

## "多細胞生物" 糸状菌の隔壁孔を介した細胞間連絡

誌名	マイコトキシン
ISSN	02851466
著者	丸山, 潤一
巻/号	61巻2号
掲載ページ	p. 53-58
発行年月	2011年7月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



## “多細胞生物”糸状菌の隔壁孔を介した細胞間連絡

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  
113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1

### 要 旨

糸状菌は、多数の細長い細胞が連なる菌糸の形態で生長する。隣接する細胞は隔壁で仕切られているが、隔壁孔と呼ばれる小さな穴を介して連絡をしている。この隔壁孔を介した細胞間連絡は、糸状菌の多細胞生物としての生育に重要な役割を果たしていると考えられるが、一方で、ある細胞が溶菌した際に、隔壁孔を介して連絡している隣の細胞も溶菌に巻き込まれるリスクを伴うシステムでもある。筆者らは、低浸透圧ショックにより麹菌 *Aspergillus oryzae* の菌糸先端が溶菌することを発見し、糸状菌に特異的なオルガネラ Woronin body が隔壁孔をふさぎ、溶菌の伝播を防ぐ役割をもつことを明らかにした。さらに、ストレス依存的に隔壁孔に蓄積するタンパク質を見出し、隔壁孔を介した細胞間連絡がストレスに応答して制御される可能性を示唆した。

キーワード：麹菌、多細胞生物、細胞間連絡、隔壁孔、Woronin body

(Received June 8, 2011)

真正子囊菌綱に属する糸状菌では、多数の細長い細胞が連なった菌糸状の形態で生育し、隣接する細胞は隔壁で仕切られている。隔壁の中心には隔壁孔と呼ばれる小さな穴があいており、隣接する細胞は隔壁孔を通じて細胞間連絡をしている。この細胞間連絡は多細胞生物に特有の細胞システムで、動物のギャップ結合 (gap junction) や植物の原形質連絡 (plasmodesmata) と共通した性質である。隔壁孔を介した細胞間連絡は、糸状菌の多細胞生物としての生育に重要な役割をもつと考えられている。これまで糸状菌において隔壁孔を介した細胞間連絡に注目した研究はあまり多くなかったが、この 10 年の間に分子レベルの解析が行われるようになってきた。本稿では、筆者らが行ってきた麹菌 *Aspergillus oryzae* での研究を中心に、隔壁孔を介した細胞間連絡の制御機構に関する知見を紹介する。

### 1. 溶菌の伝播を防ぐオルガネラ Woronin body

*A. oryzae* は我が国で古くから醸造に用いられているとともに、その安全性と優れたタンパク質分泌能力から酵素生産、異種タンパク質生産にも使用されている。*A. oryzae* を用いた酵素生産では、液体培養と比べて固体培養のときに生産性がよいことが知られている。また、固体培養のときには細胞内のタンパク質が漏出することが経験的に知られているが、これは溶菌と関連して考えられてきた。筆者らは固体培養での酵素抽出の過程を模倣して、寒天培地上の *A. oryzae* のコロニーに水を添加し、そのときの菌糸を顕微鏡で観察した。その結果、コロニー辺縁部の菌糸先端から細胞内容物が噴き出して溶菌する現象を発見した (Fig. 1A)<sup>1)</sup>。一方で、1 M 塩化ナトリウム溶液を加えた

