

令和 2 年 7 月 15 日現在

機関番号：17601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19296

研究課題名（和文）白色腐朽菌が作り出す細胞外ナノベシクル～細胞外分泌機構の新展開～

研究課題名（英文）Extracellular vesicles produced by white rot fungi

研究代表者

亀井 一郎（Kamei, Ichiro）

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：90526526

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、これまで全く報告の無かった白色腐朽菌によるEV分泌を明確に示すことができた。EVを可視化するための条件を確立することができた。特に、自然環境と大きく異なる液体培地ではなく、自然環境に近い固体培地においてEVが観察されたことは、糸状菌におけるEV研究において大変有益な情報となり得る。現状では、その生理的な意義について結論を出すには至っていないが、本研究で観察されたEVは、菌種や培養条件によって形態が異なっていたことから、細胞が無作為に細胞外へと放出したものではなく、何らかの目的を持って細胞外へ送り出されたベシクルである可能性が示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

木材腐朽菌（きのこの仲間）は多くのタンパク質や二次代謝物を細胞外に分泌し、木材を腐朽する。その分泌機構は、典型的なエキソサイトーシスが関わると考えられるが、十分には理解されていない。本研究では、白色腐朽菌が細胞外ナノベシクルを分泌しているのではないかと仮説を立て、それを明確に立証することができた。木材腐朽菌による細胞外への物質の分泌機構に新たな知見を得ただけでなく、分泌された物質の空間的制御（空間的に近い距離に局在させる）という新たな研究課題の立案に寄与した点で、大きな学術的意義がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, EV secretion by white-rot fungi, which had never been reported so far, could be clearly shown. We were able to establish the conditions for visualizing the EV. In particular, the fact that EV was observed in a solid medium that is close to the natural environment, rather than in a liquid medium that is significantly different from the natural environment, can be very useful information for EV research in filamentous fungi. The EVs observed in this study have different shape and size depending on the fungal species and culture conditions, so the cells were not released randomly outside the cells, but might have some purpose.

研究分野：森林化学

キーワード：木材腐朽菌 Extracellular Vesicles 細胞外小胞 ナノ粒子 リグニン分解酵素 多糖分解酵素 分泌機構 透過型電子顕微鏡

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。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

菌類の細胞内で酵素を合成し、細胞外に分泌する経路を明らかにすることは、酵素生産をより効率的に行うために非常に重要である。細胞外への物質の輸送方法の一つとして、脂質二重膜からなる微小な小胞を用いた経路が存在することが知られている。近年、それらの小胞が microRNA やタンパク質などを内包し、他細胞の活動に影響を与えていることが明らかになったことから、細胞間コミュニケーションツールとしての機能が注目を集めている。動物細胞において細胞外に分泌されるベシクルは様々な名称で呼ばれており、通常の細胞活動により分泌されるのはエクソソーム、マイクロベシクルなどと呼ばれている。エクソソームとマイクロベシクルの違いは明確にされていないが、その粒子の大きさや分泌機構などによって区別される。

エクソソームはその直径が 30~200 nm ほどで、エンドソーム由来のベシクルであるとされている。エンドサイトーシスの過程で形成された後期エンドソームが内側にくびれて、腔内膜小胞 (ILV; intraluminal membrane vesicle) をエンドソーム内に多数形成し、MVB (multi vesicular body) と呼ばれる状態になる。その状態でエンドソームと細胞膜が融合した際に細胞外へ放出された ILV が、エクソソームと呼ばれている。エクソソームは、上皮細胞をはじめとする様々な細胞から分泌が確認されている。一方、マイクロベシクルは、直径 100~1000 nm とエクソソームよりも大きく、細胞膜の一部が細胞の外側へ膨らみ小胞が出芽することで、直接細胞外へ分泌されると言われている。

2. 研究の目的

菌類における細胞外ナノベシクルは、一般的に EV (Extracellular Vesicles) と呼ばれており、動物に対して感染性を持つ真菌や、酵母菌、コウジカビなどで報告がある。動物細胞と異なり、菌類には細胞壁があるにもかかわらず、菌類においても EV は細胞外へ分泌される。その細胞壁通過のメカニズムに関しては明らかになっていないが、細胞外へ分泌される物質の細胞壁通過に EV が関与していることを示唆する報告もある。

特に病原性を持つ担子菌 *Cryptococcus neoformans* において EV の研究は盛んであり、EV 内に多数のタンパク質や RNA、多糖などを内包していることが報告されている。*C. neoformans* は、動物に感染して日和見感染症を引き起こす原因菌であり、EV に内包された物質は感染性に関与する物質であることから、EV の分泌が感染に関与していると考えられ、その研究が進められている。一方、木材腐朽菌は多くのタンパク質や二次代謝物を細胞外に分泌し、木材を腐朽する。その分泌機構は、典型的なエキソサイトーシスに関わると考えられるが、十分には理解されていない。本研究では、白色腐朽菌も細胞外ナノベシクルを分泌しているのではないかと仮説を立て、その存在を実験的に証明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 液体培地からの EV 画分の調製

供試菌株は、宮崎大学農学部田野演習林より採集されたカワラタケ *Trametes versicolor* TN6F 株を用いた。Kirk-LN 合成液体培地から界面活性剤である Tween80 を除いた培地を用いて培養した。500 mL 容三角フラスコに 300 mL の培地を分注して滅菌した後、前培養したプレートから 5 mm コルクボーラーで打ち抜いた菌糸を 5 片植菌した。シリコン栓をして、28 °C、140 rpm の条件下で振盪培養した。培養液 300 mL を二重にしたミラクロスでろ過して菌糸塊を除いた。その後 20,000 × g の遠心分離に 4 °C、20 分の条件で供し、上清を 200,000 × g、4 °C、1 時間の超遠心分離に供して EV 画分を沈殿させた。得られたペレットを resuspension buffer (HEPES (10 mM), EDTA (1 mM), glycerol (10%), KOH で pH7.6 に調製) で懸濁して洗浄し、再度超遠心分離を行なった。洗浄後のペレットを適量の同バッファーで懸濁し、これを EV 画分とした。

(2) 固体培地からの EV 画分の調製

PDA 培地と、寒天 (20 g/L) 加えて凝固させた Kirk-HN 培地、Kirk-LN 培地の 3 種類の寒天培地を使用した。培地の中心にメンブレン (親水性デュラポア、孔径 0.22 μm、直径 47 mm、Merck) を置き、そのメンブレンの中心に 5 mm コルクボーラーで打ち抜いた菌糸を植菌した。各培地につき 30 枚ずつ植菌した。その後、28 °C で 4 日間、菌糸コロニーがメンブレン全体に蔓延するまで培養した。菌糸を培養後、培地からメンブレンを剥がして菌糸を回収し、活性染色と TEM 観察用に半分に分けた。固体培地上の菌糸が細胞外に物質を分泌している状態であるのかを確認するため、フェノールオキシダーゼ活性染色を行った。基質溶液として 1 mM 2,6-dimethoxyphenol 溶液を使用した。予め基質溶液を含ませたる紙の上にメンブレンの半分を菌糸が上になるように浸漬し 10 秒間待った後、メンブレンを取り出して裏返し、1 分後にフェノールオキシダーゼ反応によるメンブレンの変色を観察した。残り半分のメンブレンに付着していると考えられる EV を洗い流して溶液として回収するために、バッファーによる振盪抽出を行った。培養後、メンブレンを培地からはがし、50 mM citrate buffer (pH4.5) 60 mL に菌糸が付着したままのメンブレン 30 枚を菌糸面が下向きになるように浸し、4 °C、140 rpm の条件下で 24 時間振盪して細胞外分泌物を抽出した。3 (1) に従い超遠心分離によって得られた EV 懸濁液を、スクロースクッション法を用いて精製した。

(3) ネガティブ染色を用いた EV 画分の透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察

ネガティブ染色に先立ち、200 メッシュの Cu グリッドに厚さ約 70 nm (干渉色シルバーゴールド) のフォルムパール膜を張り、厚さ 10 nm のカーボンコーティングを行った。グリッド上にサンプル 10 μL を滴下して 10 分間吸着させ、2 %酢酸ウランで 30 秒間染色した後、蒸留水で洗浄した (30 秒 \times 2 回)。十分に乾燥させた後、TEM 観察をおこなった。

(4) TEM 画像中の粒子径測定

TEM 観察によって得られた画像中の小胞は、まず Adobe Photoshop で輪郭をとり、その後 Image J を使用してフェレー径を測定した。粒子径分布を求めるために、Kirk-HN, LN, PDA 由来の EV それぞれ 542 個、963 個、589 個の粒子径を測定した。

4. 研究成果

(1) カワラタケ液体培地からの EV 検出

本実験では、ラッカーゼを多く分泌することで知られるカワラタケ *Trametes versicolor* を供試菌とし、ラッカーゼの分泌が盛んな時期の培養上清から EV 画分を得ることを目指した。既報に従い、液体培地で菌糸を培養した。低速の遠心分離によって培養上清から夾雑物を除いた後、より小さいベシクルも回収するために既報よりも強い 200,000 $\times g$ の超遠心分離に供するという方法で EV 画分の調製を行った。仮に、分泌されたラッカーゼがベシクルに内包されているとすると、超遠心分離によってベシクルが沈殿することで EV 画分にラッカーゼが濃縮され、培養 EV 画分のラッカーゼ活性は培養上清よりも有意に高くなると想定された。しかしながら、EV 画分のラッカーゼ活性は培養上清よりも低く、ラッカーゼが EV に内包されていないこと、ラッカーゼはタンパク質単独では超遠心分離によって沈殿しないことが明らかになった。一方で、得られた EV 画分を各種分析に供したところ、GC/MS 分析により菌類の細胞膜に存在する脂肪酸であるパルミチン酸とステアリン酸が検出されたことから、膜成分の一部が EV 画分に含まれること、SDS-PAGE により EV 画分に複数種類のタンパク質が含まれることが明らかとなった。しかしながら総じて、液体培養により得られた EV 画分に、小胞の存在を直接的に証明するには至らず、培養方法を再検討する必要性が生じた。

(2) カワラタケ固体培地からの EV 検出

元来、木材腐朽菌は木材という固体表面上に菌糸を伸長させて生育しており、液体培地での培養に比べて固体培地での培養の方がより自然環境での菌糸の状態に近いと考えられた。そこで固体培地上の菌糸から EV を回収できるのではないかと仮説を立て、3(2)に従い、メンブレン上での菌糸の培養と EV 回収および観察を試みた。メンブレンから回収し、超遠心分離で得られた EV 画分を TEM で観察したところ、ベシクル様の構造は凝集している状態のものが多く、観察画像のバックグラウンドに夾雑物が多く見られた。そのため個々のベシクルの形態の観察が困難であることから、EV 画分を精製するためにスクロースクッション法を採用した。スクロースクッション法により精製することで、凝集していない状態のベシクルが多く観察された(図 1)。また、細胞外分泌物抽出液の超遠心分離上清を EV 画分と同様にスクロースクッションに供して得られたフラクションには、ベシクル様の構造はほとんど観察されなかった(図 1 b)。さらに、ここで観察されたベシクル様構造を高倍率でさらに詳しく観察したところ、脂質二重膜からなるベシクルであることが明らかになった(図 2)。この結果から、固体培地上で生育した *T. versicolor* 菌糸から、EV が存在することを明確にすることができた。

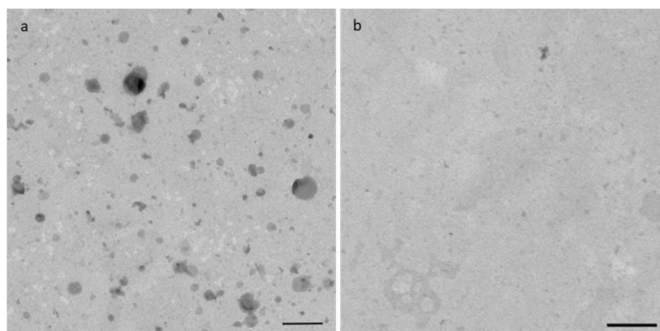


図1 スクロースクッション法により精製されたカワラタケ (*T. versicolor* NBRC30340) 由来の EV 画分の TEM 観察結果 a: EV 画分, b: 超遠心後の上清, スケールバー=500 nm

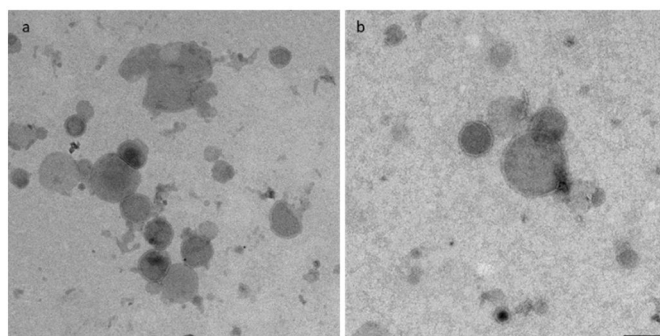


図2 カワラタケ (*T. versicolor* NBRC30340) 由来の EV の脂質二重膜構造 Scale bar=200 nm

(3) 培地の違いが EV の形態に与える影響

3 種類の固体培地から得られた EV 画分をそれぞれスクロースクッションによって精製し、TEM

観察を行った結果を図3に示す。PDA培地由来のEVを乗せたグリッドは、どこを観察してもほぼ安定的に図3bと同じような画像が観察された。一方、Kirk-LN培地由来のEVは、目視による観察からは、EVの出現頻度はグリッド上において比較的低く、一つ一つの直径は比較的大きく見えた(図3c)。Kirk-HN培地由来のEVは、PDA由来のEVと同じくらいに高頻度でEVが確認できたが、直径が小さく見えた(図3a)。これら異なる培地由来のベシクルの粒子径に着目し、その差異を数値化するために画像解析をおこなった結果を図4に示す。Kirk-HN培地では、31-40nmをピークとした山なりの頻度分布となった。PDA培地では、61から80nmをピークとした山なりの頻度分布であった。一方、Kirk-LN培地では、直径40nmから150nmの頻度が比較的高いが、他の2種類の培地と比べて、40nm未満の小径の粒子が少なく130nm以上の大径のEVの頻度が高いという結果が得られた。これらの結果は、同一菌株であっても環境の変化によって分泌するEVの形態が変化することを示している。動物細胞における細胞外分泌小胞であるエクソソームとマイクロベシクルは、同じ脂質膜小胞でありながらも、細胞からの放出メカニズムやマーカーとなるタンパク質が異なり、その粒子径も異なるとされている。以上のようなことから、細胞外ベシクルの粒子径の変化はその機能の変化を示唆しており、今後のEV研究において有益な情報であると考えられる。

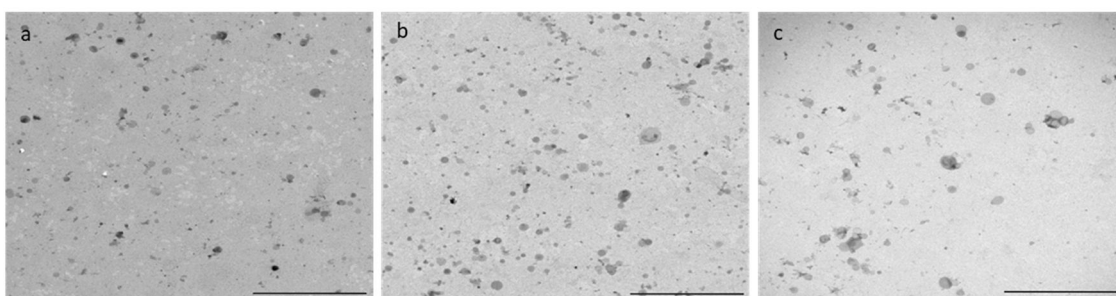


図3 カワラタケを培養した3つの異なる培地から得られたEVのTEM写真 a; Kirk-HN, b; PDA, c; Kirk-LN. Scale bar=2.0 μm

