

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18837

研究課題名(和文) “国菌”黄麹菌における初期エンドソーム動態の生理学的機能解析

研究課題名(英文) Analysis of physiological role of early endosome motility in the "Japanese national fungus" *Aspergillus oryzae*

研究代表者

樋口 裕次郎 (Higuchi, Yujiro)

九州大学・農学研究院・助教

研究者番号：50732765

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では日本の産業において重要な国菌・黄麹菌 *Aspergillus oryzae* において初期エンドソーム動態の生理的意義に関して解析を行った。初期エンドソーム動態を欠損させるため、初期エンドソームとモータータンパク質のリンカータンパク質である Aohok1 の遺伝子破壊株を作製した。Aohok1 破壊株では菌糸先端部の分泌小胞の分布に異常が見られ、実際に α -アミラーゼ生産量が有意に減少していた。さらに Aohok1 破壊株では分生子、気中菌糸、菌核形成に異常が見られた。以上から、黄麹菌において初期エンドソーム動態が α -アミラーゼ生産および細胞分化において重要な役割を果たしていることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Recently, it has revealed that the motility of an endocytic organelle early endosome (EE) has a variety of physiological roles. To further examine the role of the EE motility in the industrially important fungus *Aspergillus oryzae*, Aohok1, a putative linker protein between an EE and a motor protein was identified. The Aohok1 disruptant showed retarded mycelial growth and no EE motility, in addition to an apical accumulation of EEs and peroxisomes. Analyses on the protein secretory pathway in Aohok1 cells showed that, although distribution of the endoplasmic reticulum and Golgi was not affected, formation of the apical secretory vesicle cluster was impaired, resulting in the reduction of the major secretory protein α -amylase. Moreover, the transcript level of α -amylase-encoding gene amyB was significantly reduced in the Aohok1 disruptant. Furthermore, perturbed conidial and sclerotial formations were observed, indicating a defect in cell differentiation, in the Aohok1 disruptant.

研究分野：応用微生物学

キーワード：黄麹菌 *Aspergillus oryzae* 初期エンドソーム 細胞内動態 Aohok1 α -アミラーゼ タンパク質
分泌 細胞分化

1. 研究開始当初の背景

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* は、2006 年の日本醸造学会大会にて“国菌”に認定されており、日本において古くから発酵・醸造産業に用いられてきた有用微生物であり、高い安全性でアミラーゼなどの有用タンパク質を菌体外に大量に分泌する能力を持つ。これまでの先行研究により、その菌糸先端部では、分泌（エキソサイトーシス）と相補的なエンドサイトーシスも活発に行われており、黄麹菌において大規模分泌を可能にするには分泌と対をなす過程であるエンドサイトーシスも重要であることが分かってきた。そのエンドサイトーシス経路におけるオルガネラである初期エンドソームにおいては、細胞膜からエンドサイトーシスによって取り込まれたカーゴを選別し、細胞膜へと再びリサイクリングするもしくはリソソーム/液胞への分解へ導く。広く真核生物において、初期エンドソームは微小管・モータータンパク質系のはたらきにより、2~3 $\mu\text{m}/\text{sec}$ で恒常的な長距離動態を示す。しかしこれまでに、そうした初期エンドソーム動態の分子メカニズムは比較的良く研究されてきたが、動態を示す必然性といった生理学的意義に関してはあまり理解が進んでいなかった。

初期エンドソーム動態の生理学的意義に関する研究は、その分子メカニズムが良く研究されている植物病原性で二形成のモデル酵母である *Ustilago maydis* を用いて行われていた。まず、RNA 結合タンパク質 Rrm4 が初期エンドソーム上に局在し、mRNA とともに動態を示すことに着目し、細胞質リボソームが同様に動態を示すと予想した。*U. maydis* において 40S、60S リボソームサブユニットタンパク質を可視化し、FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching; 光退色後蛍光回復) を用いた生細胞観察により、リボソームが初期エンドソームおよび Rrm4 と共に動態を示すことが明らかになった。また、リボソームが動態を示す際に、ポリソームを形成しタンパク質翻訳を行っていることが示された。さらに、初期エンドソーム動態を欠損した細胞では、本来均一なりボソームの細胞内分布に異常を示し、初期エンドソーム動態がリボソームの細部内分布に重要な役割を果たすことが明らかになった。

