

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21780065

研究課題名（和文） “多細胞生物”糸状菌における細胞質連絡の制御機構の解析

研究課題名（英文） Studies on molecular mechanisms regulating intercellular communication in filamentous fungi, multicellular organisms

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（和文）：

糸状菌は多細胞であり、隣接する細胞が隔壁孔と呼ばれる小さな穴を介して、細胞質連絡を行っているが、本研究ではそれを制御する分子機構の解明を試みた。AoSO はストレス依存的に隔壁孔に凝集するタンパク質であるが、その過程に必要な AoSO の領域を同定した。隔壁孔に局在する MAP キナーゼ AoFus3 と相互作用する、新規隔壁孔局在タンパク質を同定した。

細胞質連絡を制御するオルガネラ Woronin body の形成機構を解析するなかで、ペルオキシソームがビオチンの生合成に関与することを世界で初めて発見した。

研究成果の概要（英文）：

Filamentous fungi grow as multicellular organisms, in which flanking cells communicate with each other via the septal pore. This project aimed to elucidate molecular mechanisms regulating the intercellular communication. AoSO that aggregates at the septal pore in response to stresses, and we identified protein regions responsible for the stress-responsive aggregation at the septal pore. Novel proteins localizing at the septal pore were identified through a screening for AoFus3 MAP kinase-interacting proteins.

We discovered a novel function of peroxisomes for biotin biosynthesis during investigating biogenesis processes of Woronin body, an organelle that regulates the intercellular communication.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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、多細胞生物、細胞質連絡、隔壁孔、麴菌、ペルオキシソーム、ビタミン、ビオチン

1. 研究開始当初の背景

子囊菌類などの糸状菌は多細胞であり、隣接する細胞は隔壁にあいた小さな穴（隔壁孔）を通じて細胞質連絡を行っている。この細胞質連絡は、動物（ギャップ結合）や植物（原形質連絡）にも共通して見られる特徴である。

一方で、この性質は、ある細胞が溶菌した場合、隣接する細胞に溶菌が伝播する危険をもたらす。Woronin body は子囊菌類に属する糸状菌に特異的に存在するオルガネラであり、隔壁孔をふさいで溶菌の伝播を防ぐ機能をもつことが知られている。

研究代表者らは以前、麴菌 *Aspergillus oryzae* のコロニーに水をかけて低浸透圧ショックを与えると、菌糸先端が溶菌することを発見した。この際に、Woronin body が溶菌の伝播を防ぐために、隔壁孔をふさぐ様子を、蛍光タンパク質を用いて可視化することに成功した。また、Woronin body がペルオキシソームから分化・形成することと、その際にペルオキシソームの分裂・増殖装置を利用することを明らかにした。

研究代表者らは、AoSO タンパク質がストレス依存的に隔壁孔に凝集することを発見し、糸状菌が環境に応じて細胞質連絡を制御している可能性を示唆した。

さらに、MAP キナーゼである AoFus3 タンパク質は通常条件で隔壁孔に局在することを発見し、溶菌時に隣接する細胞への溶菌の伝播を防ぐのに関与することを示した。

しかし、麴菌をはじめとして糸状菌における細胞質連絡を制御する分子機構に関して、これまでの知見は断片的であり、その全貌まではあまり明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では、糸状菌における細胞質連絡を制御する分子機構を明らかにすることを目的として、以下の実験を行った。

AoSO がストレスに反応して隔壁孔に凝集する分子機構の解析、隔壁孔局在 MAP キナーゼ AoFus3 と相互作用するタンパク質のスクリーニング、Woronin body 機能におけるペルオキシソームの役割について解析を行った。

3. 研究の方法

1) AoSO タンパク質がストレス依存的に隔壁孔に凝集する機構の解析

AoSO の部分欠失体を緑色蛍光タンパク質 EGFP と融合して、出芽酵母および麴菌で発現させた。これらがストレス依存的に凝集するか、その凝集が隔壁孔に局在するかどうかを、蛍光顕微鏡により観察した。

2) 新規の隔壁孔局在タンパク質の同定

隔壁孔局在タンパク質 AoFus3 に TAP (tandem affinity purification) タグを融合して、麴菌に発現させた。TAP タグを利用してアフィニティ精製を行い、AoFus3 に結合したタンパク質を取得した。トリプシン消化により生成したペプチド断片について LC-MS/MS 解析を行い、麴菌タンパク質配列のデータベースを利用して同定した。

3) Woronin body がペルオキシソームから分化・形成する機構の解析

ペルオキシソーム移行配列 PTS1, PTS2 をもつタンパク質は、それぞれの受容体である Pex5, Pex7 によりペルオキシソームに運ばれる。麴菌において、この2つのPTS受容体をコードする遺伝子 *Aopex5*, *Aopex7* を破壊し、Woronin body の機能などの表現型解析を行った。

4. 研究成果

1) AoSO タンパク質がストレス依存的に隔壁孔に凝集する機構の解析

AoSO は 1195 アミノ酸からなる巨大なタンパク質であり、WW ドメイン以外の既知のドメイン構造は存在しない。本研究では、AoSO の凝集機構を明らかにするために、欠失解析を行った。

まず、出芽酵母においても AoSO がストレス依存的に凝集することを確認した。そして、AoSO 部分欠失体に緑色蛍光タンパク質 EGFP と融合して出芽酵母で発現させた。その結果、部分欠失体 AoSO[556-1146] がストレス依存的に凝集するのに十分であることを明らかにした。

続いて、麴菌において同様の観察実験を行った結果、前述の AoSO[556-1146] に、C 末端の約 50 アミノ酸を加えた部分欠失体 AoSO[556-1195] が隔壁孔への局在を示した。このことから、AoSO の凝集が隔壁孔に局在するのに、C 末端領域 (AoSO[1147-1195]) が必要であることがわかった。

また、寒天培地で生育したコロニーに水をかけ先端細胞を溶菌させる低浸透圧ショック実験において、各 AoSO 部分欠失体が、溶菌の伝播を防ぐ機能が低下した *Aoso* 遺伝子破壊株を相補するか解析した。その結果、部分欠失体 AoSO[556-1195] が隣接する細胞への溶菌の伝播を防ぐのに十分であることを明らかにした。

ストレス依存的に隔壁孔に局在するタンパク質の研究は本研究が唯一であり、そのプロセスに必要な領域を同定したことは、ストレス依存的な細胞質連絡制御の解明に向け

て大きな前進であると考えている。

2) 新規の隔壁孔局在タンパク質の同定

MAP キナーゼ AoFus3 が隔壁孔で機能するメカニズムを解析することを目的として、TAP (tandem affinity purification) タグを用い、相互作用するタンパク質をスクリーニングした。その結果、2 つの新規タンパク質が同定され、これらが AoFus3 と同様に隔壁孔に局在することを示した。

糸状菌において、MAP キナーゼと相互作用するタンパク質を同定し、それが隔壁孔に局在することを示したのは、本研究が初めてである。今後、2 つの新規タンパク質の細胞質連絡における機能を解析することで、隔壁孔における AoFus3 の作用機序が明らかになることが期待される。

3) Woronin body がペルオキシソームから分化・形成する機構の解析

ペルオキシソーム移行配列受容体をコードする遺伝子破壊株 ($\Delta Aopex5$, $\Delta Aopex7$) では、ペルオキシソームの機能である脂肪酸の β 酸化に欠損を示した。また、*Aopex5* 遺伝子破壊株のみ、溶菌の伝播を防ぐ Woronin body の機能が顕著に低下した。この結果から、Woronin body の機能には PTS1 をもつタンパク質が関与し、PTS2 をもつタンパク質は必要ないことがわかった。

