

# 麹菌における Woronin body 機能の分子メカニズムの解明とその応用

丸山 潤一

(東京大学大学院 農学生命科学研究科)

## 研究の目的

麹菌 *Aspergillus oryzae* は日本の伝統的な発酵産業において、日本酒・味噌・醤油の醸造に用いられている。また、大量のタンパク質を培地中に分泌する能力と安全性から、酵素生産および異種タンパク質生産の宿主としても使用されている。*A. oryzae* は糸状菌であり、菌糸状の細胞を伸長させて生育する。*A. oryzae* の菌糸では多数の細長い細胞が連なり、隣接する細胞は隔壁で仕切られている。透過型電子顕微鏡で隔壁を観察すると、その中心には隔壁孔と呼ばれる小さな穴があいており、隣接する細胞はこれを介して細胞間連絡をしている。

我々は以前の研究で、寒天培地上の *A. oryzae* のコロニーに水をかけると先端細胞が溶菌することを発見した (図 1)<sup>1,2)</sup>。この際に、「Woronin body (オロニン小体)」という子囊菌門の糸状菌に特異的に存在する細胞小器官が隔壁孔をふさいで、隣の細胞への溶菌の伝播を防ぐことを明らかにした (図 1)<sup>1)</sup>。また、*A. oryzae* において、Woronin body がペルオキシソームから分化する過程を明らかにした<sup>2,3)</sup>。しかし、Woronin body が隔壁近傍に局在するためのメカニズムはまだわかっていなかった。本研究では、Woronin body が隔壁近傍に局在することが、その溶菌の伝播を防ぐ機能に果たす役割を解明することを目的とした。

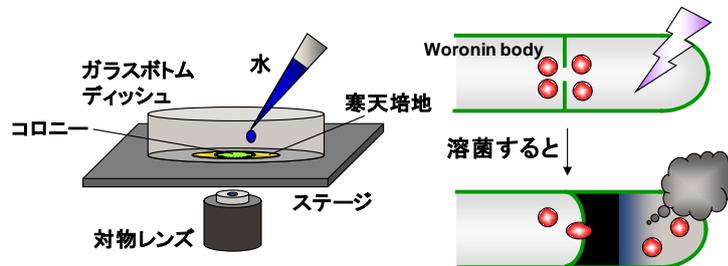


図 1. 低浸透圧ショックによって菌糸先端が溶菌した際に、Woronin body が隔壁孔をふさぐことで隣接する細胞への溶菌の伝播を防ぐ。

## 方法

*A. oryzae* の遺伝子の破壊は、アデニン要求性を相補する *adeA* マーカーによって行った。透過型電子顕微鏡観察では、寒天培地での培養で得られた *A. oryzae* の各株の菌体について、グルタルアルデヒドおよび四酸化オスミウムによる固定を行った。低浸透圧ショック実験では、ガラスボトムディッシュに薄く広げた寒天培地上に *A. oryzae* の各株を点植菌し、1 日培養後に水を添加してコロニー辺縁部の菌糸先端を溶菌させた。隣接する 2 番目の細胞の内容物の有無を微分干渉顕微鏡で観察することによって、溶菌が伝播したかどうか判定した。

## 結果

### AoLAH タンパク質の機能解析

アカパンカビ *Neurospora crassa* において、Woronin body は隔壁でなく細胞膜に繫留されるが、最近、この過程に必要なタンパク質 Leashin (LAH) が同定された<sup>4)</sup>。 *A. oryzae* ゲノムデータベースを検索した結果、 *N. crassa lah* と相同性を有する遺伝子 AO090011000895 を見だし、 *Aolah* と命名した。アミノ酸配列の比較によって ORF 予測を修正し、 *N. crassa* では *lah* 遺伝子が2つのタンパク質を発現するのとは異なり、 *Aolah* 遺伝子は 5,727 アミノ酸からなる単一ポリペプチドをコードすることが推定された。

続いて、AoLAH の機能解析を目的として、その遺伝子破壊株を取得した。透過型電子顕微鏡観察を行った結果、野生型株では Woronin body が隔壁近傍に観察されたが、 *Aolah* 遺伝子破壊株では同様の局在は観察されず、繫留されていない Woronin body が隔壁から離れたところに観察された。以上の結果から、AoLAH が Woronin body の隔壁近傍への繫留に必要であることを明らかにした。

低浸透圧ショックにより溶菌を誘導したところ、 *Aolah* 遺伝子破壊により溶菌が伝播する菌糸の割合が増加した。このことから、AoLAH は Woronin body の溶菌の伝播を防ぐ機能に関与することが示された。

### AoLAH タンパク質の各領域の機能解析

AoLAH は 5,000 アミノ酸を超える巨大なタンパク質であることから、その機能における各領域の役割を解析することにした。

AoLAH の N 末側の配列的に保存された 1 番目から 2,039 番目のアミノ酸の領域を EGFP と融合して局在解析した。その結果、隔壁孔の両側にその局在が観察され、溶菌時には隔壁孔に移行したことから、Woronin body の局在・挙動と一致した。一方で、AoLAH の C 末側の配列的に保存された 4710 番目から 5727 番目の領域の場合は、隔壁孔に局在が観察された。これらの結果より、AoLAH の N 末側の領域は Woronin body との相互作用、C 末側の領域は隔壁孔への相互作用に機能することが示唆された (図 2)。

さらに、AoLAH の N 末側と C 末側の領域を融合したタンパク質を *Aolah* 遺伝子破壊株で発現した結果、Woronin body が隔壁近傍に再び観察されるようになった。これは、前述の N 末側と C 末側の機能から予想通りの結果であったが、Woronin body が隔壁の

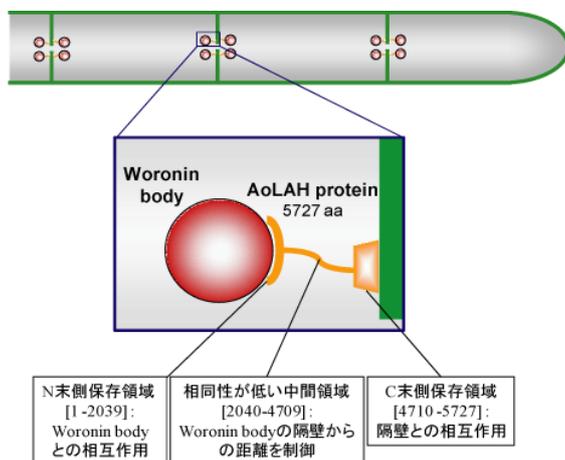


図 2. AoLAH タンパク質の構造と機能

より近くで観察されるようになった。この結果より、糸状菌の間で配列的に保存されていない2,040番目から4,709番目の領域が、Woronin bodyの隔壁からの距離を制御するのに関与することがわかった(図2)。

## 結論

本研究では、AoLAHタンパク質がWoronin bodyを隔壁近傍に局在させることにより、溶菌の伝播を防ぐ機能に関与することを明らかにした。また、AoLAHにおいて、2,500アミノ酸を超える中間の領域が、Woronin bodyの隔壁からの距離を制御することについては、隔壁孔をふさぐ機能との関連に興味もたれる。

最近我々は、オランダのグループとの共同研究によって、通常の生育条件でもWoronin bodyが一部の隔壁孔を可逆的にふさぐことを発見した<sup>5)</sup>。そして、隣り合う細胞どうしの細胞間連絡を止めることにより、酵素生産で働く細胞と休む細胞を区別していることを明らかにした。このWoronin bodyの機能にAoLAHが関与している可能性があり、興味深いと考えられる。

## 文献

- 1) Maruyama, J., Juvvadi, P. R., Ishi, K., Kitamoto K. (2005) Three-dimensional image analysis of plugging at the septal pore by Woronin body during hypotonic shock inducing hyphal tip bursting in *Aspergillus oryzae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **331**: 1081-1088.
- 2) Maruyama, J., Kitamoto K. (2013) Expanding functional repertoires of fungal peroxisomes: contribution to growth and survival processes. *Front. Physiol.* **4**: 177.
- 3) Escano, C. S., et al. (2009) Disruption of the *Aopex11-1* gene involved in peroxisome proliferation leads to impaired Woronin body formation in *Aspergillus oryzae*. *Eukaryot. Cell* **8**: 296-305.
- 4) Ng, S. K., Liu, F., Lai, J., Low, W., Jedd, G. (2009) A tether for Woronin body inheritance is associated with evolutionary variation in organelle positioning. *PLoS Genet.* **5**: e1000521.
- 5) Bleichrodt, R. J., van Veluw, G. J., Recter, B., Maruyama, J., Kitamoto, K., Wösten, H. A. (2012) Hyphal heterogeneity in *Aspergillus oryzae* is the result of dynamic closure of septa by Woronin bodies. *Mol. Microbiol.* **86**: 1334-1344.