

博士論文

麹菌 *Aspergillus oryzae* における
エンドサイトーシスの生理学的機能に関する研究

東京大学大学院 農学生命科学研究科 応用生命工学専攻
平成 19 年度 博士課程入学
氏 名 樋口 裕次郎
指導教員名 北本 勝ひこ

目次

序章	3
第1章 麹菌 <i>Aoend4</i> 条件発現株を用いたエンドサイトーシスに関する解析	17
序	17
結果 1-1 <i>Aoend4</i> 条件発現株の作製	18
1-2 <i>Aoend4</i> 条件発現株における生育比較	19
1-3 <i>Aoend4</i> 条件発現株におけるエンドサイトーシスの解析	20
1-4 <i>Aoend4</i> 条件発現株における細胞壁に関する解析	22
1-5 <i>Aoend4</i> 条件発現株におけるステロールリッチ領域の解析	23
1-6 <i>Aoend4</i> 条件発現株の <i>Aoend4-egfp</i> による相補実験	24
1-7 エイソソーム様構成因子 <i>Aopil1</i> の解析	25
考察	26
第2章 麹菌におけるエンドサイトーシス関連因子の探索	51
序	51
結果 2-1 AoAbp1 を bait にした yeast two-hybrid スクリーニング	52
2-2 AoAbp1 と相互作用するタンパク質をコードする遺伝子の同定	53
2-3 エンドサイトーシス関連因子としての AAA ATPase 様タンパク質を コードする遺伝子の同定	55
考察	56
第3章 AAA ATPase 様タンパク質の機能解析	69
序	69
結果 3-1 麹菌 <i>aipA</i> 遺伝子のクローニング	70
3-2 AipA と AoAbp1 の相互作用解析	71
3-3 <i>aipA</i> 変異株を用いた表現型解析	73
考察	76

総括及び展望	98
実験材料と方法	102
参考文献	127
略語一覧	136
発表論文一覧	137
要旨	138
謝辞	142

序章

序-1 背景

真核生物は、オルガネラ間での物質輸送の手段として細胞内小胞輸送系を発達させている。ゴルジ体 (Golgi apparatus) 以降の分泌およびエンドサイトーシス (endocytosis) 経路は、ポストゴルジネットワークとして輸送網を形成している。細胞膜タンパク質や細胞外の物質は、エンドサイトーシスにより、細胞膜の陥入によって生じる小胞中に取り込まれて細胞内へ送られ、初期エンドソーム (early endosome) へと至る。この後、分解されるべき物質は後期エンドソーム (late endosome) からリソソーム (lysosome) /液胞 (vacuole) へと運ばれ、リサイクリングされるべき物質は直接、またはゴルジ体を経て間接的に細胞膜へと再輸送される (Fig. 0-1)。エンドサイトーシスの機構は真核生物において広く保存されており、シグナル伝達、細胞極性の再構築、外界からの栄養分取得、細胞膜や細胞膜タンパク質の細胞内への取り込みにおいて重要な役割を有する (Polo and Di Fiore, 2006)。

エンドサイトーシス

エンドサイトーシスはカーゴの種類とその取り込み機構によって、いくつかのモードに分けられ、大きくはファゴサイトーシス (phagocytosis) とピノサイトーシス (pinocytosis) に分けられる (Conner and Schmid, 2003)。ピノサイトーシスはさらに、マクロピノサイトーシス (macropinocytosis)、カベオラ依存性エンドサイトーシス (caveolae-mediated endocytosis)、クラスリン依存性エンドサイトーシス (clathrin-mediated endocytosis) に分けられ、さらにクラスリン・カベオラ非依存性エンドサイトーシス (clathrin- and caveolae-independent endocytosis) も存在する (Conner and Schmid, 2003; Kaksonen *et al.*, 2006) (Fig. 0-2)。

動物細胞においてファゴサイトーシスは、マクロファージや単核球、好中球などにより主に行われ、バクテリアなどの病原体や死細胞の残骸といった比較的大きな物質を細胞内に取り込む (Aderem and Underhill, 1999)。その機構は細胞表面の特異的なレセプターと Cdc42 や Rac といった Rho-family GTPase によって制御されている (Hall and Nobes, 2000)。一例を挙げると、マクロファージ上の Fc (fragment crystallizable

region) レセプターは、バクテリアの表面抗原に結合した抗体を認識し、またその抗体と結合することによって活性化される。続いて Cdc42 や Rac の活性化によってアセンブリーされたアクチンによって細胞膜が細胞外に伸長し、抗体によって取り囲まれた抗原物質を包み込むようにして細胞内に取り込む。

ピノサイトーシスは液相エンドサイトーシス (fluid-phase endocytosis) とも呼ばれ、細胞外の液体成分を細胞内に取り込む。細胞外物質と細胞膜との特異的な結合を介さない取り込み (adsorptive endocytosis) も存在するが、より効率的な取り込み機構として特異的なレセプターを介したレセプター依存性エンドサイトーシス (receptor-mediated endocytosis) による取り込みが存在する。

マクロピノサイトーシスは成長因子などの細胞外刺激によって細胞膜が波打つことによって起こるが、その詳細な機構は未だによく分かっていない。ファゴサイトーシスとマクロピノサイトーシスとの大きな相違点としては、取り込むカーゴの種類が異なる点もあるが、取り込みにおいて細胞膜を細胞外に伸長させる際、ファゴサイトーシスでは包みこむように物質を取り込むのに対し、マクロピノサイトーシスでは細胞膜から伸ばした膜の先端が細胞膜に再び融合することによってマクロピノソーム (macropinosome) と呼ばれる構造を形成して取り込むという点が挙げられる。

カベオラ依存性エンドサイトーシスは、カベオラと呼ばれるフラスコ状の構造を細胞膜内側に作り、それにより物質を細胞内に取り込む。カベオラにはカベオリン (caveolin) と呼ばれるホモ 2 量体の細胞膜タンパク質が存在し、カベオリンにコレステロールが結合することでコレステロールを細胞内に取り込む。コレステロールの他にはスフィンゴ糖脂質がカーゴとなる。その取り込み機構には src キナーゼが関与し、コレステロールやスフィンゴ糖脂質、カベオリンの存在するバランスが重要である (Cheng *et al.*, 2006)。しかし、カベオラ依存性エンドサイトーシスに関する知見は近年増加してきているものの、まだその詳細な機構はほとんどわかっていない。

クラスリン依存性エンドサイトーシスは、エンドサイトーシスのモードの中でこれまでに最も解析が進んでいる。以下にクラスリン依存性エンドサイトーシスについてこれまでに分かっている知見をまとめた。

クラスリン依存性エンドサイトーシス

クラスリン依存性エンドサイトーシスは、以前はレセプター依存性エンドサイトーシスと同義と考えられていた。しかし、レセプター依存性エンドサイトーシスはピノサイトーシスにとって通常に見られる形態であることから、現在ではレセプター依存性エンドサイトーシスはクラスリン依存性エンドサイトーシスの中の主要な一形態であると考えられている。また、クラスリン依存性エンドサイトーシスはアクチン依存性エンドサイトーシスとも呼ばれ、その名の通りクラスリンやアクチンが取り込みの際に主に関係しているエンドサイトーシスである。コレステロールをカーゴとする低密度リポプロテイン (LDL: low density lipoprotein) や LDL レセプター、鉄をカーゴとするトランスフェリン (Tfn: transferin) と Tfn レセプターなどがクラスリン依存性エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれる (Schmid, 1997)。

クラスリンはトリスケリオン (triskelion) と呼ばれる3本足の構造をしている。それらは3本のクラスリン重鎖 (clathrin heavy chain) からなり、クラスリン重鎖それぞれにクラスリン軽鎖 (clathrin light chain) が強固に結合している (Kirchhausen, 2000a)。クラスリンは細胞膜にできた陥入に、クラスリン被覆ピット (clathrin-coated pit) と呼ばれるサッカーボール状の構造を形成する。クラスリン被覆ピットはカーゴや取り込みの機構に必要なタンパク質が集積し成熟すると、GTPase であるダイナミン (dynamin) によって細胞膜からくびりとられ、クラスリン被覆小胞 (clathrin-coated vesicle) となる。ダイナミンはすべてのエンドサイトーシスのモードに共通して存在し、細胞膜においてエンドサイトーシスを統括する制御因子であると考えられている。

クラスリン依存性エンドサイトーシスの機構には多くのタンパク質が関与し、時間的、空間的に制御され、またそれらの関与するタンパク質の機能重複性も相まって非常に複雑な機構となっている。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いた研究により、最近になりその全貌の一端が明らかになってきた (Kaksonen *et al.*, 2005)。まず、クラスリン (clc1p、chc1p) や End3p、Sla1p、Pan1p、End4p/Sla2p といったコート (coat) タンパク質が細胞膜に集積し、クラスリン被覆ピットを形成する。次にミオシン (myosin) である Myo5p やアクチン重合の活性化因子である WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein) 様タンパク質の Las17p がクラスリン被覆ピットにリクルートされる。続いて細胞膜の湾曲に関わるとされる amphiphysin 様タンパク質の Rvs161p、Rvs167p がクラスリン被覆ピットに集積する。最後に Sac6p、Abp1p、Arp2/3p がアク

チン重合によってアクチンパッチ (actin patch) を形成し、クラスリン被覆ピットを徐々に細胞内に陥入させていく。細胞内におけるこれら一連の流れは数十秒の時間スケールで行われる。

クラスリン依存性エンドサイトーシスにおいて、アクチンは重要な役割を果たしている (Smythe and Ayscough, 2006)。アクチンのダイナミックな重合は細胞内において細胞膜の再構成に関わるいくつかの主要な機構と深い関連がある。アクチンはラメリポディア (lamellipodia; 葉状仮足)、フィロポディア (filopodia; 糸状仮足) といった細胞遊走に関わる構造を構築し、そしてエンドサイトーシスにおいてはアクチンパッチという形で細胞膜の再構成を行う。エンドサイトーシスにおいてアクチンの果たす明確な役割はまだわかっていない。現在までに考えられているモデルでは、大部分のアクチンはクラスリン被覆ピットに存在するコートタンパク質と結合している一方で、細胞膜のごく近傍においてモノマーのアクチンが次々と重合することによって細胞膜から離れる方向に力を発生させる。これによりクラスリン被覆ピットが徐々に細胞内へ陥入されていくと考えられている (Fig. 0-3)。

糸状菌におけるエンドサイトーシスに関するこれまでの研究

真核生物において広く保存されているエンドサイトーシスは、糸状菌においても当然存在するものと考えられていた。糸状菌と近縁の生物である出芽酵母においてもエンドサイトーシスは存在し、エンドサイトーシス経路を可視化する系として各種の蛍光色素が用いられてきた (Munn, 2000; Shaw *et al.*, 2001)。しかし、ある種の糸状菌において、出芽酵母で用いられてきたエンドサイトーシスのマーカーを同様に用いても細胞内への取り込みが行われないことが報告され、これにより糸状菌におけるエンドサイトーシスの存在に対して疑問が生じ始めた (Read and Kalkman, 2003)。

糸状菌にエンドサイトーシスが存在しないと主張する理由として代表的なものは、FM4-64 がある種の糸状菌において細胞内に取り込まれないというものであった (Cole *et al.*, 1998)。FM4-64 は、出芽酵母においてエンドサイトーシスによって取り込まれるマーカーとして最もよく用いられる両親媒性の蛍光色素である (Vida and Emr, 1995)。Lucifer Yellow は、出芽酵母における液相エンドサイトーシスによって取り込まれるマーカーであるが、一部の糸状菌で細胞内に取り込まれないことも報告されていた (Fischer-Parton *et al.*, 2000; Torralba and Heath, 2002)。また、ランタン (La^{3+} ; Lanthanum) は超微細構造レベルで観察できる、エンドサイトーシスによって取り込まれるマーカーとして動物および植物細胞において報告されていたが、糸状菌である *Neurospora crassa* では細胞内に取り込まれなかった (Torralba and Heath, 2002)。さらに、動物や植物細胞において電子顕微鏡でしばしば観察されるクラスリン被覆小胞が、糸状菌では観察されないという報告もあった (Kirchhausen, 2000b)。

しかし、以上のような糸状菌においてエンドサイトーシスが存在しないとするデータのほとんどがネガティブデータであり、また報告されている菌種も少なく、観察条件等の再検討が必要なものが多かった。これに対し、糸状菌においてエンドサイトーシスが存在すると主張する報告の方が大勢を占めていた。その理由としては、多くの糸状菌において FM4-64 が細胞内に取り込まれ (Fischer-Parton *et al.*, 2000; Torralba and Heath, 2002; Wedlich-Söldner *et al.*, 2000)、その取り込みの過程は ATP、低温、アクチン依存性といった出芽酵母における FM4-64 のエンドサイトーシスの特徴を有していた (Fischer-Parton *et al.*, 2000; Vida and Emr, 1995)。また、*N. crassa* においてはそのゲノム上に、出芽酵母においてエンドサイトーシスで働くタンパク質をコードする 29 遺伝子のホモログが、高い相同性を有して存在することが示されていた (Read and

Kalkman, 2003)。さらに、植物の花粉管といった糸状菌と同様に先端生長をする細胞においてもエンドサイトーシスが存在することや (Camacho and Malho, 2003)、真核生物における細胞膜のリサイクリングやシグナル伝達物質の取り込みといったエンドサイトーシスの生理学的機能を考慮すると、当然糸状菌にもエンドサイトーシスは存在すると考えられていた。

***Aspergillus* 属糸状菌を用いたエンドサイトーシスの最近の研究**

こうした研究の流れの中で近年になり、糸状菌にエンドサイトーシスが存在するかどうかに関して、*Aspergillus* 属糸状菌を用いた研究によりほぼ決着が見られるようになった。*Aspergillus nidulans* においては、FM4-64 を用いて詳細なエンドサイトーシスに関する細胞生物学的解析がなされ、これにより非選択的なエンドサイトーシスの解析手法が構築された (Peñalva, 2005)。一方、私は *Aspergillus oryzae* において、染色試薬を用いた手法に頼らない、細胞膜タンパク質であるプリントランスポーターAoUapC (uric acid-xanthine permease) の細胞膜からの取り込みに着目し、これと EGFP (enhanced green fluorescent protein) との融合タンパク質を用いることによって、培地の置換によりエンドサイトーシス経路を可視化する系の構築を行った (Higuchi *et al.*, 2006)。これにより、選択的なエンドサイトーシスを解析する手法が構築された。AoUapC-EGFP は、糸状菌のエンドサイトーシス研究の指標として有用であるが、エンドサイトーシス誘導前から液胞に蛍光が観察されるため、細胞膜での取り込みの段階の解析には利用できるが、細胞内に取り込まれた後の解析には不向きである。その点 FM4-64 は取り込まれていく過程を可視化できるという利点があるものの、小胞体やミトコンドリアといったエンドサイトーシス経路以外のオルガネラも染色してしまうため (Peñalva, 2005)、純粋にエンドサイトーシス経路の解析を行うには欠点がある。そこで現状では、糸状菌でのエンドサイトーシスの解析には状況に応じて AoUapC-EGFP と FM4-64 両方を用いる必要性がある (Fig. 0-4)。

上記の *A. nidulans* および *A. oryzae* の研究では、異なるエンドサイトーシスマーカーを用いてその取り込み過程を詳細に解析した点も重要であるが、これまでの研究との決定的な違いは、エンドサイトーシス誘導後に見られるエンドソームに関する解析であった。糸状菌は出芽酵母とは異なり、細長い細胞形態をとる。エンドソームは、その細長い空間を数 μm /秒というスピードで動き回っていることが明らかになった。

こうしたエンドソームの動態解析は、近年における生細胞顕微鏡観察技術の発達により可能になった。

さらに *A. nidulans* では、エンドサイトーシス関連因子である *S. cerevisiae* Abp1p、End4p/Sla2p、Sac6p にそれぞれ対応するホモログ AbpA、SlaB、FimA の生細胞観察が行われ、それにより糸状菌におけるエンドサイトーシスが菌糸先端部において最も活発に行われていることが示唆された (Araujo-Bazán *et al.*, 2008; Taheri-Talesh *et al.*, 2008; Upadhyay and Shaw, 2008)。このようにここ数年では、糸状菌のエンドサイトーシスに関する新たな知見が次々に明らかになり、エンドサイトーシスの研究が活発となってきている。

麹菌 *Aspergillus oryzae*

本研究の解析対象である麹菌 *A. oryzae* は、古くから日本において酒、味噌、醤油といった醸造産業に利用されてきた有用な微生物であり、そうした経緯から 2006 年 10 月、日本醸造学会大会において国菌に認定された。*A. oryzae* は非常に高い分泌能力を有し、アミラーゼ (amylase) などの有用酵素を菌体外に大量に分泌する。また、安全性の高い菌として GRAS (Generally Regarded As Safe) に認められている。しかし、有性世代が確認されておらず、古典的な遺伝学的研究手法を用いることができない、多核の多細胞生物であるなどといった研究材料としては扱いにくい性質を有するため、長い間その研究は応用研究にとどまり、本格的な基礎研究は 10 年程前まではなされてこなかった。近年、ゲノム解読が完了したことにより、その情報を利用した逆遺伝学による研究が容易に行えるようになった (Machida *et al.*, 2005)。さらに、Gateway システムを用いた形質転換用プラスミドの迅速な構築法といった分子生物学的手法が確立された (Mabashi *et al.*, 2006)。こうしたことから、同様にゲノム解読がなされた *N. crassa* や *A. nidulans* といった他の糸状菌におけるモデル生物と比較しても、研究を行う上での扱いやすさという点で全く遜色の無い研究対象となってきた。実際に、*A. oryzae* ではこれまでに EGFP を用いた細胞内オルガネラの解析や (Maruyama *et al.*, 2006; Ohneda *et al.*, 2002; Shoji *et al.*, 2006) オルガネラマーカートンパク質の確立がなされている (Kuratsu *et al.*, 2007)。

序-2 目的

エンドサイトーシスの機構は、動物細胞や出芽酵母 *S. cerevisiae* において解析が進んでいたが、糸状菌においてはその機構はもとより、その存在すら近年まで明らかとはなっていなかった (Mukherjee *et al.*, 1997; Munn, 2000; Shaw *et al.*, 2001)。 *A. oryzae* ゲノムデータベース (http://www.bio.nite.go.jp/dogan/MicroTop?GENOME_ID=ao) を用いた解析から、 *S. cerevisiae* においてエンドサイトーシスで機能するタンパク質をコードする遺伝子の *A. oryzae* におけるホモログは、高い相同性を持って保存されていることが明らかとなっている (Table 0)。しかし、そうした個々の遺伝子の解析はこれまでほとんどなされておらず、 *A. oryzae* を含めた糸状菌におけるエンドサイトーシスの機構や役割については現段階ではまだほとんど分かっていない。菌糸先端においては、先端生長が進むに従って細胞極性を再構築する必要があると考えられるため、細胞壁合成酵素などをリサイクリングするために恒常的なエンドサイトーシスが起きている可能性がある。細胞極性の再構築に関する研究において、細胞極性が容易に観察できる糸状菌は研究対象として優れている。さらに、ダイナミックな分泌を行う *A. oryzae* におけるエンドサイトーシスの解析は、その細胞内輸送経路の一端を解明し理解することにもつながる。

近年、糸状菌におけるエンドサイトーシスの研究は、 *A. nidulans* によって主導されているものの、そうした解析では、エンドサイトーシス関連因子の局在解析にとどまり、生理学的解析にまではまだ踏み込まれていない。そこで本研究では、産業上非常に有用であり、また細胞内輸送経路の基礎研究の対象としても魅力的な麹菌 *A. oryzae* を用いて、糸状菌におけるエンドサイトーシスの機構およびその生理学的意義の解析を行った。さらには出芽酵母のホモログ解析から脱却し、糸状菌でよりオリジナルな解析を行うためのスクリーニング系を構築し、エンドサイトーシスの分子メカニズムに新たな知見をもたらすことを目的とした。

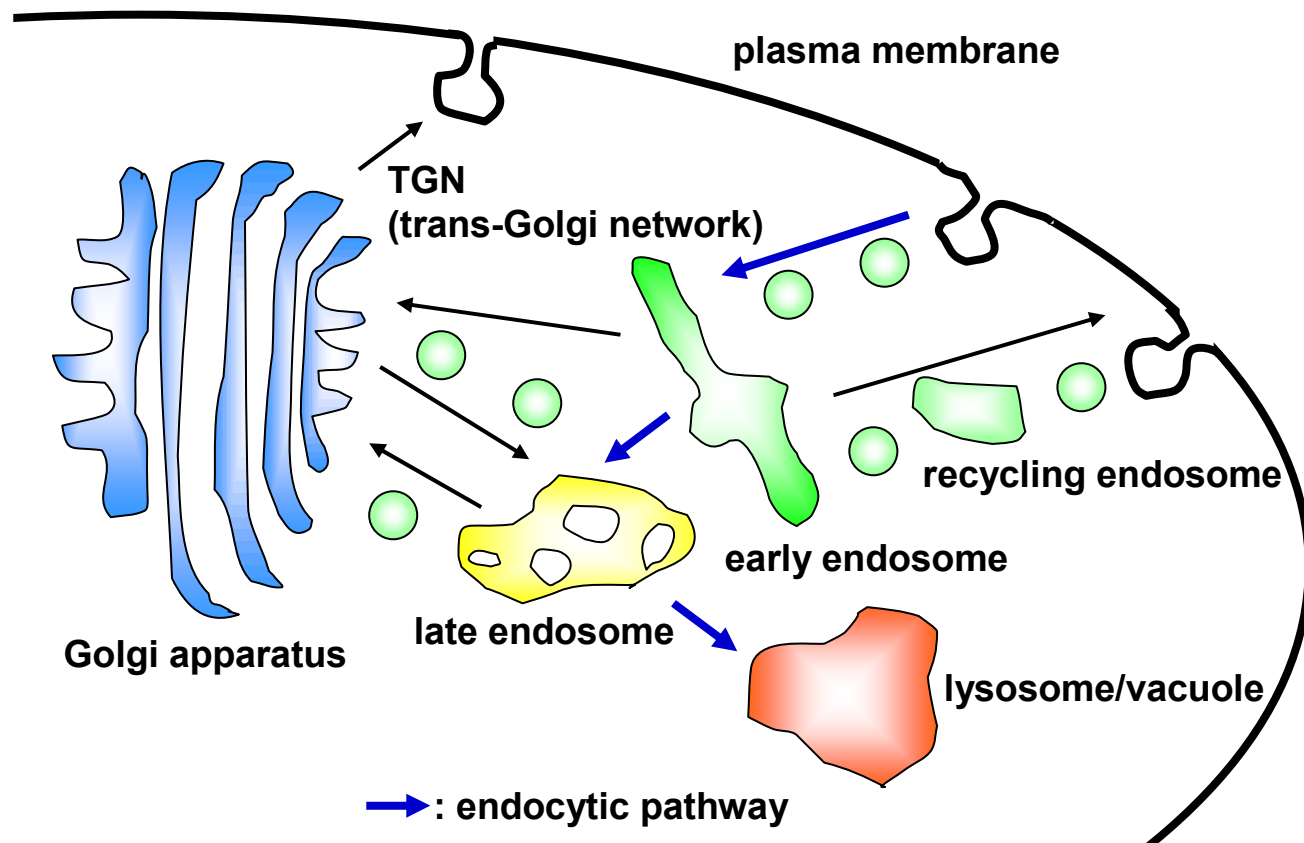


Fig. 0-1 ポストゴルジネットワーク

真核生物は、オルガネラ間での物質輸送の手段として細胞内小胞輸送系を発達させている。ゴルジ体以降の分泌およびエンドサイトーシス経路は、ポストゴルジネットワークとして輸送網を形成している。細胞膜タンパク質や細胞外の物質は、エンドサイトーシスにより、細胞膜の陥入によって生じる小胞中に取り込まれて細胞内へ送られ、初期エンドソームへと至る。この後、分解されるべき物質は後期エンドソームからリソソーム/液胞へと運ばれ、リサイクリングされるべき物質は直接、またはゴルジ体を経て間接的に細胞膜へと再輸送される。エンドサイトーシス経路を青矢印で示した。

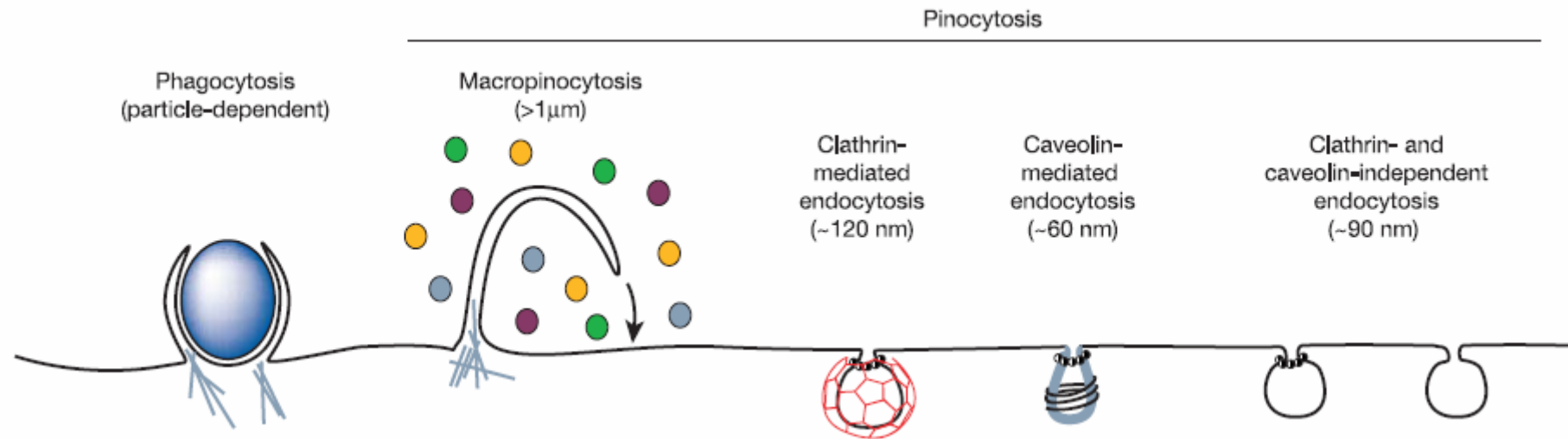


Fig. 0-2 エンドサイトーシスのモード

Conner SD, Schmid SL (2003) *Nature* **422**: 37-44.