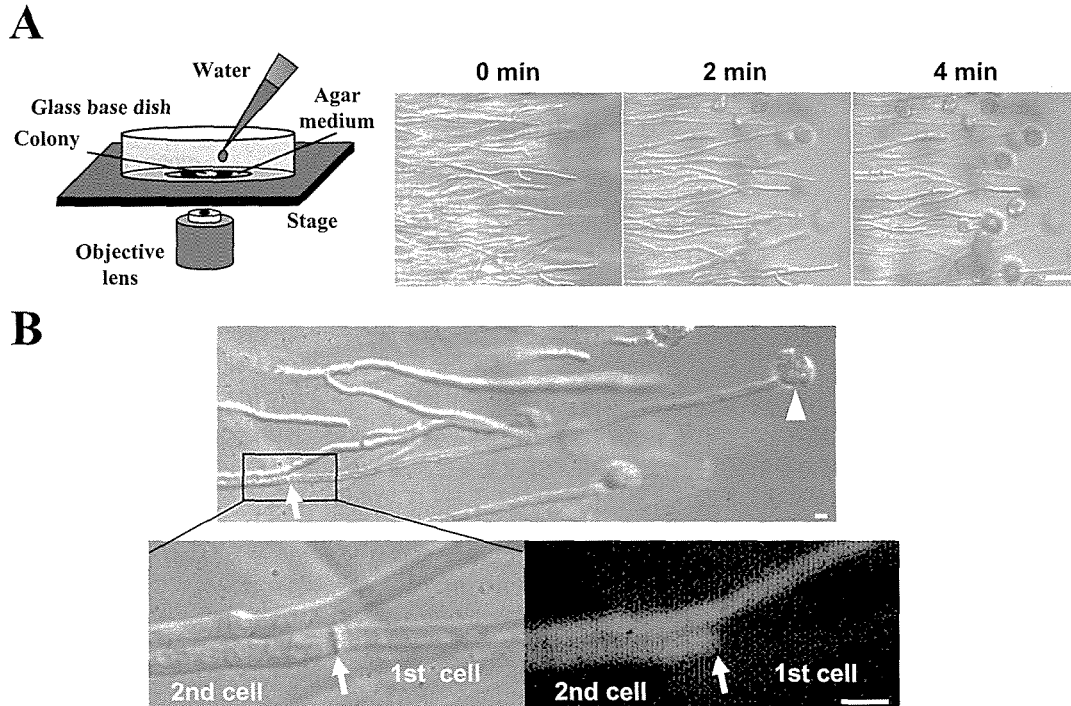


Fig. 1. Hyphal tip bursting upon hypotonic shock in *Aspergillus oryzae*. (A) Schematic model of hypotonic shock experiment and time-lapse observation of hyphal tip bursting. Before and after hypotonic shock, hyphal tips at the edge of a colony were observed with DIC microscopy. Bar: 50  $\mu\text{m}$ . (B) Blockage of the extensive cytoplasmic leakage from the 2nd cell upon the hyphal tip bursting induced by hypotonic shock. The cytoplasm was labeled by EGFP expression. An arrowhead and arrows point the burst hyphal tip and following septum, respectively. Bar: 10  $\mu\text{m}$ .

場合、また液体培養の菌体を用いた際には、このような溶菌は見られなかった。このことから、観察された溶菌は低浸透圧ショックによるものと結論した。

このとき、溶菌した先端細胞と隔壁孔を通じて連絡をしている2番目の細胞は、溶菌に巻き込まれる可能性がある。ところが、その2番目の細胞では細胞内容物が維持され、溶菌は伝播していなかった (Fig. 1B)。さらに培養を続けると、こ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た<sup>2)</sup>。Woronin body は真正子囊菌綱に属する糸状菌に特異的に存在するオルガネラであり、菌糸が損傷したときに溶菌の伝播を防ぐ役割をもつ。このオルガネラは通常、隔壁孔近傍に局在するが、溶菌した細胞に隣接する隔壁孔をふさぐ (Fig. 2A)。透過型電子顕微鏡下では、*A. oryzae* の Woronin body は隔壁の近傍に電子密度の濃い球形の構造として観察される (Fig. 2B)。2000年にアカパンカビ *Neurospora crassa* で Woronin body を構成するタンパク質 Hex1 が初めて同定されたことにより<sup>3)</sup>、このオルガネラの分子レベルでの解析がようやく可能になった。筆者らは *A. oryzae* のゲノムデータベースより *hex1* 相同遺伝子 (*Aohex1*) を見出し、これに赤色蛍光タンパク質 DsRed2 を融合して発現することで Woronin body を可視化した<sup>1)</sup>。同時に、分泌タンパク質 RNase T1 と緑色蛍光タンパク質 EGFP との融合発現によって隔壁を可視化して、上述の低浸透圧ショックで溶菌した細胞に隣接する隔壁を、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。その結果、Woronin body が隔壁孔をふさぐ様子を、生きている細胞で初めて可視化することに成功した (Fig. 2C)。また、作製した *Aohex1* 遺伝子破壊株では Woronin body は観察されず、低浸透圧ショック下では隣接する細胞に溶

