

令和元年5月30日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15242

研究課題名(和文)糸状菌特有の細胞融合を誘導する遺伝子転写制御機構の解析

研究課題名(英文)Analysis of the regulation mechanism of cell fusion in filamentous fungi

研究代表者

片山 琢也 (Katayama, Takuya)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・特任助教

研究者番号：70792191

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：糸状菌(カビ)は酵母とは異なり、菌糸を伸長している栄養生長時にも細胞が融合する。我々は糸状菌の一種である麹菌*Aspergillus oryzae*において、糸状菌特異的な新規タンパク質FipCを同定し、これが細胞融合に関与する機能を持つことを示していた。

本研究における遺伝学的な解析から、FipCが転写因子AoSte12を介して細胞融合に関わる遺伝子群の転写を制御することを示した。さらにFipCと相互作用する2つのタンパク質を同定した。これらは糸状菌特有の細胞融合メカニズムを解明する上で重要な知見である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糸状菌に特異な細胞融合制御機構には未解明な部分が多いが、FipCの解析を進めることでその解明に繋がると考えられる。細胞融合制御機構の解析が進めば、細胞融合効率の低い麹菌*A. oryzae*の効率的な融合が可能となり、ひいては現在困難な交配育種の実現に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Cell fusion occurs during vegetative growth in filamentous fungi unlike yeasts. We previously identified pezizomycotina-specific novel protein FipC and showed its involvement in regulation of cell fusion.

In the present study, we investigated the genetic relationship between FipC and its interactors, an MAP kinase AoFus3 and a transcription factor AoSte12, and showed the regulation of cell fusion-related genes by FipC via AoSte12. In addition, we identified two novel interactors of FipC. These results will contribute to elucidation of the filamentous fungi specific regulation mechanism of cell fusion.

研究分野：細胞生物学

キーワード：糸状菌 細胞融合 麹菌 *Aspergillus oryzae* MAPキナーゼ 転写制御

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 糸状菌では酵母とは異なり、有性生殖時だけでなく栄養生長時にも細胞が融合する。細胞融合頻度の高いアカパンカビ *Neurospora crassa* では研究が進んでおり、複数の細胞融合関連因子が同定されているが、その制御機構の全容は未解明である。一方、その他の糸状菌では細胞融合の研究はほとんど行われていないが、その原因として細胞融合頻度が低く、解析が困難であることが挙げられる。細胞融合は有性生殖においても必須の過程であり、細胞融合制御メカニズムが解明されれば、産業上用いられる糸状菌の交配育種の実現にも繋がる可能性がある。我々は麹菌 *Aspergillus oryzae* において細胞融合を定量的に検出する系を確立し、細胞融合の解析を可能としていた。

(2) 我々は細胞融合に必要な Fus3 オルソログ AoFus3 と相互作用するタンパク質として、転写因子 Ste12 オルソログ AoSte12 に加えて、これまで同定された例のない糸状菌特異的な FipC を同定し、これらの破壊株では細胞融合効率が低下することを示していた。さらに、これらの株では細胞融合関連遺伝子の mRNA レベルが低下することも示しており、AoFus3、FipC、AoSte12 が細胞融合関連遺伝子の転写制御を介して細胞融合を調節することが示唆されていた。これらのことから、AoFus3、FipC、AoSte12 が糸状菌特異的な細胞融合の制御に関与する可能性が考えられた。

2. 研究の目的

AoFus3、FipC、AoSte12 による細胞融合関連遺伝子の制御を明らかにすることで、糸状菌特有の細胞融合誘導機構の解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) *Aofus3*、*fipC*、*Aoste12* の各遺伝子単独破壊株と二重破壊株、*fipC*、*Aoste12* の高発現株を用い、細胞融合効率、細胞融合関連遺伝子 (*AonosA*、*Aoham6*、*Aoham7*、*Aoham8*) の mRNA レベルを測定することで、これらの遺伝学的上下関係について検討した。

(2) ウェスタン解析により FipC、AoSte12 の翻訳後修飾と各遺伝子破壊、高発現の翻訳後修飾への影響を検討した。

(3) TAP 解析により FipC と相互作用するタンパク質の同定を試みた。

4. 研究成果

(1) *fipC* 高発現株では細胞融合頻度が低下したものの、細胞融合関連遺伝子の mRNA レベルは亢進していたことから、FipC が細胞融合関連遺伝子の正の制御因子であることが示唆された。一方、*Aoste12* 破壊株において *fipC* を高発現した場合、細胞融合頻度の低下は見られなかった。この際、細胞融合関連遺伝子のうち *AonosA* の誘導が見られないことから、FipC が AoSte12 を介して *AonosA* の発現を誘導すること、過剰な *AonosA* の誘導が細胞融合を妨げることが示唆された。また、*Aoste12* 破壊株においても *fipC* の高発現が *AonosA* 以外の細胞融合関連遺伝子を誘導したことは、FipC が AoSte12 非依存的にも細胞融合関連遺伝子を誘導することを支持する結果である。

Aofus3 破壊株において *fipC* を高発現した場合には、*AonosA*、*Aoham6*、*Aoham8* の誘導が見られなくなり、FipC によるこれらの遺伝子の誘導には AoFus3 も必要であることが示唆された。

(2) *fipC* 破壊株では細胞融合頻度の著しい低下に加え、生育の低下や菌核能の消失といった表現型が観察され、*Aoste12* 破壊株と比較すると重篤なレベルである。しかし、*fipC* と *Aoste12* の二重破壊株におけるこれらの表現型は *Aoste12* 破壊株と同等であり、*fipC* 破壊株では AoSte12 がこれらの表現型を引き起こす原因であると考えられた。さらに、細胞融合関連遺伝子の転写解析の結果においても、*fipC* 破壊株では細胞融合関連遺伝子の mRNA レベルが著しく低下するが、*Aoste12* との二重破壊株では *Aoste12* 破壊株のレベルまで mRNA レベルが回復することが示された。これらの結果は *fipC* 破壊株では AoSte12 が細胞融合関連遺伝子の発現を抑制しており、その結果として細胞融合効率が著しく低下することを示唆している。

Aofus3 と *fipC* または *Aoste12* の二重破壊株の細胞融合関連遺伝子の mRNA レベルの低下において相加的または相乗的な影響や mRNA レベルの回復は見られなかった。

(3) *Aoste12* を高発現した場合、細胞融合頻度の著しい低下が見られた。*Aoste12* を高発現すると生育が著しく悪化するため、上記の解析と同様の培養条件では細胞融合関連遺伝子の転写解析は不可能であった。*Aoste12* 高発現株の生育を支持するために、別の培地条件で転写解析を行った結果、細胞融合関連遺伝子の mRNA レベルの低下が見られた。これらの結果から、AoSte12 が細胞融合関連遺伝子の発現を抑制する機能を有することが示唆され、上記(2)の結果を支持すると考えられた。当初 AoFus3、FipC、AoSte12 は細胞融合関連遺伝子の転写を正に制御すると考えられたが、AoSte12 が負の制御にも関わることが示された。このような制御は他の糸状菌や酵母においても報告されておらず、新たな細胞融合制御機構の解明に繋がる可能性がある。

(4) AoSte12 が転写因子であることや他の生物における知見から AoSte12 は AoFus3 の下流で機能する可能性が考えられた。さらに上記の結果より、AoSte12 は FipC よりも下位で機能すると考えられた。また、FipC が AoFus3、AoSte12 の両方と相互作用することから、FipC も AoFus3 よりも下位で機能する可能性が考えられた。そのため、FipC、AoSte12 が何らかの翻訳後修飾により制御されるという推定のもと、ウエスタン解析によりこれらのタンパク質の状態を検出した。その結果、FipC、AoSte12 の両方で推定分子量よりも移動度の小さいバンドが複数検出され、これらが何らかの翻訳後修飾を受けることが示唆された。

(5) FipC、AoSte12 の翻訳後修飾に対する AoFus3 の寄与について検討するため、*Aofus3* 破壊株、AoFus3 の活性化条件において、それぞれのタンパク質をウエスタン解析により検出した。その結果、両方の条件において FipC、AoSte12 のバンドに変化は見られなかった。

(6) AoSte12 の翻訳後修飾に対する FipC の寄与について検討するため、*fipC* 破壊株、高発現株で AoSte12 を検出した。その結果、*fipC* 破壊株では大部分の AoSte12 が最も移動度の大きいバンドに収束し、逆に *fipC* 高発現株では移動度の小さいバンドがより濃く検出された。これらのことから、FipC が AoSte12 の翻訳後修飾に関連していることが示唆された。このことから、FipC が AoSte12 の翻訳後修飾を制御することで、AoSte12 の細胞融合関連遺伝子に対する機能を調節している可能性が考えられる。今後、AoSte12 の翻訳後修飾の種類や部位を特定することで、この可能性を検討することができると思われる。

(7) FipC の機能や制御について詳細に調べるため、TAP 解析により FipC と相互作用するタンパク質の候補を複数同定した。まず、他の糸状菌において細胞融合に関与することが知られていたタンパク質について共免疫沈降法により相互作用の確認を行ったが、再現性は得られなかった。しかし、それら以外のタンパク質についての検討において、2 つのタンパク質との相互作用について再現性が確認された。

(8) 以上のように、*A. oryzae* において AoSte12 が細胞融合関連遺伝子を正、負の両方に制御することが示され、さらに糸状菌特異的な新規タンパク質 FipC がその制御を調節していることが強く示唆された。また、FipC と相互作用するタンパク質を同定することに成功し、FipC の機能を解析する重要な手がかりとなると考えられる。今後、生化学的な解析を進めることで、糸状菌における新たな細胞融合制御メカニズムが分子レベルで解明されることが期待される。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Tomoya Okabe, [Takuya Katayama](#), Taoning Mo, Noriko Mori, Feng Jie Jin, *et al.*, BiFC-based visualisation system reveals cell fusion morphology and heterokaryon incompatibility in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*, *Scientific Reports*, 査読有、Vol. 8、2018、pp: 2922、DOI: 10.1038/s41598-018-21323-y.

[Takuya Katayama](#), Hidetoshi Nakamura, Yue Zhang, Pascal Arnaud, Wataru Fujii, Jun-ichi Maruyama, Forced Recycling of an AMA1-Based Genome-Editing Plasmid Allows for Efficient Multiple Gene Deletion/Integration in the Industrial Filamentous Fungus *Aspergillus oryzae*, *Applied and environmental microbiology*, 査読有、Vol. 85、2019、pli: e01896-18、DOI: 10.1128/AEM.01896-18.

〔学会発表〕(計7件)

森法子ら、*Aspergillus oryzae* の不和合性における HET ドメインタンパク質をコードする遺伝子の機能解析、日本農芸化学会、2018

藤井陽平ら、*Aspergillus* 属糸状菌の異なる分化における新規転写因子による制御機構の解析、日本農芸化学会、2018

[片山琢也](#)ら、ゲノム編集による*Aspergillus oryzae* 実用株の効率的遺伝子改変、日本農芸化学会、2018

Yue Chen ら、Comparative functional analysis of Fus3-type MAPK cascade and scaffold HAM-5 ortholog in development and cell fusion of *Aspergillus oryzae*, 日本農芸化学会、2019

森法子ら、*Aspergillus oryzae* の HET ドメイン遺伝子の不和合性における機

能解析、日本農芸化学会、2019

遠藤章仁ら、麹菌 *Aspergillus oryzae* の菌核形成に必要な新規転写因子の制御機構の解析、日本農芸化学会、2019

Takuya Katayama ら、An AoFus3-interacting protein FipC is a novel regulator of cell fusion in *Aspergillus oryzae*、30th Fungal Genetics conference、2019

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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、研究者個人に帰属されます。