

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05783

研究課題名(和文)核はなぜ分解されないのか? - 糸状菌に学ぶヌクレオファジーの分子機構 -

研究課題名(英文)Why nuclei are not degraded by autophagy?-Lessons from fungal studies

研究代表者

有岡 学 (Arioka, Manabu)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・准教授

研究者番号：20242159

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文): TAP-AoAtg8結合タンパク質のスクリーニングからヌクレオファジーにおける受容体の候補となる6タンパク質を選別した。うち1つをコードする遺伝子の破壊株で飢餓時におけるヒストンH2B-EGFPの分解が抑制されたことから、これをNprA (Nucleophagy receptor A) と命名した。またオートファジーによる核分解の様子を可視化するためAoypt7破壊株およびAoatg15破壊株の蛍光顕微鏡及び電子顕微鏡による観察を行った。さらに液胞プロテアーゼであるPepEおよびAoPrb1の解析から麹菌ではオートファジーにおける液胞プロテアーゼの役割が出芽酵母と異なることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

核全体が分解されるヌクレオファジーとしてはテトラヒメナ大核の分解、イネいもち病菌の付着器内の核の分解が知られている。また、植物病原菌Fusarium oxysporumでは菌糸融合の際に一方の菌糸からもう一方の菌糸に核が侵入するが、その際侵入を受けた細胞の核が分解される。後2者は糸状菌であるが、いずれも単核の生物であり、またそこに関わる受容体は未同定である。多核の細胞におけるヌクレオファジーの機構は未解明であり、また特定の機能を持った特殊な細胞ではなく、通常の栄養細胞においてヌクレオファジーが起こるという点で本研究の成果は非常にユニークであると考えられる。

研究成果の概要(英文): From the screening of TAP-AoAtg8-binding proteins, 6 proteins were selected as candidates of organelle receptors for nucleophagy. We named this protein NprA (Nucleophagy receptor A) because the degradation of histone H2B-EGFP upon starvation was inhibited in a mutant deleted for the gene encoding one of the 6 candidates. To visualize degradation of nuclei by autophagy, Aoypt7- and Aoatg15-disrupted strains were generated and observed by fluorescence and electron microscopies. In addition, analysis of the roles of vacuolar proteases PepE and AoPrb1 was conducted, which demonstrated that they play distinct roles during autophagy in *Aspergillus oryzae* compared to *Saccharomyces cerevisiae*.

研究分野：微生物学・細胞生物学・生化学

キーワード：核 オートファジー 液胞 麹菌 ヒストンH2B-EGFP プロテアーゼ オートファゴソーム

### 1. 研究開始当初の背景

オートファジーは細胞質成分を液胞/リソソームに輸送し分解する細胞内プロセスの総称であるが、細胞質成分を無差別に分解するバルクオートファジーと、特定の基質が特異的に認識されて分解される選択的オートファジーに大別される。後者のうち核が分解されるものをヌクレオファジーと呼ぶが、一般にヌクレオファジーでは核質や核膜の一部分のみが分解され、核全体は分解されない。核は遺伝情報の担い手であるため、その分解が細胞の機能喪失および細胞死に直結することを考えれば当然であると考えられる。一方、一部の生物では例外的に核全体が分解されるヌクレオファジーも知られている。テトラヒメナは大核と小核の 2 種類の核を持つ。後者が遺伝情報を子孫に伝える役割を持つのに対し、前者は転写のテンプレートとして用いられるが、有性生殖の際にはヌクレオファジーによって分解される。また、イネいもち病菌は感染の際「付着器」と呼ばれる特殊な細胞を形成するが、この付着器内の核はオートファジーによって分解される。これらにおいて核は「丸ごと」分解されるが、それはテトラヒメナの場合は一代限りしか保持されない大核であり、またいもち病菌の場合はイネへの感染成立後には不要になる付着器の核である。

これらに対し、申請者らは麹菌の様々なオルガネラの動態を観察する過程で、上述したヌクレオファジーとは異なる様式のヌクレオファジーを偶然発見した (Shoji et al., PLoS One 5, e15650 (2010))。ヒストン H2B-DsRed で核を、オートファジーに関わる出芽酵母 Atg8 の麹菌オルソログ AoAtg8 と EGFP の融合タンパク質でオートファゴソーム膜をそれぞれ標識したところ、飢餓の誘導によって核がオートファゴソーム膜によって徐々に取り囲まれ、その後液胞内に取り込まれ、最終的に DsRed 蛍光が液胞内に拡散する、すなわち核が丸ごと分解される様子が確認された。さらに抗 EGFP 抗体を用いたウエスタンブロット解析から、炭素源や窒素源制限飢餓時にヒストン H2B-EGFP が分解され、それが  $\Delta Aogatg8$  株では抑制されることが示された。これらの結果から、麹菌では栄養飢餓時に特殊な細胞ではなく栄養細胞において核が丸ごとオートファジーで分解されることが示唆された。麹菌は多核であり、細胞内に複数の核を持つため、核が細胞内に最低限 1 個残されていれば細胞は死を免れると予想される。それでは、核をすべて分解しない仕組みは何だろうか？そもそも核はどのようにして認識され、分解されるのだろうか？分解される核と、分解されない核との間にどのような違いがあるのだろうか？そして、単核の細胞では、他のオルガネラと異なりなぜ核だけは飢餓にさらされても分解されないのだろうか？これらの疑問に答えるため以下の研究を行った。

### 2. 研究の目的

本研究では、申請者らが麹菌 (*Aspergillus oryzae*) で見出した「核を丸ごと分解するヌクレオファジー」の分子機構を解明し、それを通じて多くの生物では「核はなぜオートファジーで分解されないのか」という、より本質的な謎を解明することを目的とした。上述の通り、核を細胞当たり一つしか持たない単核の細胞では核を丸ごと分解することが細胞死に直結することは自明であるが、麹菌は多核であるため、細胞当たり核が最低限 1 個残されていれば生存は可能である。ではなぜ単核の細胞では飢餓時でも核は分解されないのだろうか？また、麹菌では核はどのような機構で認識され、分解されるのだろうか？本研究ではこれらの疑問に答えるため、核全体が分解されるヌクレオファジーに関わる受容体を同定してその機能の解析を行うことを目的とした。

### 3. 研究の方法

これまで、ミトコンドリアを分解するマイトファジー、小胞体を分解する ER ファジーなどの選択的オートファジーにおいては、それらのオルガネラの特異的受容体 (それぞれ出芽酵母 Atg32 と Atg39/Atg40) は最終的に Atg8 と結合することでオートファジーが進行することが報告されている。麹菌のヌクレオファジーにおいても同様に Atg8 結合タンパク質が受容体として関与すると予想し、AoAtg8 タンパク質に結合するタンパク質の網羅的同定を試みた。N 末端にプロテイン A とカルモジュリン結合ペプチド配列からなる TAR (Tandem Affinity Purification) タグを付加した AoAtg8 (TAP-AoAtg8) を発現する  $\Delta Aogatg8$  株を取得し、炭素源飢餓条件、コントロールとしての富栄養条件など、様々な培養条件で TAP-AoAtg8 に結合するタンパク質を比較した。また TAP タグのみを発現する株を用いたネガティブコントロール実験も行い、ヌクレオファジー誘導時に AoAtg8 に特異的に結合するタンパク質を選別した。次いで選別した候補についてそれらをコードする遺伝子の破壊株を作製し、ヒストン H2B-EGFP の飢餓時における分解を調べた。

また、核がオートファゴソーム膜によって取り囲まれ、液胞に輸送される様子を Time-lapse 撮影により観察するため、オートファゴソーム膜と液胞膜の融合に関わる酵母 YPT7 の麹菌オルソログ *Aoypt7* の破壊株、および液胞内でオートファジックボディーの分解に関わる酵母 ATG15 の麹菌オルソログ *Aogatg15* の破壊株を作製した。

加えて、核の分解が液胞で行われることを確認するため、液胞プロテアーゼ全般の活性化に関

わる最上流のプロテアーゼをコードする出芽酵母 *PEP4* の麹菌オルソログ *pepE* を破壊した株を作製し、飢餓時におけるヒストン H2B-EGFP 分解への影響を調べた。また、上記の選択的オートファジーにおいては、各オルガネラの受容体は Atg8 に加えて Atg11 にも結合することが知られている。そこで麹菌の Atg11 オルソログ *AoAtg11* をコードする *Aoatg11* 破壊株でのヒストン H2B-EGFP 分解についても調べた。

#### 4. 研究成果

##### (1) ヌクレオファジーに関わる受容体の探索と解析

上述の TAP-*AoAtg8* 結合タンパク質のスクリーニングから候補となる 6 タンパク質を選別し、その局在解析を行ったところ、いずれも核に局在することがわかった。各タンパク質をコードする遺伝子の破壊株を用いてヒストン H2B-EGFP の分解を検討したところ、うち 1 つの破壊株で飢餓時におけるヒストン H2B-EGFP の分解が抑制されることがわかった。また、この候補タンパク質は酵母 two-hybrid 実験においても *AoAtg8* と結合すること、*Atg8*-interacting motif (AIM) を 3 つ持つこと、そのうち AIM3 の変異体では *AoAtg8* 結合能が失われること、AIM3 変異体発現株ではヒストン H2B-EGFP の飢餓時における分解が抑制されることがわかった。以上からこの候補タンパク質がヌクレオファジーにおける核受容体であることが示唆され、*NprA* (Nucleophagy receptor A) と命名した。

*NprA* の局在を調べたところ、非飢餓時には核質内に局在していたが、飢餓時には核の表面に局在する様子が観察された。*AoAtg8* と結合するためには核膜表面に移動する必要があるが、この局在変化がどのような仕組みで起こるかは未解明である。また、*NprA* は膜ドメインを持たないことから、*NprA* を核膜上にアンカーする膜タンパク質の存在が示唆される。*NprA* と結合し、膜ドメインを持つタンパク質の探索を行い、*NprA* が核膜上に局在化する仕組みを解明する必要がある。

##### (2) オートファジーによって分解される核の顕微鏡観察

$\Delta Aoypt7$ 、 $\Delta Aoatg15$  の両破壊株とも、麹菌オートファジー欠損株に見られる、気中菌糸および分生子の形成が著しく低下するという表現型を示した。まず、これらを用いて実際にヌクレオファジーが欠損しているかを調べるため、ヒストン H2B-EGFP 融合タンパク質を発現させ、その分解をプロセッシングアッセイにより調べた。その結果、 $\Delta Aoypt7$  株では予想通り窒素源および炭素源飢餓時のヒストン H2B-EGFP の分解は抑制された。一方、 $\Delta Aoatg15$  株ではヒストン H2B-EGFP の分解は部分的にしか低下しなかった。このことから、麹菌では *AoAtg15* 以外の液胞リパーゼがオートファゴソーム膜の分解に関わることが示唆された。

蛍光顕微鏡による観察では、 $\Delta Aoypt7$  株では核を取り囲んだオートファゴソームが細胞質に蓄積する様子が観察された。一方  $\Delta Aoatg15$  株においては核を取り囲んだオートファゴソームが液胞内に蓄積する様子が認められた。さらに透過型電子顕微鏡による観察では、これらの観察結果に一致する、より鮮明で詳細な画像を取得することに成功した。以上から麹菌のヌクレオファジーによる核の分解は液胞で行われることが確認された。

##### (3) オートファジーに関わる液胞プロテアーゼの解析

核の分解に関わる液胞プロテアーゼの同定を試みた。出芽酵母では *Pep4* と *Prb1* がオートファゴソーム膜の分解に関わること、*Prb1* は *Pep4* によって活性化することから、まず *Pep4* のオルソログである麹菌 *PepE* をコードする遺伝子の破壊株を取得し、オートファジーへの影響を調べた。その結果、予想に反し *pepE* 破壊株においてヒストン H2B-EGFP や EGFP-*AoAtg8* の飢餓時の分解は野生株のそれとほとんど変化がなかった。また、オートファジーが欠損した場合に見られる表現型である気中菌糸および分生子形成の欠損は *pepE* 破壊株では全く見られなかった。これらの結果から、*PepE* は麹菌においてオートファジーには関与しないと結論した。一方 *PRB1* のオルソログである *Aopr1* の破壊株では気中菌糸・分生子形成は著しく低下しており、オートファジーが欠損しているものと考えられた。しかしヒストン H2B-EGFP や EGFP-*AoAtg8* の分解はさほど低下していなかった。これは、液胞に蓄積したオートファゴソーム膜が不安定で、細胞抽出液調製中にオートファゴソーム膜内に蓄積した基質の分解が起こるためであると考えられた。以上から、麹菌ではオートファジーにおける液胞プロテアーゼの役割が酵母と異なることが分かった。

