

令和元年6月14日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18672

研究課題名(和文)糸状菌胞子における休眠メカニズムの分子基盤解析

研究課題名(英文)Study of molecular mechanism for conidial dormancy in filamentous fungi

研究代表者

萩原 大祐 (Hagiwara, Daisuke)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：20612203

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：糸状菌の休眠胞子および発芽胞子におけるトランスクリプトーム解析から、各ステージにおける特異的な遺伝子群を特定した。休眠胞子特異的因子の多くの発現は、AtfA転写因子に影響を受けており、休眠胞子においてAtfAが重要な機能を示すことを明らかにした。AtfA遺伝子破壊株の胞子の一部は休眠が打破された形態を示し、休眠維持にAtfAが深く関与すると考えられた。また、AtfAの上流のシグナル伝達系であるHOG経路のMAPKとして機能するSakAは、Protein kinase A (PKA) と相互作用することが示され、両シグナル伝達系を介して胞子休眠が制御されている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糸状菌は環境中に遍在し、人間の社会生活の様々なところで関与する。一方で、胞子の休眠維持機構に関して、その分子基盤はほとんど明らかでなかった。本研究では、AtfAおよびその上流シグナリング経路について解析を進め、分子基盤としての関与について新しい知見を得ることができた。これらの解明により新たな抗菌剤や制御法などの開発に繋がることを期待される。

研究成果の概要(英文)：To understand which genes are involved in maintaining and exit for conidia dormancy, we conducted RNA-sequencing analysis for dormant conidia and 1h-germinated conidia in *A. fumigatus*, *A. niger*, and *A. oryzae*. From the transcriptome analysis, we identified the common conidia-associated genes (CAGs) and germinated conidia-associated genes (GeAGs). Expression of a large part of CAGs is dependent on bZip-type transcription factor AtfA. Furthermore, the conidia of atfA deletion mutant partly showed derepression of conidial dormancy. These results suggested that AtfA plays a crucial role in conidial dormancy. Our study also revealed that SakA MAPK in the HOG pathway which regulates function of AtfA was able to physically interact with protein kinase A (PKA). The PKA pathway has been reported to be involved in conidial germination. Therefore, the new working model for maintaining conidial dormancy is interaction between the HOG pathway and PKA pathway converged on AtfA.

研究分野：微生物学

キーワード：糸状菌胞子 休眠 シグナル伝達 トランスクリプトーム解析 二次代謝産物

1. 研究開始当初の背景

糸状菌は土壌や生活空間の至る所に存在し、作物病害、食品汚染、感染症の原因にもなるなど、人間の社会生活に深く関与している。一般的に、糸状菌の無性胞子（以後、胞子）は多量に着生され、環境ストレス高耐性を示すことから、糸状菌に遍在性と高い環境応答能を与えており、糸状菌の生活環において重要なステージである。近年は、胞子形成メカニズムについて、分子・遺伝子レベルで精力的に解析研究が取り込まれている。一方で、糸状菌胞子の着生後から発芽までのステージを休眠状態（resting stage/ dormancy）と呼ぶが、休眠に入る機構、休眠状態を維持する機構の分子メカニズムに関する知見は限られている。

2. 研究の目的

本研究では、*Aspergillus* 属糸状菌を対象として休眠胞子の生物学的特長の分子レベルでの理解を深めることを端緒として、糸状菌胞子の休眠機構の分子メカニズム解明を目的とした。特に、休眠胞子が発芽へと代謝シフトする際に起こる遺伝子発現変動の全体像を明らかにすることにより、制御メカニズムの同定を試みた。またこれらの発現解析は、休眠胞子に蓄積する生理活性物質の存在の発見にいたり、胞子に蓄積する二次代謝産物の生物学的意義についても議論の材料を提供することを目指した。

3. 研究の方法

休眠胞子および発芽胞子における網羅的な転写変動を明らかにするため、複数の *Aspergillus* 属菌を対象に RNA-sequencing 解析を行った。また、比較転写解析から胞子発芽期に発現誘導される因子を明らかにする。これらの解析から導き出された、シグナル伝達系因子の解析へと繋げる。一方、異なる温度環境で形成された休眠胞子のストレス耐性能の解析、および休眠胞子内の RNA-sequencing 解析を進め、生成環境と休眠胞子の諸性質との関係を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 休眠胞子および発芽胞子特異的な発現因子の探索

