

152. エンドサイトーシス関連新規 AAA ATPase の分子機構の解明

樋口 裕次郎

九州大学 大学院農学研究院 生命機能科学部門 システム生物学講座 発酵化学分野

Key words : AAA ATPase, エンドサイトーシス, エイソソーム, *Aspergillus oryzae*, *Schizosaccharomyces pombe*

緒言

細胞内の様々な部位に局在する AAA (ATPases associated with diverse cellular activities) ATPase は、主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¹⁾。黄麹菌 *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 ATPase である AipA がこれまでに同定されていた²⁾。*aipA* 破壊株では顕著な表現型を示さないものの、過剰発現株では生育の低下および菌糸先端部でのエンドサイトーシスによるリサイクリングの遅延が見られる。また EGFP-AipA は、エンドサイトーシス関連タンパク質に特徴的な菌糸最先端からやや内側の細胞膜近傍に観察される。これらのことから、AipA がエンドサイトーシスを負に制御する因子であることが示唆されていた。しかし、AipA の詳細な分子機構については未解明であったため、本研究では AipA および分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* にも存在する 2 つの機能未知な AipA オルソログ (SPAC328.04, *knk1*) の機能解析を行った。その結果、AipA 様 AAA ATPase がエイソソームと関連し、ストレス条件下においてエンドサイトーシスの制御機構に関わっていることが示唆されたので報告する。

方法および結果

1. AipA 相互作用因子の探索と顕微鏡解析

AipA の機能解析をさらに進めるためにまず、AipA と相互作用する因子の探索を行った。AoAbp1 をベイトに AipA を見出した方法と同様に、AipA をベイトとして酵母ツーハイブリッド (YTH) 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。そこで *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、エンドサイトーシス関連タンパク質である AoLas17 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 AoPil1 と相互作用する可能性を見出した。実際に YTH 解析を行うことにより、AipA が AoPil1 と相互作用することを明らかにした (Fig. 1)。さらに、生細胞において AoPil1-EGFP の局在を解析し、細胞膜近傍に局在し、そして mDsRed-AipA と共局在することを確認した (Fig. 2)。

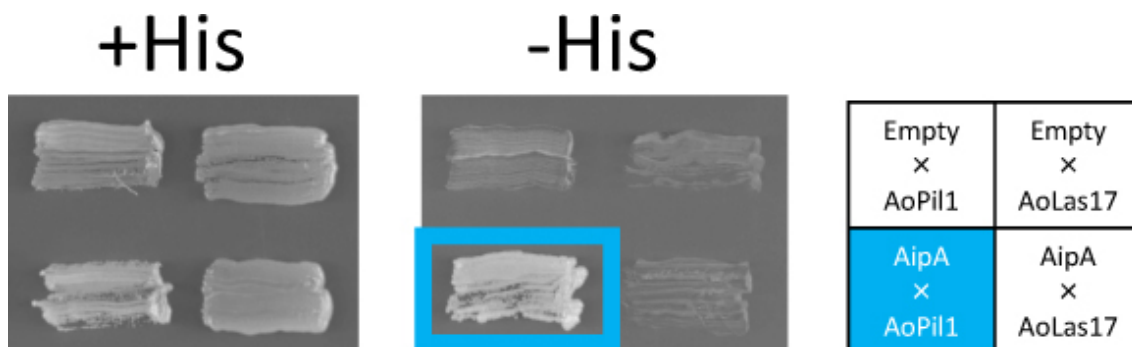


Fig. 1. AipA interacts with AoPil1

YTH analysis revealed that AipA interacts with AoPil1, but not with AoLas17.

