

第三章 EGFP-AoVam3p を用いた液胞膜動態の解析

背景

第二章の結果より、EGFP-AoVam3p は、late endosome/prevacuolar compartment 様構造と液胞膜に局在することが明らかになった。しかし late endosome/prevacuolar compartment 様構造に局在する EGFP-AoVam3p の割合は比較的小さいため、大部分の EGFP 蛍光は液胞膜を反映していると考えられる。このことから、当初の目的とした様に EGFP-AoVam3p を用いて液胞膜の観察が可能であると判断した。

従来の糸状菌の液胞観察系では、6-carboxyfluorescein diacetate (CFDA) 誘導体(Shepherd et al., 1993a, b; Cole et al., 1997; Cole et al., 1998; Ashford, 1998; Uetake et al., 2002)や液胞酵素と EGFP の融合タンパク質(Ohneda et al., 2002)を用いることによって内腔を可視化している。このため液胞の大まかな形は捉えられても、詳細な形態は観察しづらかった。また液胞内腔は酸性であることから fluorescein による蛍光は減衰され、加水分解酵素が多く存在することから蛍光物質の半減期も早く、長時間の観察は難しかった。これに対し EGFP-AoVam3p は液胞膜を可視化していることから、蛍光が長時間持続するとともに細かい膜構造も観察可能であると予想された。このためまず EGFP-AoVam3p を共焦点顕微鏡により観察することで、液胞膜動態の経時的な観察を行った。また染色が困難な、長時間培養後の密度の高い菌糸体における液胞も観察した。さらに分生子発芽や気中菌糸といった特殊な発達段階にある菌糸の液胞もあわせて観察した。

第一節 共焦点顕微鏡を用いた液胞膜動態の解析

通常基部の菌糸において液胞は静的な構造体として観察される。しかしこれらの液胞も分単位の時間で観察すると、移動し、さらに融合や分裂と思われる動きを示していた(Fig. 3-1a)。先端に近い菌糸においてはチューブ状の液胞が観察される。この領域の液胞はより動的で、秒単位の観察によってもその動きが見て取れる(Fig. 3-1b)。また大きな液胞間を小胞状の液胞が動く様子(Fig. 3-1b, 大きな矢頭)や、粒状構造が液胞表面を動く様子(Fig. 3-1b, 小さな矢頭)、さらにそこから形成されたチューブ状液胞(Fig. 3-1b, 矢印)が伸長し、近くの発達した液胞と融合する様子も観察された。さらに先端側の菌糸においては粒状

の構造(Fig. 3-1c, 矢頭)が菌糸の軸にそった動きをしており、しばらく後にその場所にチューブ状液胞(Fig. 3-1c, 矢印)が形成されることが観察された。

Fig. 3-1a で分かる様に、EGFP-AoVam3p の局在は液胞の膜に限られており、通常内腔への局在はみられない。しかし培養 2 日ないし 3 日経過後の菌糸体における基部の菌糸においては、液胞の膜ではなく内腔に EGFP 蛍光が観察された(Fig. 3-2a)。融合タンパク質において EGFP はアミノ末端に付加されているため、液胞膜の細胞質側に存在することが予想される。従って EGFP の内腔への移行には、液胞膜の内腔への出芽を必要とする。これらの菌糸においては液胞が細胞のほぼ大半を占めるほどに発達していることから、ミクロオートファジーによる細胞質成分の液胞内への取り込みと、それに伴う液胞膜の内腔への移行が起こった可能性が示唆される。さらにこれらの液胞はチューブ状の液胞(Fig. 3-21, 矢印)によって連絡されていたことから、分解産物がチューブ状液胞を介してリサイクルされている可能性も考えられる。また基部の菌糸においては細胞膜に近接して比較的小さな液胞が多く存在している様子も観察された(Fig. 3-2b)。

第二節 EGFP と AoVam3p の融合タンパク質を用いた様々な発達段階における液胞形態の観察

次いで分生子発芽における液胞の動態を観察した。分生子中で EGFP-AoVam3p による蛍光は粒状あるいは雲状の構造として観察された(Fig. 3-3, 0 hr-1 hr)。植菌後 2 hrs 程度経過すると、分生子の膨潤に伴って分生子内に発達した液胞が観察される様になった(Fig. 3-3, 2 hrs~)。分生子内の液胞はさらに発達を続け、最終的に発芽管を伸ばした分生子においては通常直径 2 μm 以上の液胞が数個含まれる様になった。この結果は液胞が、分生子発芽において何らかの役割を担っている可能性を示しているのかもしれない。

次に気中菌糸における液胞構造の観察を試みた。EGFP-AoVam3p による液胞膜の可視化の利点の一つは、液胞内腔ではなく膜が観察できることにより液胞の動態を捉えやすいことであるが、もう一つの利点として染色の必要がないことがあげられる。このため従来の染色によっては観察できなかった培地に接触していない気中菌糸などの液胞構造も観察できるようになった。

気中菌糸における液胞構造を観察するために、当研究室の石らによって考案された分生子形成観察法(Ishi et al., 2005)を改変し、Fig. 3-4 に示すような

培養法を開発した。22 mm×22 mm のカバーガラス上に約 1 cm×1 cm の大きさに切った厚さ約 1 mm の 2% agar 入り寒天培地をのせ、その側面に分生子を植菌した。その上にさらに 22 mm×22 mm のカバーガラスをかぶせることにより、菌糸が横方向にのみ伸長する様にした。これを湿らせたキムワイプを入れたシャーレに入れ、30°C で 2-3 日培養後、顕微鏡観察に供した。

