

麹菌の生育と分化において細胞内トラフィックが果たす役割の解析

有岡 学

(東京大学大学院農学生命科学研究科)

研究の目的

一般に分泌酵素は細胞内を輸送小胞に包まれて運ばれるが、その際小胞が正しい目的地を選ぶための目印として働くのが SNARE タンパク質である。SNARE タンパク質は融合する膜どうしの特異的な認識に関与するとともに、膜融合の driving force としても働くことから、細胞内小胞輸送において中心的な役割を果たすと考えられている。本研究では、高いタンパク質分泌能力を有する麹菌の細胞内小胞輸送の過程やそこに関与するオルガネラに関する基礎的な知見を得ることを目的として、麹菌の持つ全 SNARE タンパク質の配列の同定および局在解析を行った。また、それらのうち特に液胞膜に局在する AoVam3 タンパク質に着目し、糸状菌の生育と分化における液胞の役割を検討した。

方法

麹菌ゲノムデータベースの検索から、麹菌の持つ全 SNARE タンパク質の配列を抽出した。それらの細胞内局在を解析するため、N 末端側に EGFP (enhanced green fluorescent protein) を連結した融合タンパク質を発現する安定形質転換株を取得した後、液体培地で培養して発現する菌糸の部位および生細胞での各 SNARE タンパク質の挙動を蛍光顕微鏡で観察した。また、各オルガネラのマーカータンパク質と EGFP との融合タンパク質を発現する株を用いてその挙動を観察した。

結果

推定SNAREタンパク質 21 個の*in silico*解析および配列決定

出芽酵母の SNARE の配列情報をもとに、麹菌のゲノム配列から AoBet1、AoBos1、AoGos1、AoSec20、AoSec22、AoUfe1、AoSft1、AoTlg2、AoTlg1、AoVti1、AoSyn8、AoVam7、AoNyy1、AoYkt6、AoSso1、AoSso2、AoSec9、AoSnc1 を見出した。RT-PCR 解析を行ったところ、一部の SNARE では増幅がみられず、アノテーション情報の誤りが推測された。それらに関しては 5'-および 3'-RACE 解析を行い、配列を確定した。また、ゲノムアノテーションでは報告されていなかった出芽酵母 Use1 のオーソログ AoUse1 を新たに見出した。以上の結果、すでに当研究室で見出していた AoSed5 と AoVam3 をあわせ、麹菌は 21 個の SNARE 遺伝子を持つことがわかった。

推定SNAREタンパク質 21 個の網羅的局在解析

各 SNARE に対し、その N 末端に EGFP を連結した融合タンパク質を麹菌に発現させ、局在を蛍光顕微鏡により観察した。また、EGFP 蛍光が細胞質にのみ観察された AoYkt6、AoSec9 を除く SNARE について、オルガネラ染色試薬を利用して局在するオルガネラの同定を試みた。

その結果、小胞体には AoUfe1、AoSec20、AoUse1、および AoSec22 が局在することがわかった。EGFP 蛍光は細胞内においてリング状およびチューブ状の形態を示し、核膜、細胞膜、および隔壁の周辺に分布した。AoSed5、AoBos1、AoGos1、AoBet1、AoSft1 および AoVti1 は菌糸先端付近に小さなドット状の構造体として観察され、これらはゴルジ体であると推測された。AoSso1、AoSso2 および AoSnc1 を発現する株においては蛍光は細胞質膜に観察された。蛍光は細胞の全周にわたってほぼ均一に分布し、菌糸先端ではやや弱かった。AoVam3、AoVam7 と AoNyy1 は CMAC で染色される液胞膜に局在し、同様の局在は AoVti1 においても認められた。AoNyy1 は細胞質膜にも認められたが、液胞への局在が正しい機能を反映したものであると考えられた。

糸状菌では、初期エンドソームは菌糸内を活発に動く構造体として、後期エンドソームは液胞近傍に存在する FM4-64 で染色される構造体として観察されている。AoTlg1、AoTlg2、AoVti1、AoSyn8 と AoSnc1 は粒子状の動的構造体に局在した。一方、AoTlg2、AoVti1、AoNyy1、AoVam7 と AoSyn8 は静止した液胞近傍の構造体にも局在した。従って、これらのタンパク質はそれぞれ前期および後期エンドソームに局在すると考えられた。また、いくつかの SNARE は隔壁にも局在した。それらは細胞質膜の AoSso1、AoSso2 と AoSnc1、小胞体膜の AoSec20 と AoUse1、エンドソームあるいは液胞に局在する AoTlg1、AoVti1 および AoNyy1 であった。

