

“多細胞生物” 麹菌の細胞間連絡を制御するオルガネラ Woronin body に関する研究



東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻 助教 丸山 潤 一

はじめに

麹菌は日本で古くから日本酒・醤油・味噌の製造に用いられるとともに、タンパク質を大量に分泌する能力を有することから酵素生産や異種タンパク質生産にも利用されている。以前の麹菌研究では酵素の性質や生育特性などが主な研究対象であり、糸状菌として細長い菌糸を伸長させながら生長する形態的特徴に着目した解析はあまり行われていなかった。筆者らは、麹菌で初めて、緑色蛍光タンパク質 GFP (Green Fluorescent Protein) を用いた細胞内可視化技術を確立し、さまざまなオルガネラやタンパク質の局在を可視化、菌糸状の形態に特有の動態を見いだした。

また、麹菌は細長い細胞が連なって菌糸を構成する多細胞生物であり、隣接する細胞は隔壁にあいた小さな穴である隔壁孔を通して細胞間連絡を行っている。この隔壁孔を介した細胞間連絡は、動物のギャップ結合 (gap junction)、植物の原形質連絡 (plasmodesmata) のような、多細胞生物に共通する特徴として興味深い。麹菌をはじめとする糸状菌において多細胞という観点からの研究はあまり進んでおらず、筆者は麹菌での隔壁孔を介した細胞間連絡の分子メカニズムの解明に取り組んだ。

1. 低浸透圧ショックによる麹菌の菌糸先端の溶菌

麹菌を用いた酵素生産において、固体培養での生産性は液体培養と比べて優れている。筆者は、固体培養で水を添加し、酵素抽出を行う過程を模倣するという目的で、寒天培地上の麹菌のコロニーに水を添加して低浸透圧ショックを与えたところ、菌糸先端から溶菌する現象を発見した (図 1)。一方で、1 M 塩化ナトリウム溶液を添加した際や、液体培地で培養した菌体に同様の低浸透圧ショックを与えたときは、このような溶菌は起こらなかった。溶菌するということは菌糸内に残っている酵素も抽出されることであり、固体培養における高い酵素生産性を説明する一つの理由であると考えられた。

溶菌した先端細胞と隔壁孔を通じて連絡している 2 番目の細胞を観察すると、溶菌は伝播せず、細胞内容物が維持されていた。さらに培養を続けると、この 2 番目の細胞から溶菌した先端細胞内に菌糸内菌糸が形成され、新たな菌糸先端を形成する能力をもつことがわかった。以上の観察結果から、通常は、隣接する細胞どうしは隔壁孔を通じて細胞間連絡を行っているも

の、菌糸損傷時には隔壁孔を閉じて溶菌の伝播を防ぐ機構がはたらいていることが推測された。

2. 糸状菌特異的なオルガネラ Woronin body の機能解析

Woronin body は、1864 年にロシアの菌学者 M. S. Woronin により発見された、糸状菌に特異的に存在するオルガネラである。Woronin body は菌糸損傷時に隔壁孔をふさぎ、隣接する細胞への溶菌の伝播を防ぐことが、透過型電子顕微鏡観察などにより示唆されてきた。しかし、約 10 年前にアカバシカビで Woronin body を構成するタンパク質が同定されるまでは、分子レベルでの解析は進んでいなかった。

筆者は、麹菌の Woronin body 構成タンパク質 AoHex1 を蛍光タンパク質と融合して発現し、このオルガネラを生きた糸状菌細胞で初めて可視化した。その結果、低浸透圧ショックにより溶菌した先端細胞に隣接する隔壁孔を、Woronin body がふさいで溶菌の伝播を防ぐ様子を観察することに成功した (図 2)。また、AoHex1 をコードする遺伝子を破壊すると Woronin body が消失し、溶菌の伝播を防ぐ機能が顕著に低下した。以上の実験により、低浸透圧ショック時に隔壁孔をふさぎ、溶菌の伝播を防ぐ機能に Woronin body が必要であることを証明した。

一方で、Woronin body 以外の細胞間連絡を制御する因子については、あまり解析が進んでいなかった。筆者らは最近、さまざまなストレス条件 (高温/低温、炭素源/窒素源飢餓、高