この条件で観察した時、培地内あるいは培地上の通常の菌糸と、栄養と接していない二種類の菌糸という形態的に異なる三種類の菌糸が観察された。栄養と接していない菌糸のうち一つは通常の菌糸より若干細く、ガラス表面からほとんど焦点をずらすことなく観察されたことから、ガラス表面を這っている菌糸であると考えられた。もう一つは 10 μm 前後の直径を持ち、ガラス表面から焦点を大きくずらさなければ観察されなかったことから、気中菌糸であることがわかった。以下、前者をガラス表面菌糸、後者を気中菌糸と呼ぶ。EGFP を発現しない野生株においてもこれらの菌糸、特に気中菌糸は細胞膜あるいは細胞壁に強い自家蛍光を持っていた(Fig. 3-5d, 6d)。このため以下の実験において、細胞表面の蛍光はすべて自家蛍光と判断した。また EGFP を発現しない野生株においては細胞内のオルガネラ様構造が蛍光を有していることはなかった(Fig. 3-5d, 6d)。

ガラス表面菌糸において液胞は通常小さく、直径 2 μm 以上の大きな液胞は観察されなかった(Fig. 3-5a)。またガラス表面菌糸においてはチューブ状液胞が高い頻度で存在し(Fig. 3-5b)、一部の菌糸では網目状に見えるほどチューブ状液胞構造が発達していた(Fig. 3-5c)。気中菌糸においても同様に液胞は小さな粒状構造として観察され(Fig. 3-6a)、チューブ状または網目状の液胞も存在した(Fig. 3-6b)。一部の気中菌糸においては発達した液胞も観察された(Fig. 3-6c)。蛍光像とその数秒後に撮影された微分干渉像との比較でわかる様に、これらの発達した液胞(大きな矢頭)はゆっくりと菌糸先端方向へ流れる様に移動していた。これに対し細胞膜近くに存在する液胞(小さな矢頭)は動かなかった。ただしこれらの発達した液胞を有する菌糸は周りに水滴を伴っている場合が多く、真性の気中菌糸といえるかどうかは断言できない。寒天培地の中あるいは表面においては通常の培養条件下と同様に、膜が EGFP 蛍光を有する液胞(Fig. 3-7a)、チューブ状液胞(Fig. 3-7b)、内腔全体が EGFP 蛍光で満たされた液胞(Fig. 3-7c)が観察された。

考察

糸状菌におけるここ十数年の研究から、チューブ状液胞の存在など特徴的な液胞の側面が明らかになってきた(Shepherd et al., 1993a, b; Cole et al., 1997; Cole et al., 1998; Ashford, 1998; Ohneda et al., 2002; Uetake et al., 2002)。しかし主に分子生物学的な解析の遅れから、その後の研究が滞っていたのも事実である。

筆者は分子生物学的手法が適用可能な *A. oryzae* を用いることで糸状菌の液胞機能を解明することを目的とし、出芽酵母 Vam3p の相同タンパク質 AoVam3p を用いることによってまず液胞膜の可視化を行った。EGFP-AoVam3p は従来の 6-carboxyfluorescein diacetate (CFDA)誘導体(Shepherd et al., 1993a, b; Cole et al., 1997; Cole et al., 1998; Ashford, 1998; Uetake et al., 2002)や CMAC (Cole et al., 1998; Ohneda et al., 2002)、CPY-EGFP (Ohneda et al., 2002)を用いた液胞可視化系と異なり液胞膜を可視化できることから、液胞膜の動態を詳細に、高解像度で観察することができる様になった。また染色を行う必要がない点で簡便であり、培地と直接接していない気中菌糸やガラス表面菌糸における液胞形態も初めて明らかにすることができた。

今回の研究から、液胞が糸状菌の分化、発達の過程で何らかの役割を担っていることが示唆された。一つは分生子発芽において液胞の肥大化が起こるという観察結果である。*Colletotrichum graminicola* において、分生子発芽に先立って油滴がオートファジーによって液胞内へ取り込まれ、それに伴って液胞の体積が増大することが知られている (Schadeck et al., 1998; Schadeck et al., 2003)。また *Magnaporthe grisea* の付着器形成においても油滴がオートファジーにより液胞内へ取り込まれることが知られている(Weber et al., 2001)。付着器は植物体に侵入するために必要な膨圧を、グリセロールの蓄積によって獲得している(de Jong et al., 1997)。このため液胞に取り込まれた油滴が分解、代謝されることによってグリセロールに変換される可能性も示唆されている(Weber et al., 2001)。グリセロールは分生子の発芽時にも必要である(Witteveen and Visser, 1995)。これらの知見を総合すると、分生子の液胞は油滴などを取り込むことで発達し、それによって生じるグリセロールが分生子の膨潤に関与しているのかもしれない。また液胞自身植物において細胞体積の調節に関与していることから(Dolan and Davies, 2004)、液胞の発達によって細胞質の体積を増加させることなく分生子の膨潤を行っているのかもしれない。

通常液胞の膜のみに局在がみられた EGFP-AoVam3p であるが、2-3 日培養後の基部の菌糸においては液胞内腔が EGFP 蛍光によって満たされていることが観察された。融合タンパク質において EGFP は液胞膜の細胞質側に存在するはずなので、EGFP の液胞内腔への移行には液胞膜の内腔への出芽が必要である。これらの菌糸においては液胞が細胞の大半を占めるほどに発達していることから、細胞質成分が液胞内へ取り込まれたことが予想される。このことから基部の菌糸においてはミクロオートファジーによる細胞質成分の液胞への取り込みと、それに伴う液胞膜の内腔への移行が起こっていると考えられる。おそらく菌糸の密度が高くなって栄養が十分に得られない基部の菌糸においては、エネルギーを消費して細胞を生き長らえさせるよりは、最小限の生命活動だけを行う様に不要な細胞質成分、オルガネラを分解しているのではないだろうか。さらにこれらの液胞はチューブ状液胞によって連絡されていたことから、分解産物であるアミノ酸やポリリン酸がチューブ状液胞を介して他のコンパートメントへリサイクルされている可能性も考えられる。