休眠胞子および発芽胞子に特異的な因子を明らかにすることを目的として RNA-sequencing 解析を行った。より普遍的な因子を見つけ出すことを意図し、解析対象には複数の *Aspergillus* 属菌 (*Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*) を使用し、これらの結果を比較した。まず、菌糸体と休眠胞子との比較から、胞子特異的に高発現する遺伝子は、各菌において 687, 694, 812 個見つかった。さらに、培地添加 1h 後と発芽を誘導した発芽胞子では、休眠胞子に比べて 766, 1241, 749 個の遺伝子がそれぞれの菌で高発現していることが明らかになった。なお、休眠胞子に蓄積される転写物 (mRNA) が時間をおいても安定であるのかを確認する必要があると考え、採集後に乾燥させて室温で 1 週間静置した休眠胞子からも RNA-sequencing 解析を行った。その結果、休眠胞子特異的な遺伝子の約 4% または 6% のみで、転写物の 4 倍を超える増加または減少が認められた。すなわち、約 9 割の休眠胞子特異的な遺伝子転写物は、胞子採集後も 1 週間は量的安定に存在していることがわかった。

次に、各菌種間で共通のオーソログ因子を抽出すると、91 個の休眠胞子特異的な因子、391 個の発芽胞子特異的な因子が見出された。休眠胞子特異的な因子には、conidia-specific catalase, CatA や、トレハロース蓄積に関与する VosA、hybrid-histidine kinase, Fhk1 をコードする遺伝子が含まれていた。同様に、発芽胞子特異的な因子の中にはリボソームの合成に関連する因子が 13 個含まれており、リボソーム装置の合成が de novo で発芽の最初期に開始されていることが示唆された。また興味深いことに、*A. fumigatus calA* 遺伝子とそのオーソログである *A. niger* An16g03330 および *A. oryzae* A0090005001280 遺伝子は、いずれも発芽胞子特異的な因子群の中で最も高い発現値を示しており、胞子発芽に重要な機能を持つことが推測された。CalA は Thaumatin-like protein とアノテーションされており、*A. nidulans* にも CetA と CalA の 2 つの Thaumatin-like protein が存在する。*A. nidulans* の CetA と CalA の二重破壊株は生育不能であり、本タンパク質が糸状菌の生育に必須であることが伺える。

(2) AtfA 転写因子が休眠 / 発芽制御に関与する

今回の解析で明らかになった休眠胞子特異的な因子の多くは、胞子ストレス耐性に関与する bZip 型転写因子 AtfA の制御下にあることが、過去のデータから示唆された。そこで、*A. fumigatus* 野生株と AtfA 遺伝子破壊株とで、休眠胞子の比較トランスクリプトーム解析を行った。その結果、約 10% または 13% の因子の転写産物量が、AtfA 破壊株で増加、または減少していることが解った。668 個の休眠胞子特異的な因子に限って見ると、54% の因子が AtfA 破壊株の胞子で、転写産物量が低下しており、休眠胞子において AtfA が重要な機能を有することが示唆される。一方で、発芽胞子特異的な因子に関して AtfA の関与を調べたところ、一群の遺伝子の発現が AtfA 破壊株の休眠胞子内で高い値を示した。特に、前述の *calA* の発現も高いことから、休眠胞子内で発芽に関する因子の脱抑制が進んでいると予想された。すなわち、AtfA が破壊されたことにより、胞子の休眠が打破された状態にあると考えられた。

AtfA 破壊株の胞子の休眠状態を明らかにするため、胞子の形態観察を行ったところ、サイズの不揃いな胞子であることが解った。さらに、野生株の休眠胞子では細胞膜のエルゴステロー

ル量は極少であるのに対して、AtfA 破壊株では Filipin 染色によるエルゴステロールのシグナルが確認でき、発芽プロセスが亢進していることが示唆された。また、resazurin や XTT による代謝活性測定からも、AtfA 破壊株の休眠孢子では代謝活性を示していることが明らかになった。これらの結果から、AtfA は孢子の休眠を正に制御する因子であり、その欠失により発芽機構が活性化することが予想される。

(3) 異なる温度環境で着生した休眠孢子の特性の違い

異なる環境下で着生した休眠孢子の特性の違いを明らかにするために、異なる培養温度で着生した孢子内のトランスクリプトーム比較解析を行った。25, 37, 45 で *A. fumigatus* を PDA プレート培養し、着生した孢子をプレート上から回収した。25 培養から回収した孢子は、他の条件の孢子に比べて濃い灰緑色を呈し、メラニンが高度に蓄積していることが示唆された。実際、複数のメラニン生合成遺伝子の発現が上昇しており、25 で得られる孢子は UV 照射ストレスに耐性を示した。続いて、異なる温度条件で培養し回収された休眠孢子から RNA を抽出し、比較トランスクリプトーム解析を行った。その結果、25 で得られた孢子において、13 個の遺伝子からなる二次代謝遺伝子クラスターが高発現していることが明らかになった。本遺伝子クラスターの PKS 遺伝子破壊株を作製し、休眠孢子の酢酸エチル抽出物において消失するピークを単離した。NMR による構造解析を行った結果、抗菌活性や抗原虫活性が報告されている Trypacidin と同定された。この結果から、Trypacidin は培養温度依存的に *A. fumigatus* の休眠孢子に蓄積することが明らかになった