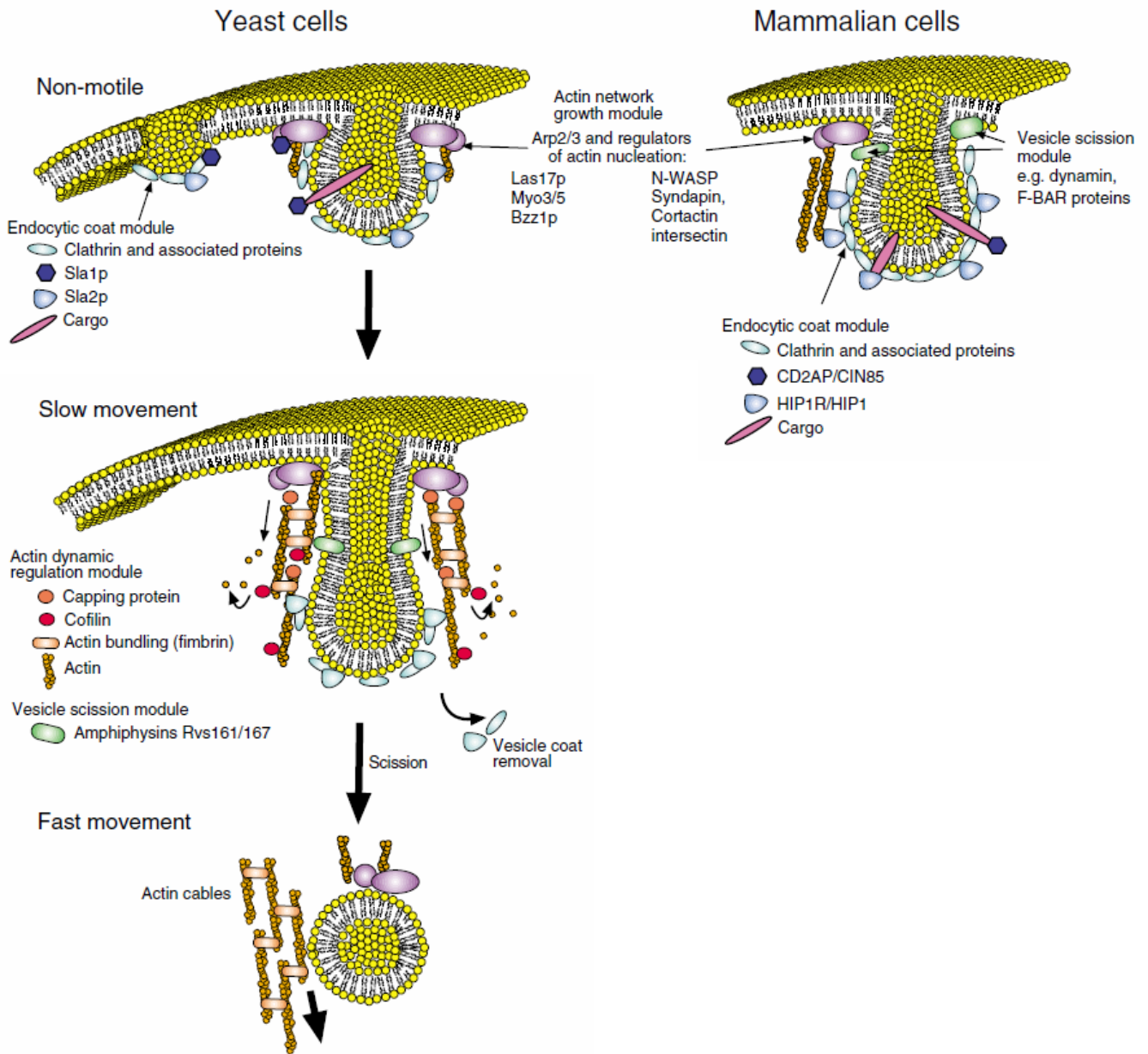


Fig. 0-3 エンドサイトーシスにおけるアクチンの役割に関するモデル図

Smythe E, Ayscough KR (2006) *J Cell Sci* 119: 4589-4598.

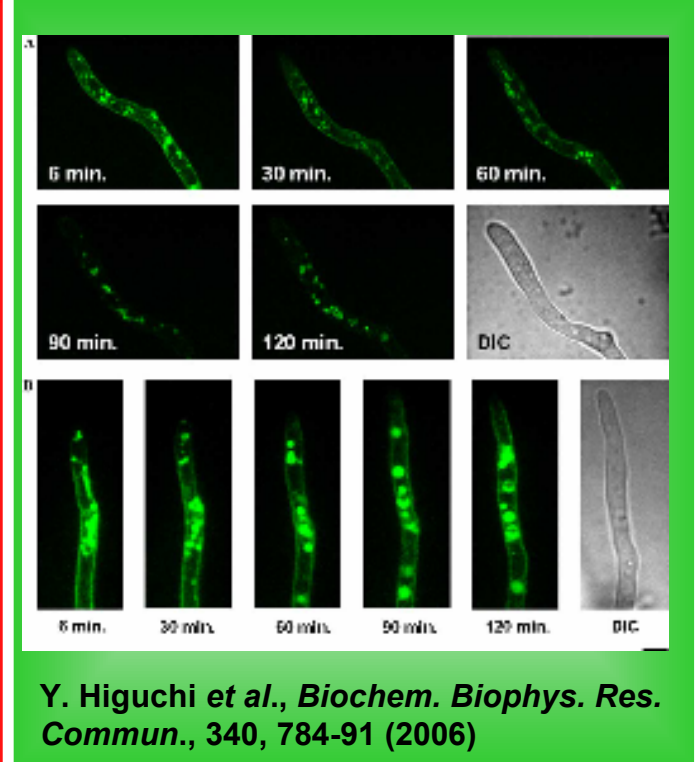
A**FM4-64****B****AoUapC-EGFP**

Fig. 0-4 *Aspergillus*属糸状菌におけるエンドサイトーシスの解析

*Aspergillus nidulans*における、FM4-64を用いた詳細なエンドサイトーシスに関する細胞生物学的解析 (A) および、*Aspergillus oryzae*における、細胞膜タンパク質であるプリンランスポーターAoUapC (uric acid-xanthine permease) とEGFP (enhanced green fluorescent protein) との融合タンパク質を用いたエンドサイトーシス経路の可視化 (B)。AoUapC-EGFPは、糸状菌のエンドサイトーシス研究の指標として有用であるが、エンドサイトーシス誘導前から液胞に蛍光が観察されるため、細胞膜での取り込みの段階の解析には有用であるが、細胞内に取り込まれた後の解析には不向きである。その点FM4-64は取り込まれていく過程を可視化できるという利点があるものの、小胞体やミトコンドリアといったエンドサイトーシス経路以外のオルガネラも染色してしまうため、純粋にエンドサイトーシス経路の解析を行うには欠点がある。そのため、糸状菌でのエンドサイトーシスの解析には状況に応じてAoUapC-EGFPとFM4-64両方を用いる必要がある。

Table 0 *A. oryzae*におけるエンドサイトーシス関連遺伝子

<i>S. cerevisiae</i> protein	Function	<i>A. oryzae</i> gene ID	e-value
Abp1p	actin-binding protein	AO090010000777	6e ⁻¹²
Act1p/End7p	actin	AO090124000010	0
Arp2p	actin-related protein	AO090012000548	e ⁻¹⁶³
Arp3p	actin-related protein	AO090026000672	e ⁻¹⁶⁶
Ark1p	actin-regulating kinase	AO090120000083	8e ⁻⁹⁰
Chc1p	clathrin heavy chain	AO090023000802	0
Clc1p	clathrin light chain	AO090003001230	2e ⁻¹⁸
Dnm1p	dynammin-like	AO090010000776	0
End3p	Eps15-like	AO090012000592	2e ⁻³⁷
End4p/Sla2p	Hip1/Hip1R-like	AO090020000087	e ⁻⁷⁸
Ent1p	epsin-like	AO090003000369	5e ⁻³⁹
Ent2p	epsin-like	AO090003000369	2e ⁻³⁴
Inp51p	synaptojanin-like	AO090673000007	e ⁻¹³⁰
Inp52p	synaptojanin-like	AO090673000007	e ⁻¹⁷⁴
Inp53p	synaptojanin-like	AO090673000007	0
Las17p	WASP-like	AO090120000140	2e ⁻³⁹
Lsp1p	primary component of eisosomes	AO090005001548	2e ⁻⁹²
		AO090003000094	5e ⁻³⁰
Myo3p	Type I myosin	AO090005000576	0
		AO090009000707	e ⁻¹¹⁴
		AO090020000430	e ⁻¹⁰²
Myo5p	Type I myosin	AO090005000576	0
		AO090009000707	e ⁻¹¹⁸
		AO090020000430	e ⁻¹⁰⁰
Pan1p	Eps15-like	AO090026000829	9e ⁻⁷⁷
Pil1p	primary component of eisosomes	AO090005001548	e ⁻¹¹³
		AO090003000094	2e ⁻³⁵
Prk1p	protein kinase	AO090120000083	5e ⁻⁹²
Rvs161/End6p	endophilin-like	AO090009000668	2e ⁻⁷⁸
Rvs167p	amphiphysin-like	AO090020000620	4e ⁻⁸⁷
Sac6p	fimblin	AO090011000951	0
Sla1p	actin binding protein	AO090023000332	e ⁻⁴⁵
Sur7p	component of eisosomes	AO090011000512	6e ⁻²⁴
Ypt51p/Vps21p	Rab5-like	AO090003000619	2e ⁻⁵²
Ypt52p	Rab5-like	AO090023000765	3e ⁻⁴³
Ypt53p	Rab5-like	AO090003000619	e ⁻⁴³

第1章 麹菌 *Aoend4* 条件発現株を用いたエンドサイトーシスに関する解析

序

糸状菌では、近年までエンドサイトーシスはその存在が明確にされていなかったため、エンドサイトーシスに関する解析はあまりなされておらず、糸状菌におけるエンドサイトーシスに関する知見はほとんど無かった (Read and Kalkman, 2003)。2005年、Peñalva は、*Aspergillus nidulans* においてエンドサイトーシス経路の染色試薬として FM4-64 を用いた生細胞観察の実験系を構築した (Peñalva, 2005)。それにより、糸状菌におけるエンドサイトーシスの細胞生物学的な解析が本格的に始まった。ほぼ時を同じくして、私は *Aspergillus oryzae* において、細胞膜のプリントランスポーターである AoUapC と EGFP の融合タンパク質をレポーターにして、エンドサイトーシス経路の可視化を行った (Higuchi *et al.*, 2006)。これにより、*A. oryzae* では AoUapC-EGFP 発現株においてエンドサイトーシスの解析が行えるようになり、また、必要に応じて、FM4-64 を用いた解析も行えるようになった。さらに最近になると、*A. nidulans* において、エンドサイトーシスに関連すると考えられる因子、AbpA、SlaB、FimA の生細胞観察が行われ、それにより、糸状菌におけるエンドサイトーシスが菌糸先端部において最も活発に行われていることが示唆された (Araujo-Bazán *et al.*, 2008; Taheri-Talesh *et al.*, 2008; Upadhyay and Shaw, 2008)。しかし、それらの解析では、エンドサイトーシス関連因子の局在解析にとどまり、糸状菌におけるエンドサイトーシスの詳細な生理学的解析はこれまでのところほとんどなされていない。

本研究では、糸状菌におけるエンドサイトーシスの機構およびその生理学的意義の解析を目的とした。そこでまず、糸状菌に比べてエンドサイトーシスの解析が進んでいる出芽酵母のエンドサイトーシス変異株の知見を利用して、麹菌 *A. oryzae* においてエンドサイトーシス欠損株を作製し、それを用いた表現型解析を行った。

結果

1-1 *Aoend4* 条件発現株の作製

出芽酵母 *S. cerevisiae* の *END4/SLA2* (synthetic lethal with *ABP1*) 遺伝子はエンドサイトーシス関連遺伝子の中で最も解析の進んでいるものの一つである (Baggett *et al.*, 2003; Gourlay *et al.*, 2003; Newpher and Lemmon, 2006; Raths *et al.*, 1993; Sun *et al.*, 2005; Wesp *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1999)。 *END4* 遺伝子は、 α -ファクターレセプターである Ste2p および液相エンドサイトーシスのマーカーである Lucifer Yellow のエンドサイトーシスによる取り込みに欠損を持つ変異株から同定された。このことから、End4p/Sla2p は、レセプター依存性エンドサイトーシスと液相エンドサイトーシス両者において必須なタンパク質であり、またアクチン細胞骨格の構築および極性化に必要であることが報告されている (Raths *et al.*, 1993)。

そこで、*A. oryzae* における *END4/SLA2* 遺伝子のホモログを DOGAN の *A. oryzae* ゲノムデータベース (http://www.bio.nite.go.jp/dogan/MicroTop?GENOME_ID=ao) から一つ見出し、これを *Aoend4* としてクローニングを行い、さらに 5'-RACE により転写開始点を決定し、その情報を基に翻訳開始点を推定した (Fig. 1-1)。その結果、AoEnd4 は 1,043 アミノ酸残基からなり、CLUSTALW (<http://align.genome.jp/>) を用いた解析により、アミノ酸配列レベルで Sla2p/End4p とは 42% の相同性を示すことが明らかとなった (Fig. 1-2)。また、Pfam (<http://pfam.janelia.org/>) によるモチーフ検索により、AoEnd4 は N 末端に PIP₂ (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate) との結合に関わるとされる ENTH (Epsin N-terminus homology) ドメインと ANTH (AP180 N-terminus homology) ドメイン、C 末端にアクチンとの結合に関わる I/LWEQ ドメインを有することが分かった (Fig. 1-3)。また、コイルドコイル (coiled-coil) ドメインを 2 箇所有し、プロリンリッチドメイン、グルタミンリッチドメインも有していた。検索結果において、AoEnd4 で見られたプロリンリッチドメイン以外のモチーフは End4p/Sla2p にも保存されており、AoEnd4 が End4p/Sla2p と機能的に類似していることが示唆された。

S. cerevisiae *END4/SLA2* は生育に必須の遺伝子ではなく、その破壊株は FM4-64 や Lucifer Yellow などのエンドサイトーシスのマーカーや Ste2p などのフェロモンレセプターの細胞内への取り込みに欠損を示すことが知られている。そこでまず、*A. oryzae* におけるエンドサイトーシス欠損株として *Aoend4* 破壊株の作製を試みた。しかし

PCRによる解析の結果、*Aoend4*のヘテロカリオン体が3株取得されたものの、ホモカリオン体は取得できず、*Aoend4*は生育に必須の遺伝子であると考えられた (data not shown)。そこで、内在性の*Aoend4*を*thiA*プロモーター (*PthiA*) 下で条件発現させるTE4株の作製を行った。*Aoend4*の上流1.5 kb、*adeA*マーカー、*PthiA*、*Aoend4* ORFの開始コドンから1.7 kbを有するDNA発現カセットをNSR13株に形質転換し、サザン解析によって2株の*Aoend4*条件発現株 (TE4-1、TE4-2)の取得を確認した (Fig. 1-4)。*PthiA*はチアミン非存在下において下流の遺伝子を発現させ、チアミン存在下では下流の遺伝子の発現を抑制する。また*PthiA*はチアミンの濃度によって下流の遺伝子の発現量を変化させ、10 μ Mの濃度で下流の遺伝子をほぼ完全に抑制すると報告されている (Shoji *et al.*, 2005)。本研究では以降の実験において、内在性の*Aoend4*の発現をほぼ完全に抑制させることを目的に、培養の際には最初からチアミンを添加し、その終濃度を10 μ Mで統一した。

1-2 *Aoend4*条件発現株における生育比較

TE4株ではチアミン存在下のプレート培地において著しい生育阻害が見られた (Fig. 1-4A)。さらに、MM±チアミン培地 (pH 5.5) を基準に、+1 M NaCl (塩ストレス)、+1.2 M sorbitol (浸透圧ストレス) 培地で培養を行った結果、コントロール株に比べ一層生育が阻害された (Fig. 1-5A)。以上から、*Aoend4*の発現抑制条件下ではストレス感受性となることが示された。液体培養においてもプレート培養同様の生育阻害が観察された (Fig. 1-5B)。さらに、顕微鏡下で菌糸形態を観察したところ、*Aoend4*の発現抑制条件下では特に菌糸先端部において異常な形態が観察された (Fig. 1-6A)。それらはコントロール株と比べて菌糸の幅が太くなっており、*Aoend4*の発現抑制によって菌糸の形態に異常をきたしていることが示唆された (Fig. 1-6B)。

以上の結果から、チアミン非存在下においてTE4-1株、TE4-2株の両*Aoend4*条件発現株はコントロール株同様の表現型を示すことが明らかとなった。さらに、TE4-1株、TE4-2株の両*Aoend4*条件発現株間で表現型に違いが見られなかったため、以降の実験において親株として使用する際はTE4-1株を使用し、チアミン非存在下の条件をコントロール株同様の表現型として解析した。

1-3 *Aoend4* 条件発現株におけるエンドサイトーシスの解析

TE4-1 株を親株として、細胞膜タンパク質であるプリントランスポーターと EGFP との融合タンパク質である AoUapC-EGFP を発現するコンストラクトのプラスミドを形質転換することで TEUE3 株を作製した。その株を用いて、*Aoend4* の発現抑制がエンドサイトーシスに与える効果を検討するため、AoUapC-EGFP のエンドサイトーシスの誘導と同時に FM4-64 による共染色を行った (Fig. 1-7)。AoUapC-EGFP のエンドサイトーシスは、最初 AoUapC の基質となるウラシルを含む培地 (M-mem) で培養した状態から、アンモニウム塩を含んだ培地 (M-int) にシフトすることで誘導される (Higuchi *et al.*, 2006)。これは、N 源として資化されやすいアンモニウム塩を培地に添加することで、AoUapC が細胞膜から必要無くなりエンドサイトーシスによって取り込まれるからであると説明できる。*Aoend4* の発現条件下では、FM4-64 は添加 5 分後には既に細胞内に取り込まれている様子が観察された (Fig. 1-7)。また、AoUapC-EGFP は時間を追うごとに細胞膜から取り込まれ、エンドサイトーシスの誘導 90 分後には細胞膜からほぼ完全に細胞内に取り込まれている様子が観察された (Fig. 1-7)。それに対し、*Aoend4* の発現抑制条件下では、AoUapC-EGFP と FM4-64 は共に細胞内に取り込まれず、細胞膜上の AoUapC-EGFP でラベルされた異常陥入構造に FM4-64 が蓄積している様子が観察された (Fig. 1-7)。このことから *Aoend4* の発現抑制条件下では、エンドサイトーシスによる AoUapC-EGFP および FM4-64 の細胞膜からの取り込みに欠損を持つことが示された。

S. cerevisiae Abp1p (actin binding protein) は細胞膜上でエンドサイトーシスの起こっている部位とされる表層アクチンパッチ (cortical actin patch) に局在する (Newpher *et al.*, 2005; Newpher and Lemmon, 2006; Stefan *et al.*, 2005)。そこで、エンドサイトーシスの取り込み部位に関する解析を行うために、*S. cerevisiae* ABP1 の *A. oryzae* におけるホモログである *Aoabp1* をクローニングした (Fig. 1-8)。AoAbp1 は 788 アミノ酸残基から構成され、アミノ酸配列レベルで Abp1p と 23%の相同性を示した (Fig. 1-9)。また、AoAbp1 は N 末端に F-アクチンの分解や F-アクチンとの結合に関与する Cofilin/ADF (actin depolymerizing factor) ドメイン、C 末端に他のエンドサイトーシス関連因子との結合に関与すると考えられる SH3 (Src homology-3) ドメインを 2 つ有し、また SH3 ドメインと結合するプロリンリッチドメインも有していることが明らかとなった

(Fig. 1-10A)。Abp1p は Cofilin/ADF ドメインを有するものの、SH3 ドメインは1つしか持たず、プロリンリッチドメインも存在しないことから、AoAbp1 と機能的に差がある可能性が考えられた。

AoAbp1 の細胞内局在を解析するため、niaD300 株を親株に *Aoabp1-mdsred* 融合遺伝子を *amyB* プロモーター (*PamyB*) 下で発現するプラスミドを形質転換した AAD1 株を作製した。コントロール株として、niaD300 株に *niaD* マーカーを導入した niaD300N-1 株を用いた。AoAbp1 は Abp1p 同様にアクチンパッチに局在すると予想されるため、AoAbp1-mDsRed とアクチンが共局在するかを間接蛍光抗体法により確認した (Fig. 1-10B)。間接蛍光抗体法には、1次抗体に抗アクチン抗体を、2次抗体には FITC (fluorescein isothiocyanate) ラベルした抗 IgG 抗体を用いた。その結果、アクチンは特に菌糸先端の細胞膜上でパッチ状に集積して観察され、アクチンと AoAbp1-mDsRed の局在はほぼ一致して観察された。このことから AoAbp1-mDsRed はアクチンパッチに局在していることが示された。コントロール株においてもアクチンの局在は同様に観察されたことから、*PamyB* 下で *Aoabp1-mdsred* を *niaD* 遺伝子座で発現させたことによるアクチンの局在への影響はほとんど無いと考えられた。

