

平成 20 年 5 月 28 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007 年度～2008 年度

課題番号：19780053

研究課題名(和文) 糸状菌特異的なオルガネラである Woronin body の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of Woronin body, an organelle specifically found in filamentous fungi

研究代表者

丸山 潤一 (MARUYAMA JUN-ICHI)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教

研究者番号 00431833

研究成果の概要：

糸状菌は多数の細胞が連なった菌糸として生育する。隣接する細胞は隔壁により仕切られ、そこにあいた小さな穴である隔壁孔を通じて細胞質連絡を行っている。真正子囊菌綱に属する糸状菌に特異的に存在するオルガネラ Woronin body は、通常隔壁近傍に存在し、菌糸損傷時には隔壁孔をふさぎ、隣接する細胞への溶菌の伝播を防ぐ働きを有する。本研究では、Woronin body がペルオキシソームから分化する機構、および Woronin body タンパク質をコードする遺伝子の選択的スプライシングによる Woronin body の形態・機能の制御についての知見が得られた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 19 年度	2,300,000	0	2,300,000
平成 20 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	330,000	3,730,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：糸状菌、Woronin body、ペルオキシソーム、選択的スプライシング、麹菌

1. 研究開始当初の背景

真正子囊菌綱に属する糸状菌は、多数の細胞が連なった菌糸として生育する。隣接する細胞は隔壁により仕切られ、そこにあいた小さな穴である隔壁孔を通じて細胞質連絡を行っている。真正子囊菌綱に属する糸状菌に特異的に存在するオルガネラ Woronin body は、通常隔壁近傍に球形の構造として観察され

るが、菌糸損傷時には隔壁孔をふさぎ、隣接する細胞への溶菌の伝播を防ぐ働きを有する。ロシアの生物学者 M. Woronin による発見から約 150 年が経過したものの、10 年前までは Woronin body の形成機構および機能について分子レベルの解析はほとんど進んでいなかった。

2. 研究の目的

研究開始時までに研究代表者は、Woronin body タンパク質をコードする *Aohex1* 遺伝子を麹菌 *Aspergillus oryzae* よりクローニングし、その破壊株において Woronin body が消失し、溶菌の伝播を防ぐことができないことを観察した。また、選択的スプライシングにより分子量の違う2つの AoHex1 タンパク質(スプライシング型 AoHex1 (sAoHex1), 非スプライシング型 AoHex1 (nsAoHex1))が発現していることを明らかにした(Maruyama *et al.*, 2005)。しかし、Woronin body における選択的スプライシングの役割はわかっていなかった。さらに、AoHex1 タンパク質にはペルオキシソーム局在配列が存在することから、Woronin body がペルオキシソームの派生器官であることが示唆された。しかし、Woronin body がペルオキシソームから分化する機構に関する知見はほとんどなかった。本研究では、Woronin body の機能・形成におけるペルオキシソーム、および *Aohex1* 遺伝子の選択的スプライシングの役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Woronin body がペルオキシソームから分化する機構に関する解析

ペルオキシソームの分裂・増殖に必要な *PEX11* 遺伝子に相同な遺伝子について、破壊株を作製した。ペルオキシソームの機能とともに Woronin body の分化について表現型解析を行った。

(2)Woronin body における *Aohex1* の選択的スプライシングの役割の解析

Aohex1 破壊株に sAoHex1 または nsAoHex1 を単独で発現させることで、それぞれの相補能を調べた。具体的には、Woronin body の機能および形態について表現型解析を行った。

4. 研究成果

(1) Woronin body がペルオキシソームから分化する機構に関する解析

ペルオキシソームの分裂・増殖に必要な *Pex11* に着目し、*A. oryzae* より *PEX11* 相同遺伝子を2つ見出した。それぞれ *Aopex11-1*、*Aopex11-2* と命名し、これらの遺伝子破壊株を取得した。*Aopex11-1* 遺伝子破壊株では、炭素源がオレイン酸のときに生育阻害が認められ、ペルオキシソームの数が減少するとともに肥大化していた。このことから、*AoPex11-1* がペルオキシソームの分裂・増殖に関与することが確認された。さらに *Aopex11-1* 遺伝子破壊株では、Woronin body

の機能が低下し、ペルオキシソーム膜に結合するが分化はできない Woronin body が観察された。一方、*Aopex11-2* 遺伝子破壊株では、ペルオキシソームおよび Woronin body について変化は観察されなかった。

以上の結果により、*AoPex11-1* が Woronin body の分化に関与することを明らかにした。本研究は、Woronin body の分化にペルオキシソーム分裂増殖因子が関与することを初めて示したものであり、*Eukaryotic cell* 誌においてこの研究成果が評価され掲載された。今後は、*AoPex11-1* に関連する分子を探索することで Woronin body の分化機構の全容が解明されることが期待される。

(2)Woronin body における *Aohex1* の選択的スプライシングの役割の解析

選択的スプライシングで生じる2つの AoHex1 の機能を解析するため、*Aohex1* 破壊株に sAoHex1 または nsAoHex1 を単独で発現させ、それぞれの相補能を調べた。その結果、sAoHex1 は破壊株を相補したのに対し、nsAoHex1 のみでは完全には相補できなかった。よって、Woronin body の機能は、主に sAoHex1 が担っていることが示唆された。さらに、透過型電子顕微鏡により Woronin body の形態を観察した結果、sAoHex1 単独発現株では通常の球形とは異なる六角形の構造が観察された。一方、nsAoHex1 単独発現株では不定形をしたものが多く観察された。このことから、2つの AoHex1 タンパク質の構成によって Woronin body の形態が変化することが明らかとなった。

以上の結果により、Woronin body の機能と形態に *Aohex1* の選択的スプライシングが関与していることが示唆された。Woronin body の制御における選択的スプライシングに関する研究はこれが初めてであり、選択的スプライシングの知見が乏しい糸状菌において貴重な研究成果であると考えられる。また、同様の選択的スプライシングが他の糸状菌(植物病原菌など)においても起こることが知られており、応用的にも波及効果を及ぼすことが期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 7件)

(1) C. S. Escano, P. R. Juvvadi, F. J. Jin, T. Takahashi, Y. Koyama, S. Yamashita, J. Maruyama, K. Kitamoto (2009) Disruption of the *Aopex11-1* gene involved in peroxisome proliferation leads to impaired Woronin body formation in *Aspergillus oryzae*.

