

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26892022

研究課題名(和文) 麹菌のエンドサイトーシスにおいて機能する新規AAA ATPase複合体の解析

研究課題名(英文) Analysis of novel AAA ATPase complex involved in endocytosis in *Aspergillus oryzae*

研究代表者

樋口 裕次郎 (Higuchi, Yujiro)

九州大学・(連合)農学研究科(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) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：麹菌 *Aspergillus oryzae* において、エンドサイトーシス関連タンパク質AoAbp1と相互作用する因子としてAAA (ATPases associated with diverse cellular activities) ATPaseであるAipAが同定されていたが、AipAの分子機能については未解明であった。本研究により、エンドサイトーシス関連構造体であるエイソソームの構成因子AoPil1とAipAの相互作用を明らかにし、生細胞内において共局在することを確認した。さらに、aipA破壊株がエルゴステロール生合成阻害剤に感受性を示すことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：AAA (ATPases associated with diverse cellular activities) ATPase localises at versatile intracellular sites and functions mainly in dissociation or degradation of protein complex. In koji mold *Aspergillus oryzae*, a AAA ATPase AipA had been identified as an interacting protein with an endocytic protein AoAbp1; however, molecular function of AipA had not been analysed in detail. In this study, it was revealed that AipA interacts with AoPil1, which is a putative component of eisosome, an endosomal structure at the plasma membrane. In addition, it was confirmed that AipA colocalises with AoPil1 in *A. oryzae* cells. At last, it was shown that *aipA* disruptant exhibits the sensitivity against inhibitors of ergosterol biosynthesis.

研究分野：応用分子細胞微生物学

キーワード：AAA ATPase 麹菌 エンドサイトーシス AipA エイソソーム AoPil1

1. 研究開始当初の背景

真核生物において、エンドサイトーシスは細胞外からの物質を取り込む他に、シグナル伝達や細胞極性の再構築、細胞膜や細胞膜タンパク質の取り込みやリサイクリングなどに重要な機構である。しかし、麹菌を含む糸状菌においてはエンドサイトーシスの明確な指標が存在しなかったために、エンドサイトーシスの詳細な機構やその生理学的意義に関する解析はほとんど行われていなかった。そこでまず申請者は、細胞膜タンパク質でありプリントランスポーターである AoUapC と enhanced green fluorescent protein (EGFP) との融合タンパク質である AoUapC-EGFP を発現する株を作製し、エンドサイトーシスを解析する実験系を構築した。

麹菌は菌糸先端から アミラーゼといった有用タンパク質を大量に分泌する能力を有し、その菌糸先端部では、分泌と相補的なエンドサイトーシスも活発に行われていることが予想された。そこで申請者は、初期エンドソームに局在し分泌に参与する v-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の可視化を試みた。Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) を用いた解析により、EGFP-AoSnc1 は主に菌糸先端の分泌小胞の集合体である Spitzenkörper に局在し、菌糸先端部をリサイクリングしていることが示唆された。

以上の解析から、麹菌の多大な菌体外タンパク質分泌を可能にするのが、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た。そこで、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可能性が考えられた。そこで申請者は、エンドサイトーシス関連因子である麹菌の AoAbp1 をベイトにした yeast two-hybrid スクリーニングにより、エンドサイトーシス関連因子の探索を行った。その内、AAA (ATPases associated with diverse cellular activities) ATPase と推定された AipA を見出した。エンドサイトーシスにおいて機能する AAA ATPase は、全生物種を通じてこれまで報告は無い。AipA はエンドサイトーシスを負に制御していることが示唆されたが、その詳細な機能に関しては未知である。

2. 研究の目的

麹菌 *Aspergillus oryzae* は、日本の発酵・醸造産業上非常に有用な菌種、国菌であり、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。しかし、麹菌の細胞内小胞輸送経路に関してはまだよく解明されていない。これまでの先行研究により、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

こで本研究では、麹菌において初めて見出されたエンドサイトーシスにおいて機能する AAA ATPase である AipA を中心とした分子機構を明らかにし、麹菌を含めた真核生物における AAA ATPase の新たな機能を提案することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 酵母ツーハイブリッド解析による AipA 相互作用因子の解析

酵母ツーハイブリッド解析には専用のキット試薬 (Clontech) を用いた。 *aipA*, *AoLas17*, *AoPil1* の cDNA を酵母ツーハイブリッド用のベクターにクローニングし、出芽酵母菌株を作製した。cDNA ライブラリーに関しては、以前の解析で用いたものを使用した。

(2) AipA とその相互作用因子の細胞内局在解析

AoPil1-EGFP を内在性の遺伝子座で発現する株を作製した。そして、AipA との共局在を解析するために、赤色蛍光タンパク質 mDsRed と AipA との融合タンパク質を発現するコンストラクトおよび菌株を作製した。

蛍光観察には、正立型顕微鏡 ECLIPSE 80i (Nikon) および共焦点・超解像顕微鏡 TCS SP8 STED (Leica) を使用した。

(3) *aipA* 破壊株の表現型解析

aipA 破壊株、相補株、コントロール株を DPY 寒天培地上で生育比較を行った。2 種類のエルゴステロール阻害剤 (東京化成工業) を用いた。イトラコナゾールは DMSO に 3 mM ストックを調製し、終濃度 150 nM で使用した。ミコナゾールはメタノールに 3 mM ストックを調製し、終濃度 1 μM で使用した。

4. 研究成果

(1) 酵母ツーハイブリッド解析による AipA 相互作用因子の解析

AipA の機能解析を進めるためにまず、AipA と相互作用する因子の探索を行った。AipA は AoAbp1 をベイトに麹菌の cDNA ライブラリーから酵母ツーハイブリッドスクリーニングにより見出された。そこで同様にして、AipA をベイトとして酵母ツーハイブリッドスクリーニングを行った。しかし、再現性を含めて目ぼしい候補は見出されなかった。

次に、in silico 解析により、出芽酵母に存在する AipA オルソログ、Sap1p と Yta6p の相互作用因子を調べた。その結果、Sap1p と Yta6p がエンドサイトーシス関連タンパク質である Las17p およびエンドサイトーシス関連構造体であるエイソソームの構成因子 Pil1p と相互作用することがデータベースから明らかになった。そこで麹菌において、Las17p と Pil1p のそれぞれのオルソログである AoLas17 と AoPil1 を解析対象とした。実

際に酵母ツーハイブリッド解析を行うことにより、AipA との相互作用を調べたところ、AoLas17 では見られなかったものの、AoPil1 が AipA と相互作用することが明らかになった(図 1)。

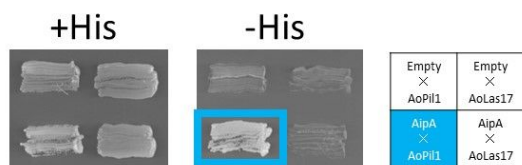


図 1 AipA と AoPil1 の相互作用

(2) AipA とその相互作用因子の細胞内局在解析

AipA と AoPil1 が実際に麹菌細胞内で相互作用するかを解析するために、局在解析を行った。まず、AoPil1-EGFP を内在性の発現量で局在解析する株を作製し、観察を行った。AoPil1-EGFP は主に細胞膜近傍にパッチ状に観察され、菌糸先端部や隔壁に局在していた。特筆すべき点として、分生子において蛍光が強く観察されたことから、菌糸が発芽する前段階で AoPil1 が特に機能していることが示唆された(図 2A)。

次に、実際に AoPil1 と AipA 両者の局在解析を行うために mDsRed-AipA 発現コンストラクトを作製した後、これを AoPil1-EGFP 発現株に形質転換した。この株を用いて蛍光観察を行ったところ、AoPil1 と AipA が共局在することがわかった(図 2B)。今後は実際に結合もしくは同じコンパートメントに存在するかどうかを生化学的に解析する必要があると考える。

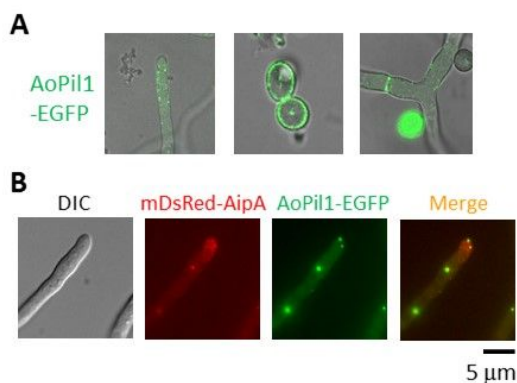


図 2 AipA と AoPil1 の麹菌細胞内局在

A. 麹菌細胞内各所における AoPil1-EGFP の局在解析。B. mDsRed-AipA と AoPil1-EGFP の菌糸先端部における共局在解析。

(3) aipA 破壊株の表現型解析

AipA と相互作用する因子の解析を行う一方で、AipA の機能を探るために、aipA 破壊株の表現型解析を行った。近年、Aspergillus nidulans における Aopil1 オルソログ pilA 破壊株ではエルゴステロール生合成阻害剤で

あるイトラコナゾールに耐性を示すことが報告されている。そこで、AoPil1 と相互作用することが明らかとなった AipA の遺伝子破壊株で同様の生育比較解析を行ったところ、逆に感受性を示すことが明らかになった(図 3)。同様の結果が、他のエルゴステロール生合成阻害剤であるミコナゾールでも確認された。

以上から、AipA はエルゴステロールのストレス条件下、AoPil1 の関与するエイソソームと関連したエンドサイトーシス機構において機能する可能性が考えられた。



図 3 aipA 破壊株の生育比較解析

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 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

樋口 裕次郎, 柿本 健一, 宋 原準, 竹川 薫, 真核微生物における AipA 様 AAA ATPase の機能解析, 日本農芸化学会, 2016.03.29. 札幌

柿本 健一, 竹川 薫, 樋口 裕次郎, 黄麹菌 *Aspergillus oryzae* におけるエンドサイトーシス関連 AAA ATPase AipA と相互作用する因子の解析, 第 15 回糸状菌分子生物学コンファレンス, 2015.11.19. 東京

柿本 健一, 竹川 薫, 樋口 裕次郎, 黄麹菌 *Aspergillus oryzae* における AAA ATPase AipA 相互作用因子の探索, 第 52 回化学関連支部合同九州大会, 2015.06.27. 北九州

〔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