##### (4) Atg11 オルソログの解析

これまでオルガネラが分解される選択的オートファジーにおいては各オルガネラの受容体は *Atg8* に加えて *Atg11* にも結合することが知られている。そこで麹菌の *Atg11* オルソログ *AoAtg11* をコードする *Aoatg11* 破壊株でのヒストン H2B-EGFP 分解を調べた。その結果、炭素源飢餓時におけるヒストン H2B-EGFP の分解はほとんど変化しなかったが、窒素源飢餓時におけるそれはほぼ完全に抑制された。炭素源飢餓時においてもヒストン H2B-EGFP の分解は *AoAtg8* に依存することから、この結果は、炭素源飢餓時における核の分解は非選択的オートファジー、窒素源飢餓時におけるそれは受容体を介した選択的オートファジーであることを示唆する。この点をさらに検証するため、選択的オートファジーに必須な *Atg1* による *Atg11* のリン酸化部位に変異を導入した株を用いてヒストン H2B-EGFP の分解を調べる予定である。

核全体が分解されるヌクレオファジーとしては、既に述べたようにテトラヒメナ大核の分解、イネいもち病菌の付着器内の核の分解が知られている。また、植物病原菌 *Fusarium oxysporum* では菌糸融合の際に一方の菌糸からもう一方の菌糸に核が侵入するが、その際侵入を受けた細胞の核が分解される。後2者は糸状菌であるが、いずれも単核の生物であり、またそこに関わる受容体は未同定である。多核の細胞におけるヌクレオファジーの機構は未解明であり、また特殊な(特定の機能を持った)細胞ではなく、通常の栄養細胞においてヌクレオファジーが起こるという点においても本研究は先行研究とは異なる。本研究の成果はこうした点で非常にユニークであると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Chen Junlin, Arioka Manabu	4. 巻 85
2. 論文標題 Autophagy deficiency boosts the production of kojic acid in the filamentous fungus <i>Aspergillus oryzae</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 2429 ~ 2433
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bbb/zbab175	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Asai Yoshiki, Hiratsuka Tomoshige, Ueda Miyu, Kawamura Yumi, Asamizu Shumpei, Onaka Hiroyasu, Arioka Manabu, Nishimura Shinichi, Yoshida Minoru	4. 巻 17
2. 論文標題 Differential Biosynthesis and Roles of Two Ferrichrome-Type Siderophores, ASP2397/AS2488053 and Ferricrocin, in <i>Acremonium persicinum</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 207 ~ 216
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acscchembio.1c00867	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Kim, D. M. and Arioka, M.
2. 発表標題 G protein-coupled receptors GprK and GprR regulate sclerotia formation through their GTPase-activating activity in <i>Aspergillus oryzae</i>
3. 学会等名 第20回糸状菌分子生物学コンファレンス
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤田 純佳、橋本 真宇、吉田 稔、有岡 学
2. 発表標題 麹菌 <i>Aspergillus oryzae</i> におけるオートファジーを介した核分解の分子機構の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川合 杏奈、宮川 拓也、田之倉 優、吉田 稔、有岡 学
2. 発表標題 糸状菌由来分泌型ホスホリパーゼA2の構造および機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 黄梅 昌朗, 吉田 稔, 有岡 学
2. 発表標題 麹菌Aspergillus oryzaeのヌクレオファジーにおけるAoAtg15の機能解析
3. 学会等名 第20回東京大学生命科学シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Junfeng Peng, Minoru Yoshida, Manabu Arioka
2. 発表標題 Analysis on the role of proteins involved in the process of nucleophagy in the filamentous fungus Aspergillus oryzae
3. 学会等名 第20回東京大学生命科学シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Junfeng Peng, Manabu Arioka
2. 発表標題 Analysis on the role of proteins involved in the process of nucleophagy in Aspergillus oryzae
3. 学会等名 第8回糸状菌若手ワークショップ
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 黄梅 昌朗, 藤田 純佳, 吉田 稔, 有岡 学
2. 発表標題 麹菌Aspergillus oryzaeのヌクレオファジーにおけるオートファジー関連遺伝子Aogat8とAogat15の機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Junfeng Peng, Minoru Yoshida, Manabu Arioka
2. 発表標題 Identification and characterization of proteins involved in nucleophagy in Aspergillus oryzae
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関