気中菌糸およびガラス表面菌糸においても液胞が特徴的な形態を示すことが明らかになった。いずれの菌糸においても液胞は小さく、チューブ状液胞が発達していた。ではなぜ菌根菌のように菌糸先端と基部両方向への物質輸送の必要性がないと思われる *A. oryzae* においてもこのようなチューブ状液胞が存在するのであろうか。チューブ状液胞が高い頻度で観察された二種類の菌糸はいずれも直接培地と接していない。つまり伸長のためにはより基部の、培地と接している菌糸からの栄養輸送を必要とするはずである。このような状況は自然界でも起こりうると考えられる。栄養の存在する場所で生育していると次第に密度が過多になり、栄養が枯渇する。このような場合分生子を形成して後は風に任せるという方法も悪くはないが、それほど遠くないところに栄養の存在する場所がある場合、非効率的である。従って菌糸の伸長を行う過程で貧栄養な乾燥した石の上などに到達した場合、その先に再び栄養のある場所が存在することを祈ってそのままある程度菌糸を伸長させる機構があるのだろう。そしてチューブ状液胞はこのような場合に、栄養と接していない菌糸へと栄養輸送するために働いているのではないだろうか。

以上の結果を合わせると、Fig. 3-8 に示したような面白いモデルが推測される(Shoji et al., 2006b)。栄養が枯渇し始めた基部の菌糸においてはエネルギーを消費して細胞の延命を行うのが非効率的なため、オートファジーによって

細胞質成分とオルガネラの分解を行う。図ではマイクロオートファジーのみ示しているが、マクロオートファジーが同時に起こっている可能性もある。液胞内での分解によって生じたアミノ酸やポリリン酸といった低分子化合物は、チューブ状の液胞を介し代謝が盛んで菌糸の伸長を最も行っている菌糸先端へと輸送される。この時細胞質ではなく液胞内を輸送する利点は、拡散定数が高く物質の移動が早いこと(Darrah et al., 2006)と、細胞質の恒常性に影響を与えるであろう高濃度のリンを隔離できることである(Ashford, 1998)。このような輸送は特に、栄養と直接接していない菌糸へ向けて優先的に起こる。菌糸先端へ運ばれた低分子化合物は何らかのトランスポーターの働きによって液胞から細胞質へとリサイクルされる。

本研究は世界で初めて、気中菌糸における細胞内構造の観察を行ったものとしても位置づけられる。気中菌糸は分生子形成に必要であるため、糸状菌にとって重要な構造である。しかしこれまで気中菌糸形成に関与する因子としては、hydrophobin タンパク質が知られているにすぎない(Talbot, 1997)。この一因としては *A. nidulans* が糸状菌のモデルとして用いられてきたことがあるのではないだろうか。*A. nidulans* の気中菌糸はほとんど伸長せず、分生子形成に異常のある変異株でのみ肉眼で容易に捉えられる様になる(Adams et al., 1998)。従って今回の観察を可能にした一つの要素は、*A. oryzae* を用いたことである。気中菌糸は通常の菌糸と比べ、液胞形態一つをとっても大きな違いがあることが今回の観察で明らかになった。また観察を通じて気中菌糸中で隔壁がみられなかったことから、気中菌糸には隔壁が存在しない可能性もある。このように気中菌糸は通常の菌糸と比べ生理的に大きな違いがあり、興味深い特徴も有していると思われる。今後 *A. oryzae* を用いることによって、気中菌糸という一つの分化した器官の分子機構、生理的意義などを解析していけるのではないだろうか。

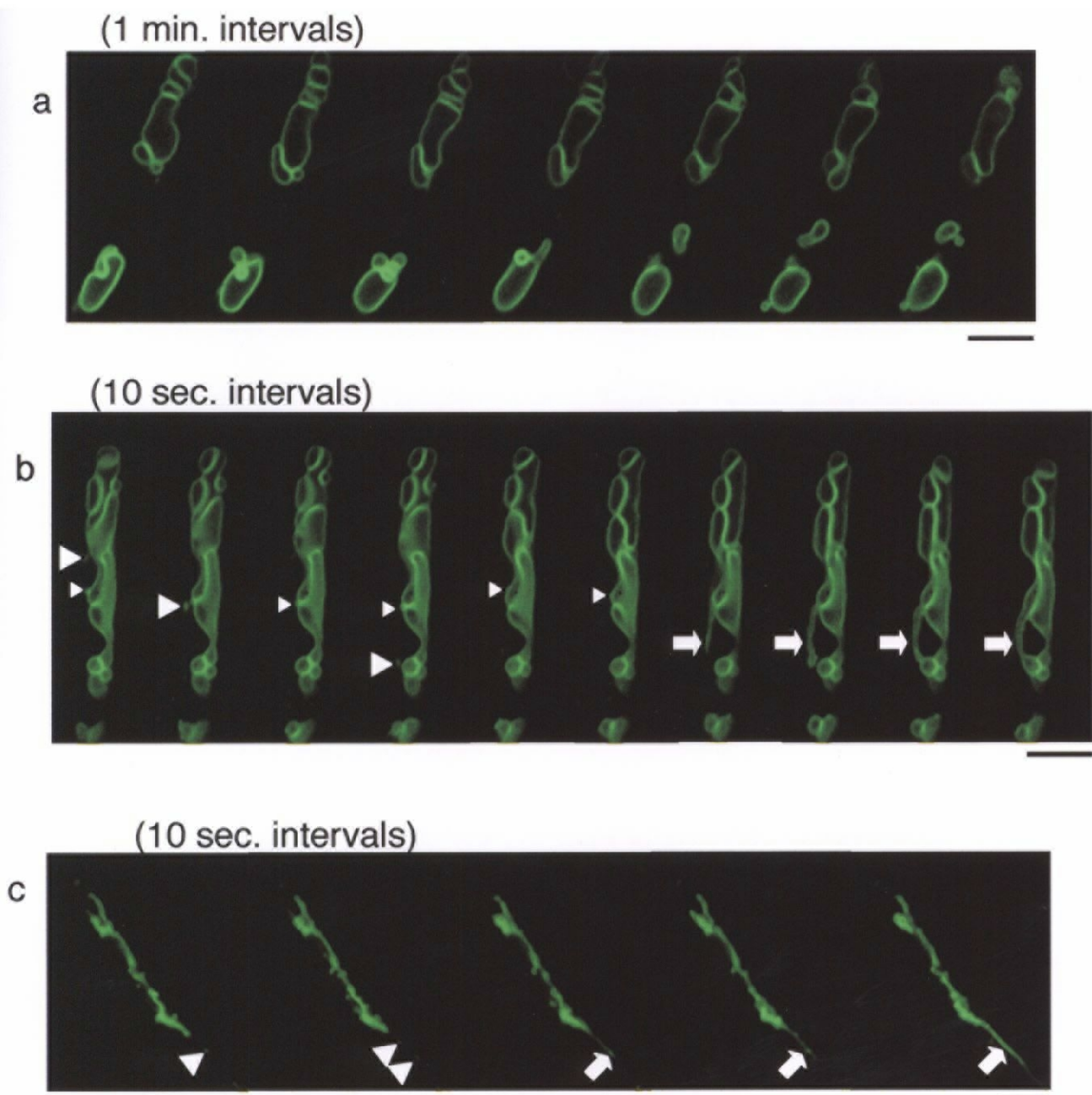


Fig. 3-1. Confocal microscopy of EGFP-AoVam3p-expressing strains.

UEV1 was grown in glass base dishes for 20 hours and observed with an inverted confocal laser scanning microscope. **(a)** Time-lapse images of large vacuoles taken at intervals of 1 min. Vacuoles changed in size, position, and number over time. **(b)** Time-lapse images of vacuoles taken at intervals of 10 s. Moving punctate structures (large arrowheads), putative late endosomes/prevacuolar compartments (small arrowheads), and tubular vacuoles (arrows) that replaced the punctate structures are shown. **(c)** Time-lapse images of a tubular-vesicular cluster taken at intervals of 10 s. Moving punctate structures (arrowheads) and a tubular vacuole (arrows) that replaced the punctate structures were also observed here. Scale bars represent 5 μm.

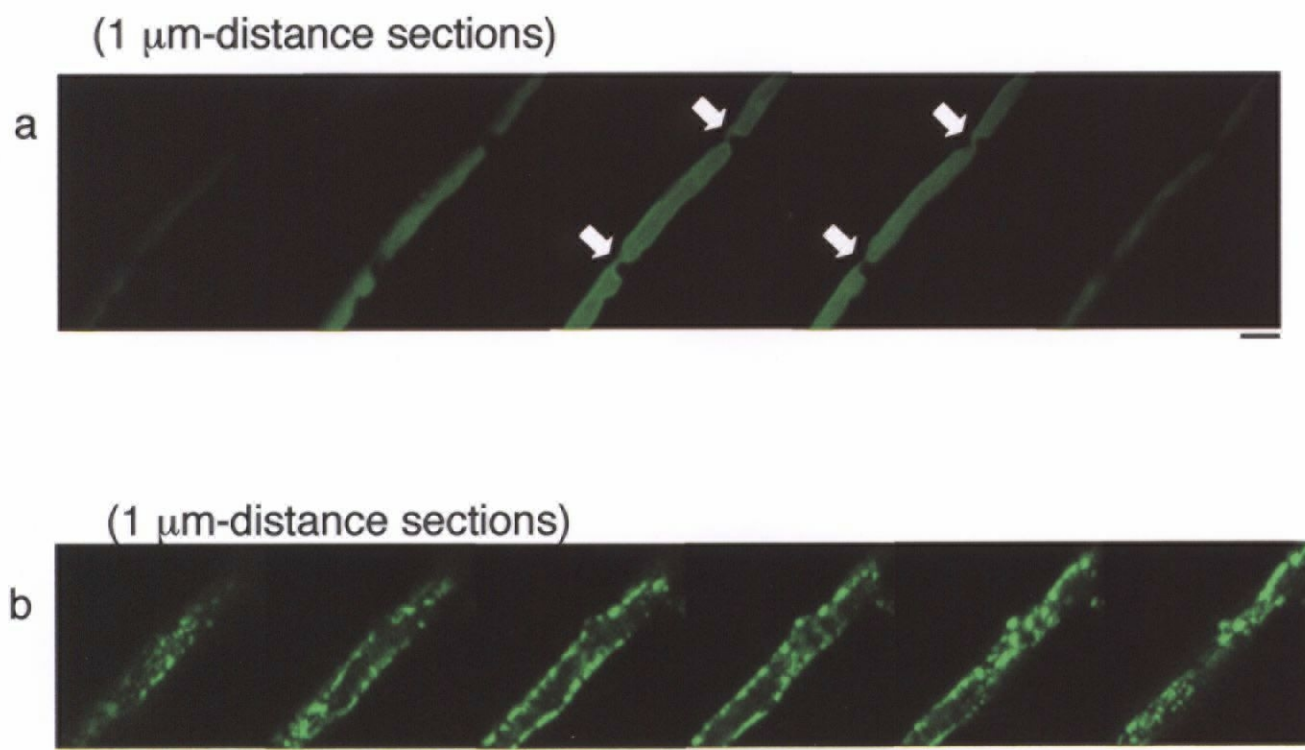


Fig. 3-2. Vacuolar morphology of basal region of the mycelium

(a) Distance sections (1 μm) of vacuoles in the basal region. The entire lumen was occupied with EGFP fluorescence. Tubular vacuoles (arrows) interconnected these vacuoles. (b) Distance sections (1 μm) of vacuoles in the basal region. Vacuoles were aligned just behind the plasma membrane. Scale bars represent 5 μm .

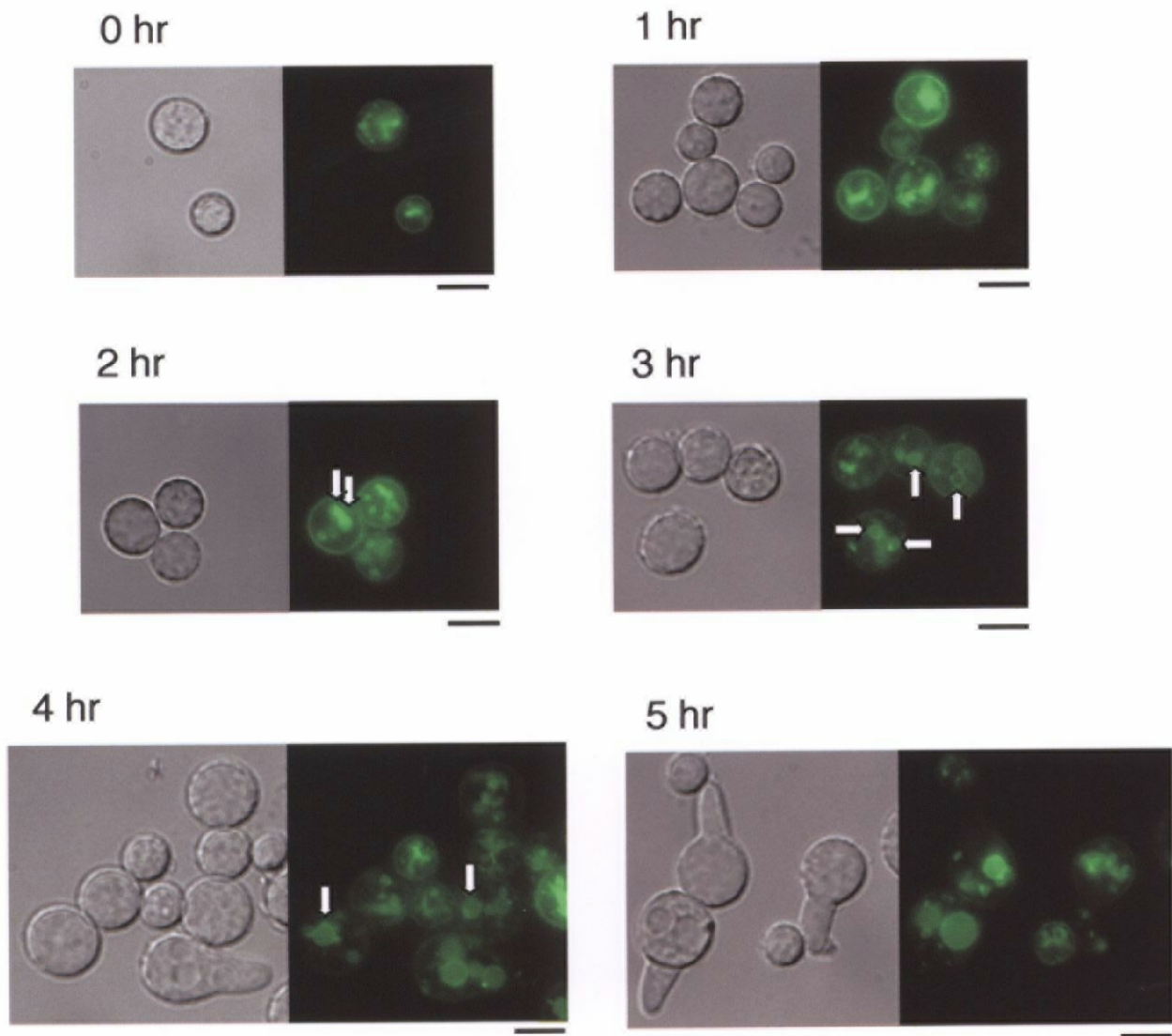


Fig. 3-3. Vacuolar morphology in germinating conidia.

DIC images (left) and EGFP fluorescence (right) of conidia from TPVEV1 at the time indicated after inoculation into DPY medium. Large vacuoles ($>1 \mu\text{m}$) that eventually developed in swelling conidia approximately 2 hours after inoculation are indicated by arrows. Fluorescence at the cell periphery was also detected in a control strain that did not express EGFP, and therefore was judged as autofluorescence. Scale bars represent $5 \mu\text{m}$.

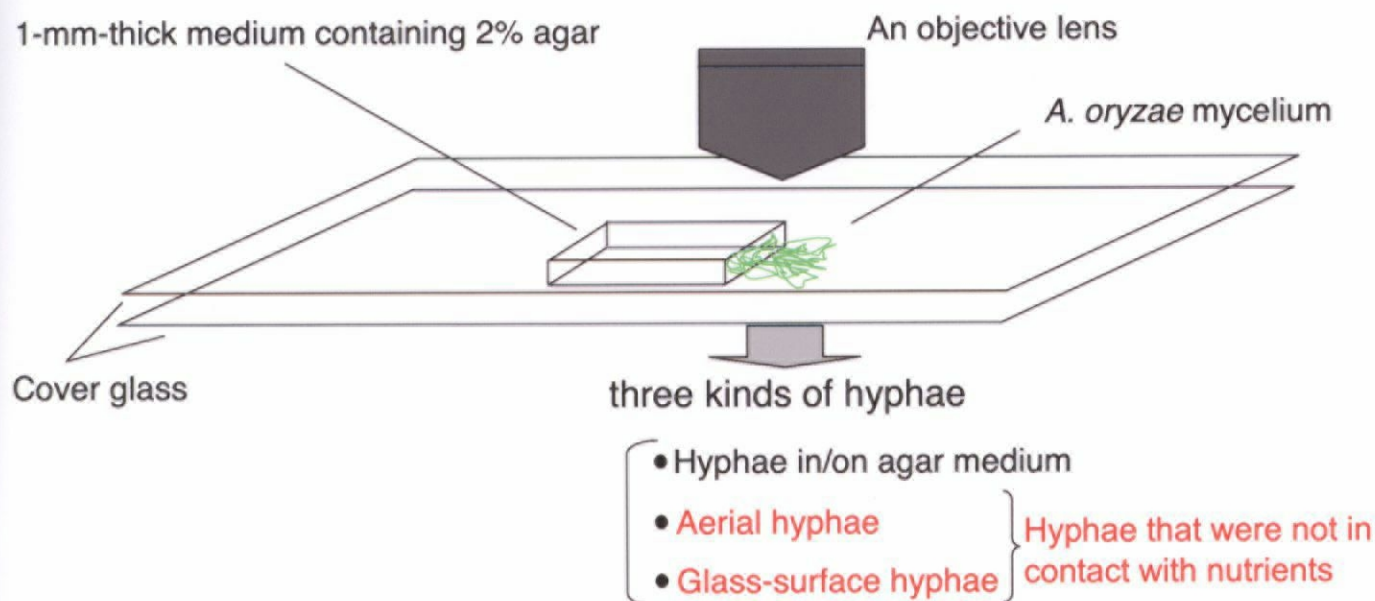
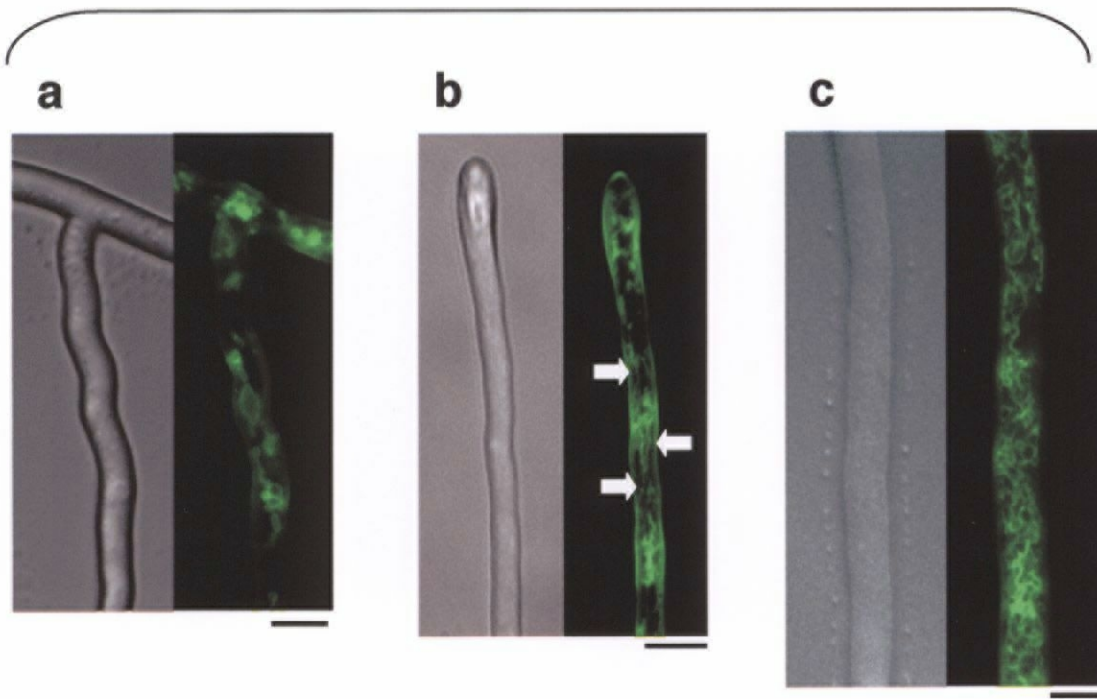


Fig. 3-4. Schematic illustration of the method for the observation of aerial and glass-surface hyphae

Conidia were inoculated on the side of approximately 1-mm-thick CD medium containing 2% agar, that was excised as a 1 cm×1 cm square, and hyphae were allowed to grow in lateral directions for 48 hours. In this method, three kinds of hyphae that grew laterally were observed: hyphae that grew in/on the agar medium, and two kinds of hyphae that were not in contact with nutrients; hyphae that grew in the air (aerial hyphae) and hyphae that grew on the cover glass surface (glass-surface hyphae).

EGFP-AoVam3p



WT
(autofluorescence)



Fig. 3-5. Vacuolar morphology in glass-surface hyphae of TPVEV4

a. Small vacuoles in a glass-surface hypha. **b.** Tubular vacuoles in a glass-surface hypha are indicated by arrows. **c.** In some regions, tubular-vesicular vacuoles were so dense that they showed a rather reticular-like appearance. **d.** Autofluorescence in wild type strain. Bars represent 5 μ m.

EGFP-AoVam3p

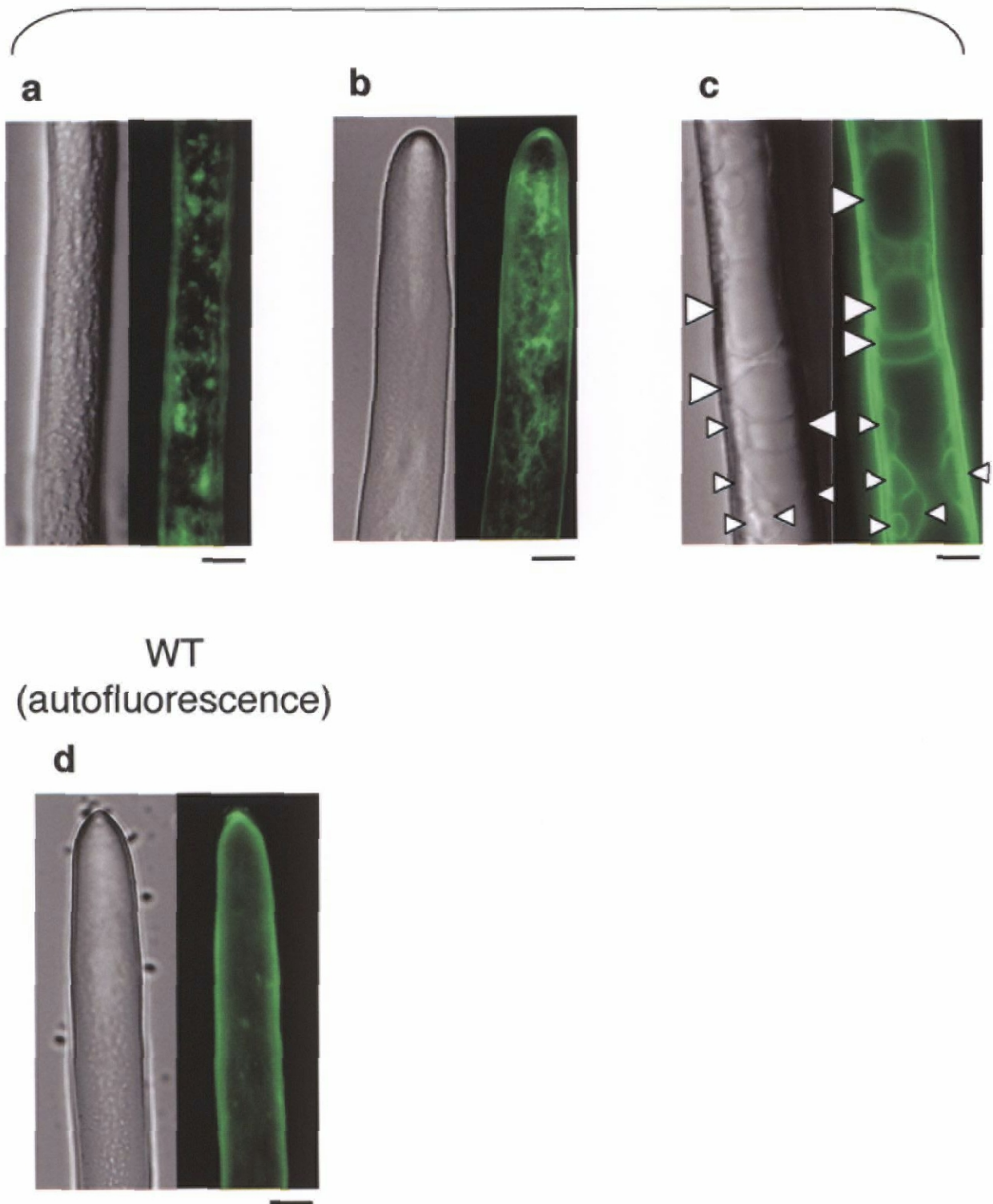


Fig. 3-6. Vacuolar morphology in aerial hyphae of TPVEV4

a. Small vacuoles in an aerial hypha. **b.** Tubular vacuoles that extended in the longitudinal direction and had a reticular appearance. **c.** Large vacuoles were sometimes present in aerial hyphae. These vacuoles flew toward the hyphal tip (large arrowheads; compare with the DIC image that was taken several seconds later) while vacuoles that aligned behind the plasma membrane remained immobile (small arrowheads.) **d.** Autofluorescence in wild type strain. Bars represent 5 μ m.

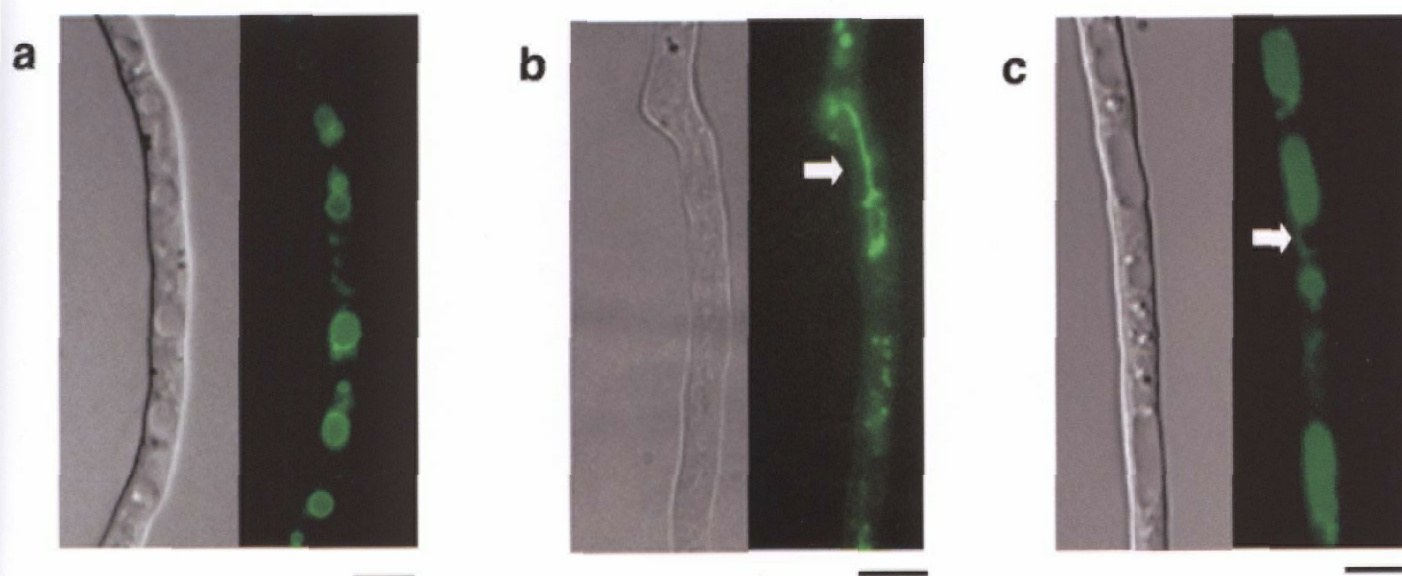


Fig. 3-7. Vacuolar morphology in hyphae in/on agar medium in TPVEV4

a. Large spherical vacuoles **b.** A tubular vacuole is indicated by an arrow. **c.** Large vacuoles whose lumen was entirely occupied with EGFP fluorescence. A tubular vacuole that interconnected large vacuoles is indicated by an arrow. Scale bars indicate 5 μm .

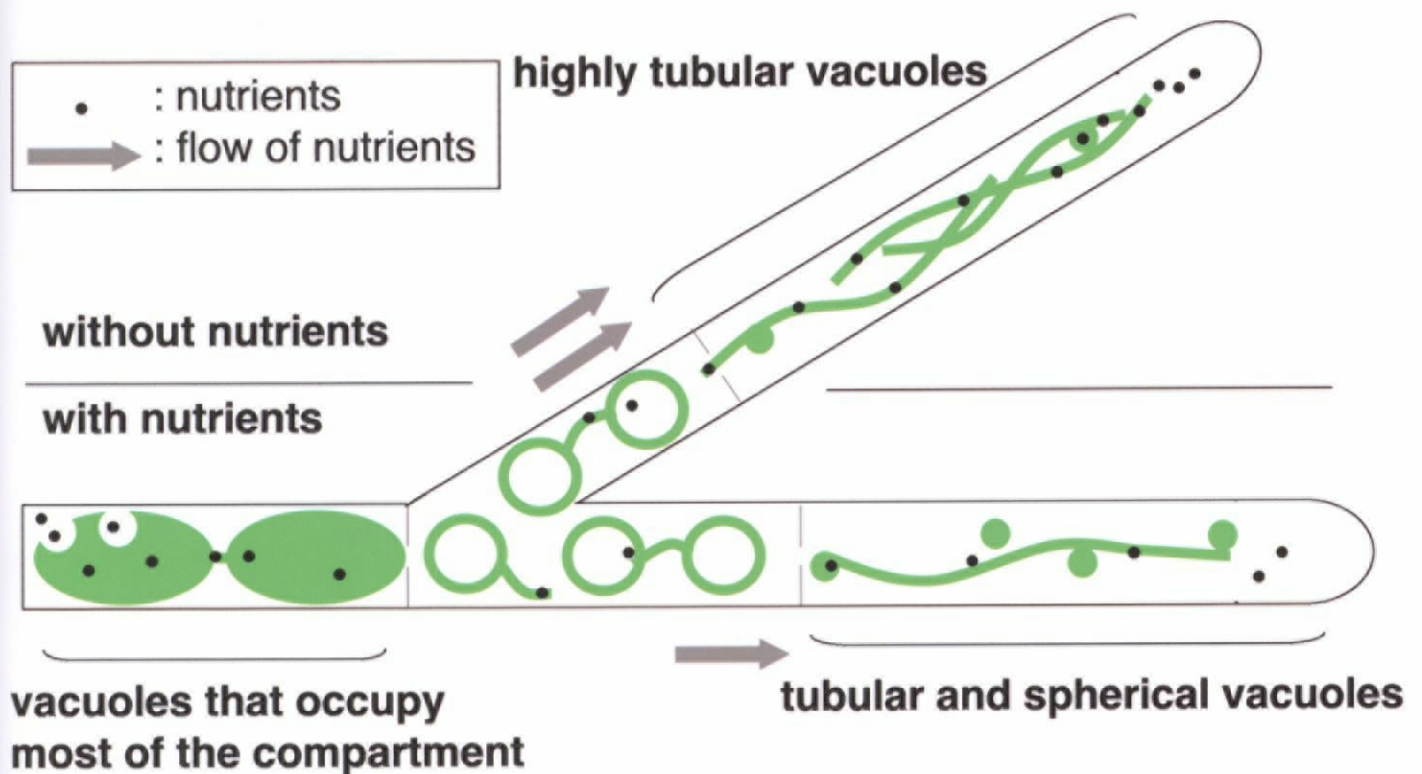


Fig. 3-8. Schematic illustration of pleiomorphic vacuoles and their possible involvement in nutrient recycling

Nutrients such as nitrogen and phosphorus compounds (small black circles) are taken-up by autophagy in the mature region of the mycelium, and degraded in the large vacuoles. The products such as amino acids and polyphosphate are delivered to the hyphal tips, especially to the hyphae without nutrients, via the tubular vacuoles.