- Eukaryot. Cell, Vol. 8, 296-305. (査読あり)
- (2) J. Maruyama, K. Kitamoto (2008) Multiple gene disruptions by marker recycling with highly efficient gene-targeting background (*ligD*) in *Aspergillus oryzae*. Biotechnol. Lett., Vol. 30, 1811-1817. (査読あり)
 - (3) P. R. Juvvadi, J. Maruyama, K. Kitamoto (2007) Phosphorylation of the *Aspergillus oryzae* Woronin body protein, AoHex1, by protein kinase C: evidences for its role in the multimerization and proper localization of the Woronin body protein. Biochem. J. Vol. 405, 533-540. (査読あり)
 - (4) T. Akao, M. Sano, O. Yamada, T. Akeno, K. Fujii, K. Goto, S. Ohashi, Kunihiro, K. Takase, M. Yasukawa, Watanabe, K. Yamaguchi, Y. Kurihara, J. Maruyama, P.R. Juvvadi, A. Tanaka, Y. Hata, Y. Koyama, S. Yamaguchi, N. Kitamoto, K. Gomi, K. Abe, M. Takeuchi, T. Kobayashi, H. Horiuchi, K. Kitamoto, Y. Kashiwagi, M. Macida, O. Akita (2007) Analysis of expressed sequence tags from the fungus *Aspergillus oryzae* cultured under different conditions. DNA Res. Vol. 14, 47-57. (査読あり)
 - (5) 丸山 潤一「多細胞生物」麹菌の隔壁孔を介した細胞間コミュニケーション」醸造協会誌、Vol. 104、98-104 (2009) (査読なし)
 - (6) 丸山 潤一「隔てられても心はひとつ? - 麹菌の隔壁孔を介した細胞間コミュニケーション」生物工学会誌、Vol. 86、292 (2008) (査読なし)
 - (7) 正路淳也、樋口裕次郎、丸山潤一、北本勝ひこ「糸状菌オルガネラの形態とその極性依存的な配置」蛋白質核酸酵素、Vol. 53, 753-759 (2008) (査読なし)

〔学会発表〕(計 11件)

- (1) 丸山 潤一「麹菌 *A. oryzae* におけるストレス条件下での隔壁孔を介した細胞質連絡の解析」日本農芸化学会大会、(平成 21 年 3 月 27 日～29 日 福岡)
- (2) 岩崎 健太郎「麹菌の Woronin body タンパク質 AoHex1 の選択的スプライシング産物によるアカパンカビにおける機能相補解析」日本農芸化学会大会、(平成 21 年 3 月 27 日～29 日 福岡)
- (3) Cristopher ESCANO “Functional characterization of the AoS0 protein in *Aspergillus oryzae*” 日本農芸化学

- 会大会、(平成 21 年 3 月 27 日～29 日 福岡)
- (4) 佐々木 智江美「麹菌 *A. oryzae* における AoFus3 の機能および局在解析」日本農芸化学会大会、(平成 21 年 3 月 27 日～29 日 福岡)
 - (5) 岩崎 健太郎「*A. oryzae* の Woronin body タンパク質 AoHex1 における選択的エキソンにより付加される 50 アミノ酸の機能解析」日本生物工学会大会(平成 20 年 8 月 27 日～29 日 仙台)
 - (6) 尹 載宇「麹菌 *Aspergillus oryzae* の *ligD* 遺伝子欠損によるプロテアーゼ遺伝子多重破壊株の取得」日本生物工学会大会(平成 20 年 8 月 27 日～29 日 仙台)
 - (7) Cristopher ESCANO “Disruption of the *Aopex11-1* gene involved in peroxisome proliferation resulted in immature differentiation of Woronin body in *Aspergillus oryzae*” 9th European Conference on Fungal Genetics (April 5 - 8, 2008 Edinburgh, Scotland)
 - (8) 田鍋 康子「麹菌 *A. oryzae* のペルオキシソーム移行シグナル受容体の Woronin body 機能発現における役割」日本農芸化学会大会(平成 20 年 3 月 26 日～29 日 名古屋)
 - (9) 岩崎 健太郎「麹菌 *A. oryzae* における *Aohex1* 遺伝子の選択的スプライシングが Woronin body に与える影響」日本農芸化学会大会(平成 20 年 3 月 26 日～29 日 名古屋)
 - (10) 丸山 潤一「光変換型蛍光タンパク質による麹菌の隔壁孔を介した細胞間連絡の観察」日本農芸化学会大会(平成 20 年 3 月 26 日～29 日 名古屋)
 - (11) Cristopher ESCANO “Effect of disruption of the *Aopex11* genes involved in peroxisome biogenesis on Woronin body formation in *Aspergillus oryzae*” 日本生物工学会大会(平成 19 年 9 月 25 日～27 日 広島)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕
なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

丸山 潤一 (MARUYAMA JUN -ICHI)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教

研究者番号：19780053

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし