

プロジェクト名：真菌類（カビ類）に特異的な生命維持機構の解明

代表者：畠山晋（科学分析支援センター・講師）

1 本研究の背景と新規短寿命変異株の特徴

研究代表者らは、これまでアカパンカを研究材料として、短寿命変異株の原因遺伝子のクローニングおよび、その遺伝子機能の解析に取り組んで来た。その一環として、新たな短寿命変異株を遺伝子ノックアウトライブラリーより探索し、既知の短寿命変異株との遺伝的な関係の解明、もしくは新たな細胞寿命メカニズムの発見を睨んで解析を続けている。アカパンカビは遺伝的背景が整っているため、遺伝学の研究分野において、古くは一遺伝子一酵素説に始まり、エピジェネティクス、RNA 干渉など、現代において幅広く理解され、応用されている原理・技術の先達となっている。本研究は、菌類の寿命についての独特な解釈を行なう学問的な側面だけでなく、抗真菌剤の開発分野において重要な生物学的知見がもたらされることが期待できる。

H23 年度の研究機構プロジェクト研究経費を用いて、アカパンカビの遺伝子ノックアウトライブラリーより短寿命を示す株が 20 株弱探索された。これらのうち、カビ類（真菌類）にしか存在しない遺伝子のノックアウト株も存在することが、ホモロジー検索より明らかとなった。H24 年度は、これらの中で、AとBの二つの遺伝子について、これらの遺伝子欠損株（KO 株）の表現型の解析を行なった。寿命をリセットするために、野生株との戻し交雑を行い、野生型の表現型を示す兄弟株との表現型の比較を行なった。まず、菌糸成長速度については、下図 1 に示す様に、これらの KO 株は早期に菌糸成長をした。菌糸成長速度については、A 遺伝子 KO 株はほぼ野生株と同等の成長速度を示したのちに成長を停止したのに対して、B 遺伝子 KO 株は成長速度が測定開始時から遅く、野生株の約 30 パーセントの成長速度であった。また、既知の短寿命変異株は、一般に変異原に対する感受性があるが、両遺伝子の KO 株は、ともにメチルメタンシルホン酸に対する感受性が高く、短寿命変異株と同様の表現型を示すことが明らかとなった。

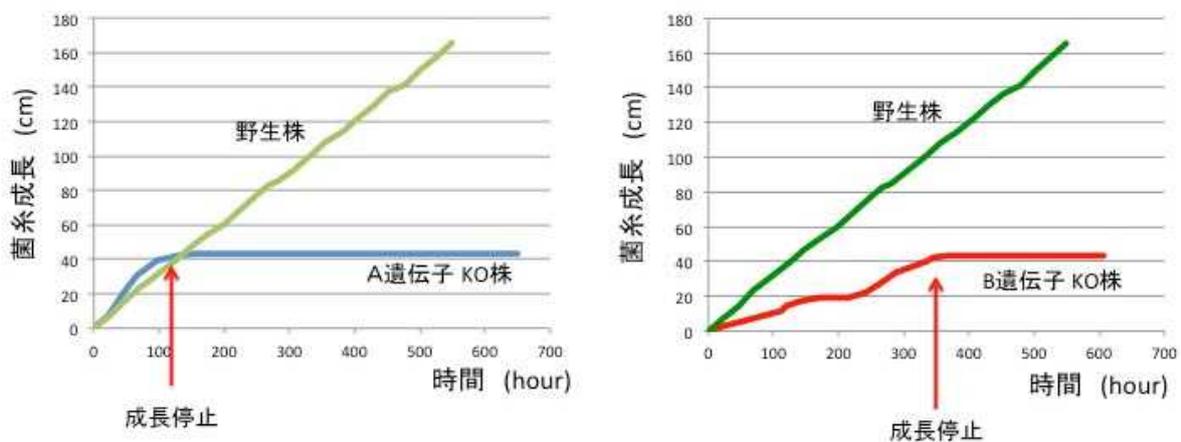
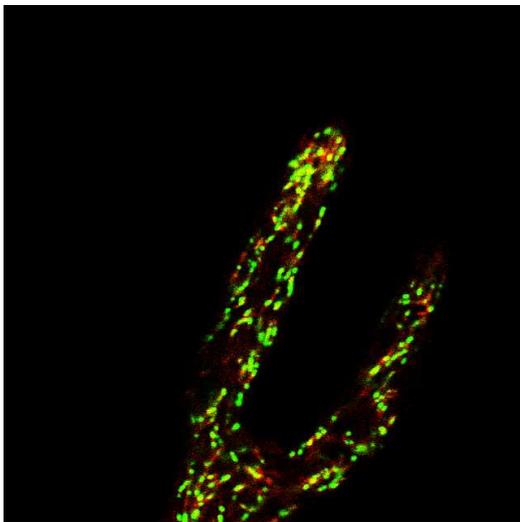


図 1 新規短寿命変異株の菌糸成長の解析

2 遺伝子産物の局在解析

A、Bそれぞれの遺伝子の機能を予測するために、局在の解析を試みた。A、B遺伝子の予想 ORF のカルボキシル末端に GFP をタンデムに発現し、かつこの複合タンパク質をコードする DNA 領域が、アカパンカビの *his-3* 遺伝子座に特異的に導入できるようなコンストラクトを作製した。このコンストラクトをアカパンカビの *his-3* 変異株に導入し、ヒスチジンの栄養要求性を回復した株を最少培地にて選択した。幾つかの形質転換株を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。図2は、B遺伝子の遺伝子発現産物のカルボキシル末端において GFP を融合したタンパク質が発現している様子を表している。ミトコンドリアを特異的に蛍光観察できる色素、Mitotracker Red との画像を重ねると、部分的に共局在する部分が認められた。この点状共局在部分は、ミトコンドリアのゲノムである可能性が高いが、今後解析が必要である。A遺伝子については、コンストラクトの作製に失敗した。遺伝子配列を確認し、局在が観察できるコンストラクトの作製を目指す。



(図2の説明)

形質転換株の菌糸を共焦点レーザー顕微鏡にて観察したもの。

緑色：GFP (Green Fluorescent Protein)、赤色：Mitotracker Red、
点状共局在する黄色の部分が共局在を表している。

図2 B遺伝子産物はミトコンドリア内に点状存在する。

B遺伝子の産物が、ミトコンドリア DNA (mtDNA) の部分に局在する場合には、この遺伝子が mtDNA の安定性に関与する可能性が高い。例えば、同じく短寿命変異株の *mus-10* や *nd* は菌糸成長の早期停止と mtDNA の不安定化が報告されており (Kato *et al*, Genetics 185 (2010), Siegel-Rogol *et al*, Mol Cell Biol 9 (1989)) これらの間の関連性が強く示唆されている。よって、mtDNA の関係、ミトコンドリアの機能など、この遺伝子が欠損することによって引き起こされる表現型の解析が必要である。

3 その他の短寿命変異株の解析

本解析に平行して、その他の短寿命変異株の解析も進行した。まず、*uvs-5* 変異株はミトコンドリアの融合に関わる *Fzo1* のホモログに点突然変異を生じており、この変異が原因となってミトコンドリアの融合不全を起こし、菌糸成長の早期停止が起っていた。この遺伝子産物は先に報告した *mus-10* の遺伝子産物と物理的に相互作用があることが示され、この結果を Eukaryotic cell 誌に報告した。また、C変異株の原因遺伝子のクローニングも進行し、まもなく特定を決定する。以上のように、少しずつ短寿命変異に関わる遺伝子が明らかになっており、中には共通した部分で機能するものも見いだされてきた。いずれも新規な遺伝子機能と結びついており、今後、ますます細胞寿命の機構解明への展開が期待できる。