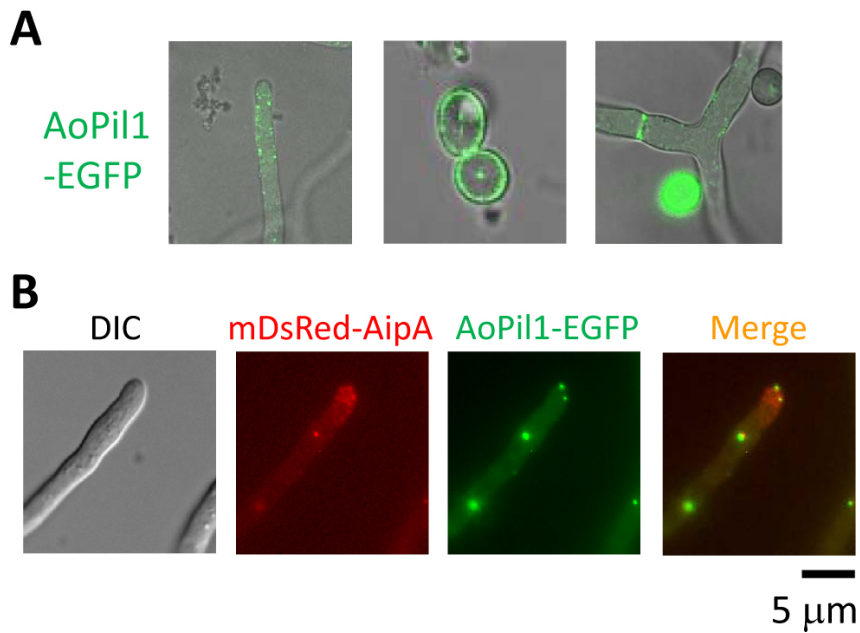


Fig. 2. Co-localisation of AipA and AoPil1

(A) AoPil1 localises at the plasma membrane of around hyphal tip, conidia and septa. (B) AipA and AoPil1 co-localise near the hyphal tip region.

2. *aipA* 破壊株の表現型解析

糸状菌 *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 itraconazole に耐性を示すことが報告されている³⁾。そこで、*aipA* 破壊株で解析を行ったところ、逆に感受性を示すことを明らかにした (Fig. 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 miconazole でも確認された。

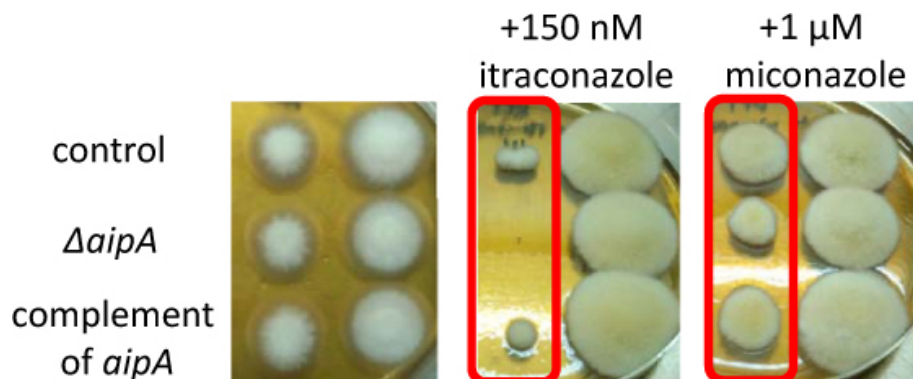


Fig. 3. *aipA* disruptant is sensitive to inhibitors of ergosterol biosynthesis

aipA disruptant exhibits the sensitivity to inhibitors of ergosterol biosynthesis, itraconazole and miconazole (circled in red).