さらに、植物感染時の *U. maydis* における初期エンドソーム動態の寄与に関して解析が行われた。植物病原菌は、エフェクターと呼ばれるタンパク質を感染時特異的に発現して分泌することにより、植物の免疫システムを抑制する。*U. maydis* の植物感染時には、エフェクター遺伝子の発現調節のため、菌糸先端と核との間で情報伝達が行われていることが推測され、動態を示す初期エンドソームがその情報伝達を担っていると予想された。そこで、感染時における初期エンドソームの動態の寄与を調べるために、他の細胞内輸送経路に影響を及ぼさずに、初期エンドソーム

の動態のみを特異的に阻害すると、エフェクター遺伝子の発現が抑制され、またそれに対応してエフェクタータンパク質の植物細胞への分泌量の低下が確認された。これにより、*U. maydis* が植物感染する際に、初期エンドソームの動態がエフェクター遺伝子の発現レベルにおいて重要であることが明らかになった。

このように、初期エンドソーム動態が及ぼす生理学的役割に関して近年理解が進んできた。しかし、未だ多くの生物種において、その生理学的意義に関してはわかっていなかった。

2. 研究の目的

エンドサイトーシス経路におけるオルガネラである初期エンドソームは、広く真核生物において、恒常的な長距離動態を示す。これまでに、初期エンドソーム動態の分子メカニズムは比較的良く研究されてきたが、動態を示す必然性といった生理学的意義に関してはあまり理解が進んでいなかった。日本の発酵・醸造産業で有用利用されている“国菌”であり、モデル糸状菌である黄麹菌 *Aspergillus oryzae* を用いた解析は、得られた新規基礎的知見がそのまま有用異種タンパク質生産といった応用研究にも利用できるという大きな利点がある。そこで本研究では、黄麹菌を用いた解析により、未知の初期エンドソーム動態の意義を明らかにすることを目的とした。そこでまず、黄麹菌における初期エンドソームの同定から始め、初期エンドソーム動態停止の株を作製した。そして、初期エンドソームが停止した条件において、細胞に及ぼす影響を細胞生物学的なアプローチによって詳細に解析することで、リボソームに限らない他のオルガネラへの局在・分布への影響を調べる。さらに、初期エンドソーム動態に関連して、細胞内膜交通や細胞の分化への影響についても検討を行った。

3. 研究の方法

(1) *Aohok1* 破壊株の表現型解析

対照株、*Aohok1* 破壊株、相補株を各種寒天培地上で生育比較を行った。浸透圧試験には 1.2 M ソルビトールを添加した。また、細胞壁ストレス試験には、300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の Calcofluor White、90 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の SDS および Congo Red を用いた。さらに、唯一の炭素源としてオレイン酸を含む培地も用いた。

(2) 細胞内局在解析

EGFP(改変型緑色蛍光タンパク質)-AoRab5 を初期エンドソームマーカーに用いた。また、*Aohok1*-EGFP を内在性の *Aohok1* 遺伝子座で発現する株を作製した。さらに、ペルオキシソームマーカーとして、EGFP-PTS1 を、小胞体マーカーとして EGFP-AoSec22 を、ゴルジ体マーカーとして EGFP-AoGos1 を、分泌小胞マーカーとして EGFP-AoSnc1 を用いた。

蛍光観察には、共焦点・超解像顕微鏡 TCS SP8 STED (Leica) を使用した。動態および輝度解析には MetaMorph (Molecular Devices) を用いた。

(3) 分泌酵素および遺伝子発現解析

100 ml 容三角フラスコに 20 ml の DPY 液体培地を入れ、 10^5 個の分生子を植菌し、30 で 150 rpm にて 7 日間培養した。培養上清をサンプリングし、SDS-PAGE 後の CBB 染色により、分泌された α -アミラーゼ量を解析した。また、培養上清における α -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、酸性ペプチダーゼ活性を市販のキット試薬 (キッコマンバイオケミファ) を用いて測定した。