(4) AtfA を制御するシグナル伝達系の解析

本課題よりも以前の研究から、AtfA 転写因子の制御カスケードとして、細胞外の高浸透圧ストレス応答経路である HOG 経路がすでに明らかにされている¹⁾。さらに、孢子の休眠状態には cAMP を介した Protein kinase A (PKA) 経路の関連も示唆されてきたため、HOG 経路と PKA 経路のクロストークについて手掛かりを得ることを目指した。*A. fumigatus* の HOG 経路の MAPK である SakA の遺伝子破壊株において、PKA 活性を測定すると、活性が低下しており、HOG 経路が PKA 複合体の機能制御に関与することが示唆された。また、野生株では高浸透圧ストレスとなる高濃度ソルビトールの添加時に PKA 活性の上昇が見られるが、SakA 破壊株ではその誘導が消失した。続いて、SakA に GFP を融合した株を作製し、さらに PKA の制御ドメインである PkaR、および触媒ドメインである PkaC1 に HA タグをそれぞれ導入し、免疫沈降実験を行った。その結果、PkaR はストレス非存在下で SakA と相互作用し、高濃度のスクロース添加により解離することが示唆された。一方、PkaC1 は高濃度のスクロース添加により、相互作用が誘導されることが示された。これらの結果は、糸状菌において HOG 経路と PKA 経路の間で直接の相互作用が存在することを示す初めてのデータとなり、休眠の制御における両経路の機能について詳細に理解する手掛かりとして重要な発見となった

参考文献

- 1) Hagiwara et al., Transcriptional profiling for *Aspergillus nidulans* HogA MAPK signaling pathway in response to fludioxonil and osmotic stress. *Fungal Genet Biol*, 2009, 46: 868-78.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件、すべて査読有り)

- 1) José de Assis L, Manfiolli A, Mattos E, Malavazi I, Jacobsen ID, Brock M, Cramer RA, Thammahong A, Hagiwara D, Ries LNA, Goldman GH: Cooperation between protein kinase A (PKA) and high osmolarity glycerol (HOG) response pathways cooperatively control cell wall carbohydrate mobilization in *Aspergillus fumigatus*. *mBio*, 9: e01952-18 (2018)
- 2) Takahashi-Nakaguchi A, Sakai K, Takahashi H, Hagiwara D, Toyotome T, Chibana H, Watanabe A, Yaguchi T, Yamaguchi M, Kamei K, Gono T: *Aspergillus fumigatus* adhesion factors in dormant conidia revealed through comparative phenotypic and transcriptomic analyses. *Cell. Microbiol.*, 20: e12802 (2018)
- 3) Takahashi H, Kusuya Y, Hagiwara D, Takahashi-Nakaguchi A, Sakai K, Gono T: Global gene expression reveals stress-responsive genes in *Aspergillus fumigatus* mycelia. *BMC Genomics*, 18: 942 (2017)
- 4) Hagiwara D, Sakai K, Suzuki S, Umemura M, Nogawa T, Kato N, Osada H, Watanabe A, Kawamoto S, Gono T, Kamei K: Temperature during conidiation affects stress tolerance, pigmentation, and trypacidin accumulation in the conidia of the airborne pathogen *Aspergillus fumigatus*. *PLoS One*, 12: e0177050 (2017)
- 5) Hagiwara D, Takahashi H, Kusuya Y, Kawamoto S, Kamei K, Gono T, Comparative

transcriptome analysis revealing dormant conidia and germination associated genes in *Aspergillus* species: An essential role for AtfA in conidial dormancy. *BMC Genomics*, 17: 358 (2016)

〔学会発表〕(計 4 件)

- 1) 萩原大祐、「ゲノム、トランスクリプトーム解析で“見る”糸状菌研究」日本農芸化学会大会(2018) (招待講演)
- 2) 萩原大祐、「糸状菌ゲノムから紐解く二次代謝の多様性」日本マイコトキシン学会第81回学術講演会(2018) (招待講演)
- 3) 萩原大祐、「真菌のゲノム情報から Chemotaxonomy を考える」第61回日本医真菌学会学術集会(2017) (招待講演)
- 4) Hagiwara D, Sakai K, Suzuki S, Umemura M, Nogawa N, Kato N, Osada H, Watanabe A, Kawamoto S, Gono T, Kamei K, “Temperature during conidiation affects stress tolerance, pigmentation, and tryptacin accumulation in the conidia of the airborne pathogen *Aspergillus fumigatus*. IUMS 2017, (2017)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
特になし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。