

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K14767

研究課題名（和文）有用糸状菌におけるオルガネラ間相互作用によるリン脂質バランス制御機構の解明

研究課題名（英文）Regulation of phospholipid balance via organelle interactions in a useful filamentous fungus

研究代表者

岩間 亮（Iwama, Ryo）

東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・助教

研究者番号：90793042

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：主要リン脂質の網羅的定量解析法を用いて、糸状菌のオルガネラコンタクトサイト因子破壊株におけるリン脂質解析を実施した。糸状菌におけるリン脂質解析の基盤として、糸状菌のリン脂質動態を詳細に明らかにするとともに、それらの合成に関わる遺伝子の経時的な転写変動を明らかにした。解析を通して、分生子の発芽時にホスファチジルエタノールアミン(PE)が増加することが示され、PEが発芽時の正常なミトコンドリア形態を維持するのに必要な可能性が示唆された。また、ミトコンドリアを中心にオルガネラコンタクトサイト形成に関わる因子の欠失株のリン脂質組成を解析することにより、いくつかの欠失株で共通してPE量が減少した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

人間生活と密接に関わる微生物の一つである糸状菌において、これまで精力的に研究が行われていなかったリン脂質組成を詳細に明らかにした。糸状菌の産業利用における重要な特性である細胞外タンパク質分泌には、これらリン脂質を主な構成要素とする生体膜動態が重要な要素となる。本研究では、さらに細胞内の膜同士に関連に関わる因子の解析も行った。本研究は、糸状菌の重要な細胞基盤の一つを明らかにするものである。

研究成果の概要（英文）：Using a comprehensive quantitative analysis for major phospholipids, we investigated phospholipid profiles within disrupted strains of organelle contact sites in filamentous fungi. As a basis for phospholipid analysis in filamentous fungi, we clarified in detail the dynamics of phospholipids in filamentous fungi and the temporal transcriptional variations of genes implicated in their synthesis over time. Our analysis revealed a notable augmentation of phosphatidylethanolamine (PE) during conidia germination, indicating a potential necessity for PE in maintaining regular mitochondrial morphology during the germination. Interestingly, our investigation of phospholipid composition in deletion strains of factors crucial to organelle contact site formation revealed consistent reductions in PE levels in multiple deletion strains.

研究分野：応用微生物学

キーワード：糸状菌 *Aspergillus nidulans* *Aspergillus oryzae* 生体膜 リン脂質 リピドーム解析 オルガネラ ミトコンドリア

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

リン脂質は、細胞やオルガネラを区画化する役割を果たす生体膜の主要構成成分であり、頭部や尾部（アシル鎖）の違いにより様々な種類が存在する。真核細胞においては、リン脂質はすべての膜上で均等に合成されているわけではなく、リン脂質種によってそれぞれ特定のオルガネラ膜上に限定されることが知られている。したがって、特定のオルガネラで合成されたリン脂質は細胞全体に適切に輸送される必要があり、その機構について研究が行われてきた。近年、各々のオルガネラ同士が近接した場であるメンブレンコンタクトサイトが次々に報告されているが、リン脂質の適切な輸送がその役割の1つと考えられており、その生理的意義に関する研究が精力的に行われてきた。

真核微生物の1つである糸状菌は、長い糸状の細胞形態を基本としながらも、分岐構造を形成し、分生子形成器官へ分化するなど、複雑な細胞形態制御機構を有する。申請者らは、糸状菌 *Aspergillus nidulans* において、ホスファチジルセリン(PS)からホスファチジルエタノールアミン(PE)への変換に関わる PsdB を欠損させると、生育が顕著に悪化すること、細胞形態が異常になることを報告していた (*J. Biosci. Bioeng.*, **131**, 139-146 (2021))。また、産業用糸状菌 *Aspergillus oryzae* においても、リン脂質合成に関わる遺伝子が適切に発現制御されていないと細胞形態が異常になることを示していた。これらの結果は、細胞内リン脂質バランスが適切に維持されることの重要性が糸状菌ではより大きいことを示唆していた。

糸状菌においてリン脂質バランスがどのように制御されているのかについての報告はないことに加え、リン脂質バランスに関わるメンブレンコンタクトサイトの役割に関しても報告もほとんどなかった。産業上重要な微生物である糸状菌における細胞基盤をリン脂質やオルガネラの観点から明らかにすることは糸状菌の有効利用を図る上で極めて重要であると考えられた。

2. 研究の目的

様々な培養条件における糸状菌のリン脂質プロファイルを明らかにするとともに、オルガネラ間相互作用がそのバランスの維持にどのように関与しているのかを解明することを目的とした。糸状菌におけるメンブレンコンタクトサイトに関わる因子を破壊することにより、糸状菌細胞全体のリン脂質組成に与える影響を解析するとともに、オルガネラ形態に与える影響を解析することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 申請者がすでに立ち上げていた主要リン脂質の網羅的定量解析（リピドーム解析）を用いて、細胞形態が大きく異なる分生子、液体培養した菌糸体、プレート培養した菌体を対象にそれぞれの条件下における主要リン脂質の組成を定量した。

(2) 変化を示したリン脂質種に対して、それらの合成に関わる遺伝子の経時的な発現量変化をqPCRにより解析した。

(3) ミトコンドリアに大きく関わるリン脂質が分生子の発芽時にかけて大きく増加することを見出した上で、発芽時における分生子内のミトコンドリア形態を野生型株やリン脂質合成酵素欠失株と比較した。

(4) 糸状菌において、オルガネラコンタクトサイトやリン脂質輸送に関わると推定される遺伝子の欠失株を作製し、それら欠失株の表現型を解析した。

4. 研究成果

(1) 糸状菌は、【1】球状の分生子（無性胞子）の等方的な生長、【2】一定の大きさに達した後の極性確立と発芽、【3】菌糸生長による糸状細胞形態の形成、【4】空気中へと菌糸伸長と分生子形成器官の構築および分生子の産生、を繰り返すことにより生育範囲を拡大させている。このように、糸状菌はライフサイクルを通して、明確に細胞形態を変化させるが、まず、これら細胞形態の違いと主要

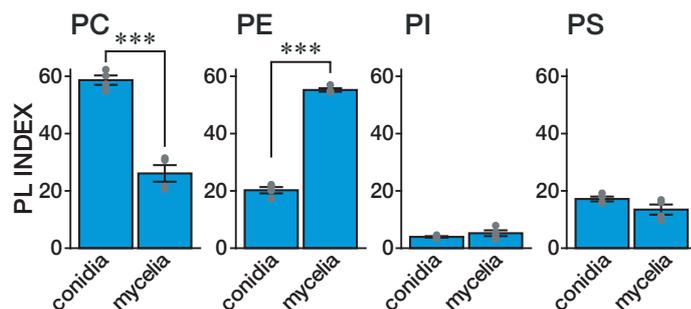


図1. 分生子と菌糸塊の脂質組成の違い

リン脂質の関係について、モデル糸状菌 *A. nidulans* を用いて解析した (図 1)。その結果、分生子では他の生育フェーズと比較してホスファチジルコリン(PC)/PE 比が高いが、分生子が等方的に無極性生長する間に、PE 量が顕著に上昇し、PC 量が顕著に減少することが示された。同様の傾向は、*A. oryzae* においても確認された。

(2) 分生子が無極性生長する間に、PE 量が顕著に上昇し、PC 量が顕著に減少することに着目し、PE 合成に関わる *psdA*、*psdB*、*psdC*、*psdD* および PC 合成に関わる *pemA*、*pemB* の発現量を経時的に解析した。発芽前に PE 合成に関わる遺伝子の転写量が増加すること、PC 合成に関わる遺伝子の転写量が減少するなど、脂質解析と一致する結果が得られた (図 2)。

(3) 網羅的な脂質解析から、発芽前に PE を中心にミトコンドリアで重要な働きを示す脂質の増加が明らかになった。そこで、PE 動態に着目し、発芽前に増加する PE 量の意義を調べるため、*psdB* 欠失株、*psdC* 欠失株、*psdD* 欠失株を作製した。また、ミトコンドリアへの影響も予測されたため、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の Tom70 の *A. nidulans* におけるオルログ (TomA と命名した) を指標にミトコンドリア形態を評価した。野生型株は発芽プロセスの進行に伴い、ミトコンドリアの大きさが増加し、真円度が減少することが明らかとなったが、*psdD* 欠失株においては、発芽前に TomA の局在がドット状になる、真円度の高いミトコンドリアが維持されているなど、ミトコンドリア形態が異常になる結果が得られた (図 3)。

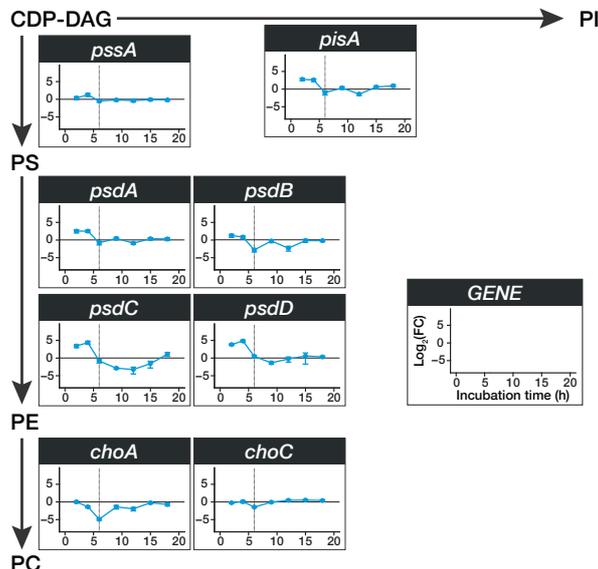


図 2. 分生子発芽時、発芽後のリン脂質合成酵素遺伝子の転写量の経時的変化

分生子を液体最少培地に植菌した後、2, 4, 6, 9, 12, 15, 18 時間後の菌体を回収し、それぞれの遺伝子特異的なプライマーを用いた定量 PCR を行った。

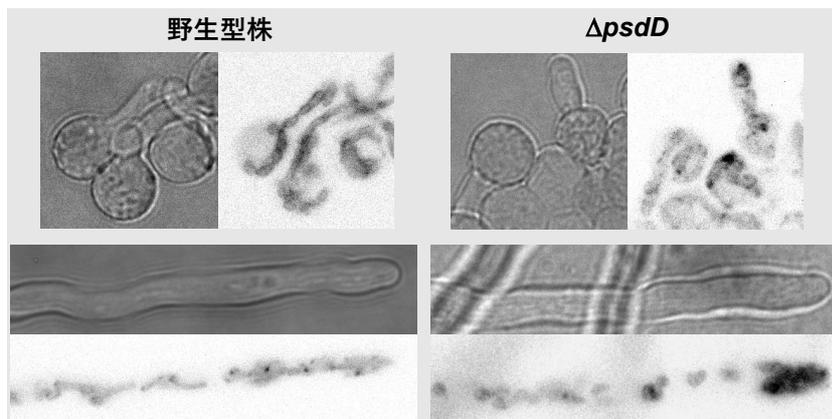


図 3. 野生型株と *psdD* 欠失株のミトコンドリア形態

TomA-mNeonGreen を発現するそれぞれの分生子の発芽直後の発芽管、または、16 時間以上培養した菌糸先端を観察した。

(4) 糸状菌のメンブレンコンタクトサイト形成因子について、*S. cerevisiae* で既知となっている因子のホモログを *A. nidulans* で破壊し、その表現型を解析した。ミトコンドリアと小胞体とのコンタクトサイト形成に関わる因子の破壊株は生育欠損を示し、小胞体と細胞膜とのコンタクトサイト形成に関わる一部の因子の破壊株についても顕著な生育欠損が見られた。これら破壊株を液体培養で培養した場合におけるリポドーム解析を実施したところ、いずれの破壊株においても、PE 量が減少し、PI 量が増加するといった同様の傾向が見られた。糸状菌細胞においても、小胞体やミトコンドリアは細胞全体にネットワーク状に存在することから、これらのオルガネラが糸状菌細胞におけるリン脂質バランスの制御に大きく関わることは想定されるが、それぞれのメンブレンコンタクトサイトの破壊が同様の表現型を示している可能性も考えられる。

(5) 次に、メンブレンコンタクトサイト等で機能することが想定される脂質輸送タンパク質に着目した。*S. cerevisiae* の Sec14 のオルソログに当たる因子の欠失株が、小胞体と細胞膜とのコンタクトサイト形成に関わる因子の欠失株と同様の表現型を示すことが分かった。また、これら表現型が培養温度により、大きく異なることも明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岩間亮、堀内裕之
2. 発表標題 糸状菌 <i>Aspergillus nidulans</i> のライフサイクルにおけるリン脂質組成のダイナミックな変動
3. 学会等名 第21回糸状菌分子生物学コンファレンス
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩間亮、楊淳児、須澤徹生、堀内裕之
2. 発表標題 糸状菌の菌糸生長時における生体膜リン脂質組成の特徴
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 楊淳児、岩間亮、堀内裕之
2. 発表標題 糸状菌 <i>Aspergillus nidulans</i> の分生子発芽時に増加するホスファチジルエタノールアミンの生理的意義の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岩間亮、須澤徹生、楊淳児、堀内裕之
2. 発表標題 糸状菌の細胞形態形成におけるリン脂質組成の重要性
3. 学会等名 第65回 日本脂質生化学会
4. 発表年 2023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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------