同様に培養した菌体サンプルより総 RNA を抽出し、合成した cDNA を用いて定量 RT-PCR 解析を行った。 α -アミラーゼをコードする *amyB*、グルコアミラーゼをコードする *glaA*、酸性ペプチダーゼをコードする *pepA* の発現量をアクチンをコードする *actA* で標準化した。

4. 研究成果

(1) 初期エンドソーム動態欠損株の表現型解析

初期エンドソーム動態欠損による生理的影響を解析するために、*Aohok1* 破壊株を作製した。EGFP-AoRab5 を初期エンドソームマーカーに用い、*Aohok1* 破壊株において初期エンドソーム動態が停止していることを確認した。対照株と破壊株の生育比較を行ったところ、破壊株では生育の遅延およびコロニー形態の異常が見られ、浸透圧ストレスおよび細胞壁ストレスに緩和が見られた。さらに、ペルオキシソームの細胞内局在を解析すると、破壊株において菌糸先端への蓄積が見られた。しかし、オレイン酸を単一炭素源とする培地においても生育阻害は見られず、ペルオキシソームの細胞内局在異常による生理的意義は見いだせなかった。

次に、初期エンドソーム動態欠損によるタンパク質分泌経路への影響を調べた。小胞体およびゴルジ体の細胞内分布に異常は見られなかったものの、菌糸先端に見られる分泌小胞の分布に異常が見られた (図 1)。

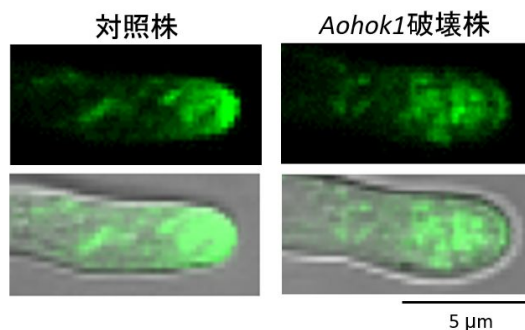


図 1 初期エンドソーム動態欠損株における分泌小胞の分布異常

(2) 初期エンドソーム動態欠損株における分泌酵素に関する解析

Aohok1 破壊株における菌糸先端での分泌小胞の分布異常から、実際に分泌タンパク質量解析を行った。*Aohok1* 破壊株では、 α -アミラーゼの分泌生産量が有意に低下していた。これに対し、グルコアミラーゼおよび酸性ペプチダーゼの生産量に有意な変化は見られなかった。そこで、それらの酵素をコードする遺伝子の発現量を定量 RT-PCR 解析したところ、*Aohok1* 破壊株において α -アミラーゼをコードする *amyB* 遺伝子は有意に減少していたが、グルコアミラーゼをコードする *glaA*、酸性ペプチダーゼをコードする *pepA* 遺伝子に変化は見られず、活性量変化と一致する結果となった (図 2)。

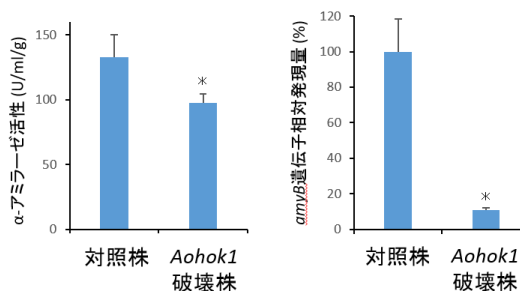


図 2 初期エンドソーム動態欠損株における α -アミラーゼ生産の減少

(3) 初期エンドソーム動態欠損による細胞分化異常

初期エンドソーム動態欠損が及ぼす細胞分化への影響を調べた。*Aohok1* 破壊株においては、分生子形成量の低下が見られるものの、対照株に比べて気中菌糸の伸長が見られた (図 3)。さらに、通常の培養条件では形成が抑制されている菌核形成が促進しており、細胞の分化制御に異常をきたしていることが示唆された。

