

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15429

研究課題名（和文）糸状菌における細胞融合を誘導する転写制御機構の解析

研究課題名（英文）Study on the transcriptional 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）と酵母は同じ菌類に属するが、その制御機構には相違があると考えられる。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 FsiA を同定し、これが転写因子である AoSte12 を介して細胞融合を転写レベルで制御することを示唆していた。本研究における解析により、AoSte12 以外に *A. oryzae* の細胞融合を制御する転写因子が存在する可能性が考えられた。さらに未知の細胞融合に関わる転写因子のスクリーニングから複数の候補因子を同定した。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

糸状菌の細胞融合の研究はアカパンカビ *Neurospora crassa* を中心に行われてきた。本研究から考えられた新たな細胞融合制御機構は *N. crassa* において提唱されているモデルとは異なり、糸状菌のなかでも細胞融合制御機構に相違があることを示唆している。また、本研究で同定した細胞融合に関わる転写因子は酵母には保存されておらず、糸状菌と酵母の細胞融合の違いを明らかにする上で重要な知見となりうる。また細胞融合は個体間での交配には必須な過程であるが、麹菌 *A. oryzae* では困難である。そのため、本解析のさらなる進展により *A. oryzae* の交配育種の実現につながる事が期待される。

研究成果の概要（英文）：The regulation mechanisms are thought to be different between filamentous fungi and yeasts. We previously identified filamentous fungi specific novel protein FsiA in koji mold *Aspergillus oryzae* and suggested that FsiA transcriptionally regulates cell fusion via a transcription factor AoSte12.

The results in this study suggest that a transcription factor other than AoSte12 regulates cell fusion in *A. oryzae*. Moreover, we obtained some candidate transcription factors involved in cell fusion. These results will contribute to elucidate 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* 転写制御

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 生物において細胞融合は有性生殖に必須の過程である他、多核生物である糸状菌においては遺伝的に異なる核を有する個体(ヘテロカリオン)の形成にも必要である。これらの現象は産業糸状菌である麹菌 *Aspergillus oryzae* の交配育種を実現する上で重要な過程である。しかし、糸状菌の細胞融合機構の研究は主にアカパンカビ *Neurospora crassa* に限られ、その他の糸状菌では研究が進んでいなかった。この問題の解決のため、我々は *A. oryzae* における細胞融合の定量法、融合細胞の可視化法を確立していた。

(2) 出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の細胞融合を制御する MAP キナーゼカスケードとその下流の転写因子 Ste12 は糸状菌においても細胞融合に関与するが、酵母と糸状菌との細胞融合様式の違いを考えると制御機構にも違いが存在することが示唆されていた。我々は *A. oryzae* において細胞融合に関わる新規タンパク質として FsiA を同定し、FsiA が AoSte12 を介して細胞融合を転写レベルで制御することを示唆していたが、その詳細な分子機構は不明であった。ただし、FsiA の存在が AoSte12 のリン酸化レベルに影響を与えることは示唆していた。一方で酵母では細胞融合に必須な Ste12 が *A. oryzae* では必須ではないことも示しており、AoSte12 に依存しない制御機構の存在が示唆されていた。

### 2. 研究の目的

糸状菌の細胞融合を遺伝子の転写レベルで制御する Ste12 依存的、非依存的な分子機構を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 一部を欠損した AoSte12 の解析から被リン酸化箇所を絞り込み、さらに候補となった被リン酸化アミノ酸残基を置換した変異体を発現する株の表現型解析から、AoSte12 の被リン酸化部位の特定を試みた。

(2) *Aoste12* 欠失株における RNA-seq 解析と AoSte12 の ChIP-seq 解析を行い、AoSte12 が直接制御する遺伝子の同定を試みた。

(3) 糸状菌特異的に存在する転写因子の破壊株を用いて細胞融合に寄与する転写因子の同定を試みた。

### 4. 研究成果

(1) これまでの解析により、*fsiA* 欠失株では AoSte12 のリン酸化レベルが減少し、*fsiA* 高発現株では増加することが示唆されていた。このことと表現型を考慮し、リン酸化型 AoSte12 が細胞融合を誘導し、非リン酸化型 AoSte12 が細胞融合と生育を抑制するという仮説を立てた。そこで、部分的に領域欠損させた AoSte12 に HA タグを付加したタンパク質を発現する *fsiA* 欠失株、*fsiA* 高発現株を作製し、ウエスタン解析により検出されるバンドの位置を比較することで、AoSte12 の被リン酸化領域の特定を試みた。その結果、AoSte12 の N 末端 304 アミノ酸のみを発現させた場合にも両株間でバンドの位置に違いが見られたことから、AoSte12 のこの領域がリン酸化修飾を受けることが示唆された。また、これらの解析の中で、AoSte12 の N 末端 205 アミノ酸の領域が FsiA との相互作用に必要であることが示された。

(2) AoSte12 の被リン酸化アミノ酸残基を特定するため、N 末端 304 アミノ酸に含まれるセリン、スレオニン、チロシン残基のなかで糸状菌の Ste12 オルソログに保存されている 33 のアミノ酸残基を抽出した。セリン、スレオニンはアラニンに、チロシンはフェニルアラニンに置換した、一残基置換体 HA-AoSte12 を発現する *fsiA* 高発現株を作製し、ウエスタン解析により検出した。その結果、3 つのアミノ酸残基の置換体 (T122A、T145A、S228A) において HA-AoSte12 の移動度の増加が見られた。このうち T122A 変異体では FsiA との相互作用が見られないことから、FsiA との相互作用が AoSte12 のリン酸化に必要である可能性が考えられた。一方で、他の 2 つの変異体では FsiA との相互作用が確認された。

(3) 上記の 3 つの AoSte12 の変異体の発現カセットを *Aoste12* 欠失株に導入し、細胞融合効率を測定した結果、T122A、T145A 変異体発現株では細胞融合効率の減少が見られたが、S228A 変異体発現株では細胞融合効率の減少は見られなかった。以上の結果から、変異体でも FsiA と相互作用、細胞融合効率に影響を与える T145 が AoSte12 の制御に重要である可能性が考えられた。

次に *fsiA* 欠失株で見られる細胞融合、生育の阻害が *Aoste12* の欠失により部分的に回復

することから、*fsiA*、*Aoste12* の二重欠失株に *AoSte12*<sup>T145A</sup> または *AoSte12*<sup>T145D</sup> を発現させて、その表現型を観察したところ、期待通り *AoSte12*<sup>T145D</sup> を発現させても二重欠失株の生育を悪化させることはなかった。しかし、*AoSte12*<sup>T145A</sup> の発現株でも *fsiA* 欠失株ほどの生育の悪化は示さず、*AoSte12* の T145 のリン酸化だけでは *AoSte12* の制御機構を説明することは困難であり、さらなる解析が必要であると考えられた。

(4) (1)-(3)の解析と並行し、*AoSte12* がどのように細胞融合を制御するのかを明らかにするため、*Aoste12* 欠失株における RNA-seq 解析と *AoSte12* の ChIP-seq 解析を行い、*AoSte12* の標的となる遺伝子の特定を試みた。これ以前の解析では細胞融合を誘導する条件で十分に菌体を回収することができず、代替として液体静置培養時の転写解析を行い、*AoSte12* が細胞融合関連遺伝子の発現を制御することを示唆していた。しかし、今回は細胞融合の誘導条件での RNA 抽出を可能とし、その条件で RNA-seq 解析を行った。

*N. crassa* では *Ste12* オルソログ PP-1 が転写因子をコードする *adv-1* を誘導し、ADV-1 が細胞融合に関連する遺伝子の転写を誘導するというモデルが提唱されている。以前液体静置培養で行った転写解析の結果、*A. oryzae* でも *AoSte12* が *adv-1* オルソログ *AonosA* を誘導するという同様の機構が考えられていた。しかし、今回細胞融合の誘導条件で行った RNA-seq 解析の結果、*Aoste12* 欠失株で *AonosA* の発現量の低下は見られず、この結果は qRT-PCR によっても支持された。また ChIP-seq 解析でも *AonosA* のプロモーター領域に顕著なピークは検出されなかった。以上のことから、*AoSte12* が *AonosA* を直接の標的としないことが示唆され、*A. oryzae* の細胞融合制御機構は *N. crassa* とは異なっており、未だ明らかになっていない細胞融合制御機構が存在する可能性が考えられた。

(5) 細胞融合を誘導する条件で培養した場合に、細胞融合が誘導されるタイミングを調べるため、緑色蛍光を持つ株と赤色蛍光を持つ株の胞子を混合して培養した結果、培養 13 時間後に初めて融合細胞が確認された。そこで、細胞融合が誘導されていない培養 8 時間後と誘導されている培養 16 時間後においてそれぞれ RNA-seq 解析を行い、細胞融合時に起こる転写変動について検討したところ、この間に *AonosA* の発現が著しく上昇することが示された。そして *AoSte12* が *AonosA* を直接制御しないのであれば、別の転写因子が細胞融合時に *AonosA* の発現を誘導することが考えられた。細胞融合時に *AonosA* の発現を誘導する転写因子を同定するため、*A. oryzae* の転写因子欠失株を用いたスクリーニングを行うこととした。当初、薬剤耐性遺伝子を用いた細胞融合検出系を確立して行う予定であったが、細胞融合を検出する実験系のなかで薬剤耐性が期待通りに機能しなかったため、栄養要求性株を用いた系に変更した。

*AonosA* が糸状菌に特異的な転写因子をコードしていることを考慮し、BLASTp 解析を基に糸状菌には保存されているが酵母には保存されていない転写因子を 101 個選択し、これらをスクリーニングの対象とした。101 遺伝子のうち、3 遺伝子を除いた 98 遺伝子の欠失株を作製し、野生型株との間での細胞融合効率を測定した。野生型株同士の間での細胞融合効率と比較して細胞融合効率が 20%未満に減少する欠失株を選択し、6 つの候補遺伝子を取得した。

(6) 以上のように、本研究からこれまでに知られていない糸状菌の細胞融合制御機構の存在が示唆され、さらにスクリーニングによってその機構で働くことが期待される候補転写因子の絞り込みに成功した。今後、これらの転写因子の解析を進めることによって、糸状菌の新たな細胞融合制御機構の解明につながることを期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takuya Katayama, Ozgur Bayram, Taoning Mo, Betim Karahoda, Oliver Valerius, Daigo Takemoto, Gerhard H Braus, Katsuhiko Kitamoto, Jun-ichi Maruyama	4. 巻 115
2. 論文標題 Novel Fus3- and Ste12-interacting protein FsiA activates cell fusion-related genes in both Ste12-dependent and -independent manners in Ascomycete filamentous fungi	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Microbiology	6. 最初と最後の頁 723-738
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/mmi.14639	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 該当する

〔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 Lu Chan, Mori Noriko, Katayama takuya, Saito Ryota, Iwashita Kazuhiro, Maruyama jun-ichi
2. 発表標題 Cellular dynamics upon cell fusion in the co-culture between compatible/incompatible strains in the industrial filamentous fungus <i>Aspergillus oryzae</i>
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 皆川春香、片山琢也、岡大椰、小川真弘、兒島孝明、中野秀雄、小山泰二、北本勝ひこ、丸山潤一
2. 発表標題 麹菌 <i>Aspergillus oryzae</i> における転写因 TrsA と TrsB による菌核形成制御機構の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 知見悠太、山口勝司、齋藤直也、片山琢也、重信秀治、丸山潤一
2. 発表標題 麹菌 <i>Aspergillus oryzae</i> が有する特異的な染色体領域の発見とゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 による大規模欠損
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Lu Chan, Katayama Takuya, Saito Ryota, Iwashita Kazuhiro, Maruyama Jun-ichi
2. 発表標題 Mitochondria fission dysfunction alleviates hetero- karyon incompatibility-triggered cell death in the industrial filamentous fungus <i>Aspergillus oryzae</i>
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2022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		
アイルランド	アイルランド国立大学		