

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18663

研究課題名(和文)糸状菌をモデルとした極性生長におけるアクチンケーブルの役割

研究課題名(英文)Role of actin cables on polarised growth of filamentous fungi

研究代表者

竹下 典男 (TAKESHITA, Norio)

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：20745038

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：糸状菌の菌糸の生長速度が一定ではなく、早い遅いを繰り返していることが判明した。細胞内カルシウムイオン濃度の変化を蛍光によりライブイメージングすることに成功し、周期的なパルスを発見した。カルシウムイオンチャンネルがそのパルスに必要なことから、細胞外からのカルシウムイオンの一時的な流入が起きることが示された。そして、菌糸先端のアクチンの重合、エキソサイトーシス、カルシウムの流入が周期的に起きること、それらが同調していることが示され、論文として公表した (Takeshita et al PNAS 2017)。

研究成果の概要(英文)：Many eukaryotic cells grow by extending their cell periphery in pulses. The molecular mechanisms underlying this process are not yet fully understood. Here we present the first comprehensive model of stepwise cell extension by using the unique tip growth system of filamentous fungi. Live-cell imaging analysis, including super-resolution microscopy, revealed that the fungus *Aspergillus nidulans* extends the hyphal tip in an oscillatory manner. The amount of F-actin and secretory vesicles (SV) accumulating at the hyphal tip oscillated with a positive temporal correlation, while vesicle amounts were negatively correlated to the growth rate. The intracellular Ca^{2+} level also pulsed with a positive temporal correlation to the amount of F-actin and SV at the hyphal tip. The data indicate a model in which transient Ca^{2+} pulses cause depolymerization of F-actin at the cortex and promote SV fusion with the plasma membrane, thereby extending the cell tip.

研究分野：応用微生物学

キーワード：糸状菌 カビ アクチン カルシウム 極性 イメージング 超解像 菌糸

1. 研究開始当初の背景

糸状菌は、常に極性を菌系の先端に維持することで先端生長を行うことから、細胞極性と形態形成との関わりを解析するための適したモデルである。一方で、動植物や農作物への病原性を示すものを含み、その高い酵素分泌能から醸造・発酵、抗生物質・有用酵素生産などの産業分野でも重要である。糸状菌の病原性と高い分泌能は菌糸状の形態と密接に関連していることから、先端生長の分子機構の解明を目指した本研究は、医薬・農薬開発上また産業上への応用にも大きく貢献する先駆的なものである。

本研究では、古くから遺伝学の研究対象とされ、分子生物学的手法が整備された糸状菌のモデル生物である *Aspergillus nidulans* (真菌、多核多細胞生物) を用いて、極性生長の分子機構を解明する。先端生長のために必要な膜脂質やタンパク質は、菌糸先端への分泌小胞の輸送とエキソサイトーシスによって、菌糸先端の形質膜に供給される。膜輸送には、微小管とアクチン細胞骨格、そしてそれらに対応したモータータンパク質が、中心的な役割を担っている。微小管は、その配置から菌糸後方から先端に向かう長距離の膜輸送に利用され、対照的にアクチンケーブルは菌糸先端の形質膜近傍にのみ局在し、菌糸先端でのエキソサイトーシス(分泌小胞と形質膜との融合)に関わると考えられている。アクチン重合阻害剤やミオシンモーターの解析から、アクチンケーブルが先端生長に必須であることが示されているが、アクチンケーブルの可視化は長年困難であった。

2. 研究の目的

本研究では、これまで明かされてこなかった極性生長におけるアクチンケーブルの真の役割を解明し、極性生長の全体像を明らかとすることを目的とした。

1) 極性決定因子とアクチンケーブルの局在性の相関：菌糸の幅は約 2 μm であるのに対し、極性マーカは菌糸先端の形質膜上の約 120 nm の部位に集中して局在することが示されている。その極性部位に局在する極性マーカが、アクチンケーブルの重合を行う SepA をそこに局在させることは示されているが、実際に極性部位からアクチンケーブルが伸長しているかどうかは不明である。緑・赤の蛍光タンパク質の組み合わせで、局在の関連を解明する。

2) 分泌小胞輸送におけるアクチンケーブルの機能：極性マーカが集合する極性部位に、分泌小胞も蓄積することが示されている。実際に分泌小胞がアクチンケーブルに沿って輸送されるかどうか、蛍光顕微鏡を用いて解明する。

3) 微小管とアクチンケーブルの相互依存性：微小管は、菌糸先端に向かって重合・伸長し、先端の形質膜に到達後、脱重合により収縮する。重合・脱重合を繰り返すことで、

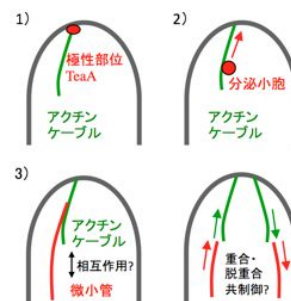
菌糸先端に分泌小胞や極性マーカを輸送する。アクチンケーブルも重合と脱重合を繰り返しているようであるが、微小管との関わりは明らかになっていない。アクチンケーブルと微小管が相互作用するか、それぞれの重合・脱重合が関連して制御されているかを解明し、それらの分子機構を検討する。

3. 研究の方法

これまでに、糸状菌の極性生長の機構を解析してきた。本研究では、極性生長に必須でありながら解析が困難であったアクチンケーブルの役割を明らかにし、極性生長の全体像の理解につなげる。極性マーカ(TeaA)、エキソサイトーシス、微小管との関わりを検討するため、以下のことを明らかにする。1) 極性決定因子が局在する部位からアクチンケーブルが形成されるか。2) アクチンケーブルに沿って分泌小胞が輸送されるか。3) アクチンケーブルと微小管が相互作用するか、相互依存性があるか。アクチンケーブルと比較対象が、緑または赤色蛍光タンパク質で標識された株を作製し、スピニングディスク型共焦点顕微鏡による高速分解能ライブイメージングと、様々な画像解析技術を組み合わせ、解析方法を確立しながら研究を遂行する。

4. 研究成果

糸状菌 *A. nidulans* においてアクチンケーブルを可視化するため、GFP 付加したトロポマイオシン(TpmA)またはアクチン結合タンパク質由来の 17 アミノ酸である Lifeact を発現する株を作成した。それぞれの表現型を解析し、菌糸先端におけるアクチンケーブルの挙動(長さ、重合速度、脱重合速度、重合頻度)を糸状菌で初めて定量化することに成功した。その結果、GFP-TpmA が正常なアクチンケーブルを可視化していること、GFP-Lifeact が発現量に依存してアクチンケーブルを安定化することが示された。GFP と mCherry の組み合わせで、超解像顕微鏡を含む蛍光顕微鏡により解析し、アクチンケーブルと微小管の相互作用を明らかにした。高速スピニングディスク型共焦点顕微鏡を用いて、それぞれの重合と脱重合が協調的に制御されている機構を明らかにした。これらの結果をまとめ corresponding author として論文を作成し、Frontiers in Microbiology に受理された。



また、糸状菌の菌系の生長速度が一定ではなく、早い遅いを繰り返していることが判明した。細胞内カルシウムイオン濃度の変化を蛍光によりライブイメージングすることに成功し、周期的なパルスを発見した。カルシウムイオンチャンネルがそのパルスに必要であることから、細胞外からのカルシウムイオンの一時的な流入が起きることが示された。そして、菌系先端のアクチンの重合、エキソサイトーシス、カルシウムの流入が周期的に起きること、それらが同調していることが示され、論文として公表した (Takeshita et al PNAS 2017)。さらに、超解像イメージング技術により、これまで検出できなかった高速・長距離移動の分泌小胞の輸送を発見した (Zhou et al Sci Adv 2018)。

これらの研究は、糸状菌の菌系先端生長がどのようにしてなされるかという、基礎研究のみならず応用研究にも重要な影響を与える疑問に対する明確な回答を与えるものである。そして、超解像顕微鏡を含む最先端イメージング技術を、初めて糸状菌に応用したものであるため、独創性と先駆性が大きい。また、動物の神経細胞や植物の花粉管などを含む細胞一般の極性生長の理解に貢献し、再生医療を視野に入れた細胞・組織工学にも応用可能であることから、生物学への貢献と波及効果は重大である。加えて、糸状菌が関わる醸造・発酵、有用酵素生産、動植物への病原性など、医薬・農薬開発上また産業上への応用にも大きく貢献する可能性を秘めた根元的な研究である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Superresolution and pulse-chase imaging reveal the role of vesicle transport in polar growth of fungal cells.

Zhou L, Evangelinos M, Wernet V, Eckert AF, Ishitsuka Y, Fischer R, Nienhaus GU, Takeshita N. Sci Adv. 2018 Jan 24;4(1):e1701798. 査読有

Oscillatory fungal cell growth. Takeshita N. Fungal Genet Biol. 2018;110:10-14 査読有

Pulses of Ca²⁺ coordinate actin assembly and exocytosis for stepwise cell extension.

Takeshita N, Evangelinos M, Zhou L, Serizawa T, Somera-Fajardo RA, Lu L, Takaya N, Nienhaus GU, Fischer R. Proc Natl Acad Sci U S A. 2017;114(22):5701-5706. 査読有

Dynamics of Actin Cables in Polarized

Growth of the Filamentous Fungus *Aspergillus nidulans*.

Bergs A, Ishitsuka Y, Evangelinos M, Nienhaus GU, Takeshita N. Front Microbiol. 2016;7:682. 査読有

Coordinated process of polarized growth in filamentous fungi.

Takeshita N. Biosci Biotechnol Biochem. 2016;80(9):1693-9. 査読有

〔学会発表〕(計 7 件)

14th European Conference of Fungal Genetics, Norio Takeshita, Pulses of Ca²⁺ coordinate actin assembly and exocytosis for stepwise cell extension. 2018 年

12th International Fungal Biology conference, Norio Takeshita, Pulses of Ca²⁺ coordinate actin assembly and exocytosis for stepwise cell extension. 2017 年

農芸化学会, 竹下典男, 糸状菌の先端生長における極性制御機構の解析, 2017 年

Annual Conference of VAAM, Norio Takeshita, Coordinated process of polarized growth in filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. 2016 年

13th European Conference of Fungal Genetics, Norio Takeshita, Superresolution microscopy reveals a dynamic picture of cell polarity maintenance during hyphal growth. 2016 年

第 15 回 糸状菌分子生物学コンファレンス, 竹下典男, 糸状菌の先端生長におけるアクチンケーブルと微小管の協調的重合制御, 2015 年

11th Molecular Biology of Fungi, Norio Takeshita, Norio Takeshita, Cooperated polymerization between actin cables and microtubules in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. 2015 年

〔図書〕(計 1 件)

Advanced microscopy methods for the study of protein localization, interaction and dynamics in filamentous fungi. Oier Etxebeste, Norio Takeshita, 2015, 20p, Springer

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.microbes.agbi.tsukuba.ac.jp/takeshita/>

6．研究組織

(1)研究代表者

竹下 典男 (TAKESHITA Norio)

筑波大学 生命環境系 助教

研究者番号：20745038