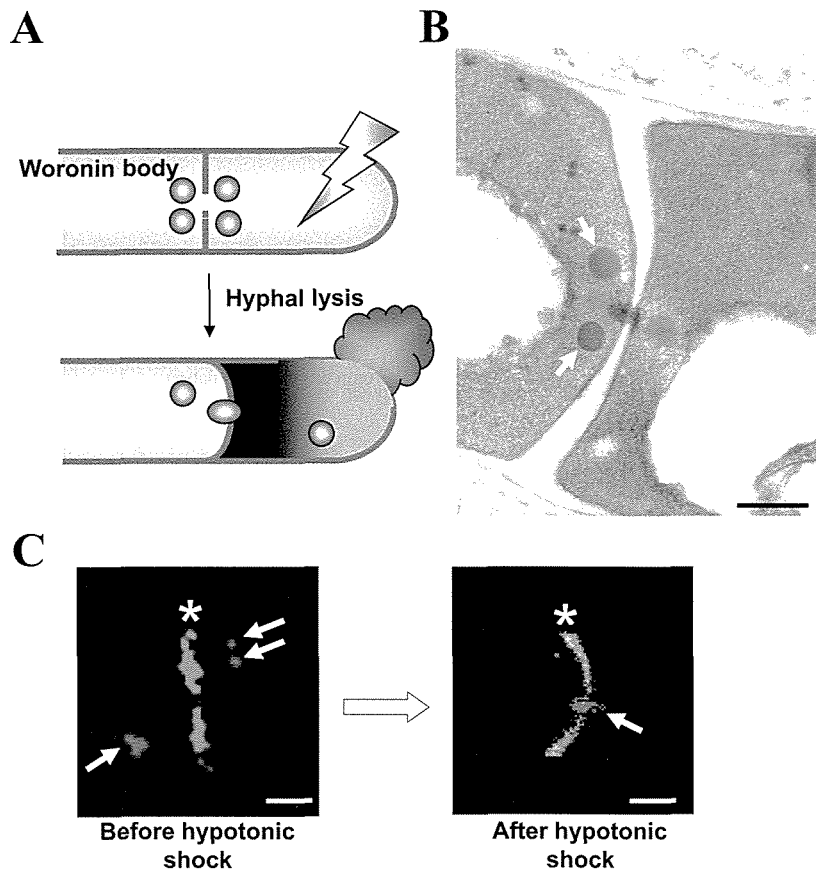


Fig. 2. Morphology and function of Woronin body. (A) Schematic model of Woronin body function. (B) Transmission electron microscopic observation of Woronin bodies (arrows) in *A. oryzae*. Bar: 500 nm. (C) Confocal images of Woronin bodies (red, arrows) and septa (green, asterisks) before and after hypotonic shock (left and right, respectively). Woronin bodies and septa were fluorescently labeled by expressing DsRed2-AoHex1 and RNase T1-EGFP fusion proteins, respectively. Bar: 2  $\mu$ m.

菌が伝播するようになった。以上のことから、AoHex1はWoronin bodyの形成、および低浸透圧ショック時に溶菌が伝播するのを防ぐのに必要であることがわかった。

## 2. ペルオキシソームから分化する Woronin body

AoHex1タンパク質はペルオキシソーム局在配列PTS1 (Peroxisome Targeting Signal 1)をもつことから、Woronin bodyはペルオキシソームから分化して形成することが示唆された。筆者らは、ペルオキシソームの分裂・増殖に必要なPex11に着目し、*A. oryzae*がもつ2つのPEX11相同遺伝子(*Aopex11-1*, *Aopex11-2*)について、各破壊株を作製した<sup>4)</sup>。このうち*Aopex11-1*遺伝子破壊株において、炭素源がオレイン酸のときに生育阻害がみられ、ペルオキシソームの数が減少していた。このことから、AoPex11-1のペルオキシソームの機能および分裂・増殖への関与が確認された。また

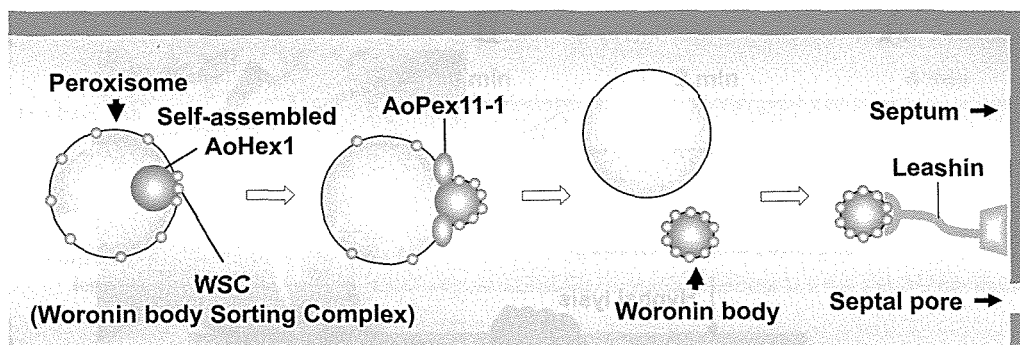


Fig. 3. Putative model of Woronin body differentiation.

同遺伝子破壊株では、低浸透圧ショック下で隣接する細胞に溶菌が伝播するようになり、ペルオキシソームから分化できない Woronin body が観察された。以上の結果から、AoPex11-1 は Woronin body の分化にも関与することが明らかになった。*N. crassa* では Woronin body の分化に WSC (Woronin body Sorting Complex) や Leashin が関与することが報告されており<sup>5,6)</sup>、Fig. 3 にこれまでの知見をもとにした Woronin body の形成機構のモデルを示す。AoHex1 タンパク質はペルオキシソームに輸送されると、自己集合して膜タンパク質の WSC に結合する。その後、AoPex11-1 により Woronin body は、ペルオキシソームから分化し、Leashin により隔壁に係留される。今後は、Woronin body 特有の分化装置と、ペルオキシソームの分裂装置との関連が明らかになることが期待される。

### 3. 他の隔壁孔局在タンパク質とその機能

一方で、Woronin body 以外の隔壁孔に局在する因子が、細胞間連絡においてどのような機能をもつかについても、あまり解析が進んでいなかった。筆者らは、真正子囊菌綱に属する糸状菌に特異的に存在する AoSO タンパク質が、上述の Woronin body と同様に溶菌の伝播を防ぐ機能に関与することを明らかにした<sup>7)</sup>。また、AoSO は通常の培養条件では細胞質に局在し、低浸透圧ショック下で溶菌した細胞に隣接する隔壁孔に蓄積する。さらにこのタンパク質は、様々なストレス（高/低温、炭素/窒素源枯渇、高/低 pH、パルスレーザー刺激）に応答して隔壁孔に蓄積することを見出した (Fig. 4)。この結果は、AoSO が溶菌時だけでなく、ストレスに応答して細胞間連絡を制御している可能性を示唆するものである。

筆者らは最近、有性生殖に関与する MAP キナーゼに相同性を有するタンパク質が隔壁孔に局在し、溶菌の伝播を防ぐ機能を有することを発見した (未発表データ)。このことは、MAP キナーゼ経路による信号伝達が、隔壁孔を介した細胞間連絡を制御していることを示唆するものである。

以上で述べた隔壁孔局在タンパク質の存在は、Woronin body 以外にも様々な因子が、隔壁孔での溶菌の伝播を防ぐ機能に関係することを意味している。このような研究の進展は、単純に Woronin body で隔壁孔をふさぐというだけでなく、溶菌後の修復から生長を再開するまでの過程も含めた「再生」のメカニズムの解明につながっていくと考えられる。

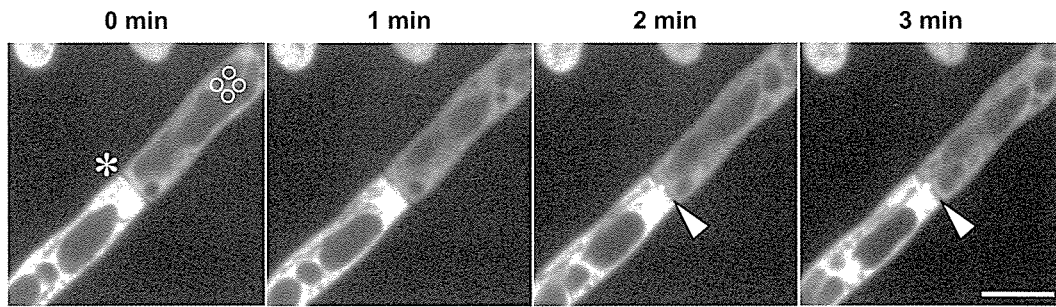


Fig. 4. Accumulation of AoSO-EGFP fusion protein at the septal pore upon pulse laser treatment. The strain expressing the AoSO-EGFP fusion protein was subjected to pulse laser treatment (0 min). Circles indicate the area where the pulse laser was applied, while arrowheads indicate the appearance of a punctate dot at the septal pore upon pulse laser treatment. Bar: 5  $\mu$ m.

### おわりに

筆者らが観察した低浸透圧ショックによる溶菌は固体培養では起こるが、液体培養では見られなかった。溶菌すると細胞内に残存している酵素が漏出してくることから、この現象は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る。したがって、*A. oryzae* の細胞間連絡を操作することにより、固体培養における酵素や異種タンパク質の収率を向上させる可能性があるかもしれない。一方で、病原糸状菌であるイネいもち病菌 *Magnaporthe grisea* では、Woronin body を欠損すると病原性が低下することが報告されている<sup>8)</sup>。このように、糸状菌が“多細胞生物”であることに着目した研究は、病原糸状菌が関係する医療や農業にも有用な知見をもたらすことが期待される。

### 参考文献

- 1) Maruyama, J., Juvvadi, P.R., Ishi, K., Kitamoto, K.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **331**, 1081-1088 (2005)
- 2) Maruyama, J., Kikuchi, S., Kitamoto, K.: *Fungal Genet. Biol.*, **43**, 642-654 (2006)
- 3) Jedd, G., Chua, N.H.: *Nat. Cell Biol.*, **2**, 226-231 (2000)
- 4) Escaño, C.S., Juvvadi, P.R., Jin, F.J., Takahashi, T., Koyama, Y., Yamashita, S., Maruyama, J., Kitamoto, K.: *Eukaryot. Cell*, **8**, 296-305 (2009)
- 5) Liu, F., Ng, S.K., Lu, Y., Low, W., Lai, J., Jedd, G.: *J. Cell Biol.*, **180**, 325-339 (2008)
- 6) Ng, S.K., Liu, F., Lai, J., Low, W., Jedd, G.: *PLoS Genet.*, **5**: e1000521 (2009)
- 7) Maruyama, J., Escaño, C.S., Kitamoto, K.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **391**, 868-873 (2010)
- 8) Soundararajan, S., Jedd, G., Li, X., Ramos-Pamplona, M., Chua, N.H., Naqvi, N.I.: *Plant Cell*, **16**: 1564-1574 (2004)

**Intercellular communication via septal pore in the multicellular microorganism *Aspergillus oryzae***

Jun-ichi MARUYAMA: Department of Biotechnology, The University of Tokyo (1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-8657, Japan Tel: +81-3-5841-5164 Fax: +81-3-5841-8033 e-mail: amarujun@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp)

Filamentous ascomycetes form multicellular hyphal networks that are compartmentalized by septa. The septum has a pore allowing the flow of cytoplasm and organelles between the adjacent cells. This intercellular communication is a common system in multicellular organisms as seen in gap junctions of animal cells and plasmodesmata of plant cells. In the industrial filamentous fungus *Aspergillus oryzae*, we found that hyphal tips burst out the cytoplasmic constituents soon after flooding colonies grown on agar media with water (hypotonic shock). Woronin body, an organelle specifically found in filamentous ascomycetes, is known to plug the septal pore adjacent to the lysed cell to prevent the excessive cytoplasmic leakage. Analysis with *A. oryzae* *Aohex1* gene encoding a major Woronin body protein revealed that Woronin bodies plug the septal pores adjacent to the burst apical cells upon hypotonic shock. Furthermore, we demonstrated that Woronin bodies differentiate from peroxisomes by employing the peroxisomal proliferation/division machinery. Recently, we found that AoSO protein accumulates at the septal pore under various stress conditions (low/high temperature, extreme acidic/alkaline pH, nitrogen/carbon starvation, pulse laser treatment). This gives a possibility that intercellular communication via the septal pore is controlled in response to environmental stresses.

**Key words:** *Aspergillus oryzae*, multicellular organism, intercellular communication, septal pore, Woronin body