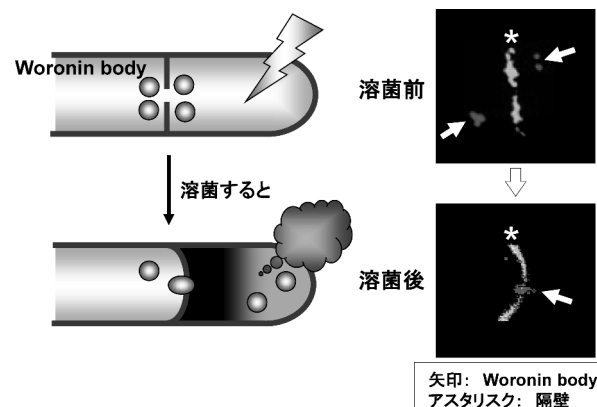


図 2 Woronin body は溶菌時に隔壁孔をふさぐ

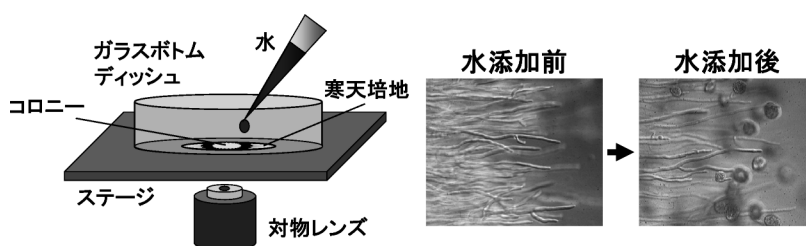


図 1 低浸透圧ショックによる麹菌の菌糸先端の溶菌

pH/低 pH, パルスレーザー処理による物理的なストレス) に応答して隔壁孔に凝集するタンパク質 AoSO を発見した。AoSO が溶菌の伝播を防ぐ機能に関与することから、このタンパク質がストレス依存的に細胞間連絡を遮断する可能性が示された。

3. Woronin body はペルオキシソームから分化する

Woronin body 構成タンパク質 AoHex1 は C 末端にペルオキシソーム移行配列 PTS1 (Peroxisome Targeting Signal 1) を有することから、Woronin body がペルオキシソームから形成している可能性が考えられた。筆者らは、ペルオキシソームの分裂・増殖装置を利用して Woronin body が分化すると予想し、この過程に必要な Pex11 に着目した。麹菌には *PEX11* 遺伝子と相同性を有する遺伝子が二つ (*Aopex11-1*, *Aopex11-2*) 存在するが、遺伝子破壊株の表現型から *Aopex11-1* 遺伝子がペルオキシソームの分裂・増殖に必要であることがわかった。さらに *Aopex11-1* 遺伝子破壊株では、ペルオキシソームにとどまったまま分化できない Woronin body が観察され、溶菌の伝播を防ぐ機能が低下することを観察した。以上の結果から、*AoPex11-1* がペルオキシソームの分裂・増殖とともに、Woronin body の分化にも関与することを明らかにした。

図 3 には Woronin body の形成機構を示す。*AoHex1* タンパク質はペルオキシソームに輸送され、重合化することで Woronin body の前駆構造を形成する。筆者らは、*AoHex1* の重合化がリン酸化修飾により調節されることを明らかにした。その後、ペルオキシソームの分裂・増殖装置を利用して、Woronin body は独立し、隔壁へと運ばれる。

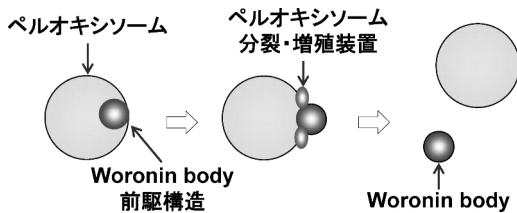


図 3 Woronin body はペルオキシソームから分化する

4. ビオチン合成におけるペルオキシソームの関与の発見

ビタミンの一種であるビオチンは、カルボキシル基転移酵素の補酵素であり、細菌、植物、一部の菌類により合成される。真核生物のビオチン合成経路については植物での研究が先行していたが、ミトコンドリアでビオチンが合成されることが報告されていたのみであり、上流の経路は不明であった (図 4)。

ペルオキシソーム移行配列には PTS1 と PTS2 の 2 種類があり、それぞれの受容体である Pex5 と Pex7 により認識される。当初、筆者らは Woronin body の分化機構を詳細に解析することを目的として、麹菌のペルオキシソーム移行配列の受容体をコードする遺伝子 *Aopex5*, *Aopex7* の破壊株を作製した。これらの遺伝子破壊株は、ペルオキシソームの一般的な機能である脂肪酸の β 酸化を行うことができず、脂肪酸を炭素源とした最少培地では生育できない。ところが驚いたことに、グルコースを炭素源とした最少培地でも、これらの株は生育できなかった。一方で、栄養が豊富な培地では正常な生育が見られたことから、その成分を絞り込んだ結果、ビオチンがこれらの株の生育に必要であることを突きとめた。