3. 分裂酵母における AipA オルソログの探索

AipA の相互作用因子や破壊株の表現型が他の真核微生物にも保存されているかを検討するため、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* を用いた解析を行った。分裂酵母にも 2 つの機能未知な AipA オルソログ

(SPAC328.04, *knk1*) が存在することを見出した。そして、分裂酵母データベース (<http://www.pombase.org/>) により AipA オルソログの相互作用情報を調べたところ、エイソソームとの関連が見出された (Fig. 4)。なお、SPAC328.04 タンパク質を Ace1 (AAA ATPase required under stresses of calcium, cold and ergosterol biosynthesis inhibitor) と名付けた (以下の4項参照)。

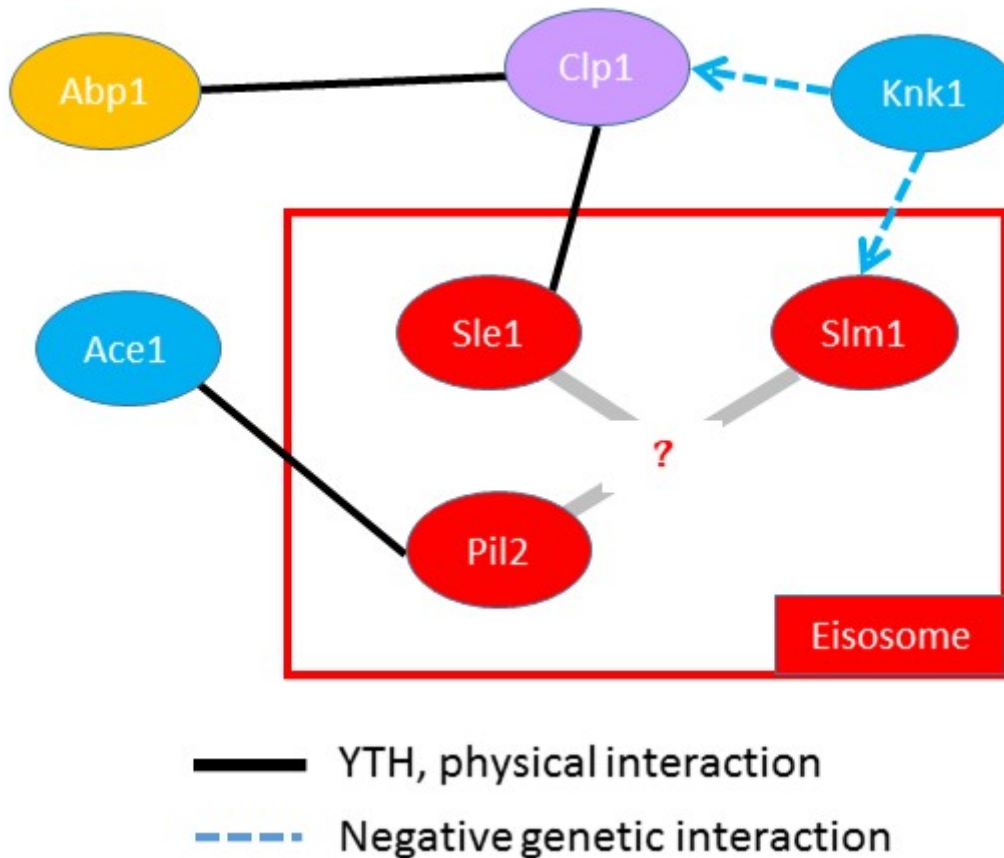


Fig. 4. Predicted interactions with AipA-like AAA ATPases in *S. pombe*

The information of both physical and genetic interactions among AipA-like AAA ATPases and eisosome-related proteins was extracted from *S. pombe* database (<http://www.pombase.org/>), in which Ace1 interacts with Pil2 investigated by YTH analysis.

4. 分裂酵母における AipA オルソログ遺伝子の表現型解析

AipA オルソログの機能解析のために、それぞれの遺伝子単独及び二重破壊株を作製した。*ace1* 破壊株は 15 °C、0.3 M の Ca 存在下で顕著な生育低下を示した (Fig. 5)。しかし同条件で、もう一つの AipA オルソログである *knk1* 破壊株では表現型を示さず、二つの AipA オルソログが別の機能を担っている可能性が示唆された。

さらに、*aipA* 破壊株で見られた表現型であるエルゴステロール生合成阻害剤存在下における生育比較を行った。この際、Ace1 との相互作用が予想される Pil2 の遺伝子破壊株でも解析を行った。その結果、*ace1* 及び *pil2* 単独破壊株において、今回の実験条件では miconazole では表現型は見られなかったものの、itraconazole に顕著な感受性を示した (Fig. 6)。

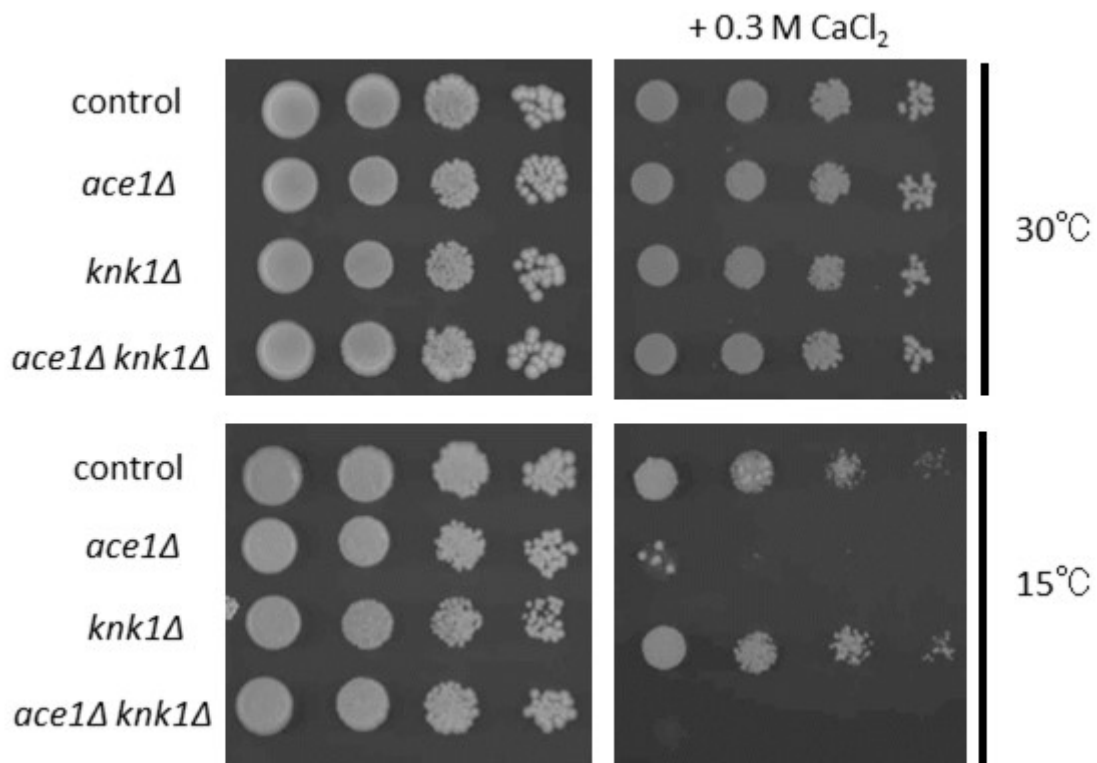


Fig. 5. *ace1* disruptant exhibits a severe growth defect under cold and calcium stresses
 When grown on a plate containing 0.3 M CaCl₂ at 15 °C, *ace1* disruptant exhibits a severe growth defect, whereas *knk1* disruptant does not.

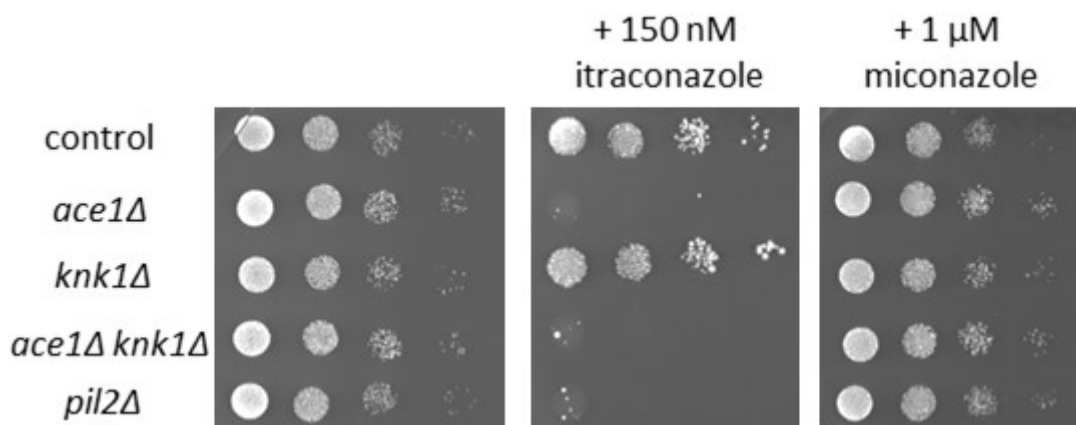


Fig. 6. *ace1* and *pil2* single disruptants are sensitive to itraconazole, an ergosterol biosynthesis inhibitor
 When grown on a plate containing 150 nM itraconazole, *ace1* and *pil2* single disruptants display a severe growth defect, whereas *knk1* disruptant does not.

考 察

本研究により、AipA がエイソソーム関連因子 AoPil1 と相互作用し、エルゴステロールに対するストレス条件下において機能していることが示唆された。エイソソームは出芽酵母において初めて見出された細胞膜近傍に存在する静的な構造体であり、エンドサイトーシスとの関連が示唆されている⁴⁾。今後は、AipA、AoPil1 および AoAbp1 の3者間のエンドサイトーシスにおける機能関連を示していく必要がある。さらに、分裂酵母における AipA 様 AAA ATPase である Ace1 および Knk1 の機能解析を行った。まず、両者ともにエイソソーム関連タンパク質との相互作用が示唆された。そして、Ace1 は AipA と同様に、エルゴステロールに対するストレスの他に、低温かつカルシウムストレス存在下で機能することが示唆された。*knk1* 破壊株は細胞の一端がねじれる (kink) という表現型から、新規の形態形成因子として同定されたものの、具体的な分子機能に関しては未だ明らかになっていない⁵⁾。今後は Ace1 と Knk1 との機能性の違いを明らかにしていく必要がある。以上から、真核微生物である黄麹菌及び分裂酵母を用いた解析により、AipA 様 AAA ATPase がエイソソームと関連し、ストレス条件下においてエンドサイトーシスの制御機構に関わっていることが示唆された。

共同研究者

本研究の共同研究者は、九州大学農学研究院発酵化学研究室の竹川薫教授である。最後に、本研究に御支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く御礼申し上げます。

文 献

- 1) White SR, Lauring B. AAA+ ATPases: achieving diversity of function with conserved machinery. *Traffic* 2007;8:1657-67. PubMed PMID: 17897320.
- 2) Higuchi Y, Arioka M, Kitamoto K. Functional analysis of the putative AAA ATPase AipA localizing at the endocytic sites in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2011;320:63-71. doi: 10.1111/j.1574-6968.2011.02288.x. PubMed PMID: 21507053.
- 3) Vangelatos I, Roumelioti K, Gournas C, Suarez T, Scazzocchio C, Sophianopoulou V. Eisosome organization in the filamentous ascomycete *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot. Cell* 2010;9:1441-54. doi: 10.1128/EC.00087-10. PubMed PMID: 20693301.
- 4) Walther TC, Brickner JH, Aguilar PS, Bernales S, Pantoja C, Walter P. Eisosomes mark static sites of endocytosis. *Nature* 2006;439:998-1003. PMID: 16496001.
- 5) Scheffler K, Recouvreux P, Paoletti A, Tran PT. Oscillatory AAA+ ATPase Knk1 constitutes a novel morphogenetic pathway in fission yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2014;111:17899-904. doi: 10.1073/pnas.1407226111. PubMed PMID: 25422470.