

令和元年6月14日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15086

研究課題名(和文)多細胞微生物の細胞機能のヘテロ性の解明

研究課題名(英文)Heterogenous organization of multicellular fungal hyphal cells

研究代表者

高谷 直樹 (Takaya, Naoki)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：50282322

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、糸状菌の菌糸の細胞ごとの機能分化(ヘテロ性)を明らかとすることを旨とした。糸状菌 *Aspergillus nidulans* の菌糸をマイクロ培養デバイス内で整列させて培養することが可能となったが、その後の解析に用いる大量の培養システムを構築することは困難であった。一方、グリコーゲン代謝酵素とチオレドキシリン様タンパク質の細胞内局在性を蛍光タンパク質との融合タンパク質を用いて解析した結果、いずれも菌糸の部分によって局在が異なることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

微生物の多細胞体(菌糸、バイオフィーム等)は、天然および人工的な環境下で極めて頻繁に見られる。したがって、微生物による多細胞性の増殖のメカニズムを解明することができれば、身の回りの役立つ菌糸を効率的に生長させ、厄介な菌糸を抑制する画期的な微生物制御技術の開発につながり、多くの産業分野の技術革新を促すと期待される。本研究成果は、このための基礎的知見として重要な意義を持つ。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to reveal fungal hyphal principle of multi-cellular organization and spatial heterogeneity. Firstly, we established ordered growth of filamentous hyphae in micro-scale devices for biochemical analyses. We cultured germrings and hyphae of the fungus *Aspergillus nidulans* in the devices, while the biomass of the harvested hyphae was below limits of biochemical analyses such as highly sensitive mass spectrometry. GsyA and GphA, which are predicted to be involved in glycogen metabolism, and AN6915 (thioredoxin-like protein) were investigated for their localization in the multicellular hyphae. Their fusion proteins with fluorescent mCherry and GFP were produced in recombinant *A. nidulans* strains, and fluorescence microscopies indicated that they are localized in particles in the cells, of which morphology and presence are different among the hyphal tip and basal cells. These results confirms that the heterogenous cells comprise fungal hyphae.

研究分野：応用微生物学

キーワード：糸状菌 多細胞生物 菌糸

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

1. 研究開始当初の背景

単細胞微生物を祖として発展した微生物の研究は、より複雑な多細胞微生物の研究へと展開し、現在では、糸状菌などの多細胞微生物(菌糸)や単細胞微生物の多細胞性のバイオフィルムを分子レベルで解析することが可能となりつつある。これら微生物の多細胞性の増殖様式は病原菌の感染の確立などの様々な応用面で重要であることから、微生物が多細胞体を構築する機構の解明は現在の応用微生物学の最大の課題の一つといえる。糸状菌の多細胞体は、細胞外マトリクスである細胞壁を介した細胞同士の物理的な付着と異なる代謝を行う不均一な細胞集団による機能分化によって成立する(図1)。後者の細胞の不均一性(ヘテロ性)と機能分化が多細胞型の増殖の鍵を握ることは明らかであるが、このメカニズムに関しては、研究代表者らによる糸状菌の菌糸の代謝に関する一部の研究を除き、多くが未解明のままであった。

2. 研究の目的

多細胞からなる糸状菌の菌糸は、先端生長により生育する。このとき、菌糸の基底部分と先端の細胞の代謝と機能は大きく異なっており、これによって多細胞性の菌糸の生長様式が維持されると予想される。先端生長の生長様式は、宿主への感染と有用化合物や酵素の分泌生産に深く関わることから応用上も重要である。このため、多細胞性の菌糸のなりたちの分子基盤について基礎・応用分野から注目されてきたが、研究の多くは、菌糸の先端部に着目したものに限られている。そこで、本研究は、菌糸の先端だけでなく基底部分と中間部分にも着目し、各部の細胞のヘテロ性と機能分化を分子レベルで解明する。そのための第一段階として、これらの mRNA と代謝産物の細胞間での局在性の相違を分析するシステムを構築し、これを明らかにすることを旨とした(図1)。

