

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05545

研究課題名(和文)カビ菌系生長の細胞外シグナルに応答した環境適応

研究課題名(英文)Environmental adaptation in response to extracellular signals in fungal growth

研究代表者

竹下 典男 (TAKESHITA, Norio)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：20745038

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細胞内のCa²⁺の伝導をライブイメージングで可視化しその特性を解析した。さらに、Ca²⁺のシグナルがどのように下流に伝わるかを調べるため、CalmodulinまたはCalmodulin dependent kinaseにGFPを付加した融合タンパク質を発現する株を構築し、GFP抗体による免疫沈降を行い相互作用するタンパク質群を精製した。それらをLC-MS/MSの質量分析にかけると、ターゲット候補をそれぞれ20-60個同定した。それらの重複はほとんど見られず、それぞれのが異なるタンパク質をターゲットとすることで、シグナル伝達を使い分けていることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、細胞内のCa²⁺の伝導をライブイメージングで可視化しその特性を解析した。さらに、Ca²⁺のシグナルがどのように下流に伝わるかを調べるため、CalmodulinまたはCalmodulin-dependent kinaseのターゲット候補をそれぞれ20-60個同定した。それらの重複はほとんど見られず、それぞれが異なるタンパク質をターゲットとすることで、シグナル伝達を使い分けていることが示唆された。本研究は、カビが関わる醸造・発酵、動植物への病原機構の解明、カビの高い環境適応能の理解と人間生活におけるカビ対策に貢献する。

研究成果の概要(英文)：Filamentous fungi are composed of tubular cells called mycelium, which grow by extending their tips. The apical growth of mycelium is caused by the cyclic influx of Ca²⁺, which synchronizes actin polymerization and enzyme secretion to gradually elongate the mycelium. In this study, we visualized the intracellular Ca²⁺ conduction by live imaging and analyzed its characteristics. In addition, to investigate how Ca²⁺ signals are transmitted downstream, we constructed strains expressing fusion proteins of Calmodulin CaM or Calmodulin-dependent kinase, CmkA, CmkB, and CmkC, to which GFP was added. We purified the interacting proteins by immunoprecipitation with GFP antibody. They were subjected to LC-MS/MS mass spectrometry to identify 20-60 candidate targets for CaM, CmkA, CmkB, and CmkC, respectively. Interestingly, there was little overlap among them, suggesting that each protein uses different signaling strategies by targeting different proteins.

研究分野：微生物学

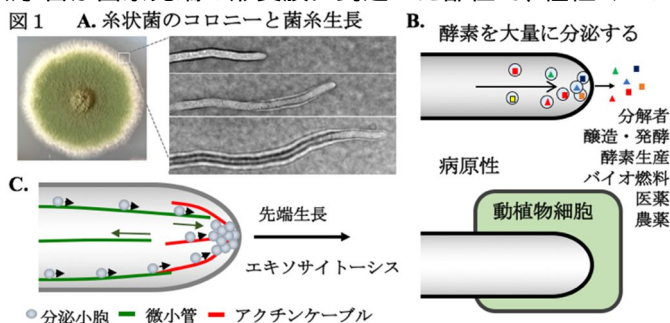
キーワード：糸状菌 菌糸 カルシウム アクチン カルモジュリン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

カビは、菌糸の先端を伸ばすことで先端生長を行うことから、細胞のダイナミックな形態変化を研究するのに最適な基礎研究のモデルである (図 1A)。また、カビは様々な酵素を大量に分泌して生長するため、環境中で分解者として重要な役割を果たし、古くから醸造・発酵に利用され、近年では有用酵素・バイオ燃料生産の産業分野でも利用されている。一方、カビは、動植物や農作物細胞へ貫入し病原性を示すものを多く含むことから、ヒトおよび作物病害の防除のためにも重要である。これらカビの有用性と病原性は、菌糸生長と密接に関連している (図 1B)。また、カビは様々な環境に適応し、人間生活における衣食住や工業製品を栄養源として菌糸生長することで、物理的・化学的に分解し劣化させる。そのため、カビ対策は大きな課題である。

先端生長のために必要な膜やタンパク質は、菌糸先端への分泌小胞の輸送とエキソサイトーシスによって、菌糸先端に供給される (図 1C)。その過程で、菌糸先端で重合して形成されるアクチンの構造物であるアクチンケーブルが、必須である。これまでに申請者は、菌糸先端 (約 3 μm の幅) のどこでエキソサイトーシスが起こるかにより、先端生長が空間的に制御されることを示した。菌糸先端に伸長する微小管が、分泌小胞の長距離の輸送に利用され、先端付近でアクチンケーブルに分泌小胞を受け渡す。微小管が菌糸先端の形質膜に到達した部位で、極性マーカーと呼ばれるタンパク質複合体が集合する。極性マーカーが集合した部位 (超解像イメージングで約 120 nm) から、アクチンケーブルが形成され、そこでエキソサイトーシスが起きる。即ち、極性マーカーがどこに集合するかにより菌糸の生長方向が制御される。



当時の成果で、菌糸生長が一定ではなく、徐々に伸びることを発見した。極性マーカーの集合、アクチンケーブルの合成、エキソサイトーシスがそれぞれ周期的であることを示し、 Ca^{2+} の流入が周期的に起きることで、これらを同調させる機構を発見した (Takeshita et al PNAS, 2017)。このように周期的に徐々に菌糸を伸ばす一連の動的機構を、ここでは菌糸生長の躍動性と呼ぶ。 Ca^{2+} の流入に関わるチャンネルの破壊株の表現型から、この躍動性が正常な形態の菌糸生長に必要であった。この躍動性の生物学的意義として、外的シグナルに早く応答し、菌糸生長の速度や方向を制御し、環境に適応するために必要であるという仮説に至った。

2. 研究の目的

この仮説を検証することを目的とし、その分子機構について、また外的シグナルに対する躍動性の変化について解析することで、仮説を検証する。さらにマイクロ流体デバイスを併用し、外的シグナルに応答した菌糸生長方向の変化 (屈性) を解析する。そして、実環境を想定し、糸状菌と細菌または植物細胞とを相互作用させた際の菌糸生長の応答 (躍動性と屈性) を解析する。

3. 研究の方法

(1) 躍動性に関わる分子機構 極性マーカーと相互作用するタンパク質群を、免疫沈降と質量分析で同定した。その中には、機能未知遺伝子群の他に、 Ca^{2+} 濃度依存的に活性化することが広く知られている kinase; Calmodulin-dependent kinase (CamK) が含まれていた。 Ca^{2+} の一時的な流入により CamK の標的がリン酸化され、アクチンの重合、エキソサイトーシスに関わる可能

性があるため、CamK ならびに機能未知遺伝子の機能解析を行う。これら遺伝子の発現を抑制または誘導した株で、菌糸生長の躍動性 (アクチンの重合、エキソサイトーシス、Ca²⁺の流入、菌糸生長)を、蛍光イメージングにより測定する。また、蛍光タンパク質付加による局在解析を行う。CamK の標的候補を、同様に免疫沈降と質量分析で同定する。

(2) 外的シグナルに応答した躍動性の変化 Ca²⁺の流入に関わるチャンネルを同定し、その活性が膨圧により制御されている可能性を示した。様々なストレスを与えて、菌糸生長の躍動性を、同様に測定する。ストレスとして、温度変化、栄養の貧富、炭素源・窒素源の違い、Ca²⁺チャンネルの活性化における膨圧を想定した浸透圧ストレス、Ca²⁺濃度、動植物細胞への侵入を想定した低酸素ストレス、マイクロマニピュレーターによる物理的接触などを試す。

(3) 外的シグナルに応答した躍動性と屈性のマイクロ流体デバイスを用いた解析

躍動性と生長方向との間の、時間制御と空間制御の関連が、未解明のままである。外的シグナルに応答した生長方向の変化(屈性)をより顕著に測定するため、マイクロ流体デバイスを用いる。この実験も、蛍光顕微鏡下で行うため、菌糸生長の躍動性と生長方向を決定する極性マーカーの位置を、蛍光イメージングにより測定する。ステージを自動で移動させて多点でタイムラプス観察が可能であるため、一回の実験で 100 以上の数の菌糸の屈性を判定出来る。屈性を促す外的シグナルとして、先の拡散性のシグナル物質を用いる。さらに、糸状菌の生育・分化を制御し、クオラムセンシングに関わる化合物 (重炭酸塩、ファルネゾール、オクタノール類等)、細菌間の認識に関わる化合物、糸状菌と植物間での認識に関わる化合物などを用いる。さらに、異種の糸状菌、細菌、植物細胞の培養液を用いた勾配により、屈性のバイオアッセイを行うことで、生物間認識に関わる新規物質の同定の糸口を掴む。

4 . 研究成果

Calmodulin CaM に RFP を付加した融合タンパク質を発現する株、さらに Calmodulin-dependent kinase, CmkA, CmkB, CmkC に GFP を付加した融合タンパク質を発現する株を構築し、それぞれの細胞抽出液に対して RFP 抗体または GFP 抗体による免疫沈降を行い相互作用するタンパク質群を精製した。それらを LC-MS/MS の質量分析にかけると、CaM, CmkA, CmkB, CmkC のターゲット候補をそれぞれ 20-60 個同定した。興味深いことに、それらの重複はほとんど見られず、それぞれのタンパク質が異なるタンパク質をターゲットとすることで、シグナル伝達を使い分けていることが示唆された。GO 解析により、CaM と相互作用するタンパク質には細胞周期、オルガネラの組織化・局在化に関わるものが濃縮され、CmkA には菌糸生長、刺激への応答、細胞間コミュニケーションに関わるものが濃縮され、CmkB,C には一次代謝に関わるものが濃縮された。外的シグナルに応答した躍動性の変化 共焦点顕微鏡ベースでポイントレーザーを使う事で細胞の目的部位にストレスを与えた際の、躍動性の変化、即ち、アクチンの重合、エキソサイトーシス、Ca²⁺の流入、菌糸生長を、蛍光イメージングにより観察し、Ca²⁺の細胞内での伝導の特性を解析した。現在、論文を準備中である。また、Ca²⁺の流入とアクチンの重合、エキソサイトーシス、膜輸送の菌糸生長における役割を総説としてまとめ発表した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Yasui Mizuki, Oda Ken, Masuo Shunsuke, Hosoda Shuji, Katayama Takuya, Maruyama Jun-ichi, Takaya Naoki, Takeshita Norio	4. 巻 7
2. 論文標題 Invasive growth of <i>Aspergillus oryzae</i> in rice koji and increase of nuclear number	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Fungal Biology and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40694-020-00099-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Abeysinghe Gayan, Kuchira Momoka, Kudo Gamon, Masuo Shunsuke, Ninomiya Akihiro, Takahashi Kohei, Utada Andrew S, Hagiwara Daisuke, Nomura Nobuhiko, Takaya Naoki, Obana Nozomu, Takeshita Norio	4. 巻 3
2. 論文標題 Fungal mycelia and bacterial thiamine establish a mutualistic growth mechanism	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 e202000878
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.26508/lisa.202000878	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Takeshita Norio	4. 巻 7
2. 論文標題 Fungal research in Japan: tradition and future	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Fungal Biology and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40694-020-00104-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Fukuda Sayumi, Yamamoto Riho, Yanagisawa Naoki, Takaya Naoki, Sato Yoshikatsu, Riquelme Meritxell, Takeshita Norio	4. 巻 12
2. 論文標題 Trade-off between Plasticity and Velocity in Mycelial Growth	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 e03196-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mBio.03196-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Takeshita Norio	4. 巻 2020
2. 論文標題 Control of Actin and Calcium for Chitin Synthase Delivery to the Hyphal Tip of Aspergillus	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Curr Top Microbiol Immunol	6. 最初と最後の頁 1-17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/82_2019_193	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 竹下典男
2. 発表標題 菌系の高速道路と細菌の通行料
3. 学会等名 新学術領域「ポストコッホ生態」公開シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 竹下典男
2. 発表標題 糸状菌と細菌の相利共生
3. 学会等名 農芸化学会シンポジウム「微生物研究の新機軸としての相互作用研究」 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹下典男
2. 発表標題 真菌と細菌の相利共生
3. 学会等名 日本細菌学会「集団微生物学と細菌バイオフィーム研究の frontline」 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 芹澤 知子, 榎尾 俊介, 別役 重之, 高谷 直樹, 竹下 典男
2. 発表標題 糸状菌の先端生長におけるカルシウム情報伝達経路
3. 学会等名 糸状菌分子生物学コンファレンス
4. 発表年 2019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		
メキシコ	CICESE		