さらにタンパク質配列データベースを検索した結果、ビオチン合成経路の上流の酵素 BioF (KAPA [7-keto-8-aminopelargonic acid] synthase) がペルオキシソーム移行配列を有することを見だし、そのペルオキシソームへの局在を示した。そして、BioF のペルオキシソームへの局在が、ビオチンの合成に必要であることを機能的に証明した (図 4)。

以上の結果から筆者らは、ペルオキシソームがビオチンの合成に関与することを、世界で初めて発見した。また、植物の BioF タンパク質についてもペルオキシソームに局在することを示したことで、本発見がビオチンを合成する真核生物に普遍的な現象であることを明らかにした。

おわりに

最近筆者らは、Woronin body や AoSO 以外の隔壁孔局在タンパク質を見だし、それらも溶菌の伝播を防ぐ機能に関与することを明らかにしている。このことは、Woronin body に限

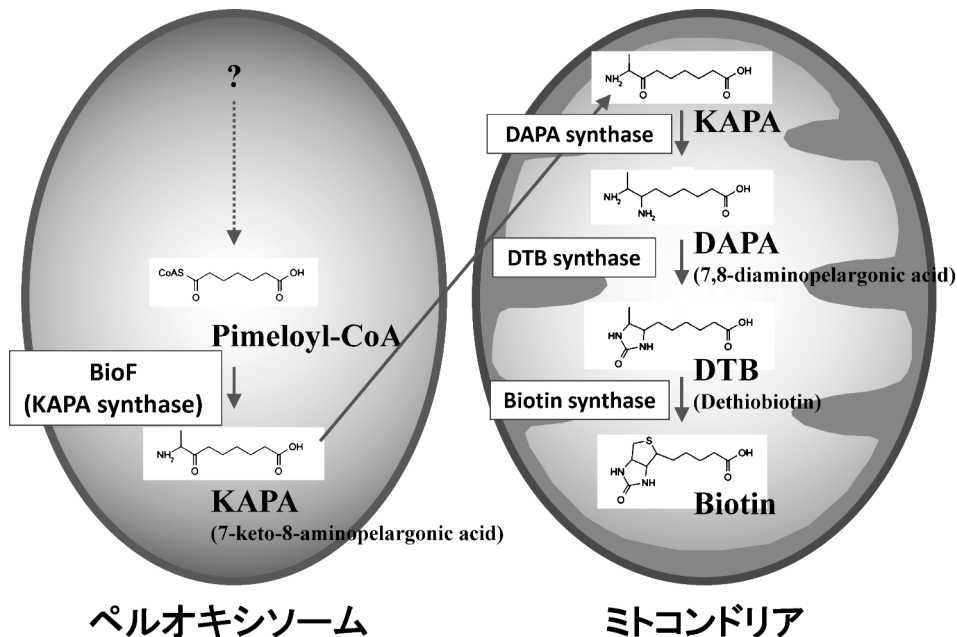


図 4 真核生物におけるビオチンの合成経路

らず、さまざまな因子が協調することで溶菌時の細胞修復に寄与している可能性を示しており、溶菌後に新たな菌糸生長を始める「再生」も含めた分子機構の解明につながることを期待している。また、ペルオキシソームがビオチン生合成に関与することの発見は、麹菌を用いて製造した食品の機能性向上に役立つ可能性がある。今後、細胞やオルガネラという観点からの研究成果を通じて、麹菌の新機能開発に貢献できればと考えている。

本研究は、東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学

専攻微生物学研究室で行ったものです。本研究においてご指導、ご支援を賜りました同研究室教授・北本勝ひこ先生に心より御礼申し上げます。また、有意義なご助言をいただきました同研究室准教授・有岡 学先生、本研究で多大な貢献をしてくださりました Praveen Rao Juvvadi 博士に深く感謝申し上げます。また本研究の成果は、微生物学研究室の方々や共同研究者の皆様のご協力、ならびに諸先生方のご支援によるものであり、ここに深く感謝申し上げます。最後になりましたが、本奨励賞にご推薦くださいました日本農芸化学会関東支部長・星野貴行先生に厚く御礼申し上げます。