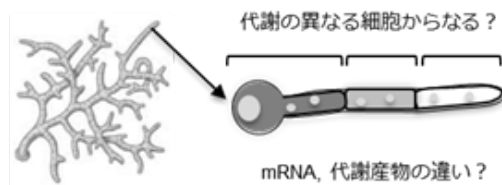


図1 糸状菌の菌糸のヘテロ性

3. 研究の方法

多細胞微生物の多細胞性のなりたちの分子機構の研究は、従来の分子生物学の手法に加えて、それらの観察技術の構築がブレイクスルーとなる。研究代表者は、最近、工学分野で主に利用されてきたマイクロ流体デバイス(シリコンチップ上に微小流路を集積し、実験系をマイクロスケール化させたもの)を微生物の観察に取り入れ、多細胞体中の任意の細胞の挙動の追跡を可能とするシステムを導入した。また、糸状菌の分子生物学・生化学的研究に秀でており、GFPなどの蛍光タンパク質を用いたタンパク質の菌糸細胞内での局在性の解析や質量分析系を用いた代謝産物の微量・網羅的解析の経験も多く持つ。本研究では、これらの技術を融合させることで、多細胞微生物の菌糸のヘテロ性と機能分化の制御機構を解明する。得られた研究成果は、これらの多細胞体を制御する技術の開発に貢献し、特に新たに同定される多細胞体の形成因子は、新たな創薬ターゲットとして新規の治療薬の開発に資する。

4. 研究成果

(1) 本研究では、多細胞性の生育形態をとる糸状菌の菌糸の細胞ごとの機能分化(ヘテロ性)を明らかにすることを旨とした。第一に、これらの多細胞系の中のヘテロ細胞を一細胞レベルで観察する手法を確立することを旨とした。具体的には、多細胞微生物である糸状菌の菌糸の基底部分、中央部分、先端部分での細胞ごとの代謝・機能の相違を解明するためにマイクロ流体デバイスを活用して、これらの部位をとりわけ戦略を立てた。また、このときのモデル糸状菌としては、*Aspergillus nidulans* を用いた。まず、デバイスの流路、材質、培地のフィード条件を検討し、観察に適した生育条件の最適化を行った。その結果、マイクロデバイス内に *A. nidulans* の胞子を入れ固定すること、その胞子を発芽させ生育させることが可能となった。さらに、生育させた菌糸の大量調整系の構築を旨としたが、これまでに、十分量の菌糸細胞を調整する系を構築することはできていない。世界的にみてもこれに成功した報告はないことから、この手法を用いて菌糸を大量に調製するためには、高度な工夫やデバイス設計が必要であると考えられる。

(2) 十分量の菌糸細胞を調整し網羅的な解析をすることが困難であったため、菌糸の多細胞系の中で他とは異なる性質を示すヘテロ細胞を一細胞レベルで観察する手法を確立することを旨とした。特定のタンパク質に着目し、それらの菌糸細胞におけるヘテロ性についての検討を行った。グリコーゲンは生物

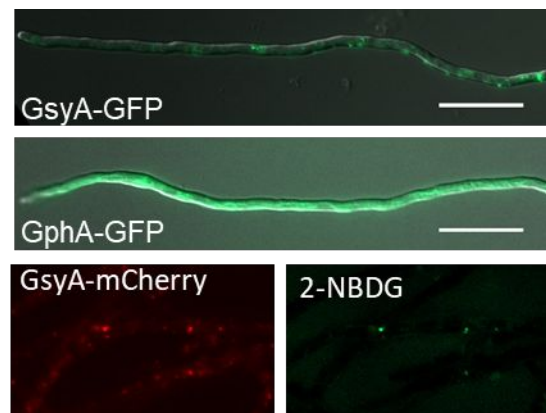


図2 *A. nidulans* の菌糸細胞内での GsyA と GphA の局在
GFP および mCherry を用いたレポーター解析。2-NBDG は glycogen の特異的染色試薬で処理した細胞

界でよく知られる貯蔵多糖であり、菌類においては *Saccharomyces cerevisiae* による生合成と分解に関する研究が進められている。*A. nidulans* も、そのゲノム中にグリコーゲンの代謝に関わると予想される遺伝子が存在するが、その機能などの詳細は未解明であった。そこで、本菌の glycogen 合成と分解に関わる glycogen synthase (GsyA)、glycogen phosphorylase (GphA)の菌糸細胞内での局在性を観察したところ、これらは互いに異なる細胞内局在性を示し、明瞭なヘテロ性が見られた(図2)。これは、糖代謝に関わる機能が菌糸細胞内で不均一であることを示すものとしてユニークな発見であった。