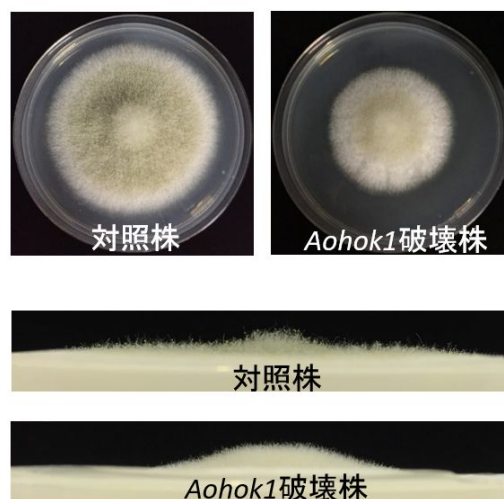


図 3 初期エンドソーム動態欠損株における細胞分化異常

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計3件)

Yusuke Togo, Yujiro Higuchi, Yoshinori Katakura, Kaoru Takegawa, Early endosome motility mediates α -amylase production and cell differentiation in *Aspergillus oryzae*, *Scientific Reports*, 7, 15757, 2017. 査読有、DOI:10.1038/s41598-017-16163-1

Hee Su Kwon, Kouhei Kawaguchi, Takashi Kikuma, Kaoru Takegawa, Katsuhiko Kitamoto, Yujiro Higuchi, Analysis of an acyl-CoA binding protein in *Aspergillus oryzae* that undergoes unconventional secretion, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 493, 481-486, 2017. 査読有、DOI:10.1016/j.bbrc.2017.08.166

Kouhei Kawaguchi, Takashi Kikuma, Yujiro Higuchi, Kaoru Takegawa, Katsuhiko Kitamoto, Subcellular localization of acyl-CoA binding protein in *Aspergillus oryzae* is regulated by autophagy machinery, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 480, 1, 8-12, 2016. 査読有、DOI:10.1016/j.bbrc.2016.10.018

〔学会発表〕(計8件)

都甲 祐介, 竹川 薫, 樋口 裕次郎, 黄麹菌 *Aspergillus oryzae* における初期エンドソーム動態のコウジ酸分泌への関与, 日本農芸化学会, 2018

都甲 祐介, 竹川 薫, 樋口 裕次郎, 黄麹菌 *Aspergillus oryzae* における初期エンドソーム動態の有用物質生産への関与, 第17回糸状菌分子生物学コンファレンス, 2017

Hee Su Kwon, Kouhei Kawaguchi, Takashi Kikuma, Katsuhiko Kitamoto, Kaoru Takegawa, Yujiro Higuchi, Analysis of unconventional protein secretion of acyl-CoA binding protein in *Aspergillus oryzae*, 第17回糸状菌分子生物学コンファレンス, 2017

Hee Su Kwon, Kouhei Kawaguchi, Takashi Kikuma, Katsuhiko Kitamoto, Kaoru Takegawa, Yujiro Higuchi, Molecular dissection of unconventional secretion of acyl-CoA binding protein in *Aspergillus oryzae*, 日本農芸化学会 関西・中四国・西日本支部 2017年度合同大阪大会, 2017

都甲 祐介, 竹川 薫, 樋口 裕次郎, 黄麹菌 *Aspergillus oryzae* の固体培養における初期エンドソーム動態に関する解析, 日本農芸化学会 関西・中四国・西日本支部 2017年度合同大阪大会, 2017

樋口 裕次郎, 都甲 祐介, 竹川 薫, 黄麹

菌 *Aspergillus oryzae* において初期エンドソーム動態は細胞の分化制御およびタンパク質分泌に關与する, 日本農芸化学会, 2017
都甲 祐介, 竹川 薫, 樋口 裕次郎, 黄麹菌 *Aspergillus oryzae* における初期エンドソーム動態に関する解析, 第16回糸状菌分子生物学コンファレンス, 2016

都甲 祐介, 竹川 薫, 樋口 裕次郎, 黄麹菌 *Aspergillus oryzae* における初期エンドソーム動態関連因子の解析, 日本農芸化学会 西日本支部大会, 2016

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.agr.kyushu-u.ac.jp/lab/hakko/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

樋口 裕次郎 (HIGUCHI, Yujiro)
九州大学・大学院農学研究院・助教
研究者番号: 50732765

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし