

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：82112

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658087

研究課題名(和文)糸状菌の環境認識シグナルと接着に関する、表面工学手法を利用した解析

研究課題名(英文) Study on surface-recognition signaling which induce surface adhesion in filamentous fungi

研究代表者

西村 麻里江(Nishimura, Marie)

独立行政法人農業生物資源研究所・植物科学領域 植物・微生物間相互作用研究ユニット・主任研究員

研究者番号：30370670

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：糸状菌バイオフィーム(カビ塊)の制御は食品産業、工業、医療現場、住環境の衛生管理上重要な課題である。糸状菌のバイオフィーム形成は対象物の表面を「認識」して「接着」することにより開始される。しかしこのメカニズムの詳細は明らかになっていない。本研究ではイネ病原性糸状菌であるいもち病菌をモデルに用い、表面工学と分子生物学を組み合わせた手法を用いて接着メカニズムの解析を行った。結果、糸状菌の接着を阻害するシグナル伝達経路と糸状菌の初期接着に重要なタンパク質を見出した。本成果は糸状菌のバイオフィーム形成阻害/バイオフィーム除去技術開発の上での基礎的知見となるものである。

研究成果の概要(英文)：Controlling of fungal biofilms has been an important issue to supply clean environments for industrial, medical and living purposes. Biofilm formation in Ascomycete filamentous fungi starts with the fungal adhering to substrate surfaces. This surface adhesion appears to be induced by fungal recognition of the surface physiological cues. In this project, we studied mechanisms that triggered adhesion in the Ascomycete fungi, *Magnaporthe oryzae*. Our results suggested that recognition signaling of certain surface cues negatively regulated the fungal adhesion. We also identified a conserved cell wall protein which was involved in the surface adhesion. Our study will contribute to the further understanding of fungal adhesion mechanisms and the development of anti-biofilm technologies.

研究分野：応用微生物学

科研費の分科・細目：微生物制御学

キーワード：バイオフィーム 糸状菌 シグナル伝達

## 1. 研究開始当初の背景

糸状菌(カビ)は住環境の至る所に見られる微生物であり、産業的に有用である一方で、食品、居住環境、医療器具、工業機器などの汚染や動植物への感染といった社会的に深刻な問題を引き起こしている。糸状菌は、水分・糖・無機塩などを認識すると孢子発芽と菌糸伸長を開始し、基板に接触すれば接着してバイオフィルムを形成する。一旦バイオフィルム化した糸状菌は薬剤による除去が非常に困難であることから、糸状菌バイオフィルム除去技術に対する開発が望まれている。

真核微生物の菌体接着に関する環境シグナルと遺伝子発現制御の研究は酵母が先んじているが(Verstrepen and Klis, Mol. Microbiol., 2006)菌体接着に関する酵母遺伝子のホモログは糸状菌ゲノム中にはない、もしくは機能が異なることが分かってきており(Nishimura et al., Biosci. Biotech. Biochem., 2009; Wilson and Talbot, Nat. Rev. Microbiol., 2009)糸状菌は酵母と異なる独自の接着機構を持っていると考えられる。

これまで主に *Aspergillus* 属菌での研究成果から、孢子表面に多く存在する界面活性タンパク質であるハイドロフォピン(Linder et al., FEMS Microbiol Rev., 2005)や細胞外マトリックスの成分であるガラクトマンナン、-1,3-グルカンなど(Beauvais et al., Cell. Microbiol., 2007)などが糸状菌での表面への接着に関する因子であると考えられてきた。しかし、汚染カビとして報告されている主要な糸状菌は植物病原菌であり、植物病原菌は感染時に強く植物に接着する必要があることを考えると、植物病原性糸状菌では腐生性の *Aspergillus* 属菌では見つからない接着機構(因子)が見つかる可能性が高い。

## 2. 研究の目的

糸状菌では菌糸による表面接触が接着を誘導していることが推測されるにもかかわらず、これまでは表面認識と接着については解析されてこなかった。我々はこれまでにを行った表面工学技術により作製された修飾基板を用いた研究から、基板表面を特定の分子(水酸基、メトキシ基)で修飾すると糸状菌の接着が制御されることを見出した。

そこで本研究課題では環境認識シグナル伝達経路の研究が糸状菌の中で最も進んでいるイネ病原性糸状菌であるいもち病菌(*Magnaporthe oryzae*)をモデルに用いて、糸状菌における環境認識シグナルによる接着誘導について解析を行うこととした。基板への接着はバイオフィルム化の引き金となるため、本研究からバイオフィルム形成阻害技術の開発のための基礎的知見を得ることが期待される。

## 3. 研究の方法

### 1) 環境認識シグナル伝達経路の遮断による

### 接着性の変化

表面工学的手法により作製された水酸基もしくはメトキシ基で修飾した金基板(図1)を用いて実験を行った。いもち病菌野性型株および遺伝子破壊により作成された環境認識シグナル伝達遮断株の孢子懸濁液 30  $\mu$ l ( $1 \times 10^5$ /ml)を分子修飾した金基板(図1)上で24時間培養後に水洗した。コントロールには未修飾の金基板を用いた。水洗後の菌体の接着性は顕微鏡を用いて確認するとともに、基板をスキャナーで取り込み画像として保存した。環境認識シグナル伝達遮断株で接着性が変化していた場合には、欠損遺伝子の相補実験、シグナル活性化株の作出や相互作用することが予想される因子遺伝子への変異の導入をさらに行った。

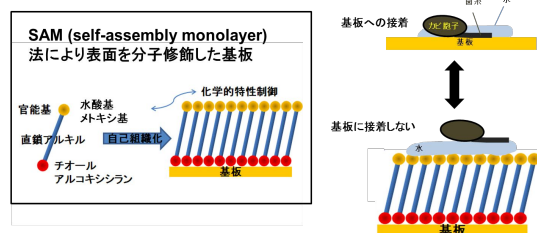


図1. 研究に用いたカビの接着を阻害する分子修飾基板

### 2) 接着/非接着時の遺伝子発現プロファイルの比較解析

野性型株および環境シグナル伝達変異株を金基板、分子修飾基板上で24時間培養後に抽出したRNAを用いてマイクロアレイ解析を行った。得られたデータから接着と連動して発現が変動する遺伝子を抽出した。

### 3) 接着時に特異的に発現が変動する遺伝子の機能解析

接着因子は細胞外分泌タンパク質や細胞壁タンパク質、多糖である可能性が高い。そこで接着時に特異的に発現が変動する遺伝子の中から上記のような特徴を持つ遺伝子を選び出し、薬剤マーカーとの相同組換えにより遺伝子破壊株を作出し、プラスチックカバースリップ上で培養し、経時的に接着性の評価を行った。

## 4. 研究成果

<以下、論文発表等を控えているため公表できる範囲でデータを示す。>

### (1) *M. oryzae* の接着を制御する環境シグナル伝達因子の解明

野性型株(WT)および環境シグナル伝達変異株はコントロールである金基板に接着する(図2上段; 白い部分が接着した菌糸を示す)。しかし、環境シグナル伝達変異株の細胞内伝達に関与している因子の破壊株のうち水酸基修飾基板に対して接着することができる変異株を見出した(図2上段; A, B, E)。しかしながら、変異株A, B, Eを含めたすべての変異株においてメトキシ基で修飾した接着阻害表面への接着は認められなかった。

また、AとBの欠損相補株では水酸基修飾表面への接着性が失われた。これらのことから *M. oryzae* には基板表面の水酸基を認識するセンサーがあることが予想される。真核生物においてシグナル伝達因子A、B、Eは相互作用して機能することが知られている。この結果から、*M. oryzae* では基板表面の水酸基が認識されシグナルがA/B/Eを介して細胞内に伝達された結果、基板への接着が抑制されていたことが推測される。

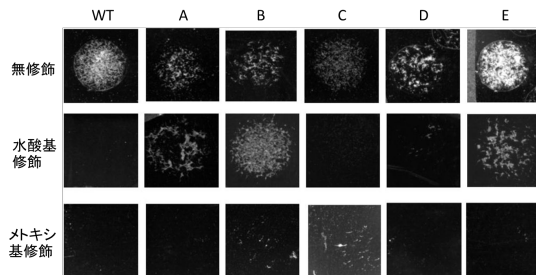


図2. 環境シグナル伝達経路の変異株における分子修飾表面への接着性

2) 接着時に特異的に発現する遺伝子の抽出  
マイクロアレイ解析の結果から、環境認識シグナル遮断株A、B、Eを水酸基修飾基板上で培養したときに野生型株と比較して発現が1.5倍以上変動する遺伝子を抽出した。これらの遺伝子の中からさらに、同じ条件で培養したAとBの欠損相補株で発現が野生型株レベルである遺伝子を選び出した。これらの遺伝子は非接着表面への接着時に特異的に発現していると考えられた。表1にこれらの遺伝子の予想機能を示す。

表1.

遺伝子機能	欠損株での遺伝子発現比*		
	A	B	E
細胞壁合成	0.23	0.43	0.19
アンキリン	0.23	0.50	0.28
膜レセプター	0.33	0.25	0.57
細胞壁タンパク質	0.29	0.49	0.84

\*野生型株での発現を1.0とする。

3) 接着時に発現が変化する遺伝子の機能解析

Eでの発現比に大きな差が見られないが細胞壁タンパク質が接着に関与している可能性を考え、遺伝子破壊によりその機能を確認した。

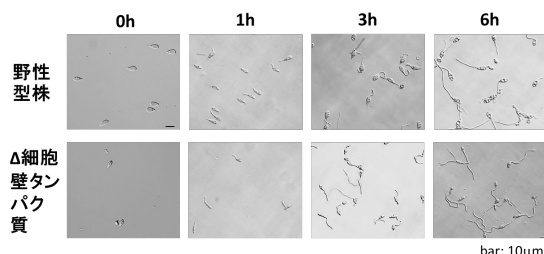


図3. プラスチックカバースリップ上での *M. oryzae* 遺伝子破壊株の接着

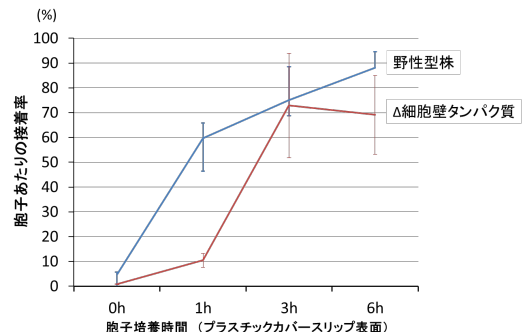


図4. プラスチックカバースリップ上での *M. oryzae* 遺伝子破壊株の接着率

図3、図4に示すように、この細胞壁タンパク質の欠損株は接着の初期 (< 培養開始3時間) で接着性の著しい低下を示す。このことからこの細胞壁タンパク質は少なくとも金の初期接着に関与していることが示唆された。この細胞壁タンパク質は糸状菌に特有であり、よく保存されていることから、糸状菌一般で初期接着に関与している可能性が高いと推測している。マイクロアレイ解析の結果絞り込まれた他の遺伝子に関しては順次、機能解析を行っているところである。

メトキシ基修飾した接着阻害基板上にこれらのシグナル遮断株が接着しないことから、いもち病菌は水酸基を認識するセンサーシステムを持っていることが予想される。その第一候補は今回の解析から見出された膜レセプターである。この膜レセプターは糸状菌に特有の構造をもっている。このレセプターの機能解析は現在行っているところであるが、もし水酸基認識に関わっているとすればコウボとは異なる環境認識機構により糸状菌が接着するという本研究の開始時にたてた仮説に合致する。

本研究では糸状菌特有の遺伝子が接着時に発現していることを見出し、それらの遺伝子の中に実際に接着に関与しているものがあることを示した。また、接着を負に制御する環境認識シグナル伝達経路の因子を新たに発見した。真核生物のシグナル伝達経路の既知知見から、これらの因子は相互作用して環境認識シグナルを伝達すると考えられる。さらにこのシグナル伝達経路の上流でセンサーとして働く可能性が大きい膜レセプターを見出すことができた。今後は水酸基がどのような機構でこのシグナル伝達経路の制御に関わるのかについて解析を進める予定である。

## 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)

準備中

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 2件)

1) 西村麻里江, 中野美紀, 三宅晃司 (2013) 表面の分子修飾による真菌の接

着制御. 日本農芸化学会 2014 年度大会

- 2) 風間静花, 川崎寿, 西村麻里江 (2013)  
いもち病菌のヘテロ 3 量体 G タンパク質  
サブユニットの解析. 第 13 回糸状菌  
分子生物学コンファレンス :83

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: 基体表面を有機分子で修飾することにより、菌体を除去できる表面処理剤及び該有機分子による表面処理方法並びに抗菌処理した基体

発明者: 中野美紀、三宅晃司、西村麻里江

権利者: 産業技術総合研究所、農業生物資源研究所

種類: 特許権

番号: 特開 2013 - 241551

出願年月日: 2012 年 5 月 23 日

国内外の別: 国内

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

西村 麻里江 (Nishimura Marie)

研究者番号: 30370670

### (2) 研究分担者

中野 美紀 (Nakano Miki)

研究者番号: 20415722

三宅 晃司 (Miyake Koji)

研究者番号: 30302392

### (3) 連携研究者