A. nidulans のチオレドキシシン様タンパク質の1つである AN6915 は、タンパク質の脱ユビキチン化活性を持つ PPPDE ドメイン、AnCdc48 (ユビキチン選択的 AAA 型シャペロン) と結合する PUL ドメインおよび酸化還元活性を有するチオレドキシシンドメインからなる構造を有することを示してきた(図3)。このようなドメイン構造を持つチオレドキシシン様タンパク質は糸状菌に特徴的である。本研究では、AN6915 が嫌気(低酸素)ストレス環境下で発現誘導されることを示した。またこの遺伝子破壊株では、嫌気条件に応答した液胞の肥大化が見られなくなったことから、AN6915 は *A. nidulans* の液胞の肥大化に関わることを示した。さらに、AN6915-GFP 融合タンパク質の細胞内局在を観察したところ、低酸素条件に応答して細胞質から液胞へと局在性が変化することが見出された。また、AN6915 の遺伝子破壊株ではオートファジーのマーカータンパク質である AtgH-GFP 融合タンパク質の液胞への移行の頻度が低かった。このことから、AN6915 株は低酸素条件に応答して自ら液胞へと移行されオートファジーを進行させる機能を持つことが示された。以上の研究は、AN6915 が菌糸の細胞によって、異なる役割を持つことを示すものであり、菌糸細胞のヘテロ性の新たな例となる知見である。また、糸状菌の菌糸において、環境条件に応答したオートファジーの代謝と液胞をマイクロ流体デバイス内で観察可能であることを示すものであった。

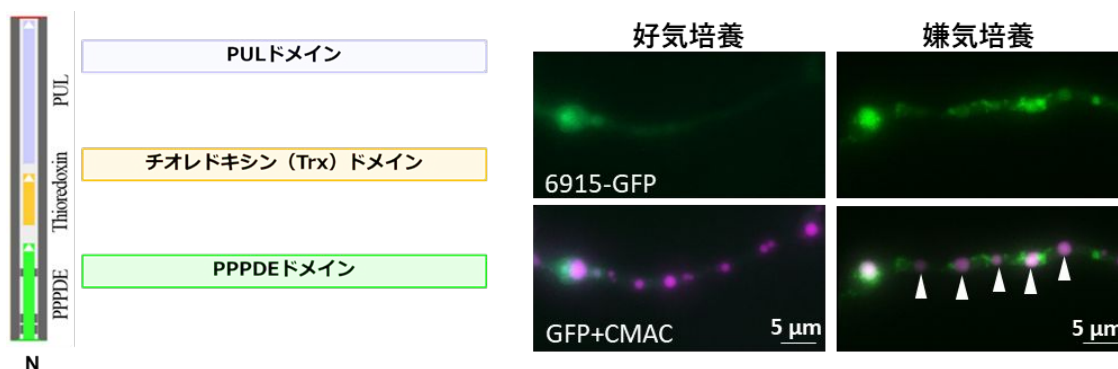


図3 *A. nidulans* の AN6915 タンパク質の機能の解析

(左) AN6915 の推定タンパク質ドメイン構造。(右) 菌糸細胞内での AN6915 の局在。AN6915 と GFP の融合タンパク質を用いた。CMAC は本菌の液胞を染色可能な蛍光試薬である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

Masuo Shunsuke, Komatsuzaki Airi, Takeshita Norio, Itoh Eriko, Takaaki Okazoe, Zhou Shengmin, Takaya Naoki: Spatial heterogeneity of glycogen and its metabolizing enzymes in *Aspergillus nidulans* hyphal tip cells, *Fungal Genetics and Biology*, 110, 48-55 (2018) 査読有
DOI: 10.1016/j.fgb.2017.11.007

[学会発表](計 2 件)

福田紗弓、島宗悠太郎、芹澤知子、横川雅俊、Andrew Utada、柳沢直樹、高谷直樹、佐藤良勝、竹下典男：マイクロ流体デバイスを用いた糸状菌の菌糸の屈性と可塑性の解析、糸状菌分子生物学コンファレンス、2018、長岡
榊尾俊介、岡添孝章、竹下典男、高谷直樹：*Aspergillus nidulans* のグリコーゲン代謝と菌糸内不均一性、糸状菌分子生物学コンファレンス、2017、佐賀
岡添孝章、阿部中央、榊尾俊介、竹下典男、高谷直樹：糸状菌 *Aspergillus nidulans* の低酸素誘導性チオレドキシシンの役割、糸状菌分子生物学コンファレンス、2017、佐賀

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<https://tsukuba-microbes.com/takaya/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：竹下典男

ローマ字氏名：(TAKESHITA, Norio)

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。