一方で、2 つのペルオキシソーム移行配列受容体欠損株が、グルコースを炭素源とする最少培地で生育阻害を示すことを見いだした。原因を調べた結果、これらの株がビオチン要求性であることを発見した。ビオチン合成酵素のひとつである BioF がペルオキシソームに局在し、そのペルオキシソーム局在がビオチン合成に必要であることを証明した。以上により、ペルオキシソームがビオチンの合成に関与することを世界で初めて発見した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- 1) Y. Tanabe, J. Maruyama, S. Yamaoka, D. Yahagi, I. Matsuo, N. Tsutsumi, K. Kitamoto, Peroxisomes are involved in biotin biosynthesis in *Aspergillus* and *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.*, Vol. 286, 2011, 30455-30461. (査読有り)
- 2) 丸山 潤一 「“多細胞生物” 糸状菌の隔壁孔を介した細胞間連絡」*マイコトキシン*, Vol. 61, 2011, 53-58. (総説)

- 3) 丸山 潤一 「多細胞生物としての糸状菌の生存戦略 -隔壁孔を介した細胞間連絡の制御機構」*バイオサイエンスとインダストリー*, Vol. 68, 2010, 341-345. (総説)
- 4) J. Maruyama, C. S. Escaño, K. Kitamoto, AoS0 protein accumulates at the septal pore in response to various stresses in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Vol. 391, 2010, 868-873. (査読有り)

[学会発表] (計 10 件)

- 1) Jun-ichi MARUYAMA, Intercellular communication via septal pore in the multicellular microorganism *Aspergillus oryzae*. Asian Mycological Congress, 平成 23 年 8 月 7-11 日 (Korea) (招待講演)
- 2) 佐伯 圭, 丸山 潤一, 北本 勝ひこ, 「麹菌 AoS0 タンパク質のストレス応答及び凝集に関わる領域の探索と解析」日本農芸化学学会大会、平成 23 年 3 月 25-28 日、京都
- 3) 佐々木 智江美, 丸山 潤一, 北本 勝ひこ 「麹菌 *A. oryzae* における AoFus3 MAPK シグナル伝達経路の解析」日本農芸化学学会大会、平成 23 年 3 月 25-28 日、京都
- 4) 丸山 潤一, Özgür BAYRAM, Oliver VALERIUS, Gerhard H. BRAUS, 北本 勝ひこ 「麹菌 *Aspergillus oryzae* における新規隔壁孔局在タンパク質の発見」日本農芸化学学会大会、平成 23 年 3 月 25-28 日、京都
- 5) 丸山 潤一 「糸状菌における“多細胞生物学” -隔壁孔を介した細胞間連絡の制御システム-」日本農芸化学学会大会、平成 23 年 3 月 25-28 日、京都 (シンポジウム主催、招待講演)
- 6) 佐伯 圭, 牧野 雄也, Cristopher Salazar ESCAÑO, 丸山 潤一, 北本 勝ひこ 「麹菌 AoS0 タンパク質のストレス応答性凝集機構に関する解析」日本農芸化学学会大会、平成 22 年 3 月 27-30 日、東京
- 7) 佐々木 智江美, 田鍋 康子, 岩崎 健太郎, 丸山 潤一, 北本 勝ひこ 「麹菌 *A. oryzae* における MAP キナーゼ AoFus3 の分子生物学的解析」日本農芸化学学会大会、平成 22 年 3 月 27-30 日、東京
- 8) 田鍋 康子, 丸山 潤一, 北本 勝ひこ 「麹菌 *A. oryzae* のビオチン合成におけるペルオキシソームの役割」日本農芸化学学会大会、平成 22 年 3 月 27-30 日、東京
- 9) 若林 奈央, 丸山 潤一, 北本 勝ひこ 「麹菌における光変換型蛍光タンパク質を用いた分泌タンパク質の動態解析」日本農

芸化学会大会、平成 22 年 3 月 27-30 日、
東京

- 10) Cristopher Salazar ESCAÑO, Jun-ichi MARUYAMA, Katsuhiko KITAMOTO, AoSO protein accumulates at the septal pore in response to various stress in *Aspergillus oryzae*. The Xth International Fungal Biology Conference、平成 21 年 12 月 6-10 日 Mexico

〔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〕

ホームページ等

http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/Lab_Microbiology/hyousi.html

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：00431833

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし