

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02119

研究課題名(和文) 有用糸状菌、二形性酵母において生体膜リン脂質が果たしている役割の総合的理解

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of the roles of membrane phospholipids in filamentous fungi and a dimorphic yeast.

研究代表者

堀内 裕之(Horiuchi, Hiroyuki)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・教授

研究者番号：00209280

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：菌類における膜リン脂質に関する研究は単細胞で酵母型生長を行う*Saccharomyces cerevisiae*におけるものがほとんどである。そこで本研究では二形性酵母、糸状菌を対象としてその膜リン脂質合成に関わる数種の遺伝子の破壊株、発現制御株などを作製し、それら遺伝子が二形性酵母、糸状菌の形態形成をなどにおいて果たしている役割の検討を行った。その結果、二形性酵母においてはそれら遺伝子の働きは*S. cerevisiae*と比較的近いものの、糸状菌においては、その生育における重要性などが*S. cerevisiae*とは異なるとともに、菌糸生長、分生子形成などに重要な役割を持つことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

菌類の膜リン脂質の機能に関する研究はこれまでほとんどが酵母*Saccharomyces cerevisiae*を対象として行われてきたのに対し、本研究では、膜リン脂質合成、輸送などに関わる遺伝子に注目し、二形性酵母、糸状菌を用いてその遺伝子破壊株、条件変異株を作製して解析することにより、膜リン脂質の菌糸生長、胞子形成などの形態分化などにおける役割をある程度解明できたことは基礎的な側面から重要な知見である。また本研究で作製した株を利用して今後さらなる解析を行えば、応用的な側面においても産業上有用な知見が得られるとともに産業上有用な菌株の分子レベルでのさらなる育種に貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Many studies on the physiological functions of membrane phospholipids have been performed using a unicellular yeast *Saccharomyces cerevisiae* so far. However, their functions in dimorphic yeasts and filamentous fungi remain to be elucidated. In this study, we constructed and characterized deletion or conditional mutants of phospholipid-related genes of filamentous fungi and a dimorphic yeast. The results obtained in this study showed that their functions of the dimorphic yeast were relatively similar to those in *S. cerevisiae*. In contrast, the functions of these genes in the growth of filamentous fungi were more critical than those of *S. cerevisiae*. We also showed that these gene products played crucial roles in various processes, such as hyphal tip growth, conidiophore formation, and conidiation of the filamentous fungi.

研究分野：微生物遺伝学

キーワード：糸状菌 二形性酵母 リン脂質 菌糸生長 形態形成

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

糸状菌、二形性酵母には産業上有用なものが多数存在する。産業上有用な糸状菌、二形性酵母をより高度に利用するためには、これら有用な菌類について分子レベルで深く理解することが必要不可欠である。二形性酵母を含めた菌糸状の形態で生育する生物は単細胞生物である酵母 *Saccharomyces cerevisiae* と異なり多細胞で生活する。さらに糸状菌においては無性孢子形成器官の分化、無性孢子形成等、二形性酵母においては酵母型、偽菌糸型、真性菌糸型等、様々な形態変化を引き起こす。これらのことから菌糸状の形態で生育する生物の遺伝子には *S. cerevisiae* にオルソログがあるものでも *S. cerevisiae* にはない菌糸状の生育に特有な機能を合わせ持つことが考えられ、実際にそのような例は多数報告されている。

真核生物の細胞には様々なオルガネラが存在し、それらはそれぞれ膜構造に覆われている。これら膜構造の主成分にはリン脂質であるホスファチジルコリン (PC)、ホスファチジルエタノールアミン (PE)、ホスファチジルセリン (PS)、ホスファチジルイノシトール (PI)、ホスファチジン酸 (PA)、カルジオリピン (CL) などが存在する。これらのリン脂質含量は、各オルガネラ膜ごとに異なっておりそれぞれ一定に保たれているが、それぞれの膜における各リン脂質の果たしている役割については未解明の部分が多い。*S. cerevisiae*、*Schizosaccharomyces pombe* においては PS、PI(4,5)二リン酸が極性部位に存在していること、PS が細胞極性の維持に関わること等が報告されていた (Nat. Cell Biol. 13: 1424-1430, 2011、MBC 28: 210-220, 2017、Proc. Natl. Acad. Sci. 107: 11805-11810, 2010 等)。しかし、糸状菌 *Aspergillus nidulans* における PS の主要局在部位は菌糸先端部の細胞表層ではないこと (Mol. Microbiol. 97: 18-32, 2015)、PI(4,5)二リン酸も細胞膜に比較的均一に分布していること (Mol. Biol. Cell 20: 4335-4347, 2009) が報告されていた。科研費受領者のグループでは、糸状菌 *A. nidulans* を用いた予備的実験で酵母と糸状菌ではリン脂質の機能、またはリン脂質の成分含量の変化が及ぼす生理的影響等において大きく異なる部分があることを示唆するデータを得ていた。

2. 研究の目的

以上のことから糸状菌、二形性酵母など菌糸状に生育する生物において、膜リン脂質成分がそれぞれどのような役割を果たしているのかを総合的に理解し、その生理的意義を明らかにすることを目的とした。解析の対象としては糸状菌として *Aspergillus oryzae* と *A. nidulans*、二形性酵母として *Yarrowia lipolytica* を用いた。

3. 研究の方法

1) 使用菌株と破壊株、プロモーター置換株の作製

Y. lipolytica CXAU1 株 (*MATA ade1 ura3*) (Yeast 14: 1387-1397, 1998) とその派生株

A. oryzae R40 $\Delta ku5$ -2 $\Delta pyrG$ 株 ($\Delta ku70 \Delta pyrG$) (丸山潤一博士より御分与) とその派生株

A. nidulans A1145 株 (*pyrG89 pyrA4 riboB2 nkuA::argB*)、A1149 株 (*pyrG89 pyrA4 nkuA::argB*) (Fungal Genetics Stock Center) とその派生株

以上の株を用いて各遺伝子破壊株、プロモーター置換株等を作製した。方法は定法に従った。

2) リン脂質組成の解析

Bligh と Dyer の方法 (Can. J. Biochem. Physiol. 37: 911-917, 1959) によりリン脂質を抽出し TLC により分離し定量した (Biochim. Biophys. Acta 260: 222-243, 1972 J. Biol. Chem. 234: 466-468, 1959)。

4. 研究成果

1) *Y. lipolytica* におけるリン脂質合成、輸送関連遺伝子破壊株の解析

図1に *S. cerevisiae* において明らかにされているリン脂質合成経路を示したが、このうちホスファチジルセリン(PS)、ホスファチジリエタノールアミン(PE)、ホスファチジルコリン(PC)の合成に与する Pss1、Psd1、Psd2、Pem1、Pem2、Cct1 をコードする遺伝子の *Y. lipolytica* でのオルソログ(それぞれ *PSS1*、*PSD1*、*PSD2*、*PEM1*、*PEM2*、*CCT1* と命名)について破壊株を作製し解析を行った。

PS 合成酵素をコードする *PSS1* の破壊株においては、生育にエタノールアミン(Etn)とコリン(Cho)を含まない最少培地では生育できなかったが、培地に上記の物質を添加した場合は野生株と同程度の生育を示した。さらにこの株をグルコースを炭素源として Etn と Cho を添加した最少培地で培養しそのリン脂質

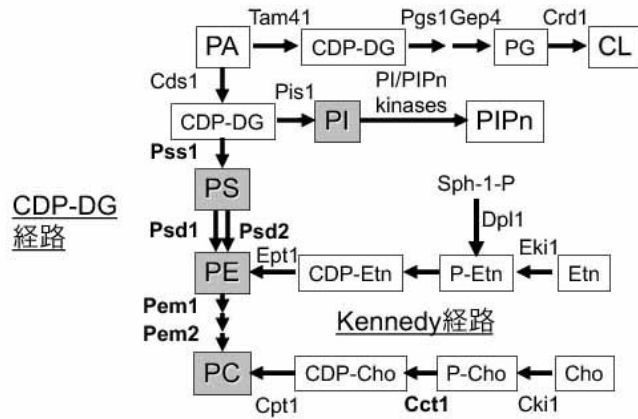


図1. *S. cerevisiae* の主要リン脂質合成経路

PIPn, ホスホイノシチド; Etn, エタノールアミン; P-Etn, エタノールアミンリン酸; CDP-Etn, CDPエタノールアミン; Cho, コリン; P-Cho, コリンリン酸; CDP-Cho, CDPコリン; PG, ホスファチジルグリセロール。本研究で対象とした酵素を太字で示し、本研究で扱ったリン脂質分子種を灰色の網掛けで示した。

組成について解析したところ、PS がほぼ検出限界以下まで減少し、PE も減少する一方、ホスファチジレイノシトール(PI)と PC が野生型株と比較して増加していることが明らかとなった。PE と PC については野生型株と大きな変化は見られなかった。*Y. lipolytica* は二形性酵母であり固体最少培地で培養した場合、野生型株では菌糸型生長がみられるが、*PSS1* 破壊株においても菌糸型生長はみられた。このことから PS は *Y. lipolytica* の菌糸型生長には必須ではないことが示唆された。

PS から PE を合成する2種類の PS デカルボキシラーゼ(PSD)をそれぞれコードする *PSD1* と *PSD2* については、それぞれの単独破壊株と *PSD1 PSD2* 二重破壊株を作製し解析を行った。*PSD1* 破壊株は Etn または Cho を含まない最少培地では生育に遅れが見られ、*PSD2* 破壊株は野生型株と同様の生育を示した。さらに *PSD1* と *PSD2* の二重破壊株を作製したところ Etn または Cho を含まない最少培地では生育が認められなかった。*PSD1* 破壊株、*PSD1 PSD2* 二重破壊株は培地に Etn または Cho を添加しても野生型株と比較して完全には生育が回復しなかった。また *PSD1* 破壊株、*PSD2* 破壊株、*PSD1 PSD2* 二重破壊株とも Etn と Cho を添加した固体培地上での菌糸型生長に異常は見られなかった。*PSD1 PSD2* 二重破壊株についてはさらに Etn と Cho を添加した最少培地で対数増殖期まで培養した菌体についてリン脂質組成を解析した。その結果、野生型株と比較して PE が減少し、PS、PC が増加することが明らかとなった。さらに Etn と Cho を添加した最少培地で対数増殖期まで培養した菌体を Etn と Cho を含まない最少培地で1日間培養した菌体についてリン脂質解析を行った。その結果 *PSD1 PSD2* 二重破壊株では野生型株と比較して PE が有意に減少し、PS が増加する傾向が見られた。さらに Etn と Cho を添加した最少培地で対数増殖期まで培養した菌体を、Etn と Cho を加えた培地と加えない培地で培養し、その細胞形態について細胞の長軸と短軸の比を取ることで解析したところ培養時間が長くなるにつれて *PSD1 PSD2* 二重破壊株ではその比が小さくなることが明らかになった。

PE から PC を段階的に合成する酵素をそれぞれコードする *PEM1*、*PEM2* についても、それぞ

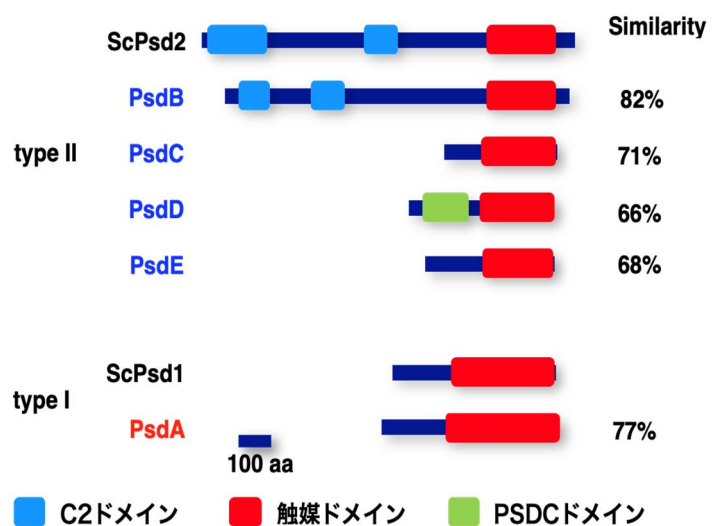
れの単独破壊株、*PEM1 PEM2* 二重破壊株を作製し、同様の解析を行った。*PEM1* 破壊株、*PEM2* 破壊株とも Etn または Cho を含まない最少培地では生育に遅れが見られたが *PEM2* 破壊株の生育の遅れはより大きかった。*PEM1 PEM2* 二重破壊株は生育が認められなかった。これら生育の欠損は培地に Etn を加えても回復しなかったが Cho を加えた場合にはほぼ野生型株並みに回復した。また *PEM1* 破壊株、*PEM2* 破壊株、*PEM1 PEM2* 二重破壊株とも Etn と Cho を添加した固体培地上での菌糸型生長に異常は見られなかった。*PEM1 PEM2* 二重破壊株についてはさらに Etn と Cho を添加した最少培地で対数増殖期まで培養した菌体についてリン脂質組成を解析した。その結果、野生型株と比較して PS が減少し、PE が増加する傾向が見られた。Etn と Cho を添加した最少培地で対数増殖期まで培養した菌体を Etn と Cho を含まない最少培地で 1 日間培養した菌体についてリン脂質解析を行った場合には、*PEM1 PEM2* 二重破壊株では野生型株と比較して PC が大幅に減少し、PE が大きく増加した。一方 Etn と Cho を添加した最少培地で対数増殖期まで培養した菌体を、Etn と Cho を加えた培地と加えない培地で培養し、その細胞形態について解析したところ培養時間が長くなるにつれて *PEM1 PEM2* 二重破壊株でも *PSD1 PSD2* 二重破壊株と同様にその比が小さくなることが明らかになった。

Kennedy 経路による Cho から PC の合成に関わる酵素をコードする *CCT1* の破壊株についても作製しその生育を観察したが、Etn と Cho を含まない最少培地においても野生型株と同様の生育を示した。

一方、*S. cerevisiae* においてリン脂質の輸送に関わることが示されている Sec14 ファミリータンパク質のうち *SFH5* の *Y. lipolytica* におけるオルソログである *SFH51*、*SFH52* のそれぞれ単独破壊株、二重破壊株を作製し生育を検討したが最少培地においても野生型株と同様の生育を示した。

2) *A. nidulans* におけるリン脂質合成酵素遺伝子の機能解析

Aspergillus 属の糸状菌のモデルとして扱われてきた *A. nidulans* においては、*S. cerevisiae* の *PSSI* のオルソログ *choA* が生育に必須の遺伝子であることが示唆されており (Mol. Microbiol. 97: 18-32, 2015)、*PEM2* のオルソログである *choC* については破壊株が取得されその生育などについてある程度解析が行われている (Curr. Genet. 56: 283-296, 2010)。一方、*PSD1*、*PSD2* のオルソログについては機能の解析がなされていなかったため本研究で解析を行った。*A. nidulans* のゲノム配列より *S. cerevisiae* の *PSD1* のオルソログとして *psdA*、*PSD2* のオルソログとして *psdB*、*psdC*、*psdD*、*psdE* の計 5 種の遺伝子が存在する



ことが明らかとなった (図 2) *psd* オルソログ遺伝子のうち *psdE* はいくつかの条件において検討しても発現がほとんど確認できなかったため *psdA*~*psdD* の 4 種の遺伝子について機能解析を行った。

図 2 *A. nidulans* と *S. cerevisiae* の PSD の構造

図中 Sc は *S. cerevisiae* の遺伝子産物を示す。

まず *psdB*、*psdC*、*psdD* についてその破壊株を作製し表現型の検討を

行ったところ、*psdC* 破壊株、*psdD* 破壊株は野生型株と同様の生育を示したのに対し *psdB* 破壊株は最少培地 37 度での生育が野生型株と比較して大幅に遅れがみられ、菌糸は多分岐となっていた。*psdB* 破壊株は 25 度では非常に生育が悪く分岐の程度はさらに大きかった。これらの生育の遅れは培地に Etn または Cho を添加することによりある程度回復が見られた。さらに *psdB* 破壊株は分生子をほとんど形成せず、分生子形成機関の形態にも異常が見られた。これら分生子形成に関わる異常は培地に Etn または Cho を添加することにより回復した。*psdB* 破壊株、*psdC* 破壊株、*psdD* 破壊株から菌体抽出液を調製し PSD 活性を測定したところ、*psdC* 破壊株、*psdD* 破壊株では野生型株と比較して有意な差は見られなかったのに対し、*psdB* 破壊株では野生型株の 20% 程度まで減少していた。*psdB* 破壊株についてはそのリン脂質組成についても検討を行った。その結果、野生型株と比較して *psdB* 破壊株では PS と PC が増加し PE と PA が減少した。これらの変化は培地に Etn または Cho を加えることにより部分的に回復した。以上の成果は J. Biosci. Bioeng. 誌で発表した (JBB 131: 139-146, 2021)。

psdA については破壊株の取得を試みたが取得できず、生育に必須の遺伝子であることが示唆された。そこで *A. nidulans* において培地へのチアミンの添加の有無により発現制御可能な *thiF* プロモーター下で *psdA* を発現させる株を作製したが、元来 *psdA* の細胞内での発現量が非常に少なく *thiF* プロモーター発現抑制条件下でも *PthiF-psdA* の発現量が野生型の *psdA* の発現量より多くなってしまい *psdA* の発現を低下させた場合の影響を検討することができなかった。

3) *A. oryzae* におけるリン脂質合成酵素遺伝子の機能解析

麹菌 *A. oryzae* においては *S. cerevisiae* の *PEM1*、*PEM2* のオルソログ (それぞれ *pemA*、*pemB* と命名) について、5' -RACE 法を用いてその転写開始点を決定しそのプロモーターを人為的に発現調節可能な *amyB* プロモーター、*thiA* プロモーターにつないだ株 (それぞれ aB-*pemA* 株、tA-*pemA* 株、aB-*pemB* 株、tA-*pemB* 株と命名) を作製し、*pemA*、*pemB* の発現抑制、高発現の影響について検討を行った。まず tA-*pemA* 株、tA-*pemB* 株を用いて *pemA*、*pemB* をそれぞれ発現抑制したところ、どちらの株も野生型株と比較して生育が非常に悪化し、菌糸の分岐も増加した。さらに、これらの条件では分生子をほとんど形成しなかった。これらの表現型の異常は、培地に Cho を添加することによって回復したが、培地に Etn を添加しても部分的にしか回復しなかった。一方、aB-*pemA* 株、aB-*pemB* 株を用いて *pemA*、*pemB* をそれぞれ高発現させた結果、aB-*pemA* 株では生育に遅れが見られ、どちらの株でも分生子形成器官に形態の異常が見られた。さらに、aB-*pemA* 株については *pemA* の高発現条件下でリン脂質組成の解析を行ったところ PC の割合が増加する結果が得られた。この株については *pemA* の高発現条件下で菌体外へのタンパク質の分泌の影響も検討したが、分泌タンパク質のパターンが野生型株と比較して変化していた。以上の結果の一部は 2021 年度の日本農芸化学会大会において発表した。

以上、本研究で得られた結果をまとめると二形性酵母 *Y. lipolytica* の結果はこれまで *S. cerevisiae* で得られていた結果と比較的近いものであり、リン脂質の組成の変化の菌糸型生長への影響は大きくはなかったが、糸状菌 *A. nidulans*、*A. oryzae* においてはリン脂質組成の変化が菌糸生長、分生子形成器官形成に大きな影響を与えることが明らかになった。また、タンパク質の分泌にも影響を与えることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 K. Takagi, A. Kikkawa, R. Iwama, R. Fukuda, and H. Horiuchi	4. 巻 131
2. 論文標題 Type II phosphatidylserine decarboxylase is crucial for the growth and morphogenesis of the filamentous fungus <i>Aspergillus nidulans</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. Biosci. Bioeng.	6. 最初と最後の頁 139-146
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiosc.2020.10.002	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 須澤徹生、岩間亮、福田良一、堀内裕之
2. 発表標題 糸状菌 <i>Aspergillus oryzae</i> の CH02/PEM1 オルソログの機能解析と菌糸生長への影響
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021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
連携研究者	福田 良一 (Fukuda Ryouichi) (50323481)	東京大学・大学院 農学生命科学研究科・准教授 (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------