

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成19年度博士課程 入学
氏名 樋口 裕次郎
指導教員名 北本 勝ひこ

論文題目 麹菌 *Aspergillus oryzae* におけるエンドサイトーシスの生理学的機能に関する研究

真核生物は、オルガネラ間での物質輸送の手段として細胞内小胞輸送系を発達させている。ゴルジ体以降の分泌およびエンドサイトーシス経路は、ポストゴルジネットワークとして輸送網を形成している。細胞膜タンパク質や細胞外の物質は、エンドサイトーシスにより、細胞膜の陥入によって生じる小胞中に取り込まれて細胞内へ送られ、初期エンドソームへと至る。この後、分解されるべき物質は後期エンドソームからリソソーム/液胞へと運ばれ、リサイクリングされるべき物質は直接、またはゴルジ体を経て間接的に細胞膜へと再輸送される。エンドサイトーシスの機構は真核生物において広く保存されており、シグナル伝達、細胞極性の再構築、外界からの栄養分取得、細胞膜や細胞膜タンパク質の細胞内への取り込みにおいて重要な役割を有する。

エンドサイトーシスに関する研究は、動物細胞や出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において進んでいる。一方、麹菌 *Aspergillus oryzae* を含む糸状菌においては、エンドサイトーシスを可視化する目的で、FM4-64 などの染色試薬や、内在性の細胞膜タンパク質であるプリントランスポーターAoUapC と EGFP との融合タンパク質を用いた実験系が近年構築されたばかりであり¹⁾、エンドサイトーシスの詳細な機構や生理学的解析は未だほとんど行われていない。そこで本研究で

は、糸状菌におけるエンドサイトーシスの機構とその生理学的意義を明らかにすることを目的とし、まずエンドサイトーシス欠損株を用いた表現型解析を行った。

1. *Aoend4* 条件発現株を用いたエンドサイトーシスに関する解析^{2),3)}

糸状菌におけるエンドサイトーシスの生理学的機能解析を行うため、*S. cerevisiae* において解析の進んでいるエンドサイトーシス関連遺伝子の *END4/SLA2* の *A. oryzae* におけるホモログ *Aoend4* の条件発現株を作製した。*Aoend4* の発現抑制条件下においては、菌糸の生育が著しく阻害され、先端生長に異常をきたしていることが示唆された。また、高塩濃度および高浸透圧ストレス条件下において、生育はより強く阻害され、ストレス感受性であることが示された。さらに、AoUapC-EGFP およびエンドサイトーシス経路の染色試薬である FM4-64 を用いた解析により、エンドサイトーシスが起こっていないことを確認した。

細胞壁合成酵素などの先端生長に必要な因子は、エンドサイトーシスによって先端にリサイクリングされていると考えられてきたが、その直接的な証拠はほとんど示されていない。そこで、エンドサイトーシスと先端生長との関わりについてより詳細な解析を行った。エンドソームに局在し、分泌に関与する SNARE である AoSnc1 を用いて、菌糸先端部におけるエンドサイトーシスによるリサイクリングを可視化した。FRAP (fluorescent recovery after photobleaching) を用いた解析により、EGFP-AoSnc1 は主に菌糸先端部に局在し、先端部をリサイクリングしていることが示唆された。一方、*Aoend4* 発現抑制条件下では、EGFP-AoSnc1 は細胞膜全体に局在する様子が観察され、エンドサイトーシスによるリサイクリングに異常をきたしていると考えられた。

Aoend4 の発現抑制条件下では、細胞膜上にエンドサイトーシスによる取り込み不全が原因と考えられる陥入様構造が観察された。この陥入様構造は細胞壁の染色試薬である Calcofluor White により染色されたことから、エンドサイトーシスが欠損したことにより、取り込み部位に細胞壁成分が蓄積したものと示唆された。また、電子顕微鏡観察によっても陥入様構造に細胞壁が蓄積していることが確認された。さらに、先端生長に関連する細胞壁合成酵素群の発現量を解析したところ、*Aoend4* 発現抑制条件下では *Aoend4* 発現時より発現の上昇が確認された。このことから、エンドサイトーシス欠損により細胞壁合成酵素群がリサイクリングされず、発現が上昇している可能性が考えられた。

2. エンドサイトーシス関連因子の探索

エンドサイトーシスにおいて機能すると考えられる AoAbp1、AoEnd4 の局在解析から、糸状菌におけるエンドサイトーシスは、菌糸先端部において最も活発に行われていると示唆された。また、エンドサイトーシスを欠損した菌糸では、先端生長が著しく阻害されたことから、エンドサイトーシスは先端生長と密接に関連していると考えられた。以上の結果と、先端生長が糸状菌において特徴的な機構であることを考え合わせると、菌糸先端部におけるエンドサイトーシスにおいても糸状菌に特徴的な機構が存在する可能性が考えられた。そこで、エンドサイトーシスに

おけるタンパク質間相互作用において機能する SH3 (Src-homology 3) ドメインを C 末端に 2 つ有するという特徴的なタンパク質である AoAbp1 を bait とし、yeast two-hybrid (YTH) スクリーニングによって *A. oryzae* におけるエンドサイトーシス関連因子の探索を行った。

AoAbp1 を bait とし、*A. oryzae* の cDNA ライブラリーを prey とした YTH スクリーニングを行った。レポーターには *HIS3*、*ADE2* の 2 種類の栄養要求性遺伝子を用い、2 回のスクリーニングによって、 2.2×10^6 のコロニーをスクリーニングした。スクリーニング用のプレートにおいて、bait と prey の相互作用が強いと考えられる、コロニーサイズの大きなものから順に、42 のクローンから cDNA インサートのシークエンスを行ったところ、16 の独立した ORF が見出された。その内、*A. oryzae* データベースのアノテーション情報を基に、細胞内輸送に関連があるかもしくは機能未知遺伝子の一部である prey に関して、YTH による再現性確認を行ったところ、5 つのポジティブクローンを得た。この内の 2 つは、同一遺伝子の一部であったことから、YTH スクリーニングの結果、AoAbp1 と相互作用するタンパク質をコードする 4 遺伝子を見出した。

YTH スクリーニングにより得られた prey の cDNA クローンの 1 つから、AAA (ATPases associated with diverse cellular activities) ATPase をコードすると予想される遺伝子の一部を見出した。AAA ATPase はその名の通り、細胞内のさまざまな部位において機能する ATPase であり、これまでにタンパク質複合体の解離やタンパク質の分解において機能するものが報告されている。YTH 解析により、この prey は AoAbp1 の 2 つの SH3 ドメインと相互作用することが示された。そこで、この prey をコードする遺伝子を *aipA* (AoAbp1 interacting protein) と名付けた。

3. AAAATPase 様タンパク質 AipA の機能解析

RACE 解析により *aipA* 全長をクローニングした結果、AipA は 784 アミノ酸から構成されると予想された。また、モチーフ検索の結果、AipA は N 末端付近に coiled-coil 領域を持ち、C 末端付近に AAA ATPase ドメインを持つと推定された。*S. cerevisiae* においては、AipA のオルソログは Sap1p と Yta6p の 2 つが存在し、共に AAAATPase と推定されているものの、それらの生理的機能はわかっていない。AipA と AoAbp1 の相互作用部位を特定するため、YTH による AipA の欠失解析を行った。その結果、AipA の coiled-coil ドメインおよび AAAATPase ドメインは AoAbp1 の SH3 ドメインと相互作用せず、両ドメインの間にあたる 315~422 アミノ酸残基の領域が AoAbp1 の SH3 ドメインと相互作用することが明らかとなった。さらに、AoAbp1 の 2 つの SH3 ドメインの組換えタンパク質と GST との融合タンパク質を調製し、*A. oryzae* において 6×Myc-AipA を発現する株の細胞抽出液を用いて GST プルダウンアッセイを行い、これらが *in vitro* において結合することを確認した。次に、AipA の細胞内局在を解析するため、EGFP-AipA および AoAbp1-mDsRed 発現株を作製したところ、それらは菌糸先端部においてよく共局在したことから、AipA がエンドサイトーシスにおいて機能している可能性が考えられた。

AipA の機能解析を行うため、*aipA* 破壊株の作製を行った。*aipA* 破壊株ではさまざまな培地条件においても顕著な生育阻害が見られず、AipA と機能の重複したタンパク質の存在が示唆された。

一方、*aipA* 高発現株では生育の低下が見られた。しかし、AAA ATPase ドメインに点変異を導入した *aipA* の高発現株では生育の低下が見られなかったことから、AipA が機能的であるためには、AipA の AAA ATPase ドメインが正常に機能する必要があることが示唆された。

まとめ

糸状菌において、エンドサイトーシスは菌糸先端部で最も活発に行われ、菌糸の先端生長に必要な因子をリサイクリングすることにおいて機能していることが強く示唆された。麹菌 *A. oryzae* は、産業上非常に有用な菌種であり、アミラーゼなどの酵素を大量に菌体外に分泌する能力を持つ。このことを可能にするのが、菌糸先端部のエンドサイトーシスによるリサイクリングの機構であると推測され、麹菌 *A. oryzae* が糸状菌における先端生長およびエンドサイトーシスのメカニズムの研究において、今後一層魅力的な生物であると考えられた。

エンドサイトーシスとエキソサイトーシスおよび先端生長が、糸状菌において相互に密接な関係を有することを考えると、先端生長の機構と同様に、エンドサイトーシスにおいても糸状菌に特徴的な機構が存在すると予想された。AoAbp1 を bait にした YTH スクリーニングによって見出された AAA ATPase 様の AipA は、AoAbp1 と *in vitro* において相互作用することが示された。また、*in vivo* においても、菌糸先端部において AipA と AoAbp1 は共局在することが確認された。以上の結果から、AoAbp1 がエンドサイトーシス関連因子であることを考えると、AipA もまたエンドサイトーシスにおいて機能することが強く示唆された。エンドサイトーシスにおいて機能する AAA ATPase は、全生物種を通じてもこれまでに報告はされておらず、エンドサイトーシスの活発に行われていると予想される *A. oryzae* において、エンドサイトーシス関連因子をエンドサイトーシス小胞から細胞質へとリサイクリングするのに機能しているのかもしれない。

- 1) Higuchi, Y., Nakahama, T., Shoji, J.Y., Arioka, M., Kitamoto, K. (2006) Visualization of the endocytic pathway in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae* using an EGFP-fused plasma membrane protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **340**, 784-791.
- 2) Higuchi, Y., Shoji, J.Y., Arioka, M., Kitamoto, K. (2009) Endocytosis is crucial for cell polarity and apical membrane recycling in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Eukaryot. Cell*, **8**, 37-46.
- 3) Higuchi, Y., Arioka, M., Kitamoto, K. (2009) Endocytic recycling at the tip region in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Commun. Integr. Biol.*, **2**, 327-328.