

# 研究終了報告書

## 「生体膜組成を介した細胞外脂肪族化合物の機能」

研究期間：2021年10月～2024年3月

研究者：岩間 亮

### 1. 研究のねらい

リン脂質二重層を主要構成成分とする生体膜は、細胞と外界の境界領域として必須の役割を果たし、全ての細胞が有する重要な構成要素の1つである。リン脂質の構造は極性頭部と疎水性尾部に大きく分けられるが、尾部は多様な脂肪酸から構成されている。生体膜の重要な物性の1つとして膜流動性が挙げられ、リン脂質尾部の脂肪酸鎖が大きな影響を持つ。細胞機能には柔軟な膜動態が必要になることも多いため、細胞は生体膜流動性を制御することで細胞機能を調節していると考えられる。

自然界の至るところに多様な脂肪族化合物が存在する。細胞内において、これら脂肪族化合物を合成するには、膨大なエネルギーと還元力を必要とするため、生物は脂肪族化合物をエネルギー源としてだけでなく、生体膜等の細胞構成要素に使用している。環境中に存在する脂肪族化合物はその疎水性から、細胞の脂質二重層に挿入され、生体膜流動性に大きな影響を与えていると考えられるが、細胞外の脂肪族化合物が生体膜全体にどのような影響を与えるのかについては体系的には理解されていない。そこで、本研究では、脂肪族化合物に応答して、細胞はどのように生体膜を変化させ、その変化が膜動態を中心とする細胞機能にどのように影響を与えるのかを解明することを目的とする。本研究を通じて、脂肪族化合物による生体膜の制御という観点から、新たな微生物機能の発見に繋がると期待される。

生体膜流動性は細胞周辺の物理化学環境によっても変化し、特に、温度や乾燥・浸透圧は大きな影響を与える。これらストレスは自然界では一般的なものであり、自然界に生育する微生物は絶えずこの変化に適応している。本研究における脂肪族化合物における応答も含めて、微生物が外界環境に応答して、生体膜環境をどのように調節しているのかの全体像の理解に向けた発展が期待される。さらに、合成に膨大なエネルギー・還元力を要する脂肪族化合物が自然界の中でどのように循環しているのかを理解できる。

基礎生物学的にも、生体膜環境をどのように感知しているのかは重要な課題であり、様々な生物種における生体膜状態の感知機構の普遍性と特異性を見出すことにより、すべての生物が共通して有する生体膜制御の理解がより一層進む。本研究が環境中における脂質生物学の発展に寄与すると期待される。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

生物における生体膜のリン脂質アシル鎖の不飽和度は環境温度によって大きく変動することが知られていたが、本研究を推進する中で糸状菌の細胞形態ごとに生体膜組成が大きく変わることが明らかとなった。リン脂質アシル鎖の不飽和度の変化においても環境温度変化による不飽和度変化を凌ぐ水準となっており、本研究目的の「細胞外脂肪族化合物の生体膜組成への影響およびその生物機能への影響」を理解するためには、細胞形態変化を示す微生物

のライフサイクルにおける生体膜変化や細胞集団であるコロニーの局所的な生体膜変化を明確にする必要が出てきた。そこで、モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* の無性孢子(分生子)を培養して経時的に得た菌体におけるターゲットリピドミクス、特徴的な培養段階の菌体におけるノンターゲットリピドミクスを実施するとともに、コロニーの場所に応じたターゲットリピドミクスを行った。その結果、発芽直後の孢子や菌糸先端など細胞極性確立・維持に関わる部分で、不飽和度の高いリン脂質やリン脂質の一種であるホスファチジルエタノールアミンが増加することが示された。同様の傾向は、*Aspergillus* 属の中で遠縁な *Aspergillus oryzae* においても観察されたが、種特異的な変化も見出されてきた。また、上記のノンターゲットリピドミクスから、ターゲットリピドミクスでは見出されなかった分子種を含め約 500 種に及ぶ脂質分子種が検出され、それぞれの生育段階で特異的に増減が見られる脂質種も明らかとなってきた。

細胞外脂肪族化合物の影響としては、糸状菌と二型性酵母を用いた解析を進めた。脂肪族化合物を添加する際に使用する界面活性剤自体がコロニー形状に大きな影響を与えたが、最終的にコロニー形態や生育に影響を与えない、界面活性剤濃度、脂肪族化合物濃度を決定した。また、糸状菌の孢子発芽時において不飽和度の高いリン脂質が増加することをモデルケースとして解析し、不飽和度の増加に関わる遺伝子の破壊株を用いたトランスクリプトーム解析を行ったところ、発芽時に不飽和度を増加させることの出来ない条件下で発現変動する遺伝子を複数特定した。

以上の解析を通して、微生物のライフサイクルにおいて生体膜組成が大きく変化していることが明らかとなり、その変化に対する細胞外脂肪族化合物の影響を調べるための条件も設定できた。生体膜組成に関連して変動する遺伝子も見出されており、本研究課題を通して、微生物の生体膜機能を探る基盤が構築されつつある。

## (2) 詳細

### 研究テーマ A「糸状菌の生活環におけるダイナミックな生体膜組成変化」

様々な生物種において、生体膜の主要構成成分であるリン脂質アシル鎖の不飽和度(以降、「生体膜不飽和度」と称する)は環境温度で大きく変化することが示されてきた。モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* においても、培養温度を低温にすると、二重結合を 5 個あるいは 6 個持つリン脂質種が増加することが示された。しかしながら、本研究において、糸状菌は生活環においてダイナミックに生体膜組成を変化させ、その変化は温度変化よりも大きいことが示された。また、生体膜組成変化と細胞形態に相関があることも示唆されてきた。

#### (A1) 糸状菌の液体培養における経時的な菌体内のリン脂質解析

*A. nidulans* の分生子を最少培地で 30℃で培養し、経時的(0、2、4、6、9、12、15、18、21、24、48 時間後)に菌体を回収し、抽出したリン脂質をターゲットリピドミクスにより、糸状菌の主要リン脂質であるホスファチジルセリン (phosphatidylserine, PS)、ホスファチジルエタノールアミン (phosphatidylethanolamine, PE)、ホスファチジルコリン (phosphatidylcholine, PC)、ホスファチジルイノシトール (phosphatidylinositol, PI)を定量した。分生子が等方的に無極性生長する間に、PE 量が顕著に上昇し、PC 量が顕著に減少することが示された。また、細胞内に極性が確立されて分生子が発芽するタイミングでは、二重結合を 5 個あるいは 6 個持つリン脂質が顕著に上昇することが示され、その比率は低温培養時よりも多いことが示された。

#### (A2) 糸状菌のプレート培地におけるコロニーの局所的なリン脂質解析

最少培地プレートで *A. nidulans* を 30℃で 3 日間培養し、形成されたコロニー内の菌体を端から段階的に約 3 mm ずつ回収し、ターゲットリピドミクスにより解析した。菌糸生長が活発に行われているコロニーの最も辺縁部にあたる領域では、その他の領域と比較して、PE 量が多く、PC 量が少ないことが示された。また、二重結合を 5 個あるいは 6 個持つリン脂質の量もコロニーの最も辺縁部に当たる領域で多いことが示された。

#### (A3) 細胞形態の違いによるリン脂質アシル鎖の影響

同じ *Aspergillus* 属で日本の発酵産業で広く使われてきた *Aspergillus oryzae* についても、(A1)と同様の実験を行った。*A. oryzae* においても、発芽するタイミングで二重結合を 5 個あるいは 6 個持つリン脂質が増加することが示された。一方で、その変化のパターンはリン脂質種ごとに *A. nidulans* とは異なり、種ごとの特異性が見出されてきた。*A. oryzae* は *A. nidulans* と比較して、空気中への菌糸(気中菌糸)が長い特徴を持つ。*A. oryzae* において、PC 量が少なくなると気中菌糸形成能が大きく低下することが示された。これら特徴を利用して、それぞれのコロニーのリン脂質解析を行ったところ、プレート表面および内部で伸長する基底菌糸はアシル鎖が短く、気中菌糸はアシル鎖が長いことが示唆された。

#### (A4) 糸状菌におけるノンターゲットリピドミクス

上記、ターゲットリピドミクスにおいて顕著な変化が見られた培養 0、9、48 時間後のサンプルについて、ノンターゲットリピドミクスを実施した。約 500 種に及ぶ脂質分子種が検出され、それぞれの条件で特異的に増減が見られる脂質種が明らかとなった。膜脂質以外の重要な脂質である貯蔵脂質にも着目し、主要成分の 1 つであるトリアシルグリセロールの不飽和度レベル、酸化レベルに極めて多様性があることが明らかとなった。

### 研究テーマ B「細胞外脂肪族化合物の生体膜組成、細胞機能への影響」

細胞外脂肪族化合物を添加する際に、界面活性剤を用いて溶解度の低い脂肪族化合物を可溶化して培地に添加することを計画したが、界面活性剤そのものが *A. nidulans*、*A. oryzae* のコロニー形態に影響を与えた。そこで、*A. nidulans* をモデルに、コロニー形状に大きな影響を与えない界面活性剤濃度を検討し、Triton X-100、Tween 20、Tween 80 において大きな形態変化を示さない濃度を決定した。また、コロニー形態や生育に影響を与えず、脂肪酸の効果も反映される実験条件も決定した。

### 研究テーマ C「生体膜不飽和度の違いによるトランスクリプトーム変化の解析」

(A1)において、糸状菌が発芽する際に生体膜不飽和度を大きく増加させていたが、実際に *A. nidulans* の既知の主要な脂肪酸不飽和化酵素遺伝子である *sdeA*、*odeA*、*odeB* の転写量が発芽前に大きく増加することが示された。発芽時に不飽和度が増加する意義を調べるため、野生型株、*odeA* 破壊株、*odeB* 破壊株が発芽するタイミングの菌体から RNA を抽出し、網羅的転写解析を行った。*odeA* 破壊株、*odeB* 破壊株ともに野生型株と比較して、発現量が変動している遺伝子は少なかったが、いずれの株においても共通して変化した遺伝子も見出された。

### 3. 今後の展開

細胞を外界環境から区画化する生体膜は生物の最も基盤的な構成要素の1つである。環境中には様々なストレスが存在し、自然界に生育する生物は絶えずこの変化に適応する必要があるが、生体膜はそれらストレスを感知する場として機能している。また、動物細胞ではエキソソーム、微生物ではメンブレンベシクルに代表される細胞外小胞、真核細胞内で輸送小胞やオートファゴソームに代表される細胞内小胞など、様々な物質を包み込む基盤としても機能する。このように様々な細胞機能の基盤となる生体膜の物理化学的特性が生体膜機能にどのような影響を与えるのかについては、重要な研究課題である。

本研究成果を踏まえ、今後、非モデル真核微生物内における局所的な生体膜組成解析法の確立、生体膜の物理化学的特性が生み出す生命現象の解明を通して、バイオものづくりにおける新たな微生物をデザイン(Design)する際の選択肢を大きく増やすことを目指す。

### 4. 自己評価

当初の研究構想時点では、真核微生物の生活環の中で生体膜組成がダイナミックに変動することは想定していなかったが、本研究で推進する中でその実態を明らかにでき、論文として報告することができた。この成果は、当初の研究構想である「細胞外脂肪族化合物の影響」を評価するための基盤となる成果となった。

また、当初計画ではターゲットリピドミクスにより主要なリン脂質組成を対象にしていたが、ACT-X 内の連携により多様な脂質種の変動も明らかになってきたことは当初想定を超える大きな成果である。また、糸状菌細胞内において、局在依存的に貯蔵脂質種が異なることが明らかになったことも新たな成果と考えられ、細胞内膜系に対する「細胞外脂肪族化合物の影響」を評価する基盤となる。

### 5. 主な研究成果リスト

#### (1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 1件

1. Iwama R, Okahashi N, Suzawa T, Yang C, Matsuda F, Horiuchi H. Comprehensive analysis of the composition of the major phospholipids during the asexual life cycle of the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Biochim. Biophys. Acta – Mol. Cell Biol. Lipids* 1868, 159379 (2023)

糸状菌(カビ)は生活環の中で細胞形態が大きく変化する真核微生物である。本論文では、モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* の液体培地での無性生活環、ならびに固体培地上に形成されるコロニーの局所的な領域における、生体膜の構成成分であるリン脂質の変化を包括的に明らかにした。細胞極性確立時や維持の際に、特定の脂質成分が増加することが示され、生体膜リン脂質組成の調節が糸状菌の生長と分化に重要であることが示唆された。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: 0 件 (特許公開前のものも含む)

(3) その他の成果 (主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

大会シンポジウム【BBB 連携シンポジウム】「若手研究者の挑戦: 環境とバイオテクノロジーから紡ぐ農芸化学の未来」(世話人代表: 高田啓、世話人: 岩間亮)

シンポジウム内講演タイトル: 真核微生物の生体膜機能を探る(岩間亮)

日本農芸化学会 2024 年度大会 (創立 100 周年記念大会)、2024 年 3 月、東京農業大学、口頭発表

糸状菌の生活環における脂質組成変動と細胞形態形成における重要性

岩間亮

第 24 回新産業酵母研究会講演会、2023 年 12 月、産総研・臨海副都心センター、招待講演

糸状菌 *Aspergillus nidulans* の菌糸生長時における脂質動態の解析

岩間亮、岡橋伸幸、加藤遼、奥崎紗矢、楊淳児、矢野隆章、田中拓男、松田史生、堀内裕之

第 22 回糸状菌分子生物学コンファレンス、2023 年 11 月、徳島あわぎんホール、口頭発表  
選出/ポスター発表

「生体膜脂質から迫る糸状菌の細胞形態制御」

岩間亮、堀内裕之

アグリバイオ、第 7 巻、第 8 号、2023、pp. 76-78

プレスリリース「糸状菌(カビ)の包括的な生体膜変化の解明 ～生体膜組成と形態の相関を解明し、糸状菌の利用・防除に新たな知見～」

<https://www.jst.go.jp/pr/announce/20230831/index.html>

[https://www.a.u-tokyo.ac.jp/topics/topics\\_20230901-1.html](https://www.a.u-tokyo.ac.jp/topics/topics_20230901-1.html)

糸状菌の細胞形態形成におけるリン脂質組成の重要性

岩間亮、須澤徹生、楊淳児、堀内裕之

第 65 回日本脂質生化学会、2023 年 6 月、KKR ホテル熊本、口頭発表