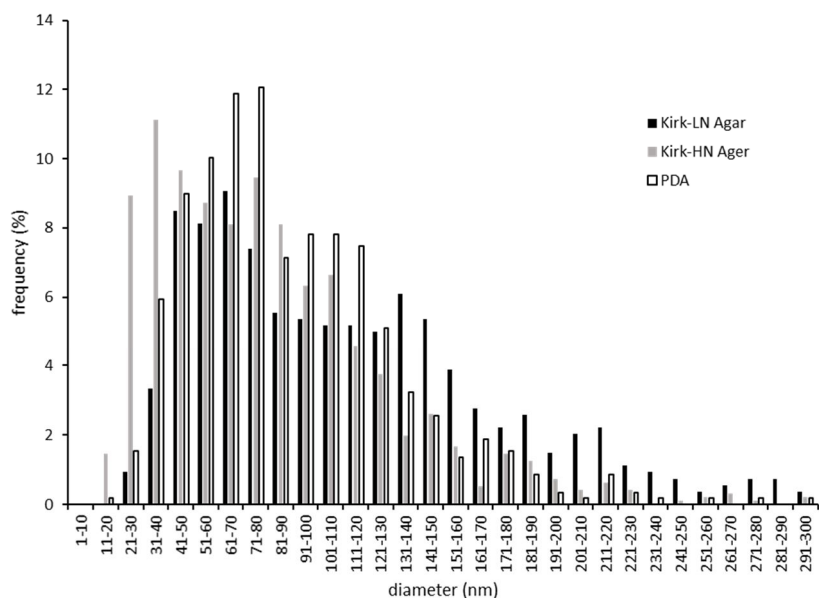


図4 異なる3つの培地で培養したカワラタケ*T. versicolor* NBRC30340由来EVの直径の分布 それぞれ、LN培地は542個、HN培地では963個、またPDA培地では589個のEVの直径を測定し、各種サイズの出現頻度をグラフ化した。

(4) 成果のまとめ

本研究において、固体培地上の菌糸からEVを回収する方法を確立し、白色腐朽菌 *T. versicolor* が細胞外にEVを分泌していることを証明した。また、EV懸濁液を利用した実験を行う際には、バッファー中に均一に懸濁する必要があるのだが、スクロースクッションを用いた精製を行うことでそれを実現できた。*T. versicolor*の分泌するEVは、そのほとんどが直径約20nmから200nmの範囲にあった。興味深いことに、培地条件が異なると粒子径分布に差異が見られた。これはEVの機能の変化や、菌糸が周囲の環境の細かい変化にตอบสนองの可能性を示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 亀井一郎	4. 巻 12
2. 論文標題 多機能型白色腐朽菌によるバイオマス変換技術の開発研究	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 生物資源	6. 最初と最後の頁 2-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 亀井一郎	4. 巻 26
2. 論文標題 POPs分解性菌類とその分解代謝経路	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 農業環境科学研究	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Harry-Asobara Joy L, Kamei Ichiro	4. 巻 29
2. 論文標題 Indirect Bacterial Effect Enhanced Less Recovery of Neonicotinoids by Improved Activities of White-Rot Fungus <i>Phlebia brevispora</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Microbiology and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 809 ~ 812
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4014/jmb.1809.09051	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Harry-asobara Joy L., Kamei Ichiro	4. 巻 9
2. 論文標題 Growth management of white-rot fungus <i>Phlebia brevispora</i> improved degradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 3 Biotech	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s13205-019-1932-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Harry-asobara Joy L., Kamei Ichiro	4. 巻 189
2. 論文標題 Characteristics of White-rot Fungus <i>Phlebia brevispora</i> TMIC33929 and Its Growth-Promoting Bacterium <i>Enterobacter</i> sp. TN3W-14 in the Decolorization of Dye-Contaminated Water	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Applied Biochemistry and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 1183 ~ 1194
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12010-019-03062-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 小関直人、亀井一郎
2. 発表標題 木材の主成分及びコナラ (<i>Quercus serrata</i>) の抽出成分が白色腐朽菌 <i>Stereum</i> sp. TN4F株の菌糸伸長に与える影響
3. 学会等名 第25回日本木材学会九州支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大塚晃生、津山濯、亀井一郎
2. 発表標題 木材腐朽時に白色腐朽菌カワラタケが分泌する細胞外小胞の分画と酵素活性
3. 学会等名 第25回日本木材学会九州支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 亀井一郎
2. 発表標題 POPs分解性菌類とその分解代謝経路
3. 学会等名 第36回農薬環境科学研究会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小川美香, 津山 濯, 亀井一郎
2. 発表標題 白色腐朽菌 <i>Trametes versicolor</i> における細胞外分泌小胞 (Extracellular Vesicles) の探索
3. 学会等名 日本きのこ学会第21回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小川美香, 津山濯, 亀井一郎
2. 発表標題 白色腐朽菌カワラタケ (<i>Trametes versicolor</i>) が生成する細胞外ナノベシクルの探索
3. 学会等名 第68回日本木材学会大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	津山 濯 (Tsuyama Taku) (40786183)	宮崎大学・農学部・助教 (17601)	