌を利用し、細胞骨格関連分子を中心に、極性成長に関係する多数の分子たちが極性成長とどのように相互関係を有するのかを総合的な視点から解析した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

## 研究分野：分子細胞生物学

科研費の分科・細目：生物科学、細胞生物学

キーワード：細胞骨格、微小管、キネシン、先端成長、糸状菌、分子モーター

## 1. 研究開始当初の背景

本研究課題で扱うカビ（糸状菌）の菌糸の成長は典型的な極性成長である。極性成長は、他にも神経細胞、花粉管、根毛細胞など、様々な生物で見られる基本的な成長様式である。この一見単純そうに見える成長も、多種多様な分子の調和によって成し遂げられる、極めて精巧な生命活動である。近年、それぞれの材料において、極性成長に関係する遺伝子、分子が数多く明らかになっている。その中には、種を超え、極性成長に普遍的に関わっている成分が多数見つかっている。一

方、その複雑さゆえ、関係する分子たちが実際にどのように働いているかについてはまだまだわからないことが多い。多様な分子の相互関係、あるいは協調関係を総合的に把握することが必要な段階に至っている。極性成長において、多数の分子を総合的に解析するには、カビは優れたモデル系と考えられる。

極性成長の分子基盤として古くから知られているものの一つに、細胞骨格とその関連分子がある。カビの菌糸の極性成長においても細胞骨格が重要であることは、我々を含め多くの研究者が証明してきた。さらに近年、

微小管モーターであるキネシンやダイニンが極性成長の普遍的プレイヤーとして注目されるようになった。微小管モーターは、極性成長に必要な物質の輸送の担い手として重要であるばかりでなく、微小管ネットワークの維持、制御にも深く関わっている。一方、アクチンやアクチンに関係する分子についても、微小管との相互作用の重要性が指摘されるようになった。さらに、分泌や細胞壁形成に関わる分子との相互関係も、極性成長の調節には重要である。以上挙げたように、極性成長は様々な要素が複雑に、しかも整然と配置された多分子間の相互作用ネットワークによって営まれている。本研究課題は、そのネットワークの有り様を解き明かすために計画したものである。

本研究で用いた子囊菌 *Aspergillus nidulans* は、培養の簡便さ、解析の多様性、強力な遺伝学的解析手段といった利点がある実験材料である。カビの基本的な成長が極性成長である点でも格好の研究材料である。すでに、その極性成長に細胞骨格や細胞内輸送が関係していることは数多く語られてきており、現象レベルではかなり十分な知識背景がある。さらにこの材料を用いた研究は、NudE、NudF (LIS1) 遺伝子といった神経の成長に重要な分子の発見や理解に貢献しており、この材料を利用することの大きな動機付けとなっている。一方、カビの菌糸成長の理解は、生命全般にわたる基本的な理解に役立つだけでなく、カビを利用している産業や、カビが引き起こす疾患の理解にも役立つものと期待される。

## 2. 研究の目的

本研究課題は、細胞の極性成長を総合的に理解するためのアプローチである。協調して働くと考えられる分子の多数を対象に、極性成長との相互関係を同時進行的に解析する。菌糸成長には、成長部分での物質の新成が必須であり、その場での合成と分解による再構成がある。合成や分解に必要な成分は、細胞の基部からの輸送によって賄われている。その輸送の運び手は細胞骨格である。本研究では、菌糸先端での再編成に関わる分子が如何に時間的、空間的に制御されているのかを理解するため、分泌に関わる分子群の時空間制御と細胞骨格の関係を解析した。また、輸送の運び手としての細胞骨格には、微小管系、アクチン系の両方が関わるが、微小管系の分子群の中でもキネシンファミリーに注目し、ファミリー遺伝子に対し全ゲノムの解析法を適用することで、多因子からなる系の相互作用ネットワークの理解を目指した。

## 3. 研究の方法

### (1)キネシン・ノックアウト株の作成

遺伝子ターゲットングに適した Ku70 遺伝子破壊株を用い、11 遺伝子あるキネシンファミリー遺伝子のうち、10 遺伝子について、ノックアウト株を作成した。残り 1 つの遺伝子は必須遺伝子であることがわかっており、ノックアウト株の作成対象から除外した。10 種のノックアウト株について、寒天培地上での成長、微小管ネットワークへの影響などを比較した。さらに複数のキネシンがノックアウトされた株を、ジーンターゲットングと掛け合わせを利用して作成した。

### (2)キネシンの蛍光タンパク質遺伝子標識

ノックアウト株の解析、及び既存の知識から、複数のキネシンが菌糸成長に関与していることが想定された。それぞれのキネシンの機能を考える上で、キネシンの細胞内局在が参考になると考え、11 遺伝子のキネシン全てについて、ジーンターゲットングによる蛍光タンパク質標識を行なった。11 種のキネシンについて、その C 末端側に mCherry 遺伝子、及び GFP 遺伝子を標識した。イメージング手法を利用し、それぞれのキネシンの時間的、及び空間的变化や、キネシンと微小管との動的な相互関係を詳細に解析した。

### (3)イメージング

孢子懸濁を調製し、カバーガラス上の液体培地に接種し、26°C で培養した。培養 12 時間以降、カバーガラスを反転させて、酸素透過性シャーレに乗せ、正立型顕微鏡にて観察した。ORCA-ER 高感度カメラで取得したイメージを iVision-Mac ソフトウェアに取り込み、画像の取得と処理を行なった。

さらにイメージングを行なう場合には、オハイオ州立大学分子遺伝学部 (のちにカンザス大学生命科学部) の Oakely 研究室に設置された装置を用い、画像の取得と処理を行なった。

## 4. 研究成果

### (1)キネシン・ノックアウト株の解析

糸状菌 *A. nidulans* のゲノム中には 10 グループのキネシンが 11 の遺伝子によってコードされている。そのうち必須遺伝子である *BimC* を除き、10 種の遺伝子についてノックアウト株を作成し、寒天培地上での成長を比較したところ、1 種類を除き、ほとんど野生株と同程度の成長を示した。1 種類のみ、成長の悪いものがあり、それは *KinA* というキネシンで、このキネシンが菌糸成長に影響することは既に報告されており、それを確認するものであった。*KinA* についても全く菌糸成長が見られないわけではなく、遅いながら、依然極性成長を示す。おそらく他にも極性成長を支える分子が存在すると考えられるこ

とから、複数のキネシンがノックアウトされた株を解析した。その結果、*KipB*をノックアウトした株が単独ではそれほど成長に影響がないが、他のノックアウトと組み合わせると成長が阻害されることがわかった。特に *KlpA* との二重破壊株で成長の阻害が著しく、低温条件ではさらに成長阻害がされた。また *KipB* ノックアウト株では全般的に低温での成長阻害が見られ、微小管の低温での安定性を反映しているのではないかと考えられた。*KlpA* との二重破壊株で成長が著しく阻害されることも微小管のダイナミクスへの影響の結果であることが示唆される。

## (2) 蛍光遺伝子標識によるキネシン局在の解析

キネシンの機能を考える上で、キネシンの細胞内局在が参考になると考え、11 遺伝子のキネシン全てについて、やはりジーンターゲットイングによる蛍光タンパク質標識を行なった。11 種のうち9種について、それぞれの特徴的な局在が観察された。その局在パターンから、菌糸成長に関わるもの、染色体分配に関わるもの、あるいはその両方に関係するものなど、機能との因果関係を考慮するのに重要な知見を得ることが出来た。

イメージング手法を用いることでさらに詳細な動態を調べ、菌糸成長に関わると考えられるキネシン間でも、物質の輸送と深くかわるもの、微小管ネットワークの構築に関わるものなど、具体的な役割において機能分化があることが想像された。

今回調べたキネシン局在のうち、すでに報告のあるものもあるが、多くが何らかの新たな知見をもたらした。今回のように、遺伝子ターゲットイングによってゲノム上遺伝子に直接蛍光タンパク質遺伝子を標識することはこれまで為されていなかった。これまでの報告に比べ、より本来に近い状態の遺伝子産物の動きを捉えることで、すでに報告のあるものについても、新たな知見、あるいは既報告にある不備なども明らかにすることが出来た。また、これまでその局在が報告されてなかったもののうちに、Class 6のもの及びClass10のものについて、新規な知見が得られた。*A. nidulans* のClass6のキネシンは、動物細胞のMKLP1 typeキネシンに相当し、MKLP1キネシンと同様、後期紡錘体の紡錘体中央に現れた。*A. nidulans* のClass6のキネシンは、さらに隔壁形成部位にも現れた。この隔壁形成部位への局在から、隔壁の形成制御に関わることが示唆された(後述)。*A. nidulans* は多核細胞であり、核分裂と細胞質分裂が必ずしも同期しておらず、これらのステップが連動していない。にもかかわらず、分裂後期に紡錘体中央部に現れ、いったん消

失した後、時間差をおいて隔壁形成部位に再び現れた。MKLP1が後期紡錘体と細胞質分裂に重要であることは他の生物でもすでに知られているが、これら二つのステップが連動して起こるため、それぞれにどう関わっているのかは判別しにくい。それらの二つのステップが分離している *A. nidulans* では、それぞれの過程での機能、あるいはこれらのステップのつながり方を解析するのに力を発揮するものと考えられる。

もう一方の *A. nidulans* のClass10キネシンは、分裂初期に一過的に核の中に集積し、分裂開始と同時に消失した。他に例を見ない極めて特異な局在を示すが、動物細胞のClass10キネシンであるKidとは、明らかな共通性は見出されない。しかしながらKidはクロモキネシンとして微小管よりは染色体と関係の深いキネシンであり、この *A. nidulans* のClass10キネシンも微小管から距離を置き、核と結びつきが深い点では似た要素を持つ。これらは一般的な微小管モーターとは異なる領域の機能分子であることが想像され、今後の解析の進展によっては新規な機能分子の解明につながることを期待される。

## (3) Class6キネシン・ノックアウト株の表現型質の発見

当初、作成したそれぞれの遺伝子の単独ノックアウト株の解析では新規な表現型質が見出されず、それぞれの機能を絞り込めずにいた。一方、2.の実験の結果を受け、その局在から影響を受ける可能性のある現象に注目し、ノックアウト株の表現型質について再検討を行なった。上記のように、Class6キネシンが隔壁形成に関係が深いことが推定されたことから、そのノックアウト株の隔壁形成を詳細に調べたところ、隔壁形成の頻度が減少していることが判明した。核分裂の進行や胞子形成などには影響が検出できなかった。この発見により、Class6キネシンが隔壁形成に重要であることはほぼ明らかとなった。すでに知られている隔壁形成に関わる分子とはかなり異なる挙動を示すことから、微小管を介した、隔壁形成の制御に関わっていることが示唆される。隔壁の頻度は少なくとも隔壁そのものには異常が見られないことから、隔壁形成そのものというより、形成のタイミングや位置の制御に関わっているのではないかと推定される。また、隔壁が極端に少なくなるにも関わらず、全体の成長には大きな欠陥は見られない。菌糸の分岐も頻繁に起こっており、特に基部での分岐では、あたかも隔壁があるかのごとく、分岐が見られることも多いことから、菌糸の分岐形成の観点からも注目すべき現象が見られている。本研究の主要なテーマである、極性成長の制

御を考える上でも興味深い現象である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Niimi, A., ..., Akashi, T., Suzuki, M. (2009) PCNA mono-ubiquitination and activation of translesion DNA polymerases by DNA polymerase alpha. J. Biochem. In press. 査読有。
- ② Taheri-Talesh N., Horio, T., Oakley, B.R. et al. (2008) The tip growth apparatus of *Aspergillus nidulans*. Mol. Biol. Cell 19: 1439-1449. 査読有。
- ③ Wortman, J.R., ..., Horio, T., Oakley, B.R., et al. (2008) The 2008 update of the *Aspergillus nidulans* genome annotation: A community effort. Fungal Genet. Biol., (Epub ahead of print). 査読有。

[学会発表] (計 10 件)

- ① 堀尾哲也、紅朋浩、Berl R. Oakley *A. nidulans* キネシンの全ゲノム的解析、生体運動合同班会議、2009年1月9日 (東京)
- ② T. Akashi, T. Horio, B. R. Oakley, Analysis of the Localizations of GFP-tagged Kinesins in the Filamentous Fungus *Aspergillus nidulans*. アメリカ細胞生物学会、2008年12月17日 (サンフランシスコ、USA)
- ③ 紅朋浩、堀尾哲也、Berl R. Oakley *Aspergillus nidulans* キネシンの細胞内局在：MKLP型、Kid型キネシンを中心に、糸状菌分子生物学コンファレンス、2008年11月17日 (金沢)
- ④ 紅朋浩、出芽酵母の微小管形成中心について、第6回さざなみコンファレンス、2008年11月10日 (姫路)

⑤ 紅朋浩、今井遼、堀尾哲也、キネシンノックアウトによる酵母 $\gamma$ チューブリン変異の回復、日本細胞生物学会、2008年6月30日 (横浜)

⑥ T. Horio, T. Akashi, B. R. Oakley, Analysis of the Localizations and Functions of Kinesins in the Filamentous Fungus *Aspergillus nidulans*. アメリカ細胞生物学会、2007年12月17日 (ワシントンDC、USA)

⑦ 堀尾哲也、紅朋浩、Naimeh Tahiri-Talesh, Berl R. Oakley、糸状菌 *Aspergillus nidulans* の速い先端成長を支える分子機構の研究、糸状菌分子生物学コンファレンス、2007年11月15日 (東京)

⑧ 堀尾哲也、紅朋浩、Berl R. Oakley、菌類の紡錘体形成-プリミティブなのか特殊化したのか-、第5回さざなみコンファレンス、2007年11月8日 (加東、兵庫)

⑨ 堀尾哲也、紅朋浩、Naimeh Tahiri-Talesh, Berl R. Oakley、糸状菌 *Aspergillus nidulans* の先端成長における細胞骨格の役割、日本細胞生物学会、2007年5月29日 (福岡)

⑩ 紅朋浩、堀尾哲也、菊池韶彦、子囊菌酵母 $\gamma$ チューブリンの共通性と特殊性、日本細胞生物学会、2007年5月29日 (福岡)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

紅朋浩 (TOMOHIRO AKASHI)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：00222513

##### (2) 堀尾 哲也 (TETSUYA HORIO)

カンザス大学・分子生命学科・Assistant Professor

バール アール オークレー (Berl R. Oakley)  
カンザス大学・分子生命学科・Professor