

麹菌の Woronin body 形成に關与する AoHex1 の機能解析

丸山 潤一

(東京大学大学院農学生命科学研究科 応用生命工学専攻)

研究成果：

Woronin body は 19 世紀にロシアの生物学者 Woronin により発見された、子囊菌類などの糸状菌に特異的なオルガネラである。通常隔壁近傍に存在し、菌糸損傷時に溶菌が他の菌糸に伝播するのを防ぐため、隔壁孔をふさぐ働きをしている。しかし、最近まで Woronin body の形成機構および機能について、分子レベルの解析は全く進んでいなかった。

古くより醸造に用いられてきた麹菌 *Aspergillus oryzae* は、安全性およびタンパク質高生産能ゆえに、現在異種タンパク質生産の宿主として産業的に注目を集めている。固体培養は長い醸造の歴史のなかで「麹造り」として行われてきた伝統的な培養法であり、液体培養と比較して酵素生産性が高いことが知られている。ここ数年で固体培養特異的な転写制御および翻訳後修飾などの分子メカニズムが解明されてきているが、細胞レベルでの解析はほとんど行われていない。また、同培養下において培地中に細胞内タンパク質が漏出することが経験的に知られているが、溶菌と関連して考えられている。そこで、溶菌制御に關与する Woronin body に着目し、その形成に關与する *Aohex1* 遺伝子を *A. oryzae* からクローニングし、解析を行った。このなかで、選択的プライミングによる 2 つの転写産物の発現、ペルオキシソーム局在配列の存在を見出した。さらに、破壊株を作製したところ Woronin body が消失したことから、AoHex1 はその形成に必要であることがわかった。本研究では、固体培養での酵素生産時に起こると考えられる溶菌を顕微鏡下で再現することにより、AoHex1 の溶菌における役割を細胞生物学的に明らかにした。

1. 浸透圧ショックによる菌糸先端の溶菌と *Aohex1* 遺伝子破壊株の溶菌の伝播

固体培養では水を培地に添加することによって、目的の酵素を抽出する。そこで、寒天培地上に形成したコロニーを水に浸して、コロニー辺縁部を顕微鏡で経時的に観察した。その結果、菌糸先端細胞が溶菌し、細胞質が飛び出す興味深い現象を見出した。一方で、1 M 塩化ナトリウム溶液を添加した場合、また液体培養の菌体に同様の低浸透圧ショックを与えても溶菌は起こらなかった。固体培養において菌糸は外部環境を高浸透圧と認識しているとの報告があることから、低浸透圧ショックにより菌糸先端が溶菌することがわかった。

次に、*Aohex1* 遺伝子破壊によって、隔壁を隔てて隣の 2 番目の細胞に溶菌が伝播し

たかを調べた。その結果、野生株では隔壁を境に溶菌の伝播は起こらなかったものの、*Aohex1* 遺伝子破壊株では2番目の細胞も溶菌していた。このことから、低浸透圧ショックによる先端細胞の溶菌の伝播を防ぐために、*AoHex1* が必要であることが明らかになった。

2. 3次元解析による Woronin body および隔壁孔の可視化

AoHex1 を緑色蛍光タンパク質 EGFP と融合して発現することにより局在を解析した。その結果、通常隔壁近傍に見られるドット状の蛍光が、低浸透圧ショックにより溶菌した細胞に隣接する隔壁の中央に観察されたことから、Woronin body の可視化に成功した。一方、*AoHex1* のペルオキシソーム局在配列のみを融合した EGFP を発現させた場合は、溶菌細胞に隣接する隔壁の中央に同様の蛍光が観察されなかった。このことから、ペルオキシソームから Woronin body に選別され、機能するためには、*AoHex1* 全体の構造が必要であることがわかった。

次に、低浸透圧ショックによる溶菌時に *AoHex1* が隔壁孔に局在することを証明するために、Woronin body および隔壁を同時に可視化した。隔壁の可視化には、分泌酵素 RNase T1 と EGFP との融合タンパク質を用いた。これを発現すると菌糸先端とともに隔壁に蛍光が見られ、共焦点レーザー蛍光顕微鏡により取得した蛍光像を3次元構築すると、蛍光を発する隔壁の中心に隔壁孔が空白部分として観察された。続いて、赤色蛍光タンパク質 DsRed2-*AoHex1* 融合タンパク質を同時に発現し、共焦点レーザー蛍光顕微鏡により取得した2重染色像を3次元構築した。その結果、DsRed2-*AoHex1* の赤い蛍光は通常隔壁近傍に存在するのに対し、低浸透圧ショックにより溶菌を誘導すると隣接する隔壁孔をふさいでいることが確認された。以上のことから、*AoHex1* は隔壁孔をふさぐことで低浸透圧ショック時に起こる溶菌の伝播を防ぐことが明らかになった。

結論

本研究では、固体培養での酵素抽出時に起こると想定される低浸透圧ショックを顕微鏡下で再現することにより、先端細胞が溶菌することを *A. oryzae* で初めて見出した。また、*AoHex1* が Woronin body 形成に関与し、低浸透圧ショックの際に隔壁孔をふさぎ溶菌の伝播を防ぐことを明らかにした。麹菌をはじめとする糸状菌は菌糸状の形態をもって生育し、隔壁で仕切られた細胞は隔壁孔を通じて原形質連絡を行うことで、旺盛な菌糸成長および高分泌能を可能にすると考えられる。今回観察された低浸透圧ショックによる溶菌の伝播を Woronin body が防ぐ現象は、糸状菌が多細胞であるからこそもつ生存維持のための巧妙な仕組みを示している。本研究は固体培養での細胞レベルの生態・環境応答を知るうえで貴重な情報を提供しており、麹菌における“固体培養の細胞生物学”の端緒となることを期待している。

文献

Maruyama, J., Juvvadi, P. R., Ishi, K., and Kitamoto, K., *Aspergillus oryzae* AoHex1 is required for Woronin body formation and septal plugging during hyphal lysis induced by hypotonic shock. Microbiology (Submitted)