各オルガネラの分布について詳細な観察を行い、以下のような知見を得た。ゴルジ体は菌糸先端に多く存在し、後期エンドソームは液胞に近接して存在する、それぞれ静止した点状の構造体として、また初期エンドソームは菌糸内を動く点状の構造体として細胞内に分布することが示唆された。また隔壁の近くには隔壁孔を避けるように小胞体が存在することも示唆された。各 SNARE はこれらのオルガネラに固有の局在を示し、一部については複数のオルガネラにまたがって分布することがわかった。

EGFP-AoVam3 を用いた麴菌の液胞形態の解析

続いて液胞膜に局在する AoVam3 と EGFP との融合タンパク質 EGFP-AoVam3 を用いたより詳細な解析を行った。若い菌糸においては EGFP-AoVam3 は液胞膜上に局在したが、数日間培養した基部の菌糸においては EGFP 蛍光が発達した液胞の内腔に認められた。融合タンパク質において、EGFP は細胞質側に露出するように設計されていることから、このような EGFP のトポロジーの変化には液胞膜の内腔への陥入および出芽が必要であると考えられた。このことから、菌糸基部においては細胞質成分がオートファジーにより液胞内腔へ取り込まれ、それに伴って液胞膜も内腔へと取り込まれていることが示唆された。この点についてさらに検討するため、基部菌糸における細胞質成分の分解についてより詳細に調べた。ヒストン H2B、ペルオキシソーム局在シグナル、クエン酸還元酵素にそれぞれ EGFP を融合して発現することで核、ペルオキシソーム、ミトコンドリアを可視化し、顕微鏡観察を行った。1 日培養の時点では EGFP 蛍光は各オルガネラに局在した。しかし 2 日培養後の基部菌糸においては、いずれの株においても液胞内腔にも EGFP 蛍光が認められた。さらに、オートファジーに必要な酵母 *Atg8* のオースログ *Aoatg8* を破壊した株において同様の実験を行ったところ、いずれのオルガネラ

マーカーも液胞内へ取り込まれなくなった。以上の結果から、基部菌糸においてはオルガネラが液胞にオートファジーによって取り込まれることが示唆された。

結論

以上の結果から、麹菌の SNARE は出芽酵母とほぼ同様のオルガネラに局在することが示唆されたが、いくつかの融合タンパク質においては隔壁への局在が確認された。従って、糸状菌においては SNARE は隔壁等において特異的な働きを担う可能性が示唆された。また、各 SNARE をオルガネラのマーカータンパク質として利用することができると考えられた。一方、AoVam3 を用いた観察から、基部の菌糸においてはオルガネラの液胞での分解とその成分の再利用が行われていることが示唆された。Aovam3 や Aogatg8 の発現を抑制すると気中菌糸の形成が阻害されることから、糸状菌の液胞がその存在部位に応じて特化した役割を担うことで分化プロセスにおいて必須の役割を果たしているものと考えられた。

文献

Shoji, J. Y., Arioka, M., and Kitamoto, K.

Vacuolar membrane dynamics in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*., *Eukaryot. Cell* 5(2), 411-421 (2006)

Shoji, J. Y., Arioka, M., and Kitamoto, K.

Possible involvement of pleiomorphic vacuolar networks in nutrient recycling in filamentous fungi., *Autophagy* 2(3): 226-227 (2006)

Kikuma, T., Ohneda, M., Arioka, M., and Kitamoto, K.

Functional analysis of the ATG8 homologue Aogatg8 and role of autophagy in differentiation and germination in *Aspergillus oryzae*., *Eukaryot. Cell* 5(8): 1328-1336 (2006)

Kuratsu, M., Taura, A., Shoji, J.Y., Kikuchi, S., Arioka, M., and Kitamoto, K.

Systematic analysis of SNARE localization in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*., *Fungal Genet. Biol.* 44(12): 1310-1323 (2007)

Shoji, J.Y., Arioka, M., and Kitamoto, K.

Dissecting cellular components of the secretory pathway in filamentous fungi: insights into their application for protein production. *Biotechnol. Lett.* 30(1): 7-14 (2008)