次に、*Aoend4* 発現抑制条件下でのアクチンパッチの局在を解析するため、*Aoend4* 条件発現株に *niaD* マーカーを持つ *Aoabp1-mdsred* 発現用プラスミドを導入した TEUA1 株を作製した。*Aoend4* 発現条件下では AoAbp1-mDsRed は菌糸最先端部にパッチ状に局在していた。一方、*Aoend4* 発現抑制条件下では、AoAbp1-mDsRed は細胞膜近傍にパッチ状に数多く存在するものの、その局在は菌糸最先端部に限らず、また AoUapC-EGFP でラベルされた異常陥入構造には観察されなかった (Fig. 1-11)。以上から、AoAbp1-mDsRed で見られるアクチンパッチの局在は AoEnd4 依存的であるもののアクチンパッチの形成過程には AoEnd4 が必要ではないことが明らかになった。また、*S. cerevisiae* の *END4/SLA2* 破壊株では、アクチンコメットテール (comet tail) が見られ、アクチンの量が増加していることから、End4p/SlA2p はアクチン重合を負に制御していることが示唆されており (Holzman *et al.*, 1993; Kaksonen *et al.*, 2003)、*Aoend4* 発現抑制条件下でも同様の観察結果が得られた。さらに、AoAbp1 は異常陥入構造には観察されなかったことから、その部位には AoAbp1 をリクルートするための因子が存在していないことが示唆された。

細胞壁合成酵素などの先端生長に必要な因子は、エンドサイトーシスによって先端にリサイクリングされていると考えられてきたが、その直接的な証拠はほとんど示されていない。エンドソームに局在し、分泌に関与する v-SNARE (vesicle-soluble NSF attachment protein receptor) である AoSnc1 は、菌糸先端部においてエンドサイトーシスによってリサイクリングされていると予想される (Kuratsu *et al.*, 2007)。そこで、*Aoend4* 条件発現株を親株に、*PamyB* 下で *egfp-Aosnc1* を発現し、*niaD* マーカーを持つプラスミドを形質転換した TESn1 株を作製した。TESn1 株において *Aoend4* 発現条件下では、EGFP-AoSnc1 は FM4-64 によって共染色され、主に菌糸先端部の細胞膜および小胞の集合体である Spitzenkörper に局在していた (Fig. 1-12A)。この局在は、EGFP-AoSnc1 が菌糸先端部においてエンドサイトーシスによってリサイクリングされているからであると示唆された。一方、*Aoend4* 発現抑制条件下では、EGFP-AoSnc1 は菌糸先端部に限らず細胞膜全体に拡散して見られた。これは、エンドサイトーシス欠損により、菌糸先端部へ EGFP-AoSnc1 がリサイクリングされないためと考えられた (Fig. 1-12A)。以上のことから、EGFP-AoSnc1 は菌糸先端部においてエンドサイトーシスによってリサイクリングされていることが示唆された。

さらに、FRAP (fluorescent recovery after photobleaching) を用いて、*Aoend4* 発現抑制条件下での EGFP-AoSnc1 の分泌に関する解析を行った (Fig. 1-12B)。*Aoend4* 発現条件下では、菌糸先端部において FRAP を行うと、約 1 分後には EGFP-AoSnc1 の蛍光の回復が見られた。これは、EGFP-AoSnc1 がエンドサイトーシスによってリサイクリングされて菌糸先端部に蛍光が回復したことと、新規に分泌された両方の可能性が考えられた。これに対し、*Aoend4* 発現抑制条件下ではエンドサイトーシスが起こらないため、菌糸先端部での FRAP によって EGFP-AoSnc1 の新規の分泌のみを解析できる。FRAP 解析の結果、菌糸先端部への EGFP-AoSnc1 の蛍光の回復は 60 分後でもほとんど見られず、新規の分泌に異常をきたしていることが示唆された。以上から、菌糸先端への正常な分泌にはエンドサイトーシスが必要であることが示唆された。

1-4 *Aoend4* 条件発現株における細胞壁に関する解析

出芽酵母 *S. cerevisiae* および分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* において、 Δ END4/SLA2 株では細胞壁が厚くなることが電子顕微鏡観察によって報告されている

(Ge *et al.*, 2005; Gourlay *et al.*, 2003)。そこで、*Aoend4* 発現抑制条件下で Calcofluor White によるキチン染色により細胞壁を蛍光顕微鏡で観察した (Fig. 1-13A)。*Aoend4* 発現抑制条件下では、AoUapC-EGFP により観察される異常陥入構造と Calcofluor White 染色により観察される細胞壁の蓄積部位が共局在して観察され、*Aoend4* 発現条件下ではそれら異常陥入構造および細胞壁の蓄積は観察されなかった (Fig. 1-13A)。

さらに詳細に異常陥入構造を解析するために、電子顕微鏡観察を行った (Fig. 1-13B)。*Aoend4* 発現条件下では、細胞壁はほぼ均一な厚さで観察された。一方、*Aoend4* 発現抑制条件下では、蛍光顕微鏡で観察された異常陥入構造が見られ、その部位に細胞壁が蓄積している様子が観察された。また、異常陥入構造には細胞壁以外の成分も観察された。以上から *Aoend4* 発現抑制条件下では、細胞壁の制御機構に異常をきたしていることが示唆された。

そこで、細胞壁合成酵素遺伝子群のリアルタイム RT-PCR により発現解析を行った。通常の培養条件において比較的発現量の高い 5 種類のキチン合成酵素 (*chsA*、*chsB*、*chsC*、*chsY*、*chsZ*) および 1,3- β -グルカン合成酵素 *Aofks1* を解析対象に選んだ (Kimura *et al.*, 2008)。これら 6 種の細胞壁合成酵素遺伝子群は全て、*Aoend4* 発現条件に比べて *Aoend4* 発現抑制条件下において高い発現レベルを示した (Fig. 1-13C)。このことから、エンドサイトーシス欠損により細胞壁合成酵素群が菌糸先端部へリサイクリングされず、発現が上昇している可能性が考えられた。

1-5 *Aoend4* 条件発現株におけるステロールリッチ領域の解析

糸状菌および酵母における菌糸様生長の際に、菌糸先端にはステロールリッチな領域が観察される (Fischer *et al.*, 2008)。ステロールリッチな領域はエンドサイトーシスとの関わりも報告されていることから、*Aoend4* 発現抑制条件下において、Filipin III 染色によりステロールリッチ領域の解析を行った (Fig. 1-14)。*Aoend4* 発現条件下では、ステロールリッチ領域が主に菌糸先端部に見られた。一方、*Aoend4* 発現抑制条件下では、ステロールリッチ領域は AoUapC-EGFP で観察される異常陥入構造に蓄積している様子が観察された。ステロールリッチ領域は、スフィンゴ脂質といった特殊な脂質が含まれる膜構造になっており、その領域に特徴的な膜タンパク質の存在が示唆されることから、異常陥入構造には本来エンドサイトーシスによって取り込まれるべきタンパク質がステロールリッチな膜ドメインにトラップされているのかもしれない。

1-6 *Aoend4* 条件発現株の *Aoend4-egfp* による相補実験

Aoend4 発現抑制条件下でこれまで観察された表現型が、実際に *Aoend4* の発現抑制によって引き起こされたものであるかを解析するため、*Aoend4* の相補実験を行った。*S. cerevisiae* では End4p/Sla2p-GFP が機能的であることが報告されている (Newpher and Lemmon, 2006; Sun *et al.*, 2005)。そこで、*Aoend4* 条件発現株を親株として、PamyB 下で *Aoend4-egfp* を発現する *niaD* マーカーを持ったプラスミドを形質転換した株である TEAEN1 株を作製した。また、コントロールとして *niaD* マーカーを *Aoend4* 条件発現株に導入した TEN1 株を作製した。それらの株を CDM±チアミンプレート上で生育比較を行った (Fig. 1-15A)。チアミンを添加した、内在性の *Aoend4* の発現抑制条件下では、TEN1 株は親株の TE4-1 株同様の生育阻害を示したのに対し、*Aoend4-egfp* を導入した TEAEN1 株では生育が回復した。このことから AoEnd4-EGFP が機能的であることが示された。

続いて、TEAEN1 株を用いて、AoEnd4-EGFP の局在観察を行った。内在性の *Aoend4* が発現する条件下では AoEnd4-EGFP の特定の部位での局在は観察されなかった。一方、内在性の *Aoend4* の発現を抑制すると、AoEnd4-EGFP は AoAbp1-mDsRed と同様に、菌糸先端部の最先端以外の細胞膜近傍に主にパッチ状の構造として局在している様子が観察された (Fig. 1-15B)。内在性の *Aoend4* が発現する条件下で AoEnd4-EGFP の局在が正確な部位で観察されなかったのは、AoEnd4-EGFP と内在性の AoEnd4 とが局在部位や相互作用する因子を競合したためと考えられた。また、チアミン培地においてともに、AoEnd4-EGFP の発現が抗 GFP 抗体を用いたウェスタン解析により確認された (Fig. 1-15C)。さらに、内在性の *Aoend4* の発現抑制条件下では、*Aoend4-egfp* 発現株において FM4-64 のエンドサイトーシス能が回復していた (Fig. 1-15D)。以上から、*Aoend4* 条件発現株において、*Aoend4* 発現抑制条件下で見られた表現型は、*Aoend4* の発現抑制それ自体によって引き起こされたものであると考えられた。

次に、TEAEN1 株に AoAbp1-mDsRed 発現プラスミドを導入することで AoEnd4-EGFP および AoAbp1-mDsRed 共発現株を作製し、内在性の *Aoend4* の発現抑制条件下で、それらの局在を観察することで細胞内全体でのエンドサイトーシスの起きている部位に関して解析した。これまでに観察されていたように AoEnd4-EGFP と AoAbp1-mDsRed は菌糸先端部に多く局在し、それらのタンパク質が良く共局在す

ることが確認された (Fig. 1-16)。また、AoEnd4-EGFP と AoAbp1-mDsRed は細胞膜全体の所々でパッチ状に見られ、隔壁にも多く局在する様子が見られた。このことから、エンドサイトーシスは菌糸先端部以外でも少なからず起こっており、外部環境に応じた細胞膜タンパク質の取り込みなどの生理的な役割を果たしていることが示唆された。

1-7 エイソソーム様構成因子 *Aopil1* の解析

近年 *S. cerevisiae* において、エンドサイトーシスによる取り込み部位としてエイソソーム (eisosome) の存在が報告された (Walther *et al.*, 2006)。エイソソームの主要な構成因子として Pil1p が存在する。*PIL1* 破壊株では、*Aoend4* 発現抑制条件下で見られたような異常な陥入構造が観察されている。そこでまず *A. oryzae* において、Pil1p と高い相同性を示す (e value = e^{-113}) タンパク質をコードする唯一の遺伝子である *Aopil1* をクローニングした (Fig. 1-17)。AoPil1 は 347 アミノ酸残基から構成され、アミノ酸配列レベルで Pil1p と 58%の相同性を示し、さらに他のエイソソームの構成因子である Lsp1p と 58%の相同性を示した (Fig. 1-18)。Pil1p と Lsp1p はアミノ酸配列レベルで 69%の相同性を示す。モチーフ検索の結果、AoPil1、Pil1p、Lsp1p には既知の機能ドメインが見出されなかった。*Aopil1* は、*PIL1* のみならず *LSP1* のホモログとしても最も高い相同性を示した。以上から AoPil1 は、Pil1p と Lsp1p 両方の機能を有している可能性が考えられた。

次に、*Aopil1* の上流 1.5 kb、*adeA* マーカー、*Aopil1* 下流 1.5 kb を有する DNA 発現カセットを調製し、これを NSRku70-1-1 株に形質転換し、*Aopil1* 破壊株を作製した (Fig. 1-19A)。しかし、*Aopil1* 破壊株では生育阻害は見られなかった (Fig. 1-19B)。さらに、FM4-64 の取り込みに異常は見られず、*Aoend4* 発現抑制条件下で観察された異常な陥入構造も見られなかったことから、エイソソーム様の構成因子は糸状菌のエンドサイトーシスには主要な働きをしていないことが示唆された (Fig. 1-19C)。

考察

本章では、*A. oryzae* においてエンドサイトーシス欠損株の取得を目的として、まず *Aoend4* 破壊株の作製を試みた。しかし、ヘテロカリオン体が取得されたのみでホモカリオン体の取得には至らなかったことから、*Aoend4* は生育に必須の遺伝子であると推測された。*AoEnd4* はアミノ酸配列情報から *S. cerevisiae* の *End4p/Sla2p* と同様のモチーフを有し、機能的に類似していると考えられる。*End4p/Sla2p* に関しては *S. cerevisiae* のみならず *S. pombe* や二形性の酵母である *Candida albicans* においても解析が行われている (Asleson *et al.*, 2001; Castagnetti *et al.*, 2005; Ge *et al.*, 2005)。*S. pombe* では、エンドサイトーシスの解析の一端として *END4/SLA2* のホモログがクローニングされ (Iwaki *et al.*, 2004)、*C. albicans* における *END4/SLA2* のホモログは、*C. albicans* が菌糸状に生育する際に重要な *INT1* の下流で機能する因子として同定された (Asleson *et al.*, 2001)。*S. cerevisiae*、*C. albicans* においては、 Δ *END4/SLA2* 株は菌糸状の生育に欠損を示す (Asleson *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 1997)。*S. cerevisiae* や *C. albicans* では Δ *END4/SLA2* 株は酵母状では生育可能であるが、菌糸状に生長できないことを考えると、菌糸状に生長する *A. oryzae* を含む糸状菌においては *END4/SLA2* のホモログである *Aoend4* が生育に必須な遺伝子であることは上記の報告と矛盾しない結果である。実際に、*A. nidulans* における *END4/SLA2* ホモログ *slaB* は、生育に必須な遺伝子であることがヘテロカリオンレスキュー法 (heterokaryon rescue technique) により示されている (Araujo-Bazán *et al.*, 2008; Osmani *et al.*, 2006)。*Aoend4* 発現抑制条件下では、プレート生育比較において菌糸の生育に阻害が見られたが、生育が可能であったことを考えると、*PthiA* によって発現が完全には抑制されなかった *AoEnd4* がわずかにでも存在することによって生育が可能であったと考えられる。

S. cerevisiae、*S. pombe* において Δ *END4/SLA2* 株では温度感受性になり、FM4-64 や Lucifer yellow といったエンドサイトーシスによって取り込まれるマーカーが細胞内に取り込まれず、細胞壁が厚くなるといった表現型を示す (Ge *et al.*, 2005; Gourlay *et al.*, 2003; Walther *et al.*, 2006)。*S. cerevisiae*、*S. pombe* における Δ *END4/SLA2* 株で観察されるように、TE4 株において *Aoend4* の発現を抑制した条件でも FM4-64 のエンドサイトーシスに欠損を示した。さらに、プレート生育比較において、*Aoend4* 発現抑制条件下ではストレス感受性となることが示された。*C. albicans* においても Δ *END4/SLA2*

株では菌糸状の生育に異常を示し、各種ストレス条件下で生育が阻害されることが報告されており (Asleson *et al.*, 2001)、本研究ではそれらの知見と一致する結果が得られた。*A. nidulans* においては、pH シグナルは7回膜貫通タンパク質である PalH がエンドサイトーシスによって取り込まれることにより制御されていると示唆されている (Herranz *et al.*, 2005; Peñalva *et al.*, 2008)。エンドサイトーシス欠損によって pH や浸透圧ストレス感受性となるのは、細胞膜のチャネルやレセプター本来の制御機構に異常をきたすことが原因であると考えられる

Aoend4 発現抑制条件下において、AoUapC-EGFP によって可視化された異常陥入構造と FM4-64 染色によって細胞膜に蓄積した部位が一致して観察された。このことから、細胞外から取り込まれる FM4-64 は、ある特定の部位から取り込まれることが示唆された。そうした部位は最近、出芽酵母において提唱されたエイソソームである可能性が考えられた (Walther *et al.*, 2006)。エイソソームはエンドサイトーシスによる取り込み部位で、主として Pil1p を含む静的な構造体として考えられている。Pil1p の他に Lsp1p、Sur7p がエイソソームには介在し、これまでに分かっているエンドサイトーシスに関わる因子との相互作用が示唆されている。本研究では、*PIL1* の *A. oryzae* における唯一のオルソログである *Aopill* の破壊株を作製したが、期待した表現型は観察されなかった。現段階では、*A. oryzae* において出芽酵母様のエイソソームの存在に関しては否定的であり、今後さらなる解析が必要である。

Abp1p は出芽酵母において遺伝学的、生化学的手法を用いて数多くのエンドサイトーシス関連因子と相互作用することが報告されており、エンドサイトーシスの取り込み部位において中心的な役割を果たしていると考えられている。Abp1p の機能としては具体的に、アクチンパッチの形成に中心的な働きをする Arp2/3p 複合体をエンドサイトーシスの起こる部位にリクルートし活性化することが分かっている (Drubin *et al.*, 1990; Mulholland *et al.*, 1994; Olazabal and Machesky, 2001)。*A. oryzae* においてエンドサイトーシスによる取り込み部位の解析を進めるためにクローニングした AoAbp1 は、アミノ酸配列の相同性が *S. cerevisiae* の Abp1p とは 23% とそれほど高い相同性を示さなかったが、Abp1p と同じドメインを有することによりそれらの機能の類似性が示唆された。しかし、AoAbp1 は C 末端に他のエンドサイトーシス関連因子との相互作用に関わるとされる SH3 ドメインを 2 つ有し、Abp1p よりさらに SH3 ドメインを 1 つ多く有することから AoAbp1 と Abp1p の機能に差があることも考えられ、*A. oryzae*

と出芽酵母とはエンドサイトーシスの取り込み部位を中心としたエンドサイトーシスの機構に違いがある可能性も考えられる。AoAbp1と同様に、*A. nidulans*のAbpAもSH3ドメインをC末端に2つ有することが報告されているため (Araujo-Bazán *et al.*, 2008)、糸状菌におけるAbp1pホモログは糸状菌に特異的な機能を有している可能性が考えられた。そこでAbp1pによるBLASTサーチを行ったところ、糸状菌の*Aspergillus fumigatus*のAbp1pホモログは2つのSH3ドメインを有していた。しかし、出芽酵母と近縁の糸状菌である*Ashbya gossypii*のAbp1pホモログはSH3ドメインが1つであった。逆に、分裂酵母*S. pombe*や菌糸状に生育する酵母の*C. albicans*のAbp1pホモログは2つのSH3ドメインを有していた。こうしたことから、Abp1pホモログがSH3ドメインを2つ有することは糸状菌特異的とは言い切れないようである。

糸状菌において、菌糸先端が連続的に生長していくためには、先端生長に必要な因子、例えば細胞壁合成酵素などを菌糸先端に常に供給する必要がある。これらは全て新規に合成されたものが菌糸先端に送られて使用されていることも考えられるが、どの程度かはわからないものの、リサイクリングして使用されていると考えるのが自然で理に適っている。*Aoend4*発現抑制条件下では、Calcofluor White染色により、主要な細胞壁構成因子であるキチンが異常陥入構造に蓄積していることが明らかになった。さらに、電子顕微鏡観察においても異常陥入構造に細胞壁成分の蓄積が確認された。これらは、キチン合成酵素といった細胞壁合成酵素が菌糸先端にリサイクリングされず、異常陥入構造に蓄積した結果と考えられる。さらに、*Aoend4*発現抑制条件下では、細胞壁合成酵素遺伝子群の発現量が増加していた。この結果は、エンドサイトーシスによるリサイクリングの異常により、細胞壁合成酵素群が菌糸先端で不足したことに対する応答と考えられる。今回解析した、ChsY、ChsZはそれぞれ*A. nidulans* CsmA、CsmBのホモログである (Chigira *et al.*, 2002; Takeshita *et al.*, 2005; Takeshita *et al.*, 2006; Tsuizaki *et al.*, 2009)。それらは、アクチンと直接相互作用するミオシン様モータードメイン (myosin motor-like domain; MMD) を有する特徴的なキチン合成酵素である。アクチンがエンドサイトーシスにおいて重要な役割を果たしていることを考えると、MMDを有するキチン合成酵素は、MMDを介してエンドサイトーシスによるリサイクリングによって局在を制御されている可能性も考えられる。

ごく最近になり*A. nidulans*において、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がダイニン集積領域 (dynein loading zone)、もしくはエンドサイトーシス

リサイクリングコンパートメント (endocytic recycling compartment; ERC) と呼ばれる領域を通じて行われているというモデルが提唱された (Abenza *et al.*, 2009)。これらの知見と今回得られた *A. oryzae* を用いた研究結果をもとに作成したモデルを示す (Fig. 1-20)。先端生長に必要な因子は、菌糸最先端部から少し基部側の細胞膜からエンドサイトーシスされた後、小胞によって ERC へと送られ、そこから小胞の集合体である Spitzenkörper を経て、再び菌糸最先端部へと輸送される。しかし、これまでに糸状菌で解析されている菌糸先端部でのエンドサイトーシスのカーゴは v-SNARE のみであるため、今後細胞壁合成酵素等を解析することで、例えばエンドサイトーシス小胞から ERC を経由しないなどの他のリサイクリング経路が見つかる可能性もある。

A. oryzae を含む糸状菌においては、菌糸先端部で活発にエンドサイトーシスが行われていることが強く示唆された。これを可能にする、出芽酵母などには見られない、糸状菌に特別な分子機構が存在する可能性が考えられる。また、*A. oryzae* は菌糸先端から大量のタンパク質を分泌する能力を持つが、これを可能にするには、分泌小胞で機能する v-SNARE 等のリサイクリングが必要であり、こうした点から菌糸先端部の活発なエンドサイトーシスが重要であると考えられる。

総括および展望

本研究は、麴菌 *A. oryzae* におけるエンドサイトーシスの機構および生理学的意義に関して、遺伝学、分子生物学、生化学、そして細胞生物学的手法を用いて解析を行ったものである。

第1章では、麴菌 *A. oryzae* においてエンドサイトーシスの変異株を取得し、それを用いた解析を行った。その結果、麴菌 *A. oryzae* を含む糸状菌において、エンドサイトーシスは菌糸先端部で活発に行われ、菌糸の先端生長に必要な因子である v-SNARE や細胞壁合成酵素等をリサイクリングすることにおいて重要な機能を果たしていることが強く示唆された。麴菌 *A. oryzae* は、産業上非常に有用な菌種であり、アミラーゼなどの酵素を大量に菌体外に分泌する能力を持つ。このことを可能にするのが、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。これらのことから、麴菌 *A. oryzae* が糸状菌における先端生長およびエンドサイトーシスのメカニズムの研究において今後一層魅力的な生物になると考えられる。

糸状菌においてエンドサイトーシスは、エキソサイトーシスおよび先端生長と相互に密接な関係を有することを考えると、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。そこで第2章では、エンドサイトーシス関連因子である AoAbp1 を bait にした YTH 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。その結果、4つの遺伝子を見出し、これらを *aipA~D* (AoAbp1 interacting protein) と命名した。また、本研究により初めて *A. oryzae* において YTH スクリーニング系が構築され、研究対象としての bait をうまく選定することで、新規因子を同定することが可能であることを示した。本研究で作製した cDNA ライブラリー以外のライブラリーを作製し使用することやスクリーニング方法を変更することで、新たな因子の発見も可能と思われる。

第3章では、AoAbp1 を bait にした YTH スクリーニングによって見出された AAA ATPase 様タンパク質である AipA の解析を行った。その結果、AipA は AoAbp1 と *in vitro* において相互作用することが示された。また、*in vivo* においても、菌糸先端部において AipA と AoAbp1 は共局在することが確認された。以上の結果から、AoAbp1 がエンドサイトーシス関連因子であることを考えると、AipA もまたエンドサイトーシス

において機能することが強く示唆された。エンドサイトーシスにおいて機能する AAA ATPase は、全生物種を通じてもこれまでに報告はされておらず、エンドサイトーシスの活発に行われていると予想される *A. oryzae* において、エンドサイトーシス関連因子をエンドサイトーシス小胞から細胞質へとリサイクリングするのに機能しているのかもしれない。今後、この仮説を実証するための解析が急務である。

細胞生物学の研究対象としての糸状菌は、その形態・分化に関する研究を筆頭に非常に興味深いものの、詳細な分子メカニズムまではわかっていないことが多い。糸状菌の研究は、近年やっとならばホモログ解析を脱却しつつあると見受けられる。未だに、きっかけはホモログから始まるといった研究が多いのは否めないが、ゲノムから抽出可能な情報はできる限り利用した上で、細胞生物学的解析を中心に、新規の普遍的あるいは糸状菌特異的な解析を行えるまでに研究材料・方法は整ってきている。*Aspergillus* 属糸状菌の基礎研究のモデルである *A. nidulans* では特にそれが顕著である。本研究で用いた麹菌 *A. oryzae* は、産業上非常に有用なことから国菌としても知られ、応用研究が重要なのは言うまでもないが、より一層活用していくためには基礎研究も同様に重要である。麹菌 *A. oryzae* はアミラーゼといった有用酵素を菌糸の先端から細胞外に大量に分泌することから、近年特にその分泌メカニズムの解析がさかんに行われている。本研究で明らかになった菌糸先端部におけるエンドサイトーシスは、エキソサイトーシスとうまくバランスが調節された相互に密接に関わり合う機構であると考えられる。このことから、エキソサイトーシスとエンドサイトーシスは、どちらをメインに解析するにしても、常に両者を意識して今後は研究を進めていくことが必要であろう。本研究で見出された、おそらくエンドサイトーシスにおいて機能すると考えられる AipA のような新規因子が、エキソサイトーシスの機構においても見つかる可能性は十二分にあり、*A. oryzae* の大量分泌能力を裏付ける分子メカニズムの解明につながるかもしれない。さらに、菌糸先端だけでなく、隔壁においてもエキソサイトーシスが起きていることが示唆されていることから (早川、2010)、本研究では詳細な解析を行うことができなかったが、隔壁におけるエンドサイトーシスも今後の研究対象の一つであろう。エンドサイトーシスは菌糸先端に限らず、菌糸全体の細胞膜上で起こっており、シグナル伝達や、外界からの栄養分取得、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において重要な役割を果たしていることが示唆されることか

ら、こうした点からの解析も今後必要である (Fig. 4)。

糸状菌の菌糸先端には、未解明の複雑な分子メカニズムが存在すると考えられる。しかし、糸状菌の形態および多細胞という性質上、エンドサイトーシス一つをとっても菌糸先端部だけに限った話ではないため、より研究の複雑性は増してくる。出芽酵母で押し進められているエンドサイトーシス小胞が形成される際の分子メカニズムに限らず、細胞膜が外界と細胞内との境界であることを考えると、外界の環境に応答してその境界面を物理的に変化させるというエンドサイトーシスは生理学的に意義深いものである。また、細胞膜からの取り込み過程以外にも、エンドサイトーシス経路で考えると、エンドソームでのカーゴの選別機構や細胞内でのシグナル伝達経路とのつながりに関しては、糸状菌だけでなく動物細胞や他のモデル生物においてもあまり解明されておらず、今後非常に興味深い研究テーマである。挑戦的な研究テーマに立ち向かい、積極的に新たな実験系を導入し、新しい切り口によるオリジナリティの高い研究を行うことで、糸状菌におけるこうした未解明のエンドサイトーシスの分子メカニズムが徐々に明らかになっていくことを期待したい。

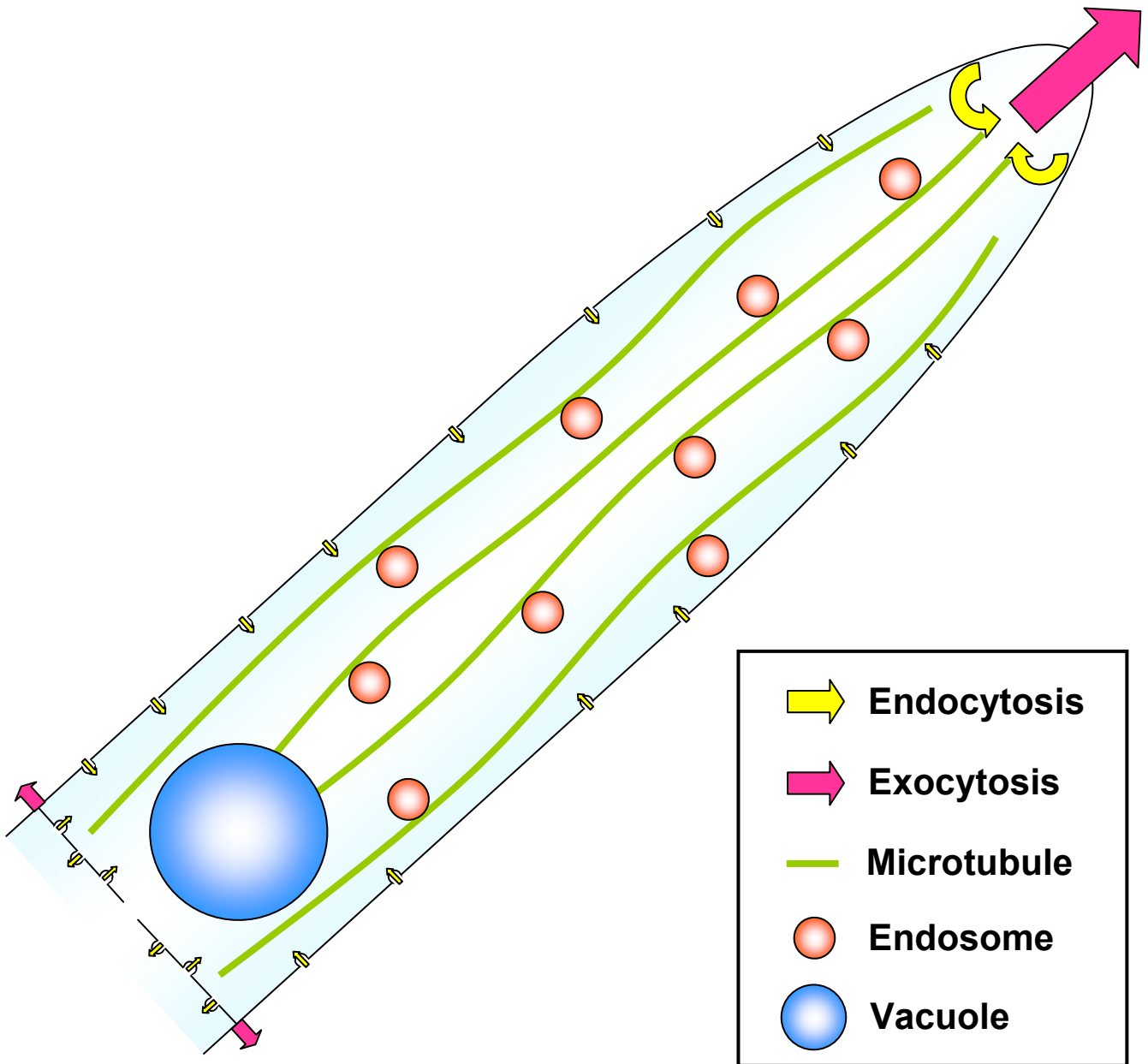


Fig. 4 糸状菌におけるエンドサイトーシスのモデル図

菌糸先端部においてはエンドサイトーシスが活発に起こっており、先端生長に必要な因子、例えば細胞壁合成酵素やv-SNAREをリサイクリングすることにおいてエンドサイトーシスは重要な役割を担っていると考えられる。さらに、本研究では詳細な解析を行うことができなかったが、隔壁においてもエキソサイトーシスおよびエンドサイトーシスが起きていることが示唆されており、エンドサイトーシスは菌糸先端に限らず、菌糸全体の細胞膜上で起こっており、シグナル伝達や、外界からの栄養分取得、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において重要な役割を有していると考えられる。

実験材料と方法

使用菌株

大腸菌組換えプラスミドの取得には、*E. coli* DH5 α (*supE44* Δ *lacU169* (Φ 80 *lacZ* Δ *M15*) *hsdR17* *recA1* *endA1* *gyrA96* *thi-1* *relA1*) を用いた。組換えタンパク質生産には、*E. coli* BL21 (DE3) pLysS (F⁻ *ompT* *hsdS* (r_B⁻, m_B⁻) *gal dcm* (DE3) pLysS (cam^R)) を用いた。

A. oryzae の使用株は Table A に示した。

使用培地

プレート用寒天培地には 2% Agar を加えた。

- ・大腸菌用

LB 培地 : 1% Bacto tryptone、0.5% Yeast Extract、0.5% NaCl

SOC 培地 : 2% Tryptone、0.5% Yeast Extract、10 mM NaCl、2.5 mM KCl、10 mM MgCl₂、10 mM MgSO₄、20 mM Glucose を混合後 20 μ m フィルターを用いて滅菌した。

また、必要に応じて選択薬剤として、アンピシリンナトリウム (和光純薬) を終濃度 100 μ g/mL で、カナマイシン硫酸塩 (和光純薬) を 10 μ g/mL で用いた。

- ・*S. cerevisiae* 用

YPDA 培地 : 1% Yeast Extract、2% Difco peptone、2% Glucose、0.003% Adenine、pH 6.5

SD 培地 : 0.67% Yeast nitrogen base without amino acids、2% Glucose、10% 10 \times DO solution
pH 5.8

10 \times DO solution : 要求性に合わせてアミノ酸を除き作製した。必要量は以下の通り。

200 mg/L L-Adenine hemisulfate salt

200 mg/L L-Arginine HCl

200 mg/L L-Histidine HCl monohydrate

300 mg/L L-Isoleucine

1,000 mg/L L-Leucine

300 mg/L L-Lysine HCl

200 mg/L L-Methionine
500 mg/L L-Phenylalanine
2,000 mg/L L-Threonine
200 mg/L L-Tryptophan
300 mg/L L-Tyrosine
200 mg/L L-Uracil
1,500 mg/L L-Valine

・ *A. oryzae* 用

DPY 培地 : 2% Dextrin、1% Polypeptone、0.5% Yeast Extract、0.5% KH_2PO_4 、0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

CD 培地 : 0.3% NaNO_3 、0.2% KCl 、0.1% KH_2PO_4 、0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.002% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、2% Glucose、pH 5.5

CDm 培地 : CD 培地成分に 0.0015% Methionine を加えた。

M 培地 : 0.2% NH_4Cl 、0.1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.05% KCl 、0.05% NaCl 、0.1% KH_2PO_4 、0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.002% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、2% Glucose、pH 5.5

M-mem 培地 : M 培地成分から 0.2% NH_4Cl 、0.1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を除き、5 mM urea、0.05 mg/mL uracil を加えた。

M-int 培地 : M 培地成分から 0.2% NH_4Cl 、0.1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を除き、10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を加えた。

MM 培地 : M 培地成分に 0.15% Methionine を加えた。

PD 培地 : ポテトデキストロース寒天培地 (日水製薬) を使用法に従い作製した (39.0 g にポテト浸出液末 4.0 g、Glucose 20.0 g、Agar 15.0 g を含む)。

PD+ade 培地 : PD 培地成分に 0.01% adenyl sulfate を加えた。

必要に応じて Glucose の代わりに Maltose、Glycerol を用いた。

また、顕微鏡観察用液体培地は 45 μm フィルターを用いて滅菌したものを用いた。特に明記が無い場合はオートクレーブ滅菌を行った。

顕微鏡観察用の thiamine 添加液体培地には 45 μm フィルターを用いてあらかじめ滅菌した 10 mM の thiamine ストック溶液を用いた。

thiamine 添加のプレート (終濃度 10 μ M) 作製の際は、45 μ m フィルターを用いてあらかじめ滅菌した 2 mM の thiamine ストック溶液をプレートに 100 μ L プレーティングして用いた。

遺伝子工学的手法

大腸菌プラスミド DNA の調製は、アルカリ SDS 法もしくは Promega 社のキット (Cat. No. A1222) を使い、形質転換は Hanahan の方法を改変して行った。

組換えタンパク質生産のための BL21 株のコンピテントセルの作製は以下のように行なった。

1. シングルコロニーを LB 液体培地 10 mL に植菌し、37°C、振盪速度 250 rpm で OD₆₀₀ = 0.4~0.5 になるまで 3~6 時間培養。
2. 細胞を 4°C、2,500 \times g で 15 分遠心して集め、1/10 量 (1 mL) の冷 TSS バッファーに再溶解。調製したコンピテントセルは 2~3 時間以内に形質転換に用いた。

TSS (Transformation and storage solution) バッファー :

1 % Tryptone、0.5 % Yeast Extract、0.5 % NaCl、10 % Polyethylene Glycol (MW 3350)、5 % DMSO、50 mM MgCl₂、pH 6.5、0.45 μ m フィルター滅菌。

DNA シークエンスには、ABI PRISMTM 310NT Genetic Analyzer (Applied Biosystems)、もしくはファスマック社による受託シークエンスを行った。

本研究で用いたプラスミド DNA は Table B に示した。

A. *oryzae* 染色体 DNA 抽出

1. 10⁶ 個の分生子を 20 mL の液体培地に植菌し、30°C で 1 日振盪培養。
2. 菌体をミラクロース (CALBIOCHEM) を用いて回収し、蒸留水で洗う。
3. 0.5 g の菌体を乳鉢に入れ、液体窒素で凍結させ、乳棒で破碎する。
4. 破碎した菌体を 600 μ L の Sol I (50 mM EDTA (pH 8.0)、0.5% SDS、0.1 mg/mL proteinase K (Roche)) に懸濁後 60°C で 30 分インキュベートした。
5. 等量の PCI (フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (25:24:1)) を加えよく混合した後、4°C、15,000 rpm で 5 分遠心。上層を回収後再び PCI 処理を行う。
6. 上層を回収後、等量の CI (クロロホルム/イソアミルアルコール (24:1)) を加えよ

く混合した後、4°C、15,000 rpm で5分遠心。

7. 上層を回収後、エタノール沈殿 Sol (100%エタノール/3 M 酢酸ナトリウム (25:1) (pH 5.2)) を1 mL 加えて4°C、15,000 rpm で10分遠心。
8. アスピレーターでペレットを残し、5分風乾後、400 μ L の TE+RNase (20 mg/mL RNase A (Sigma))を加え、37°Cで30分インキュベート。
9. PCI、CI 処理、エタノール沈殿を行い、100 μ L TE に溶解後、4°Cで保存した。
TE : 10 mM Tris-HCl pH 7.5、1 mM EDTA pH 8 をオートクレーブ滅菌した後使用。

A. oryzae トータル RNA 抽出

A. oryzae の cDNA ライブラリー作製用のトータル RNA 回収には、QIAGEN 社のキットを用い、添付の説明書に従って行った。

また、RT-PCR のテンプレートに使用するための cDNA 調製用トータル RNA 抽出は以下のようにして行った。

1. 10^6 個の分生子を 20 mL の液体培地に植菌し、30°Cで一晩振盪培養。
(以下の操作では RNase free の試薬および器具を用い、サニメント手袋 (AS ONE) を着用した)
2. 菌体をミラクロスを用いて回収し、蒸留水で洗う。
3. 0.5 g の菌体を乳鉢に入れ、液体窒素で凍結させ、乳棒で破砕する。
4. 菌体を 600 μ L TRI reagent (Sigma) に入れ、30秒間ボルテックスし5分間室温放置。
5. 200 μ L のクロロホルムを加え15秒間混合し、2分間室温で放置した後4°C、15,000 rpm で15分遠心。
6. 上層を 500 μ L のイソプロパノールに加え、軽く反転し5分間室温で放置した後、4°C、15,000 rpm で15分遠心。
7. アスピレーターでペレットを残し、1 mL の 70%エタノールを加え軽くボルテックスした後、4°C、15,000 rpm で15分遠心。
8. 5分間風乾の後、40 μ L の DEPC 処理水に溶解。
9. 適宜希釈し、OD₂₆₀ を測定することで RNA の濃度を測定する(OD₂₆₀=1 のとき RNA 40 μ g/mL)。
10. 5 μ g/ μ L の RNA 溶液に 5 μ L の DNase (Promega; 1 U/ μ L、1 U/ μ g RNA) を加え、37°C で1時間インキュベート。

11. 90 μL の DEPC 処理水と 100 μL のフェノール/クロロホルムを加え混合し、室温で 10,000 rpm、5 分間遠心。
12. 上層に 100 μL のクロロホルムを加え、室温で 10,000 rpm、5 分間遠心。
13. 上層に 260 μL のエタノール沈殿 Sol を加え、 -80°C で 20 分置いた後、12,000 rpm、 4°C で 10 分遠心。
14. アスピレーターでペレットを残し、800 μL の 70%エタノールを加え 12,000 rpm、 4°C で 5 分遠心。
15. 5 分間風乾の後、20 μL DEPC 処理水に溶解し OD_{260} を測定。サンプルは -80°C で保存した。

RT (Reverse Transcription) 反応

Clontech 社のキットを用い、また添付の説明書に従ってトータル RNA から cDNA を合成した。

1. 2 $\mu\text{g}/8 \mu\text{L}$ の total RNA、1 μL Oligo (dT)₁₂₋₁₈、2 μL DEPC 処理水を混合し 70°C で 10 分インキュベートした。
2. サンプルに、4 μL の 5×First-Strand Buffer、8 μL の dNTPs (2.5 mM)、2 μL の DTT (100 mM)、0.5 μL Power Script RT を順に加え、ピペッティングで混合し、 42°C で 60 分インキュベート。
3. 続いて 70°C 、15 分インキュベートし、 -20°C で保存した。

PCR 反応

本研究で用いたクローニング用のプライマーは Table C に示した。反応液の組成は polymerase に添付の説明書に従った。

Pyrobest (TaKaRa) を用いた PCR (クローニング用) :

98°C 10 秒、{ 98°C 10 秒、(アニーリング温度) 30 秒、 72°C 1 kb /分; 30 サイクル}

Prime STAR (TaKaRa) を用いた PCR (クローニング用) :

98°C 10 秒、{ 98°C 10 秒、(アニーリング温度) 5 秒、 72°C 1 kb /分; 30 サイクル}

r-Taq (TaKaRa) を用いた PCR (*E. coli* コロニーPCR 用) :

94°C 5 分、{ 94°C 30 秒、(アニーリング温度) 30 秒、 72°C 1 kb /分; 30 サイクル}、 72°C 5 分

KOD FX (TOYOBO) を用いた PCR (*S. cerevisiae*, *A. oryzae* コロニーPCR 用) :

94°C 5 秒、{98°C 10 秒、(アニーリング温度) 30 秒、68°C 1 kb /分; 35 サイクル}

テンプレートには、50 μL TE に菌体を 1 白金耳懸濁した溶液 2 μL (20 μL スケール) を用いた。

リアルタイム RT-PCR

Kimura らの方法 (Kimura., *et al.*, 2008) に従って行った。使用したプライマーは以下の通り (forward、reverse の順)。

<i>chsA</i> (AO090012000084)	5'-CGATCAACATCCTGATGGTG-3'
	5'-CCCACAGAATGACTCGGAAA-3'
<i>chsB</i> (AO090701000589)	5'-TACCTGGACCCTTGGCATAT-3'
	5'-ACTTGTCCATACCGTCACTG-3'
<i>chsC</i> (AO090011000449)	5'-TCACGGATCTGTTCACCAAC-3'
	5'-CTTGTAAGTAATCGGCCTGTC-3'
<i>chsY</i> (AO090026000323)	5'-CGAAAAAGAGATGGGAGGAG-3'
	5'-CTTCGGTGGCTGAGTTGATA-3'
<i>chsZ</i> (AO090026000321)	5'-CTGTCCAGCTTTAGTCGGTA-3'
	5'-GCCAATTCCTGGTCAATCTG-3'
<i>Aofks1</i> (AO090009000174)	5'-TGGACTGGAAAGTGGTACAG-3'
	5'-TTGTGTTTCTCGTCAAGGGG-3'
<i>gpdA</i> (AO090003001322)	5'-TCAGAACATCATCCCCAGCT-3'
	5'-ATCGACCTTGGAGATGTAGG-3'

RACE 解析

Gene RacerTM キット (Invitrogen) を使い、添付の説明書に沿って行った。RACE-PCR のテンプレートには、RIB40 株を DPY 液体培地で 24 時間培養した菌体から抽出したトータル RNA より作製したものを用了。RACE-PCR の後、Nested-PCR を行った産物を pT7Blue T-vector (Novagen) へクローニングし、シーケンス解析を行った。

A. oryzae の分生子回収

1. 分生子を形成したプレートに、10 mL の 0.01% Tween 80 を添加し滅菌スポイト (Transfer-pipette 3.5 mL, SARSTEDT) の先で分生子を懸濁し 15 mL チューブ (Greiner) に回収した。
2. 30 秒間ボルテックスし分生子を分散させた後、ミラクロースで菌体残渣を濾過した。
3. 3,500 rpm で 5 分間遠心し上清を捨て、5 mL の 0.01% Tween 80 を加えボルテックスし分生子を懸濁させた後 3,500 rpm で 5 分間遠心した。
4. 上清を捨て、1 mL の滅菌水を加え懸濁させ、それを 2 mL チューブ (アシスト) に移し 4°C にて保存した。

A. *oryzae* の形質転換法

プロトプラストに負荷を与えないよう、全遠心操作をブレーキオフの設定で行った。

1. 100 mL 液体培地に親株の分生子を適量植菌し、30°C で 1 日振盪培養する。
2. ミラクロースを用いて菌体を回収し、滅菌水で菌体を洗浄後、あらかじめ 45 μm フィルターで滅菌した 10 mL TF Sol 1 に菌体を加え、30°C で 3 時間、50 rpm で振盪培養。
3. ミラクロースを用いて菌体残渣を除いたプロトプラスト溶液に 10 mL の TF Sol 2 を加え、室温で 2,000 rpm、8 分間遠心した。
4. 上清を除き、5 mL の TF Sol 2 に再懸濁し、室温で 2,000 rpm、8 分間遠心した。
5. 上清を除き、5 mL の TF Sol 2 に再懸濁した後、トーマの血球計数版を用いてプロトプラストの数をカウントし、室温で 2,000 rpm、8 分間遠心した。
6. 上清を除き、プロトプラスト数が $1.0\text{-}5.0 \times 10^7$ になるように TF Sol 2 に再懸濁した溶液 200 μL に形質転換用 DNA を 10 μL (1-5 $\mu\text{g}/10 \mu\text{L}$ となるようにあらかじめ準備しておく) 加え、氷上で 30 分静置。
7. この間に 5 mL Top Agar を 15 mL チューブに分注し 45°C で溶解させておく。
8. 250、250、850 μL と 3 回に分けて TF Sol 3 を加える。加えるたびに滅菌スポイトを用いてよくピペッティングする。20 分静置。
9. 5 mL の TF Sol 2 を加え転倒混和し、室温で 2,000 rpm、8 分間遠心。
10. 上清を除き、500 μL の TF Sol 2 に懸濁したものをあらかじめ準備しておいた Top Agar に加え穏やかに混合後、下層培地に重層した。
11. 30°C で培養し、生えてきたコロニーを選択培地に 1~3 回植え継ぎ、形質転換体を

取得した。

TF Sol 1 : 0.1% Yatalase、0.6 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、50 mM Maleate buffer (pH 5.5)

TF Sol 2 : 1.2 M sorbitol、50 mM CaCl_2 、35 mM NaCl、10 mM Tris-HCl (pH 7.5)

TF Sol 3 : 60 % PEG (polyethylene glycol) 4000、50 mM CaCl_2 、10 mM Tris-HCl (pH 7.5)

Top Agar : 1.2 M sorbitol、0.8% Agar を含む各種選択培地

下層培地 : 1.2 M sorbitol、2% Agar を含む各種選択培地

サザン解析 (基本的に GE Healthcare 社の試薬を用いた)

1. ゲノムを一晩制限酵素処理。
2. 制限酵素処理液をエタノール沈殿後、20 μL の TE に溶解し電気泳動。
3. 泳動後のゲルを変性溶液 (1.5 M NaCl、0.5 M NaOH) 中で 25 分間振盪。
4. 変性溶液を捨て、ゲルを蒸留水ですすいだ後、中和溶液 (1.5 M NaCl、0.5 M Tris-HCl (pH 7.5)) 中で 30 分間振盪。
5. ゲルを Hybond- N^+ メンブレンに転写。転写用器具中でスポンジを 20 \times SSC (NaCl 175.3 g、クエン酸ナトリウム 88.2 g/L) に浸し、その上に以下のものを順に下から重ねた。ろ紙、裏返しにしたゲル、メンブレン、ろ紙 3 枚、ペーパータオル、アクリル板、重し。この状態で 4 時間静置。
6. 2 \times SSC でメンブレンを wash 後、80 $^\circ\text{C}$ で 1 時間メンブレンを乾燥。
7. ハイブリバッグにメンブレンとハイブリバッファー (Blocking reagent 0.75 g、NaCl 0.43 g、Gold hybridization buffer 15 mL) を入れて封じ、42 $^\circ\text{C}$ で 1 時間振盪。
8. DNA プロブの作製。100 ng/10 μL の DNA 溶液を 100 $^\circ\text{C}$ で 5 分間処理後、氷上で 5 分放置。10 μL の labeling reagent を加えてピペティング後、glutaraldehyde solution 10 μL を加えピペティングし、37 $^\circ\text{C}$ で 10 分間インキュベート。
9. DNA プロブをハイブリバッグに注入し 42 $^\circ\text{C}$ で 6 時間以上インキュベート。
10. ハイブリバッグからメンブレンを取り出し、新しいハイブリバッグにメンブレンを入れ、primary wash buffer (urea 18 g、SDS 0.2 g、20 \times SSC 1.25 mL/50 mL) を注ぎ 42 $^\circ\text{C}$ で 20 分インキュベート。この操作をもう 1 回行った。
11. 2 \times SSC でメンブレンを 5 分間 wash。この操作をもう 1 回行った。
12. Detection reagent 1 と 2 を 1 mL ずつ混合したものをメンブレンにかけ、ルミノイメーリアナライザーLAS-4000miniEPUV (Fujifilm) で検出した。

顕微鏡使用機器

蛍光顕微鏡観察には、正立型顕微鏡 BX52 (Olympus)、励起フィルター BFP/GFP/DsRed filter set (Chroma Technology)、および対物レンズ UplanApo 100× (Olympus)を用いた。解析ソフトウェアとして MetaMorph (Molecular Devices Co.) を使用した。

共焦点レーザー顕微鏡観察には、倒立型顕微鏡 IX71 (Olympus)、対物レンズ UplanApo 100× (Olympus) を用い、488 nm 半導体レーザー (FURUKAWA ELECTRIC)、561 nm 半導体レーザー (MELLES GRIOT)、CSU22 (confocal scanner unit)(YOKOGAWA)、Dual view (ROPER)、冷却型デジタル CCD カメラ (Andor) を接続した。解析ソフトウェアには Andor IQ (Andor) を用いた。

FRAP 解析には、MicroPoint レーザーシステム (Photonic Instruments Inc.) を用い、解析ソフトウェアとして MetaMorph (Molecular Devices Co.) を使用した。

顕微鏡観察法

蛍光顕微鏡観察用カバーガラスカルチャー：

カバーガラス (MATSUNAMI) に 100 μ L の液体培地をのせ、そこに分生子 10^5 個/10 μ L を植菌し、30°C で 20 時間前後培養した後、スライドガラス (MATSUNAMI) 上にカバーガラスを載せ、四隅をマニキュアにより封じプレパラートにして観察した。

共焦点レーザー顕微鏡観察：

ガラスベースディッシュ (IWAKI) に 100 μ L の液体培地をのせ、そこに分生子を 10^5 個/10 μ L 植菌し、30°C でインキュベートした後観察した。

細胞染色試薬

FM4-64 (N-(3-triethylammoniumpropyl)-4-(*p*-diethyl-aminophenyl-hexatrienyl)pyridinium dibromide) (Molecular Probes; T3166)：

1.6 mM ストック (DMSO に溶解) を作製し、終濃度 8 μ M で使用した。FM4-64 による共染色は FM4-64 を加えた培地に置換して 2 分室温で静置し、FM4-64 を含まない培地に置換した後観察した。

また、FM4-64 を用いた Spitzenkörper の染色を指標としたエンドサイトーシスの解

析の際には、18 時間培養したカルチャーを上記の方法で染色した後、菌体がガラスベースディッシュ底面で多く観察できるように、培地を 50 μ L 除いて観察した。

Calcofluor White (Fluorescent Brightener 28; Sigma; F3545) :

カルチャーを固定液で 10 分固定後、PBS で 2 度洗浄し、終濃度 0.1 mg/mL の Calcofluor White を含む培地で 3 分間室温で静置した。その後 PBS で 2 度洗浄し観察した。

PBS : NaCl 8 g、KCl 2 g、Na₂HPO₄ · 12H₂O 2.9 g、KH₂PO₄ 0.2 g 以上を 1 L の蒸留水に溶解後、オートクレーブ滅菌した。

固定液 (Calcofluor White 染色用): 0.5%グルタルアルデヒド、3.7%ホルムアルデヒド、
in PBS

Filipin III (Sigma; F4767) :

2.5 mg/mL ストック (DMSO に溶解) を作製し、終濃度 25 μ g/mL で使用した。12 時間カバースライドカルチャーを行った後、Filipin III を加えた培地に置換して 5 分室温で静置し、Filipin III を含まない培地に置換した後観察した。

使用薬剤

latrunculin B (Calbiochem) :

アクチン重合阻害剤。10 mg/mL のストック (DMSO に溶解) を作製し、終濃度 100 μ g/mL で用いた。

間接蛍光抗体法

カバーガラスカルチャーにて行った。wash は PBST で 2 回ずつ。またインキュベートは原則室温で行った。

1. カルチャーを wash 後、固定液で 15 分間インキュベート。
2. wash 後、消化酵素液で 15 分間インキュベート。
3. wash 後、メタノールで 10 分間 -20°C でインキュベート。
4. wash 後、抗アクチン抗体 (Sigma; A-2066) を BSA/PBS で 500 倍希釈した溶液で 1 時間インキュベート。
5. wash 後、FITC 結合抗ウサギ IgG 抗体 (Sigma; F-1262) を BSA/PBS で 200 倍希釈し

た溶液で1時間インキュベート。

6. wash 後、PBST を 100 μ L 添加し観察した。

PBST : PBS に 0.05% Tween 20 を加えた。

固定液 (間接蛍光抗体法用) : PBS に 3.7%ホルムアルデヒド、5 mM $MgSO_4$ 、2.5 mM EGTA を加えた。

消化酵素液 : PBST に 3 mg/mL Yatalase (TaKaRa)、1 mg/mL Lysing enzyme (Sigma)、10 mg/mL Egg white (Sigma)を加えた。

BSA (100 \times ストック、final 0.1 mg/mL) : 0.01 g BSA/mL

透過型電子顕微鏡観察

一晚液体培養した菌体を、まず、4%グルタルアルデヒドを含んだ 0.1 M リン酸バッファーで 4 時間、次に 1%四酸化オスミウム酸で 3 時間、4 $^{\circ}$ Cにて固定した。超薄切片を作製し、酢酸ウランで 30 分、クエン酸鉛で 5 分染色した後、JEOL 透過型電子顕微鏡で観察した (JEM-1010)。

A. *oryzae* からのタンパク質抽出法

1. 0.25 g の湿菌体重量の菌体を液体窒素で破碎し、500 μ L の抽出バッファーに懸濁。
2. 800 \times g、5 分、4 $^{\circ}$ Cで遠心し、上清を-80 度で保存した。

抽出バッファー :

buffer N (10 mM Tris-HCl (pH 7.5)、150 mM NaCl、1 mM $MgCl_2$)、1% TritonX-100、1% PIC (Protease Inhibitor Cocktail; Sigma)

ウェスタン解析

1. タンパク質抽出液を SDS-PAGE 用 4 \times サンプルバッファーと混合し、3 分間煮沸。
2. 目的のタンパク質サイズに合わせたアクリルアミド濃度のゲルを使用して SDS-PAGE 後、セミドライ式でニトロセルロースメンブレン (Whatman) にブロッキング。
3. 5%スキムミルク in TTBS で 30 分ブロッキング。
4. 一次抗体で 1~2 時間メンブレンを反応させる。
5. 30 分間にわたり 4~5 回 TTBS でメンブレンを洗う。

6. 二次抗体で 30 分～1 時間メンブレンを反応させる。
7. 10 分間にわたり 2～3 回 TTBS でメンブレンを洗う。
8. ECL 検出溶液 (Pierce) を用い、LAS-400miniEPUV (Fujifilm) で検出した。

TTBS : 2.42 g Tris、29.22 g NaCl、1 g Tween 20 in 1 L、pH 7.5

使用抗体 全て TTBS で希釈した。

抗 GFP 抗体 (Clontech; 632380) : マウスモノクローナル抗体。1,000 倍希釈で使用。

抗 DsRed 抗体 (Clontech; 632496): ウサギポリクローナル抗体。1,000 倍希釈で使用。

HRP 結合抗マウス IgG 抗体 (Vector) : 500 倍希釈で使用。

HRP 結合抗ウサギ IgG 抗体 (Vector) : 500 倍希釈で使用。

Yeast two-hybrid 解析

Matchmaker™ Library Construction and Screening Kit (Clontech) を用い、添付の説明書に従って行った。

cDNA ライブラリーの作製は以下のように行った。

1. *A. oryzae* RIB40 株を CD 液体培地で 24 時間培養した菌体からトータル RNA を抽出キット (QIAGEN) を使用して調製。
2. Random Primer (CDS III/6 Primer) を用いた First-Strand cDNA の合成。

2-1. PCR チューブに以下を混合。

2 μ L トータル RNA (0.574 μ g/ μ L)

1 μ L CDS III/6 Primer

1 μ L dH₂O

4 μ L

混ぜてスピンドウンした後、72°C で 2 分インキュベートし氷上で 2 分。

2-2. スピンドウンし、室温で以下を添加。

2 μ L 5×First-Strand Buffer

1 μ L DTT (20 mM)

1 μ L dNTP Mix (10 mM)

1 μ L MMLV Reverse Transcriptase

9 μ L

タップして穏やかに混和しスピンドウン。

2-3. 室温で 10 分インキュベート。次に 42°C で 10 分インキュベート。

2-4. 1 μL の SMART III Oligonucleotide を添加して 42°C で 1 時間サーマルサイクラーでインキュベート。

2-5. 75°C で 10 分インキュベートした後、室温でチューブを冷ます。1 μL の RNase H を加えて 37°C で 20 分インキュベート。−20°C で保存可能。

3. Long Distance PCR による ds cDNA の増幅。

3-1. 以下を 2 連で PCR チューブに作製する。

2 μL First-Strand cDNA

70 μL dH₂O

10 μL 10×Advantage 2 PCR Buffer

2 μL 50×dNTP Mix

2 μL 5' PCR Primer

2 μL 3' PCR Primer

10 μL 10×GC-Melt Solution

2 μL 50×Advantage 2 Polymerase Mix

100 μL

タップして穏やかに混和。スピンドウン。

3-2. 以下のプログラムでサーマルサイクラーにセット。

95°C 30 秒、{95°C 10 秒、68°C 6 分 (1 サイクル毎に 5 秒ずつ延長); 20 サイクル}、
68°C 5 分

3-3. 1.2%アガロース/EtBr ゲルに 7 μL を泳導して濃度を確認。−20°C で保存可能。

4. ds cDNA の精製。

4-1. CHROMA スピнкаラム内のゲルマトリックスを何度か反転することで完全に再懸濁する。1 つのカラムに対して 95 μL までの cDNA を使用。

4-2. CHROMA スピнкаラムを垂直に持ち、break-away end を親指と人差し指で持って折る。2 mL の collection チューブにスピнкаラムの末端を置き、top cap をはずす。top cap と white-end cap はとっておく。

4-3. 700×g で 5 分遠心。遠心後、カラムマトリックスはセミドライになる。この操作はカラムから平衡化バッファーを除き、マトリックスベッドを再構築する。

4-4. collection チューブとカラム平衡化バッファーを捨てる。

- 4-5. スピнкаラムを新しい 2 mL の collection チューブにセットする。ゆっくりと cDNA サンプルをゲルベッドの中央からアプライする。決してカラムの壁についてはいけない。
 - 4-6. 700×g で 5 分遠心。精製されたサンプルは collection チューブの底にある。(あれば) 同一サンプルをひとつにまとめる。
 - 4-7. 1/10 量の Sodium Acetate (3 M; pH 4.8) と 2.5 倍量の 95%エタノール (−20°C) を加える。ゆっくり前後に動かして混ぜる。
 - 4-8. −20°C に 1 時間置く(オーバーナイトの方が回収率は良い)。
 - 4-9. 室温で 20 分 14,000 rpm で遠心。ピペットで上清を注意深く除く。ペレットを捨てない。
 - 4-10. 軽く遠心し、残った液体を底にためる。すべての液体を丁寧に除き、~10 分間ペレットを風乾。
 - 4-11. ペレットを 20 μL の dH₂O にゆっくり溶解。−20°C で保存。
5. ds cDNA と pGADT7-Rec を AH109 株に形質転換する。
 - 5-1. AH109 株のコンピテントセルを調製する。
 - 5-1-1. 10 mL YPDA/Kanamycin (10 μg/mL) L 字管に、ストリークしてから 3 日以内の 3 コロニーを植菌し、30°C で 8 時間、250 rpm で振とう培養。
 - 5-1-2. 培養液の一部を 50 mL の YPDA/Kanamycin (10 μg/mL) に、16 時間後の OD₆₀₀ が 0.1 になるように植菌。植菌量 X μL は以下の計算式を参考にする。
$$OD_{600} \times X : 0.1 \times 50 \times 1000 = 1 : 2^{10}$$
 - 5-1-3. 30°C で 16~20 時間、250 rpm で振とう培養。フラスコの蓋は緩めておく。
 - 5-1-4. OD₆₀₀ が 0.15~0.3 であることを確認し、室温で 700×g、5 分遠心し、上清を捨てる。30 mL YPDA 培地に再懸濁し、これを 50 mL YPDA 培地に OD₆₀₀ が 0.1 になるようにする。2 本作製する。
 - 5-1-5. 30°C、3~5 時間、250 rpm で振とう培養。フラスコの蓋は緩めておく。OD₆₀₀ が 0.4~0.5 で終了。
 - 5-1-6. 室温で 700×g、5 分遠心し、上清を捨てる。30 mL 滅菌水に再懸濁し、再び室温で 700×g、5 分遠心し、上清を捨てる。
 - 5-1-7. 沈殿に 1.1×TE/LiAc (要時調製; 1.1 mL 10×TE、1.1 mL 10×LiAc/10 mL dH₂O) 3 mL を加える。ピペッティングで丁寧に混ぜ、スピンドウン、上清

を除く。

5-1-8. それぞれに 1.1×TE/LiAc 600 μL を加え、ピペティングで丁寧に混ぜ、1 時間以内に使用する。

5-2. あらかじめ冷却した滅菌 15 ml チューブに、

- 20 μL の ds cDNA
- 6 μL の pGADT7-Rec (0.5 μg/μL)
- ~50 μL の Herring DNA を 100°C で 5 分処理し、氷上で冷やす操作を 2 度行った 20 μL の Herring Testes Carrier DNA (denatured) を混ぜる。

5-3. 600 μL のコンピテントセルを加える。ボルテックスで穏やかに混ぜる。

5-4. 2.5 mL の PEG/LiAc 溶液を加える。ボルテックスで穏やかに混ぜる。

5-5. 30°C で 45 分インキュベート、15 分おきに細胞を混ぜる。

5-6. 160 μL DMSO を加えて混ぜ、20 分 42°C の湯浴に静置。10 分おきに細胞を攪拌。

5-7. 700×g で 5 分遠心。上清を捨て、3 mL の YPD Plus Liquid Medium に再懸濁する。

5-8. 30°C で 90 分振とう培養。

5-9. 700×g で 5 分遠心。上清を捨て、30 mL の 0.9% NaCl 溶液に再懸濁する。

6. SD/-Leu プレートによる形質転換体の選択。

6-1. 150 mm の SD/-Leu プレートに 150 μL ずつプレーティング(~200 枚)。10 倍、100 倍、1,000 倍、10,000 倍希釈した 100 μL 溶液を 100 mm の SD/-Leu プレートに撒く。

6-2. 30°C で 3-6 日培養。形質転換効率 (ライブラリーのタイター) を計算する。 1×10^6 以上が望ましい。

6-3. 形質転換体の回収。

6-3-1. プレートを 4°C で 3-4 時間冷却。

6-3-2. 5 mL の Freezing Medium(YPD に 25% glycerol を加えたもの) を添加。

6-3-3. 滅菌済ガラスビーズ (フジストン ; No. 5 直径 4.7~5.3 mm) を使って穏やかに混和して菌体を溶出する。滅菌済フラスコに液体を回収しよく混ぜる。血球計数板で細胞数を測定する。 2×10^7 cells/ml 以下の場合は遠心して液量を減らす。

6-3-4. 1 mL ずつに分注し、-80°C で保存 (1 年もつ)。

Bait 株と cDNA ライブラリーとのメイティングは以下のように行った。

1. Bait 株カルチャーの準備

1-1. SD/-Trp プレート上の 2-3 mm のコロニーを SD/-Trp/Kanamycin (Kan; 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 50 mL に植菌。

1-2. 30°C で 16~24 時間、250~270 rpm で振とう培養。

1-3. 600 $\times g$ 、室温で 5 分遠心後、上清を除く。

1-4. ~5 mL SD/-Trp 液体培地に再溶解。血球計数板で細胞数を数える。細胞密度は $1 \times 10^9/\text{mL}$ 以上が望ましい。

2. Bait 株と cDNA ライブラリー株のメイティング

2-1. cDNA ライブラリー株 1 mL ($\geq 2 \times 10^7$ cells) をディープフリーザーから出し、室温で溶解。

2-2. 5 mL の bait 株 ($\geq 1 \times 10^9$ cells/mL) と cDNA ライブラリー株 1 mL ($\geq 2 \times 10^7$ cells) を滅菌済 2 L フラスコに混ぜる。

2-3. 50 mL の 2 \times YPDA/Kan (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を加え、穏やかに混和。

2-4. 30°C で 24 時間、30 rpm で旋回。

2-5. メイティングミクスチャーを 1,000 $\times g$ 、室温で 10 分遠心。メイティングフラスコを 50 mL の 0.5 \times YPDA/Kan (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) で 2 度洗う。それらの菌体を混ぜ、ペレットを再懸濁する。

2-6. 1,000 $\times g$ 、室温で 10 分遠心。10 mL の 0.5 \times YPDA/Kan (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) でペレットを再懸濁する。細胞と培地の合計量を測る。この懸濁液を 3-1、3-2 に使用する。

3. 相互作用タンパク質を発現している酵母 2 倍体の選別

3-1. メイティング効率を測定するために、10 倍、100 倍、1,000 倍、10,000 倍希釈した 100 μL の菌体懸濁液を 100 mm の SD/-Leu、SD/-Trp、SD/-Leu/-Trp プレートに撒く。

3-2. 200 μL の菌体懸濁液を 150 mm の SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade プレートに撒く。

3-3. 30°C でコロニーが現れるまで 5~7 日間インキュベート。当たりのコロニーは 2 mm 以上で白もしくはピンク。

3-4. SD/-Leu、SD/-Trp、SD/-Leu/-Trp プレートの結果からメイティング効率とスクリーンコロニー数を計算する。

使用菌株 :

Y187 (*MAT α* , *ura3-52*, *his3-200*, *ade2-101*, *trp1-901*, *leu2-3*, *112*, *gal4 Δ* , *met*, *gal80 Δ* ,
URA3::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-LacZ, *MEL1*) ; bait 株作製用

AH109 (*MAT α* , *trp1-901*, *leu2-3*, *112*, *ura3-52*, *his3-200*, *gal4 Δ* , *gal80 Δ* ,
LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, *GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2*,
URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-LacZ, *MEL1*) ; prey 株作製用

使用プラスミド :

pGBKT7 : bait 株作製用。選択マーカーは *TRP1*。マルチクローニングサイトの上流に、Gal4p-DNA-BD、c-Myc の配列を有する。

pGADT7-Rec2 : ライブラリー作製時にのみ使用。*Sma* I サイトで切断された両端に相同組換え用の配列を持つ線状 DNA。また、*Sma* I サイトの上流に Gal4p-AD、HA の配列を有する。選択マーカーは *LEU2*。

pGADT7-Lig : prey 株作製用。pGADT7-Rec2 の *Sma* I サイトでライゲーションして環状にしたもの。

酵母からの DNA 抽出

1. 選択液体培地 10 mL で一晩振盪培養。
2. 3,000 rpm、4°C、1 分間遠心し、上清を除く。
3. 1 mL の滅菌水で洗浄し、12,000 rpm、4°C、1 分間遠心し、上清を除く。
4. 0.2 mL の破碎バッファーに懸濁後、3/4 量のガラスビーズ (フジストン ; 直径 0.25 ~0.425 mm) を入れ、ガラスビーズが沈殿しないように、2.5 分間ボルテックスし細胞を破碎。
5. PCI 抽出、CI 抽出、エタノール沈殿後、20 μ L の TE に溶解し、*E. coli* に形質転換後、プラスミド DNA を抽出した。

破碎バッファー : 100 mM NaCl、10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、1 mM EDTA(pH 8.0)、
2% TritonX-100

酵母形質転換法

1. L 字管を用い、10 mL スケールで 1 晩 30°C で前培養した培養液 1 mL に 9 mL の培地

を添加し、2~3 時間培養。(対数増殖期 (OD₆₀₀=~1.0) になるまで)

2. 15 mL チューブで 3,000 rpm、室温、2 分遠心し菌体を回収。
3. 上清を除き、5 mL の滅菌水で洗う。3,000 rpm、室温、2 分遠心。
4. 菌体を 500 μ L の 0.1 M LiAc TE で懸濁し、1.5 mL チューブに移す。
5. 100 μ L の菌体懸濁液と 300~400 ng/10 μ L の DNA を混ぜる。
6. 800 μ L の TLP を添加し、40 分室温。
7. 42°C で 10 分。
8. 室温で 12,000 rpm、10 秒遠心。
9. 滅菌水 1 mL で vortex し、室温で 12,000 rpm、10 秒遠心。
10. 滅菌水 200 μ L に懸濁し、選択培地に塗布。

0.1 M LiAc TE : 1.02 g LiAc · 2H₂O in 100 mL TE

TLP : 40% PEG4000、0.1 M LiAc in TE

酵母菌体タンパク質抽出 (TCA 法)

1. L 字管を用い、10 mL の選択培地で一晚培養したカルチャーを 50 mL の YPDA 液体培地と混ぜ、30°C、150 rpm で OD₆₀₀ が 0.4-0.6 になるまで 4~8 時間培養。
2. total OD₆₀₀ units を計算する (例 ; OD₆₀₀ 0.6×60 mL=36 total OD₆₀₀ units)。
3. 氷上で冷却した 50 mL チューブに移し、即座に 4°C、1,000 × *g* で 5 分遠心。
4. 上清を捨て 50 mL の冷却滅菌水で再懸濁し、4°C、1,000 × *g* で 5 分遠心、上清除去。
5. 7.5 OD₆₀₀ units につき 100 μ L の ice-cold TCA buffer で細胞を懸濁し、氷上。
6. 7.5 OD₆₀₀ units につき 100 μ L ずつのガラスビーズと ice-cold 20% TCA を入れた 1.5 mL チューブに細胞懸濁液を移す。
7. 1 分 vortex、30 秒氷上を 4 回繰り返す。
8. 上清を新しい 1.5 mL チューブに移して氷上に静置、これを第一抽出とした。
9. 以下のようにガラスビーズを洗う。
 - a. 250 μ L ずつの 20% TCA と TCA buffer、計 500 μ L を加える。
 - b. 1 分 vortex、30 秒氷上、1 分 vortex。
 - c. 上清を第一抽出と合わせる。
10. 混合したサンプルを 1 分静置し、上清を新しい冷却した 1.5 mL チューブに移す。
11. 14,000 rpm、4°C で 10 分間遠心後、上清を丁寧に除き捨てる。さらに、数秒遠心し

て、残った上清を除く。

12. 1 OD₆₀₀ units につき 10 μL の TCA-Laemmli loading buffer に溶解。

13. 100°Cの湯浴で 10 分。

14. 室温で 14,000 rpm、10 分間遠心後、上清を新しい 1.5 mL チューブに移す。−20°C 保存。

TCA buffer (使用前に冷却し、1% PIC と 1% PMSF を添加) :

20 mM Tris-HCl (pH 8)、50 mM 酢酸アンモニウム、2 mM EDTA

SDS/glycerol stock solution :

7.3% SDS、29.1% glycerol、83.3 mM Tris、ブロモフェノールブルー適量

Tris/EDTA solution : 200 mM Tris、20 mM EDTA

TCA-Laemmli loading buffer (要時調製) :

48% SDS/glycerol stock solution、40% Tris/EDTA solution、5% β-メルカプトエタノール、1 % PIC、1 % PMSF

GST 融合タンパク質の調製

GST 融合タンパク質の発現プラスミドは、pGEX-5X-3 を用いた。AoAbp1 の 2 つの SH3 ドメインをコードする cDNA を pGEX-5X-3 の *Sal*I サイトに導入し、形質転換した。また、pGEX-5X-3 を形質転換した株をコントロール株とした。

GST 融合タンパク質溶液の調製は以下のように行った。

1. 10 mL LB/Ampicillin (100 μg/mL) L 字管に GST 融合タンパク質発現株を植菌し、37°C で一晩振とう培養。
2. 培養液 10 μL を新しい 10 mL LB/Ampicillin (100 μg/mL) L 字管に植え、37°C で 2 時間振とう培養後、0.1 mM IPTG (isopropyl thiogalactoside) を添加して 37°C で 1 時間振とう培養。
3. 7,500 rpm、4°C、10 分遠心後、ソニケーションバッファー 2 mL に懸濁。
4. 懸濁液を 50 W で 30 秒間のソニケーション 4 回により菌体を破碎した。
5. 15,000 rpm、4°C、15 分遠心後、上清を回収した。

ソニケーションバッファー : PBS-KCl(−) (PBS から KCl を除いたもの)、1 mM DTT

GST プルダウンアッセイ

Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare; 17-0756-01) を用いた。洗浄では、チューブを穏やかに 3 回反転した後、 $500\times g$ 、 4°C 、1 分遠心して上清を除く操作を行った。

1. $500\ \mu\text{L}$ の氷冷 PBS で $20\ \mu\text{L}$ の glutathione sepharose beads (1:1 スラリー; 吸着能は、 $5\ \mu\text{g GST protein}/\mu\text{L}$) を 5 回洗浄。
2. GST、GST-bait を含む溶液 $500\ \mu\text{L}$ を加え、 4°C で 2 時間ローテーターで混和する。
3. $500\times g$ 、 4°C 、30 秒遠心後、上清を除き、beads を $500\ \mu\text{L}$ の氷冷 PBS+1% Triton X-100 で 5 回洗浄。
4. Prey を発現する *A. oryzae* 株の菌体抽出液 $400\ \mu\text{L}$ を加え、 4°C で 2 時間ローテーターで混和する。ネガティブコントロールとして、prey を添加しない beads も準備しておく。
5. \pm prey の beads に対し、 $500\times g$ 、 4°C 、1 分遠心後、上清を除き、 $500\ \mu\text{L}$ の氷冷 PBS+1% Triton X-100 で 5 回洗浄。
6. $50\ \mu\text{L}$ の SDS-PAGE 用 $1\times$ sample buffer を加え、1 分煮沸。
7. $16,000\times g$ 、 4°C 、1 分遠心して $40\ \mu\text{L}$ をサンプリングした。

大腸菌における組換えタンパク質の生産と精製

1. Prepacked Glutathione Sepharose $2\ \text{mL}$ カラム (GE Healthcare) を $10\ \text{mL}$ の PBS で洗浄。
2. $6\ \text{mL PBS} + 1\% \text{ TritonX-100}$ でゲルベッドを平衡化する。
3. $0.45\ \mu\text{m}$ フィルターで濾過した GST 融合タンパク質を含むサンプル溶液をカラムにアプライし、溶出液を捨てる。
4. カラムを $10\ \text{mL PBS}$ 、 $10\ \text{mL PreScission buffer}$ の順に洗浄。
5. GST 融合タンパク質 $100\ \mu\text{g}$ に対し、 $2\ \text{U}$ の PreScission protease (GE Healthcare) を $1.8\ \text{mL}$ の PreScission buffer に溶解後、カラムに添加して上下を閉じ、 4°C で 4 時間静置。
6. 目的タンパク質を溶出する。その後、確認のため、等量すなわち $1.8\ \text{mL}$ の elution buffer でカラム内に残った GST および GST 融合タンパク質を溶出する。
7. カラムの再生には、 $10\ \text{mL}$ ずつの $\text{PBS} + 3\ \text{M NaCl}$ 、 PBS 、 $20\% \text{エタノール}$ の順で洗い、 4°C で保存した。

PreScission buffer : $50\ \text{mM Tris-HCl}$ 、 $10\ \text{mM NaCl}$ 、 $1\ \text{mM EDTA}$ 、 $1\ \text{mM DTT}$ 、 $\text{pH } 8.0$

elution buffer : $5\ \text{mM glutathione}$ in $50\ \text{mM Tris-HCl}$ $\text{pH } 8.0$

Table A 本研究で使用した*A. oryzae* 株

Strain	Genotype
RIB40	Wild type
niaD300	<i>niaD</i> ⁻
NSR13	<i>niaD</i> ⁻ <i>sC</i> ⁻ <i>adeA</i> ⁻
NSRku70-1-1	<i>niaD</i> ⁻ <i>sC</i> ⁻ <i>adeA</i> ⁻ Δ <i>argB</i> Δ <i>ku70::argB</i>
niaD300N-1	<i>niaD</i> ⁻ <i>niaD</i>
NS13	<i>niaD</i> ⁻ <i>sC</i> ⁻ <i>adeA</i> ⁻ <i>adeA</i>
NSRku70-1-1A	<i>niaD</i> ⁻ <i>sC</i> ⁻ <i>adeA</i> ⁻ <i>adeA</i> Δ <i>argB</i> Δ <i>ku70::argB</i>
NSRku70-1-1ASO	<i>niaD</i> ⁻ <i>sC</i> ⁻ :: <i>AosC</i> <i>adeA</i> ⁻ <i>adeA</i> Δ <i>argB</i> Δ <i>ku70::argB</i>
NSRku70-1-1AN	<i>niaD</i> ⁻ :: <i>niaD</i> <i>sC</i> ⁻ <i>adeA</i> ⁻ <i>adeA</i> Δ <i>argB</i> Δ <i>ku70::argB</i>
TE4-1, TE4-2	<i>niaD</i> ⁻ <i>sC</i> ⁻ <i>adeA</i> ⁻ Δ <i>Aoend4</i> ::(<i>PthiA</i> - <i>Aoend4</i> <i>adeA</i>)
AAD1	<i>niaD</i> ⁻ (<i>PamyB</i> - <i>Aoabp1</i> - <i>mdsred</i> <i>niaD</i>)
TEUE3	<i>niaD</i> ⁻ <i>sC</i> ⁻ (<i>PamyB</i> - <i>AouapC</i> - <i>egfp</i> <i>AnsC</i>) <i>adeA</i> ⁻ Δ <i>Aoend4</i> ::(<i>PthiA</i> - <i>Aoend4</i> <i>adeA</i>)
TEUA1	<i>niaD</i> ⁻ (<i>PamyB</i> - <i>Aoabp1</i> - <i>mdsred</i> <i>niaD</i>) <i>sC</i> ⁻ (<i>PamyB</i> - <i>AouapC</i> - <i>egfp</i> <i>AnsC</i>) <i>adeA</i> ⁻ Δ <i>Aoend4</i> ::(<i>PthiA</i> - <i>Aoend4</i> <i>adeA</i>)
TESn1	<i>niaD</i> ⁻ (<i>PamyB</i> - <i>egfp</i> - <i>Aosnc1</i> <i>niaD</i>) <i>sC</i> ⁻ <i>adeA</i> ⁻ Δ <i>Aoend4</i> ::(<i>PthiA</i> - <i>Aoend4</i> <i>adeA</i>)
TEN1	<i>niaD</i> ⁻ <i>niaD</i> <i>sC</i> ⁻ <i>adeA</i> ⁻ Δ <i>Aoend4</i> ::(<i>PthiA</i> - <i>Aoend4</i> <i>adeA</i>)
TEAEN1	<i>niaD</i> ⁻ (<i>PamyB</i> - <i>Aoend4</i> - <i>egfp</i> <i>niaD</i>) <i>sC</i> ⁻ <i>adeA</i> ⁻ Δ <i>Aoend4</i> ::(<i>PthiA</i> - <i>Aoend4</i> <i>adeA</i>)
TEAEA1	<i>niaD</i> ⁻ (<i>PamyB</i> - <i>Aoend4</i> - <i>egfp</i> <i>niaD</i>) <i>sC</i> ⁻ (<i>PamyB</i> - <i>Aoabp1</i> - <i>mdsred</i> <i>AnsC</i>) <i>adeA</i> ⁻ Δ <i>Aoend4</i> ::(<i>PthiA</i> - <i>Aoend4</i> <i>adeA</i>)
DP1, DP2, DP3	<i>niaD</i> ⁻ <i>sC</i> ⁻ <i>adeA</i> ⁻ Δ <i>Aopil1</i> :: <i>adeA</i> Δ <i>argB</i> Δ <i>ku70::argB</i>
AADPEA1	<i>niaD</i> ⁻ (<i>PamyB</i> - <i>Aoabp1</i> - <i>mdsred</i> <i>niaD</i>) <i>sC</i> ⁻ (<i>PpgkA</i> - <i>egfp</i> - <i>aipA</i> <i>AnsC</i>) <i>adeA</i> ⁻ <i>adeA</i> Δ <i>argB</i> Δ <i>ku70::argB</i>
DAIPA1, DAIPA2, DAIPA3	<i>niaD</i> ⁻ <i>sC</i> ⁻ <i>adeA</i> ⁻ Δ <i>aipA</i> :: <i>adeA</i> Δ <i>argB</i> Δ <i>ku70::argB</i>
PaaA1	<i>niaD</i> ⁻ ::(<i>PamyB</i> - <i>aipA</i> <i>niaD</i>) <i>sC</i> ⁻ <i>adeA</i> ⁻ <i>adeA</i> Δ <i>argB</i> Δ <i>ku70::argB</i>
PaHaA1	<i>niaD</i> ⁻ ::(<i>PamyB</i> -3 \times HA- <i>aipA</i> <i>niaD</i>) <i>sC</i> ⁻ <i>adeA</i> ⁻ <i>adeA</i> Δ <i>argB</i> Δ <i>ku70::argB</i>
PaMaA1	<i>niaD</i> ⁻ ::(<i>PamyB</i> -6 \times myc- <i>aipA</i> <i>niaD</i>) <i>sC</i> ⁻ <i>adeA</i> ⁻ <i>adeA</i> Δ <i>argB</i> Δ <i>ku70::argB</i>
PaaA5421	<i>niaD</i> ⁻ ::(<i>PamyB</i> - <i>aipA</i> ^{K542A} <i>niaD</i>) <i>sC</i> ⁻ <i>adeA</i> ⁻ <i>adeA</i> Δ <i>argB</i> Δ <i>ku70::argB</i>
PaaA5961	<i>niaD</i> ⁻ ::(<i>PamyB</i> - <i>aipA</i> ^{E596Q} <i>niaD</i>) <i>sC</i> ⁻ <i>adeA</i> ⁻ <i>adeA</i> Δ <i>argB</i> Δ <i>ku70::argB</i>
abH1	<i>niaD</i> ⁻ <i>sC</i> ⁻ Δ <i>Aoabp1</i> ::(<i>Aoabp1</i> -3 \times HA- <i>TamyB</i> <i>AosC</i>) <i>adeA</i> ⁻ <i>adeA</i> Δ <i>argB</i> Δ <i>ku70::argB</i>
abHDAIPA1	<i>niaD</i> ⁻ <i>sC</i> ⁻ Δ <i>Aoabp1</i> ::(<i>Aoabp1</i> -3 \times HA- <i>TamyB</i> <i>AosC</i>) <i>adeA</i> ⁻ Δ <i>aipA</i> :: <i>adeA</i> Δ <i>argB</i> Δ <i>ku70::argB</i>
abHPaMaA1	<i>niaD</i> ⁻ ::(<i>PamyB</i> -6 \times myc- <i>aipA</i> <i>niaD</i>) <i>sC</i> ⁻ Δ <i>Aoabp1</i> ::(<i>Aoabp1</i> -3 \times HA- <i>TamyB</i> <i>AosC</i>) <i>adeA</i> ⁻ <i>adeA</i> Δ <i>argB</i> Δ <i>ku70::argB</i>
abE1	<i>niaD</i> ⁻ <i>sC</i> ⁻ Δ <i>Aoabp1</i> ::(<i>Aoabp1</i> - <i>egfp</i> - <i>TamyB</i> <i>AosC</i>) <i>adeA</i> ⁻ <i>adeA</i> Δ <i>argB</i> Δ <i>ku70::argB</i>
abEDAIPA1	<i>niaD</i> ⁻ <i>sC</i> ⁻ Δ <i>Aoabp1</i> ::(<i>Aoabp1</i> - <i>egfp</i> - <i>TamyB</i> <i>AosC</i>) <i>adeA</i> ⁻ Δ <i>aipA</i> :: <i>adeA</i> Δ <i>argB</i> Δ <i>ku70::argB</i>
abEPaMaA1	<i>niaD</i> ⁻ ::(<i>PamyB</i> -6 \times myc- <i>aipA</i> <i>niaD</i>) <i>sC</i> ⁻ Δ <i>Aoabp1</i> ::(<i>Aoabp1</i> - <i>egfp</i> - <i>TamyB</i> <i>AosC</i>) <i>adeA</i> ⁻ <i>adeA</i> Δ <i>argB</i> Δ <i>ku70::argB</i>

Table B-1 本研究で使用したプラスミド

Plasmid	Construction	Source
pDONR TM P4-P1R	MultiSite Gateway 5' エントリークローンベクター	Invitrogen
pDONR TM 221	MultiSite Gateway センターエントリークローンベクター	Invitrogen
pDONR TM P2R-P3	MultiSite Gateway 3' エントリークローンベクター	Invitrogen
pDEST TM R4-R3	MultiSite Gateway デスティネーションベクター	Invitrogen
pgDN	pDEST TM R4-R3に $niaD$ マーカを導入	研究室
pgDSN	pDEST TM R4-R3に $AnsC$ マーカを導入	研究室
pgDADE	pDEST TM R4-R3に $adeA$ マーカを導入	研究室
pgDSO	pDEST TM R4-R3に $AosC$ マーカを導入	研究室
pg5'PaB	pDONR TM P4-P1Rに $PamyB$ を導入	研究室
pgEaA	pDONR TM 221に $adeA$ マーカを導入	研究室
pg5'Pt	pDONR TM P4-P1Rに $PthiA$ を導入	研究室
pg5'Pp	pDONR TM P4-P1Rに $PpgkA$ を導入	研究室
pgEE	pDONR TM 221に $egfp$ を導入	研究室
pgEHH	pDONR TM 221に $ha-his6$ を導入	研究室
pg3'E	pDONR TM P2R-P3に $egfp$ を導入	研究室
pg3'HH	pDONR TM P2R-P3に $ha-his6$ を導入	研究室
pg3'DRM-CF	pDONR TM P2R-P3に $mdsred$ を導入	研究室
pg3'non	pDONR TM P2R-P3に Sma Iサイトを導入	研究室
pg5'e4up	pg5'Ppから $PpgkA$ を除き、 $Aoend4$ 上流1.5 kbを導入	本研究
pgEPt	pgEHHから $ha-his6$ を除き、 $PthiA$ を導入	本研究
pgEaAPt	pgEPtに $adeA$ マーカを導入	本研究
pg3'e4	pg3'HHから $ha-his6$ を除き、 $Aoend4$ ORFの開始コドンから1.7 kbを導入	本研究
pgTE4	pg5'e4up、pgEaAPt、pg3'e4、pDEST TM R4-R3をLR反応 インサート両端に $EcoR$ Vサイトを付加	本研究
pg5'DP	pg5'Ppから $PpgkA$ を除き、 $Aopil1$ 上流1.5 kbを導入	本研究
pg3'DP	pg3'HHから $ha-his6$ を除き、 $Aopil1$ 下流1.5 kbを導入	本研究
pgDP1	pg5'DP、pgEaA、pg3'DP、pDEST TM R4-R3をLR反応 インサート両端に Pst Iサイトを付加	本研究
pgEabp1	pgEHHから $ha-his6$ を除き、終止コドンを除いた $Aoabp1$ を導入	本研究
pgAAD1	pg5'PaB、pgEabp1、pg3'DRM-CF、pgDNをLR反応	本研究
pgAADS1	pg5'PaB、pgEabp1、pg3'DRM-CF、pgDSNをLR反応	本研究
pgEuapC	pgEHHから $ha-his6$ を除き、終止コドンを除いた $AouapC$ を導入	Higuchi <i>et al.</i> , 2006
pgAUE	pg5'PaB、pgEuapC、pg3'E、pgDSNをLR反応	Higuchi <i>et al.</i> , 2006
pg3'Snc1	pg3'HHから $ha-his6$ を除き、 $Aosnc1$ を導入	Kuratsu <i>et al.</i> , 2007
pgaESnc1	pg5'PaB、pgEE、pg3'Snc1、pgDNをLR反応	Kuratsu <i>et al.</i> , 2007
pgEend4	pgEHHから $ha-his6$ を除き、終止コドンを除いた $Aoend4$ を導入	本研究
pgAE4	pg5'PaB、pgEend4、pg3'E、pgDNをLR反応	本研究
pg3'aipA	pg3'HHから $ha-his6$ を除き、 $aipA$ を導入	本研究
pgPEAA	pg5'Pp、pgEE、pg3'aipA、pgDSNをLR反応	本研究
pg5'DAA	pg5'Ppから $PpgkA$ を除き、 $aipA$ 上流1.5 kbを導入	本研究
pg3'DAA	pg3'HHから $ha-his6$ を除き、 $aipA$ 下流1.5 kbを導入	本研究
pgDAIPA	pg5'DAA、pgEaA、pg3'DAA、pDEST TM R4-R3をLR反応 インサート両端に Pst Iサイトを付加	本研究
pgEaipA	pgEHHから $ha-his6$ を除き、 $aipA$ を導入	本研究
pgPaaA	pg5'PaB、pgEaipA、pg3'non、pgDNをLR反応	本研究
pgE3HA	pgEHHから $ha-his6$ を除き、3 × HA を導入	本研究
pgPaHaA	pg5'PaB、pgE3HA、pg3'aipA、pgDNをLR反応	本研究
pgE6myc	pgEHHから $ha-his6$ を除き、6 × myc を導入	本研究
pgPaMaA	pg5'PaB、pgE6myc、pg3'aipA、pgDNをLR反応	本研究
pgEaA542	pgEHHから $ha-his6$ を除き、 $aipA^{K542A}$ を導入	本研究
pgPaaA542	pg5'PaB、pgEaA542、pg3'non、pgDNをLR反応	本研究
pgEaA596	pgEHHから $ha-his6$ を除き、 $aipA^{E596Q}$ を導入	本研究
pgPaaA596	pg5'PaB、pgEaA596、pg3'non、pgDNをLR反応	本研究

Table B-2 本研究で使用したプラスミド

Plasmid	Construction	Source
pg5'abp1	pg5'PpからPpgkAを除き、終止コドンを除いたAoabp1ORFの1 kbを導入	本研究
pgE3HATaASO	pgEHHからha-his6を除き、3×HA、TamyB、AosCマーカを導入	本研究
pg3'abp1	pg3'HHからha-his6を除き、Aoabp1下流1 kbを導入	本研究
pgabH	pg5'abp1、pgE3HATaASO、pg3'abp1、pDEST TM R4-R3をLR反応 インサート両端にSpe Iサイトを付加	本研究
pgGaA	pDONR TM 221にegfp、TamyB、adeAマーカを導入	木村、2010
pgabE	pg5'abp1、pgGaA、pg3'abp1、pDEST TM R4-R3をLR反応 インサート両端にSpe Iサイトを付加	本研究
pGBKT7	YTH bait株作製用ベクター	Clontech
pGADT7-Rec2	YTH cDNAライブラリー作製用ベクター	Clontech
pGADT7-Lig	YTH prey株作製用ベクター	本研究
pGB-AoAbp1	pGBKT7をSma Iで切断し、Aoabp1全長のcDNAを導入	本研究
pGB-AoAbp1-ls	pGBKT7をSma Iで切断し、AoAbp1 lsのコード領域を導入	本研究
pGB-AoAbp1-lps	pGBKT7をSma Iで切断し、AoAbp1 lpsのコード領域を導入	本研究
pGB-AoAbp1-PR	pGBKT7をEcoR IサイトとBamH Iで切断し、AoAbp1 PRのコード領域を導入	本研究
pGB-AoAbp1-SH3-1	pGBKT7をNde IサイトとPst Iで切断し、AoAbp1 SH3-1のコード領域を導入	本研究
pGB-AoAbp1-SH3-2	pGBKT7をNde IサイトとPst Iで切断し、AoAbp1 SH3-2のコード領域を導入	本研究
pGB-AoAbp1-SH3	pGBKT7をSma Iで切断し、AoAbp1 SH3のコード領域を導入	本研究
pGA-prey2	pGADT-Rec2のcDNAインサートにprey2を含む	本研究
pGA-prey10	pGADT-Rec2のcDNAインサートにprey10を含む	本研究
pGA-prey11	pGADT-Rec2のcDNAインサートにprey11を含む	本研究
pGA-prey12	pGADT-Rec2のcDNAインサートにprey12を含む	本研究
pGA-prey13	pGADT-Rec2のcDNAインサートにprey13を含む	本研究
pGA-prey14	pGADT-Rec2のcDNAインサートにprey14を含む	本研究
pGA-prey15	pGADT-Rec2のcDNAインサートにprey15を含む	本研究
pGA-AipA	pGADT7-LigのSma IサイトにaipA全長のcDNAを導入	本研究
pGA-AipA1-97	pGADT7-LigのSma IサイトにAipAの1-97アミノ酸残基のコード領域を導入	本研究
pGA-AipA48-530	pGADT7-LigのSma IサイトにAipAの48-530アミノ酸残基のコード領域を導入	本研究
pGA-AipA531-784	pGADT7-LigのSma IサイトにAipAの531-784アミノ酸残基のコード領域を導入	本研究
pGA-AipA98-314	pGADT7-LigのSma IサイトにAipAの98-314アミノ酸残基のコード領域を導入	本研究
pGA-AipA315-530	pGADT7-LigのSma IサイトにAipAの315-530アミノ酸残基のコード領域を導入	本研究
pGA-AipA315-422	pGADT7-LigのSma IサイトにAipAの315-422アミノ酸残基のコード領域を導入	本研究
pGA-AipA423-530	pGADT7-LigのSma IサイトにAipAの423-530アミノ酸残基のコード領域を導入	本研究
pGA-AipA315-345	pGADT7-LigのSma IサイトにAipAの315-345アミノ酸残基のコード領域を導入	本研究
pGA-AipA346-370	pGADT7-LigのSma IサイトにAipAの346-370アミノ酸残基のコード領域を導入	本研究
pGA-AipA371-422	pGADT7-LigのSma IサイトにAipAの371-422アミノ酸残基のコード領域を導入	本研究
pGEX-5X-3	GST融合タンパク質発現用ベクター	野田博士より
pGEX-AoAbp1-SH3	pGEX-5X-3のSal IサイトにAoAbp1 SH3のコード領域を導入	本研究

Table C-1 本研究で使用したプライマー

Target	Primer	Sequence
<i>Aoend4</i> 上流1.5 kb	Aoend4up-F Aoend4up-R	tccGATATCAGGTCGACATACCAGACGAG tccCCCGGGGCTTCGTCACCTCCTGAGTT
<i>Aoend4</i> ORFの開始 コドンから1.7 kb	Aoend4 g-F Aoend4 g-R	ATGAGTCGGTAAGTGTTTTGGGAC tccCTCGAGGATATCGCTCTCCAGGTCTTTCACAC
終止コドンを除いた <i>Aoabp1</i> cDNA	Aoabp1 cDNA-F Aoabp1 cDNA-R	ATGGCATCCCTTAACCTTTC CTTTCGAAGTTCTACATAATTTGC
終止コドンを除いた <i>Aoend4</i> cDNA	Aoend4 cDNA-F Aoend4 cDNA-R	ATGAGTCGCACGGAG GTCCTCCTGGTACGAGATCTT
終止コドンを除いた <i>Aopil1</i> cDNA	Aopil1 cDNA-F Aopil1 cDNA-R	ATGCATCGCACCTATTCCATGCGC GACGCTGACAGGCTCGCGTT
<i>Aopil1</i> 上流1.5 kb	Aopil1up-F Aopil1up-R	CTGCAGCATGGCCTGCGCAATTTTCT GCTACGGTTTGTATGGGAAG
<i>Aopil1</i> 下流1.5 kb	Aopil1dw-F Aopil1dw-R	GCCAATTGCAGCCACAAACA CTGCAGATCACACACAGGATCCAGGA
<i>aipA</i> ORF	attB1-Sma-aipAo-F attB2-Sma-aipAo-R	<u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTACCCGGG</u> ATGATGCGTCCCAAACCGGCGTC <u>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCCCGGG</u> CTATCCACCTCTCTCGCCGAATTG
<i>aipA</i> 上流1 kb	aipAup-F aipAup-R	CTGCAGGCGTCCATTATCAAGCGGCAG TGATCAATTAATCCCAAGGATCTTCGGC
<i>aipA</i> 下流1 kb	aipAdw-F aipAdw-R	ACCTTTCCCTTTTCTCCTCTCTC CTGCAGTGAAACCAATGCAGACCCGGATCC
<i>aipA</i> ^{K542A} 前半	aipA-F aipA-K542A-R	ATGATGCGTCCCAAACCGGCGTC CAAGCATCGTCGCACCCGTC
<i>aipA</i> ^{K542A} 後半	aipA-K542A-F aipA-R	GGACGGGTGCGACGATGCTTG CTATCCACCTCTCTCGCCGAATTGTC
<i>aipA</i> ^{E596Q} 前半	(aipA-F) aipA-E596Q-R	GACAATAGTGAGTCGATTTGGTCCACAAAGATG
<i>aipA</i> ^{E596Q} 後半	aipA-E596Q-F (aipA-R)	CATCTTTGTGGACCAATCGACTCACTATTGTC
終止コドンを除いた <i>Aoabp1</i> ORFの1 kb	Aoabp1-nsc-att-Spe-F Aoabp1-nsc-att-R	<u>GGGGACA</u> ACTTTTGTATAGAAAAGTTGACTAGTAAACGATGCCACGGCAACAG <u>GGGGACTG</u> CTTTTTTGTACAAACTTGCTTTTTCGAAGTTCTACATAATTTGCTGGG
<i>Aoabp1</i> 下流1 kb	Aoabp1-dw-att-F Aoabp1-dw-att-Spe-R	<u>GGGGACAG</u> CTTTCTTGTACAAAGTGGTCCAAGGTGGTGTCTTCCAC <u>GGGGACA</u> ACTTTTGTATAATAAAGTTGACTAGTGAAGCCACGGCTATTGATCTTG

下線を付した配列はGateway systemの組換えに必要な配列。開始コドンおよび終止コドンを
 橙色で示した。小文字は制限酵素の切断助長配列、斜体の配列は制限酵素サイトを示す。
 重複するプライマーは括弧で示した。

Table C-2 本研究で使用したプライマー

Target	Primer	Sequence
Aoabp1 cDNA	Aoabp1 cDNA-F Aoabp1 cDNA-R	AATGGCATCCCTTAACCTTTC TCACTTTTGAAGTTCTACATAATTTGC
AoAbp1 ls のコード領域	Aoabp1-l-F Aoabp1-ls-R	CATGGCATCCCTTAACCTTTTCATCCAATGG GCCGTTGGTCTGGAGGTTGC
AoAbp1 lps のコード領域	(Aoabp1-l-F) Aoabp1-lps-R	TACAGAACGTCCTGTATCCCACGG
AoAbp1 PR のコード領域	Aoabp1-PR-EI-1585-F Aoabp1-PR-BH-1701-R	gGAAATTCCCTCTGCCCGGCTTACCAAC cgGGATCCTGGAGGGGTTGGAGTAGGGG
AoAbp1 SH3-1 のコード領域	Aoabp1SH3-1-Nde-F Aoabp1SH3-1-Pst-R	ggaattcCATA TGATTCAAGCCGTGGTGCAGTAC aaCTGCAGCAGTAGCTCAACATAGTTACTCGG
AoAbp1 SH3-2 のコード領域	Aoabp1SH3-2-Nde-F Aoabp1SH3-2-Pst-R	ggaattcCATA TGCCCACTGCTACAGCGTTGTAT aaCTGCAGTCGAAGTTCTACATAATTTGCTGGGAAG
AoAbp1 SH3 のコード領域	Aoabp1-SH3-F Aoabp1-SH3-R	CATTCAAGCCGTGGTGCAGTA TCGAAGTTCTACATAATTTGCTGGGAAG
AipAの1-97アミノ酸 残基のコード領域	(aipA-F) AipA1-97-R	CGTATCCTTTCTGCTCTCACGGAG
AipAの48-530アミノ酸 残基のコード領域	AipA48-530-F AipA48-530-R	TACTATCATAACGCCTATCGGGTTCCC CCGGGCTGGTTCTCGCAAACAG
AipAの531-784アミノ酸 残基のコード領域	AipA531-784-F (aipA-R)	GGTATGCTCCTCTTTGGACC
AipAの98-314アミノ酸 残基のコード領域	AipA98-314-F AipA98-314-R	TCTGGTAAATCCCCTCCATTCT TGTAGGTGTTGAAGTTGGTGC
AipAの315-530アミノ酸 残基のコード領域	AipA315-530-F (AipA48-530-R)	TCCACCCCTCAGGCTCCGGC
AipAの315-422アミノ酸 残基のコード領域	(AipA315-530-F) AipA315-422-R	CCGTCGTTCCGGACTCGTTCCGG
AipAの423-530アミノ酸 残基のコード領域	AipA423-530-F (AipA48-530-R)	GCTACTCCGCGCATCAGGCGC
AipAの315-345アミノ酸 残基のコード領域	(AipA315-530-F) AipA345-R	CTGAACAGTATCCTTGGAGCCTGTTCGAC
AipAの346-370アミノ酸 残基のコード領域	AipA346-F AipA370-R	CCACGTGCCTCCCCGAAGCC GGGTGTAGGCGGTTGGTAAGACGAC
AipAの371-422アミノ酸 残基のコード領域	AipA371-F (AipA315-422-R)	TCCGGAGGATCTGCGGGTGCTG
AoAbp1 SH3のコード 領域 (SalIサイト付加)	GST-Aoabp1SH3-SI-F GST-Aoabp1SH3-SI-R	ACGCGTGCACATTCAAGCCGTGGTGCAGTA ACGCGTGCAGCTCGAAGTTCTACATAATTTGCTGGG

開始コドンおよび終止コドンを橙色で示した。小文字は制限酵素の切断助長配列、斜体の配列は制限酵素サイトを示す。重複するプライマーは括弧で示した。

参考文献

Abenza JF, Pantazopoulou A, Rodriguez JM, Galindo A, Peñalva MA (2009) Long-distance movement of *Aspergillus nidulans* early endosomes on microtubule tracks. *Traffic* **10**: 57-75.

Aderem A, Underhill DM (1999) Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* **17**: 593-623.

Araujo-Bazán L, Peñalva MA, Espeso EA (2008) Preferential localization of the endocytic internalization machinery to hyphal tips underlies polarization of the actin cytoskeleton in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **67**: 891-905.

Asleson CM, Bensen ES, Gale CA, Melms AS, Kurischko C, Berman J (2001) *Candida albicans* INT1-induced filamentation in *Saccharomyces cerevisiae* depends on Sla2p. *Mol Cell Biol* **21**: 1272-1284.

Babst M, Sato TK, Banta LM, Emr SD (1997) Endosomal transport function in yeast requires a novel AAA-type ATPase, Vps4p. *EMBO J* **16**: 1820-1831.

Babst M, Wendland B, Estepa EJ, Emr SD (1998) The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal endosome function. *EMBO J* **17**: 2982-2993.

Baggett JJ, D'Aquino KE, Wendland B (2003) The Sla2p talin domain plays a role in endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **165**: 1661-1674.

Beach DL, Bloom K (2001) ASH1 mRNA localization in three acts. *Mol Biol Cell* **12**: 2567-2577.

Camacho L, Malho R (2003) Endo/exocytosis in the pollen tube apex is differentially

regulated by Ca^{2+} and GTPases. *J Exp Bot* **54**: 83-92.

Castagnetti S, Behrens R, Nurse P (2005) End4/Sla2 is involved in establishment of a new growth zone in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci* **118**: 1843-1850.

Cheng ZJ, Singh RD, Marks DL, Pagano RE (2006) Membrane microdomains, caveolae, and caveolar endocytosis of sphingolipids. *Mol Membr Biol* **23**: 101-110.

Chigira Y, Abe K, Gomi K, Nakajima T (2002) *chsZ*, a gene for a novel class of chitin synthase from *Aspergillus oryzae*. *Curr Genet* **41**: 261-267.

Cole L, Orlovich DA, Ashford AE (1998) Structure, function, and motility of vacuoles in filamentous fungi. *Fungal Genet Biol* **24**: 86-100.

Conner SD, Schmid SL (2003) Regulated portals of entry into the cell. *Nature* **422**: 37-44.

Drubin DG, Mulholland J, Zhu ZM, Botstein D (1990) Homology of a yeast actin-binding protein to signal transduction proteins and myosin-I. *Nature* **343**: 288-290.

Fischer R, Zekert N, Takeshita N (2008) Polarized growth in fungi--interplay between the cytoskeleton, positional markers and membrane domains. *Mol Microbiol* **68**: 813-826.

Fischer-Parton S, Parton RM, Hickey PC, Dijksterhuis J, Atkinson HA, Read ND (2000) Confocal microscopy of FM4-64 as a tool for analysing endocytosis and vesicle trafficking in living fungal hyphae. *J Microsc* **198**: 246-259.

Galagan JE, Calvo SE, Cuomo C, Ma LJ, Wortman JR, Batzoglou S, Lee SI, Basturkmen M, Spevak CC, Clutterbuck J, Kapitonov V, Jurka J, Scazzocchio C, Farman M, Butler J, Purcell S, Harris S, Braus GH, Draht O, Busch S, D'Enfert C, Bouchier C, Goldman GH, Bell-Pedersen D, Griffiths-Jones S, Doonan JH, Yu J, Vienken K, Pain A, Freitag M, Selker

EU, Archer DB, Penalva MA, Oakley BR, Momany M, Tanaka T, Kumagai T, Asai K, Machida M, Nierman WC, Denning DW, Caddick M, Hynes M, Paoletti M, Fischer R, Miller B, Dyer P, Sachs MS, Osmani SA, Birren BW (2005) Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature* **438**: 1105-1115.

Ge W, Chew TG, Wachtler V, Naqvi SN, Balasubramanian MK (2005) The novel fission yeast protein Pal1p interacts with Hip1-related Sla2p/End4p and is involved in cellular morphogenesis. *Mol Biol Cell* **16**: 4124-4138.

Geli MI, Riezman H (1996) Role of type I myosins in receptor-mediated endocytosis in yeast. *Science* **272**: 533-535.

Gourlay CW, Dewar H, Warren DT, Costa R, Satish N, Ayscough KR (2003) An interaction between Sla1p and Sla2p plays a role in regulating actin dynamics and endocytosis in budding yeast. *J Cell Sci* **116**: 2551-2564.

Hall A, Nobes CD (2000) Rho GTPases: molecular switches that control the organization and dynamics of the actin cytoskeleton. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **355**: 965-970.

Herranz S, Rodriguez JM, Bussink HJ, Sanchez-Ferrero JC, Arst HN Jr, Peñalva MA, Vincent O (2005) Arrestin-related proteins mediate pH signaling in fungi. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 12141-12146.

Higuchi Y, Nakahama T, Shoji JY, Arioka M, Kitamoto K (2006) Visualization of the endocytic pathway in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae* using an EGFP-fused plasma membrane protein. *Biochem Biophys Res Commun* **340**: 784-791.

Holtzman DA, Yang S, Drubin DG (1993) Synthetic-lethal interactions identify two novel genes, *SLA1* and *SLA2*, that control membrane cytoskeleton assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **122**: 635-644.

Iwaki T, Tanaka N, Takagi H, Giga-Hama Y, Takegawa K (2004) Characterization of *end^{d+}*, a gene required for endocytosis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* **21**: 867-881.

Kaksonen M, Sun Y, Drubin DG (2003) A pathway for association of receptors, adaptors, and actin during endocytic internalization. *Cell* **115**: 475-487.

Kaksonen M, Toret CP, Drubin DG (2005) A modular design for the clathrin- and actin-mediated endocytosis machinery. *Cell* **123**: 305-320.

Kaksonen M, Toret CP, Drubin DG (2006) Harnessing actin dynamics for clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**: 404-414.

Kimura S, Maruyama J, Takeuchi M, Kitamoto K (2008) Monitoring global gene expression of proteases and improvement of human lysozyme production in the *nptB* gene disruptant of *Aspergillus oryzae*. *Biosci Biotechnol Biochem* **72**: 499-505.

Kirchhausen T (2000a) Clathrin. *Annu Rev Biochem* **69**: 699-727.

Kirchhausen T (2000b) Three ways to make a vesicle. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**: 187-198.

Kuratsu M, Taura A, Shoji JY, Kikuchi S, Arioka M, Kitamoto K (2007) Systematic analysis of SNARE localization in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genet Biol* **44**: 1310-1323.

Liberzon A, Shpungin S, Bangio H, Yona E, Katcoff DJ (1996) Association of yeast SAP1, a novel member of the 'AAA' ATPase family of proteins, with the chromatin protein SIN1. *FEBS Lett* **388**: 5-10.

Machida M, Asai K, Sano M, Tanaka T, Kumagai T, Terai G, Kusumoto K, Arima T, AkitaO,

Kashiwagi Y, Abe K, Gomi K, Horiuchi H, Kitamoto K, Kobayashi T, Takeuchi M, Denning DW, Galagan JE, Nierman WC, Yu J, Archer DB, Bennett JW, Bhatnagar D, Cleveland TE, Fedorova ND, Gotoh O, Horikawa H, Hosoyama A, Ichinomiya M, Igarashi R, Iwashita K, Juvvadi PR, Kato M, Kato Y, Kin T, Kokubun A, Maeda H, Maeyama N, Maruyama J, Nagasaki H, Nakajima T, Oda K, Okada K, Paulsen I, Sakamoto K, Sawano T, Takahashi M, Takase K, Terabayashi Y, Wortman JR, Yamada O, Yamagata Y, Anazawa H, Hata Y, Koide Y, Komori T, Koyama Y, Minetoki T, Suharnan S, Tanaka A, Isono K, Kuhara S, Ogasawara N, Kikuchi H (2005) Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature* **438**: 1157-1161.

Mabashi Y, Kikuma T, Maruyama J, Arioka M, Kitamoto K (2006) Development of a versatile expression plasmid construction system for *Aspergillus oryzae* and its application to visualization of mitochondria. *Biosci Biotechnol Biochem* **70**: 1882-1889.

Maruyama J, Kikuchi S, Kitamoto K (2006) Differential distribution of the endoplasmic reticulum network as visualized by the BipA-EGFP fusion protein in hyphal compartments across the septum of the filamentous fungus, *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genet Biol* **43**: 642-654.

Mukherjee S, Ghosh RN, Maxfield FR (1997) Endocytosis. *Physiol Rev* **77**: 759-803.

Mulholland J, Preuss D, Moon A, Wong A, Drubin D, Botstein D (1994) Ultrastructure of the yeast actin cytoskeleton and its association with the plasma membrane. *J Cell Biol* **125**: 381-391.

Munn AL (2000) The yeast endocytic membrane transport system. *Microsc Res Tech* **51**: 547-562.

Newpher TM, Smith RP, Lemmon V, Lemmon SK (2005) *In vivo* dynamics of clathrin and its adaptor-dependent recruitment to the actin-based endocytic machinery in yeast. *Dev Cell*

9: 87-98.

Newpher TM, Lemmon SK (2006) Clathrin is important for normal actin dynamics and progression of Sla2p-containing patches during endocytosis in yeast. *Traffic* **7**: 574-588.

Ohneda M, Arioka M, Nakajima H, Kitamoto K (2002) Visualization of vacuoles in *Aspergillus oryzae* by expression of CPY-EGFP. *Fungal Genet Biol* **37**: 29-38.

Olazabal IM, Machesky LM (2001) Abp1p and cortactin, new "hand-holds" for actin. *J Cell Biol* **154**: 679-682.

Osmani AH, Oakley BR, Osmani SA (2006) Identification and analysis of essential *Aspergillus nidulans* genes using the heterokaryon rescue technique. *Nat Protoc* **1**: 2517-2526.

Peñalva MA (2005) Tracing the endocytic pathway of *Aspergillus nidulans* with FM4-64. *Fungal Genet Biol* **42**: 963-975.

Peñalva MA, Tilburn J, Bignell E, Arst HN Jr (2008) Ambient pH gene regulation in fungi: making connections. *Trends Microbiol* **16**: 291-300.

Polo S, Di Fiore PP (2006) Endocytosis conducts the cell signaling orchestra. *Cell* **124**: 897-900.

Raths S, Rohrer J, Crausaz F, Riezman H (1993) *end3* and *end4*: two mutants defective in receptor-mediated and fluid-phase endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **120**: 55-65.

Read ND, Kalkman ER (2003) Does endocytosis occur in fungal hyphae? *Fungal Genet Biol* **39**: 199-203.

Saksena S, Wahlman J, Teis D, Johnson AE, Emr SD (2009) Functional reconstitution of ESCRT-III assembly and disassembly. *Cell* **136**: 97-109.

Schmid SL (1997) Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process. *Annu Rev Biochem* **66**: 511-548.

Schnall R, Mannhaupt G, Stucka R, Tauer R, Ehnle S, Schwarzlose C, Vetter I, Feldmann H (1994) Identification of a set of yeast genes coding for a novel family of putative ATPases with high similarity to constituents of the 26S protease complex. *Yeast* **10**: 1141-1155.

Shaw JD, Cummings KB, Huyer G, Michaelis S, Wendland B (2001) Yeast as a model system for studying endocytosis. *Exp Cell Res* **271**: 1-9.

Shoji JY, Maruyama J, Arioka M, Kitamoto K (2005) Development of *Aspergillus oryzae* *thiA* promoter as a tool for molecular biological studies. *FEMS Microbiol Lett* **244**: 41-46.

Shoji JY, Arioka M, Kitamoto K (2006) Vacuolar membrane dynamics in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Eukaryot Cell* **5**: 411-421.

Smythe E, Ayscough KR (2006) Actin regulation in endocytosis. *J Cell Sci* **119**: 4589-4598.

Stefan CJ, Padilla SM, Audhya A, Emr SD (2005) The phosphoinositide phosphatase Sjl2 is recruited to cortical actin patches in the control of vesicle formation and fission during endocytosis. *Mol Cell Biol* **25**: 2910-2923.

Sun Y, Kaksonen M, Madden DT, Schekman R, Drubin DG (2005) Interaction of Sla2p's ANTH domain with PtdIns(4,5)P₂ is important for actin-dependent endocytic internalization. *Mol Biol Cell* **16**: 717-730.

Taheri-Talesh N, Horio T, Araujo-Bazan L, Dou X, Espeso EA, Penalva MA, Osmani SA, Oakley BR (2008) The tip growth apparatus of *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell* **19**: 1439-1449.

Takeshita N, Ohta A, Horiuchi H (2005) CsmA, a class V chitin synthase with a myosin motor-like domain, is localized through direct interaction with the actin cytoskeleton in *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell* **16**: 1961-1970.

Takeshita N, Yamashita S, Ohta A, Horiuchi H (2006) *Aspergillus nidulans* class V and VI chitin synthases CsmA and CsmB, each with a myosin motor-like domain, perform compensatory functions that are essential for hyphal tip growth. *Mol Microbiol* **59**: 1380-1394.

Torralba S, Heath IB (2002) Analysis of three separate probes suggests the absence of endocytosis in *Neurospora crassa* hyphae. *Fungal Genet Biol* **37**: 221-232.

Tsuizaki M, Takeshita N, Ohta A, Horiuchi H (2009) Myosin motor-like domain of the class VI chitin synthase CsmB is essential to its functions in *Aspergillus nidulans*. *Biosci Biotechnol Biochem* **73**: 1163-1167.

Upadhyay S, Shaw BD (2008) The role of actin, fimbrin and endocytosis in growth of hyphae in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **68**: 690-705.

Vida TA, Emr SD (1995) A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast. *J Cell Biol* **128**: 779-792.

Walther TC, Brickner JH, Aguilar PS, Bernales S, Pantoja C, Walter P (2006) Eisosomes mark static sites of endocytosis. *Nature* **439**: 998-1003.

Wedlich-Söldner R, Bolker M, Kahmann R, Steinberg G (2000) A putative endosomal

t-SNARE links exo- and endocytosis in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *EMBO J* **19**: 1974-1986.

Wesp A, Hicke L, Palecek J, Lombardi R, Aust T, Munn AL, Riezman H (1997) End4p/Sla2p interacts with actin-associated proteins for endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **8**: 2291-2306.

White SR, Lauring B (2007) AAA+ ATPases: achieving diversity of function with conserved machinery. *Traffic* **8**: 1657-1667.

Yamashita RA, May GS (1998) Constitutive activation of endocytosis by mutation of *myoA*, the myosin I gene of *Aspergillus nidulans*. *J Biol Chem* **273**: 14644-14648.

Yang S, Ayscough KR, Drubin DG (1997) A role for the actin cytoskeleton of *Saccharomyces cerevisiae* in bipolar bud-site selection. *J Cell Biol* **136**: 111-123.

Yang S, Cope MJ, Drubin DG (1999) Sla2p is associated with the yeast cortical actin cytoskeleton via redundant localization signals. *Mol Biol Cell* **10**: 2265-2283.

Zhang D, Rogers GC, Buster DW, Sharp DJ (2007) Three microtubule severing enzymes contribute to the "Pacman-flux" machinery that moves chromosomes. *J Cell Biol* **177**: 231-242.

木村 信弥 2010 博士論文

早川 雄悟 2010 修士論文

略語一覽

AAA	ATPases associated with diverse cellular activities
AipA	AoAbp1 interacting protein
AoUapC	<i>Aspergillus oryzae</i> uric acid-xanthine permease
DIC	differential interference contrast
DOGAN	database of the genomes analyzed at NITE
EGFP	enhanced green fluorescent protein
ESCRT	endosomal sorting complexes required for transport
FM4-64	<i>N</i> -(3-triethylammoniumpropyl)-4-(<i>p</i> -diethyl-aminophenyl-hexatrienyl)pyridinium dibromide
FRAP	fluorescent recovery after photobleaching
mDsRed	monomeric <i>Discosoma sp.</i> red fluorescent protein
MVB	multivesicular body
Pgene	promoter
RACE	rapid amplification of cDNA ends
RT-PCR	reverse transcription-polymerase chain reaction
SGD	<i>Saccharomyces</i> genome database
SNARE	soluble NSF attachment protein receptor
Tgene	terminator
uORF	upstream open reading frame
YTH	yeast two-hybrid

発表論文一覧

Hatakeyama, R., Nakahama, T., Higuchi, Y., Kitamoto, K. (2007) Light represses conidiation in koji mold *Aspergillus oryzae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 1844-1849.

Higuchi, Y., Nakahama, T., Shoji, J.Y., Arioka, M., Kitamoto, K. (2006) Visualization of the endocytic pathway in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae* using an EGFP-fused plasma membrane protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **340**, 784-791.

Higuchi, Y., Shoji, J.Y., Arioka, M., Kitamoto, K. (2009) Endocytosis is crucial for cell polarity and apical membrane recycling in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Eukaryot. Cell*, **8**, 37-46.

Higuchi, Y., Arioka, M., Kitamoto, K. (2009) Endocytic recycling at the tip region in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Commun. Integr. Biol.*, **2**, 327-328.

Takaya, K., Higuchi, Y., Kitamoto, K., Arioka, M. (2009) A cytosolic phospholipase A(2)-like protein in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae* localizes to the intramembrane space of the mitochondria. *FEMS Microbiol. Lett.*

正路淳也、樋口裕次郎、丸山潤一 (2006) 麹菌を用いた糸状菌細胞細胞生物学の進展 日本生物工学会誌、84 巻、364-366.

正路淳也、樋口裕次郎、丸山潤一、北本勝ひこ (2008) 糸状菌オルガネラの形態とその極性依存的な配置 蛋白質核酸酵素、53 巻、753-759.

要旨

真核生物は、オルガネラ間での物質輸送の手段として細胞内小胞輸送系を発達させている。ゴルジ体以降の分泌およびエンドサイトーシス経路は、ポストゴルジネットワークとして輸送網を形成している。細胞膜タンパク質や細胞外の物質は、エンドサイトーシスにより、細胞膜の陥入によって生じる小胞中に取り込まれて細胞内へ送られ、初期エンドソームへと至る。この後、分解されるべき物質は後期エンドソームからリソソーム/液胞へと運ばれ、リサイクリングされるべき物質は直接、またはゴルジ体を経て間接的に細胞膜へと再輸送される。エンドサイトーシスの機構は真核生物において広く保存されており、シグナル伝達、細胞極性の再構築、外界からの栄養分取得、細胞膜や細胞膜タンパク質の細胞内への取り込みにおいて重要な役割を有する。

エンドサイトーシスに関する研究は、動物細胞や出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において進んでいる。一方、麴菌 *Aspergillus oryzae* を含む糸状菌においては、エンドサイトーシスを可視化する目的で、FM4-64 などの染色試薬や、内在性の細胞膜タンパク質であるプリントランスポーターAoUapC と EGFP との融合タンパク質を用いた実験系が近年構築されたばかりであり¹⁾、エンドサイトーシスの詳細な機構や生理学的解析は未だほとんど行われていない。そこで本研究では、糸状菌におけるエンドサイトーシスの機構とその生理学的意義を明らかにすることを目的とし、まずエンドサイトーシス欠損株を用いた表現型解析を行った。

1. *Aoend4* 条件発現株を用いたエンドサイトーシスに関する解析^{2),3)}

糸状菌におけるエンドサイトーシスの生理学的機能解析を行うため、*S. cerevisiae* において解析の進んでいるエンドサイトーシス関連遺伝子の *END4/SLA2* の *A. oryzae* におけるホモログ *Aoend4* の条件発現株を作製した。*Aoend4* の発現抑制条件下においては、菌糸の生育が著しく阻害され、先端生長に異常をきたしていることが示唆された。また、高塩濃度および高浸透圧ストレス条件下において、生育はより強く阻害され、ストレス感受性であることが示された。さらに、AoUapC-EGFP およびエンドサイトーシス経路の染色試薬である FM4-64 を用いた解析により、エンドサイトーシスが起こっていないことを確認した。

細胞壁合成酵素などの先端生長に必要な因子は、エンドサイトーシスによって先端にリサイクリングされていると考えられてきたが、その直接的な証拠はほとんど示されていない。そこで、エンドサイトーシスと先端生長との関わりについてより詳細な

解析を行った。エンドソームに局在し、分泌に関与する 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を可視化した。FRAP (fluorescent recovery after photobleaching) を用いた解析により、EGFP-AoSnc1 は主に菌糸先端部に局在し、先端部をリサイクリングしていることが示唆された。一方、*Aoend4* 発現抑制条件下では、EGFP-AoSnc1 は細胞膜全体に局在する様子が観察され、エンドサイトーシスによるリサイクリングに異常をきたしていると考えられた。

Aoend4 の発現抑制条件下では、細胞膜上にエンドサイトーシスによる取り込み不全が原因と考えられる陥入様構造が観察された。この陥入様構造は細胞壁の染色試薬である Calcofluor White により染色されたことから、エンドサイトーシスが欠損したことにより、取り込み部位に細胞壁成分が蓄積したものと示唆された。また、電子顕微鏡観察によっても陥入様構造に細胞壁が蓄積していることが確認された。さらに、先端生長に関連する細胞壁合成酵素群の発現量を解析したところ、*Aoend4* 発現抑制条件下では *Aoend4* 発現時より発現の上昇が確認された。このことから、エンドサイトーシス欠損により細胞壁合成酵素群がリサイクリングされず、発現が上昇している可能性が考えられた。

2. エンドサイトーシス関連因子の探索

エンドサイトーシスにおいて機能すると考えられる AoAbp1、AoEnd4 の局在解析から、糸状菌におけるエンドサイトーシスは、菌糸先端部において最も活発に行われていると示唆された。また、エンドサイトーシスを欠損した菌糸では、先端生長が著しく阻害されたことから、エンドサイトーシスは先端生長と密接に関連していると考えられた。以上の結果と、先端生長が糸状菌において特徴的な機構であることを考え合わせると、菌糸先端部における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、エンドサイトーシスにおけるタンパク質間相互作用において機能する SH3 (Src-homology 3) ドメインを C 末端に 2 つ有するという特徴的なタンパク質である AoAbp1 を bait とし、yeast two-hybrid (YTH) スクリーニングによって *A. oryzae* におけるエンドサイトーシス関連因子の探索を行った。

AoAbp1 を bait とし、*A. oryzae* の cDNA ライブラリーを prey とした YTH スクリーニングを行った。レポーターには *HIS3*、*ADE2* の 2 種類の栄養要求性遺伝子を用い、2 回のスクリーニングによって、 2.2×10^6 のコロニーをスクリーニングした。スクリーニング用のプレートにおいて、bait と prey の相互作用が強いと考えられる、コロニーサイズの大きなものから順に、42 のクローンから cDNA インサートのシークエンスを行ったところ、16 の独立した ORF が見出された。その内、*A. oryzae* データベ

スのアノテーション情報を基に、細胞内輸送に関連があるかもしくは機能未知遺伝子の一部である *prey* に関して、YTH による再現性確認を行ったところ、5 つのポジティブクローンを得た。この内の 2 つは、同一遺伝子の一部であったことから、YTH スクリーニングの結果、AoAbp1 と相互作用するタンパク質をコードする 4 遺伝子を見出した。

YTH スクリーニングにより得られた *prey* の cDNA クローンの 1 つから、AAA (ATPases associated with diverse cellular activities) ATPase をコードすると予想される遺伝子の一部を見出した。AAA ATPase はその名の通り、細胞内のさまざまな部位において機能する ATPase であり、これまで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ものが報告されている。YTH 解析により、この *prey* は AoAbp1 の 2 つの SH3 ドメインと相互作用することが示された。そこで、この *prey* をコードする遺伝子を *aipA* (AoAbp1 interacting protein) と名付けた。

3. AAAATPase 様タンパク質 AipA の機能解析

RACE 解析により *aipA* 全長をクローニングした結果、AipA は 784 アミノ酸から構成されると予想された。また、モチーフ検索の結果、AipA は N 末端付近に coiled-coil 領域を持ち、C 末端付近に AAA ATPase ドメインを持つと推定された。*S. cerevisiae* においては、AipA のオルソログは Sap1p と Yta6p の 2 つが存在し、共に AAA ATPase と推定されているものの、それらの生理的機能はわかっていない。AipA と AoAbp1 の相互作用部位を特定するため、YTH による AipA の欠失解析を行った。その結果、AipA の coiled-coil ドメインおよび AAA ATPase ドメインは AoAbp1 の SH3 ドメインと相互作用せず、両ドメインの間にあたる 315~422 アミノ酸残基の領域が AoAbp1 の SH3 ドメインと相互作用することが明らかとなった。さらに、AoAbp1 の 2 つの SH3 ドメインの組換えタンパク質と GST との融合タンパク質を調製し、*A. oryzae* において 6×Myc-AipA を発現する株の細胞抽出液を用いて GST プルダウンアッセイを行い、これらが *in vitro* において結合することを確認した。次に、AipA の細胞内局在を解析するため、EGFP-AipA および AoAbp1-mDsRed 発現株を作製したところ、それらは菌糸先端部においてよく共局在したことから、AipA がエンドサイトーシスにおいて機能している可能性が考えられた。

AipA の機能解析を行うため、*aipA* 破壊株の作製を行った。*aipA* 破壊株ではさまざまな培地条件においても顕著な生育阻害が見られず、AipA と機能の重複したタンパク質の存在が示唆された。一方、*aipA* 高発現株では生育の低下が見られた。しかし、AAA ATPase ドメインに点変異を導入した *aipA* の高発現株では生育の低下が見られなかったことから、AipA が機能的であるためには、AipA の AAAATPase ドメインが正

常に機能する必要があることが示唆された。

まとめ

糸状菌において、エンドサイトーシスは菌糸先端部で最も活発に行われ、菌糸の先端生長に必要な因子をリサイクリングすることにおいて機能していることが強く示唆された。麴菌 *A. oryzae* は、産業上非常に有用な菌種であり、アミラーゼなどの酵素を大量に菌体外に分泌する能力を持つ。このことを可能にするのが、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、麴菌 *A. oryzae* が糸状菌における先端生長およびエンドサイトーシスのメカニズムの研究において、今後一層魅力的な生物であると考えられた。

エンドサイトーシスとエキソサイトーシスおよび先端生長が、糸状菌において相互に密接な関係を有することを考えると、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と予想された。AoAbp1 を bait にした YTH スクリーニングによって見出された AAA ATPase 様の AipA は、AoAbp1 と *in vitro* において相互作用することが示された。また、*in vivo* においても、菌糸先端部において AipA と AoAbp1 は共局在することが確認された。以上の結果から、AoAbp1 がエンドサイトーシス関連因子であることを考えると、AipA もまたエンドサイトーシスにおいて機能することが強く示唆された。エンドサイトーシスにおいて機能する AAA ATPase は、全生物種を通じてもこれまでに報告はされておらず、エンドサイトーシスの活発に行われていると予想される *A. oryzae* において、エンドサイトーシス関連因子をエンドサイトーシス小胞から細胞質へとリサイクリングするのに機能しているのかもしれない。

- 1) Higuchi, Y., Nakahama, T., Shoji, J.Y., Arioka, M., Kitamoto, K. (2006) Visualization of the endocytic pathway in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae* using an EGFP-fused plasma membrane protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **340**, 784-791.
- 2) Higuchi, Y., Shoji, J.Y., Arioka, M., Kitamoto, K. (2009) Endocytosis is crucial for cell polarity and apical membrane recycling in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Eukaryot. Cell*, **8**, 37-46.
- 3) Higuchi, Y., Arioka, M., Kitamoto, K. (2009) Endocytic recycling at the tip region in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Commun. Integr. Biol.*, **2**, 327-328.

謝辞

稿を終えるに際し、これまで6年間ご指導を賜りました東京大学大学院 農学生命科学研究科 応用生命工学専攻 微生物学研究室 教授、北本勝ひこ博士に篤く御礼申し上げます。卒論生で配属の際に、先生の話された「日本の香りのするサイエンス」の進展に自分は少しでも貢献できたことと思います。博士課程進学を決めてご相談した際に、先生は「今後は、自分の研究を通じて世の中に還元するという意識をより強く持つように」とおっしゃられました。今後もその言葉を胸に刻みつけて研究していきたいと思います。修士2年時から4年間、毎年1回海外の学会に参加させていただき、多くの貴重な経験を積ませていただきました。そして、先生と海外の学会で一緒にさせていただいた際に、研究はもちろんのこと、現地で何事にもアクティブに行動され、全ての物事に深い洞察力をもって接するその態度を学びました。微生物学研究室で学んだこの6年間は、自分にとって大きく成長できた大変有意義な時間でした。しかし、まだまだ未熟な点が多いのも自覚しております。今後とも何卒御指導・御鞭撻の程宜しくお願い致します。

研究室配属以来、3号館においてご指導いただきました、東京大学大学院 農学生命科学研究科 応用生命工学専攻 微生物学研究室 准教授、有岡学博士に深く御礼申し上げます。卒論生時に、自分の研究テーマに対して理論武装し、研究を進めていくことの重要性を教わりました。6年間を通じて、週一回の研究進捗報告においては、常に厳しい視点で研究の手法から方向性に関して多くのご指摘をいただきました。それにより、迷いなく研究を進めることができたことに感謝致します。先生の研究に対する厳しい姿勢は、常にこの6年間、怠惰な自分のお手本でした。今後少しでも近付いていけるよう努力していく所存です。

度々有意義なディスカッションをして下さいました東京大学大学院 農学生命科学研究科 応用生命工学専攻 微生物学研究室 助教、丸山潤一博士に御礼申し上げます。居室が離れていたため、普段はあまりお話できませんでしたが、お会いした際は研究の進捗状況を気にかけて下さったことに感謝しております。幅広い知識と実際に研究の現場に近いところからの先生から頂いた数々の実験に関するご提言は、幾度と無く研究の手助けになりました。

学生実験の時からお世話になり、1年弱と短い間ではありましたがご指導いただきました、明治大学 教授 中島春紫博士に御礼申し上げます。学会等でお会いし、自分の研究の進展状況を聞いて下さり、その際に自分の将来に対して、「お前なら大丈夫だよ」といつも激励して下さったことが大変自信になりました。

博士論文審査をしていただきました、東京大学大学院 農学生命科学研究科 応用生命工学専攻 分子生命工学研究室 教授、依田幸司博士、同 細胞遺伝学研究室 准教授 堀内裕之博士、同 醗酵学研究室 准教授 大西康夫博士に御礼申し上げます。審査会では、非常に有意義な示唆を多く与えていただき、それを基に博士論文をより良い物へとすることができました。

電子顕微鏡のサンプル調製法およびその使用法を教えてくださいました、東京大学大学院 農学生命科学研究科 生産・環境生物学専攻 植物病理学研究室 准教授、山下修一博士に御礼申し上げます。先生の丁寧な実演による指導により、電子顕微鏡観察法を習得することができました。残念ながら、電子顕微鏡解析は1度のみでしたが、今後機会があれば積極的に利用していきたいと思えます。

生化学実験に関する材料と方法を教えてくださいました、東京大学大学院 農学生命科学研究科 応用生命工学専攻 分子生命工学研究室 助教、野田陽一博士、マンチェスター大学 研究員 佐藤啓介博士に御礼申し上げます。お忙しい中、突然の来訪にも関わらず迅速に対応して下さり、またその後の質問にも丁寧に応対して下さいました。それにより、実験をスムーズに成功させることができました。

実験操作に限らず、研究に関するさまざまなことを教えていただき学ばせていただきました、琉球大学 助教 渡邊泰祐博士に御礼申し上げます。自分の卒論配属と渡邊先生が当時ポスドクとして微生物学研究室に入室されたのが同期ということもあり、事ある毎に自分のことを気にかけて下さいました。研究者としての将来像に関して相談した際に、「樋口なら大丈夫」と言って下さったことで自信を深めることができ、迷い無く研究に打ち込むことができました。

卒論生の時分より大変お世話になり、常に的確かつ有意義なディスカッションをしていただきました正路淳也博士に御礼申し上げます。自分のささいな疑問や考えに対して親身に対応して下さいました。また、自分の研究を最も把握してくださっていたからこそ、常に厳しい目で意見を言っていたいただいたことに感謝致します。普段からそうしたディスカッションを行っていたからこそ、投稿論文作成の際にはあまり苦勞す

ること無く行えたのだと思います。

実験手法から研究のディスカッションに至るまで多くの有意義なご助言をいただきました Praveen Rao Juvvadi 博士、金鋒傑博士、菊間隆志博士、正井久美子博士、竹下典男博士、尹載宇博士に御礼申し上げます。

卒論生の時に、研究・実験・遊び全てに打ち込むその姿勢を教わりました、現 サントリー株式会社、中濱智之氏に感謝致します。実験で忙しい最中、昼はソフトボールに、そして夜は毎週末麻雀をしていたあの頃が懐かしいです。卒業後も現在に至るまで、研究室に度々顔を出して下さり、自分の現状に気をかけて下さりました。今思えば、自分が卒論生時代に厳しく指導していただいたことが今にまで生きているのだと実感しています。中濱さんがいなければ、学位取得に至る自分はいませんでした。本当に心から感謝致します。そして、今後とも宜しくお願い致します。

微生物学研究室の皆様には大変お世話になりました。同期の木村信弥博士は、これからもお互いの道を頑張って進んでいきましょう。同じ3号館に在籍した皆様には大変お世話になりました。特に、自分が博士3年時に一緒だった皆さんには色々と自分の気づかないところでも気を配ってもらったと思い、本当に感謝しています。自分が日々気持ち良く研究室で研究・実験に打ち込めたのは皆様のおかげです。ありがとうございました。

最後に、自分の博士課程進学を快諾し、これまでの学生生活を全ての面で支えてくれた両親、家族、親族に心から感謝致します。

平成 22 年 3 月

樋口 裕次郎

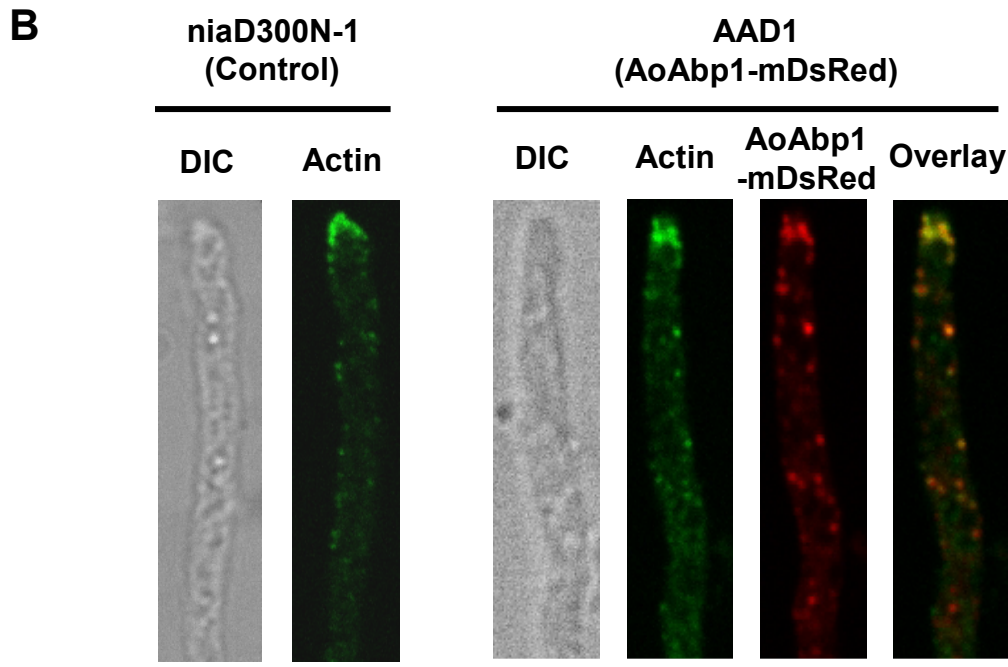
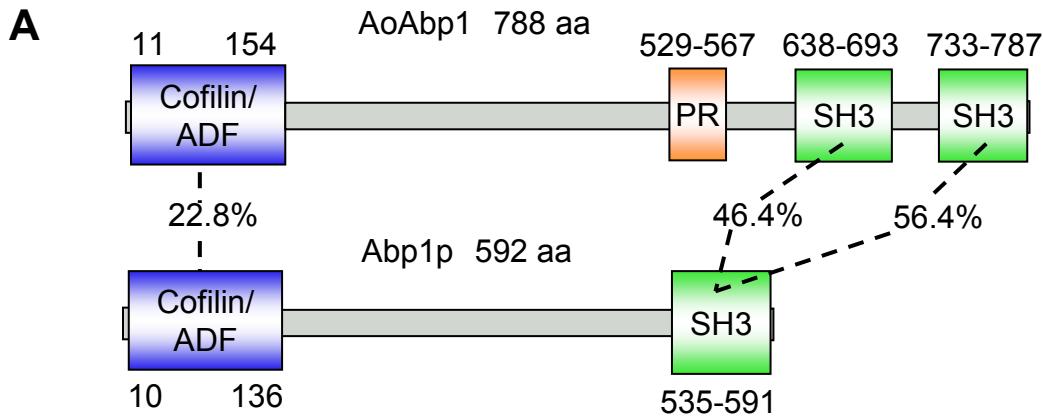


Fig. 1-10 AoAbp1のモチーフ解析と細胞内局在観察

(A) *A. oryzae* AoAbp1と*S. cerevisiae* Abp1pのモチーフ解析。アミノ酸残基数と対応するドメインとの相同性を示した。

(B) 各株の分生子をCD液体培地に植菌し、30°Cで17時間培養した後、抗アクチン抗体を用いた間接蛍光抗体法により、アクチンの細胞内局在を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。AAD1株において、AoAbp1-mDsRedとアクチンは菌糸先端部において特に共局在していた。コントロール株においてもアクチンは同様の局在を示したことから、AAD1株においてAoAbp1-mDsRedを発現させたことによるアクチンの局在への影響はほぼ無いと考えられる。スケールバーは5 μm。

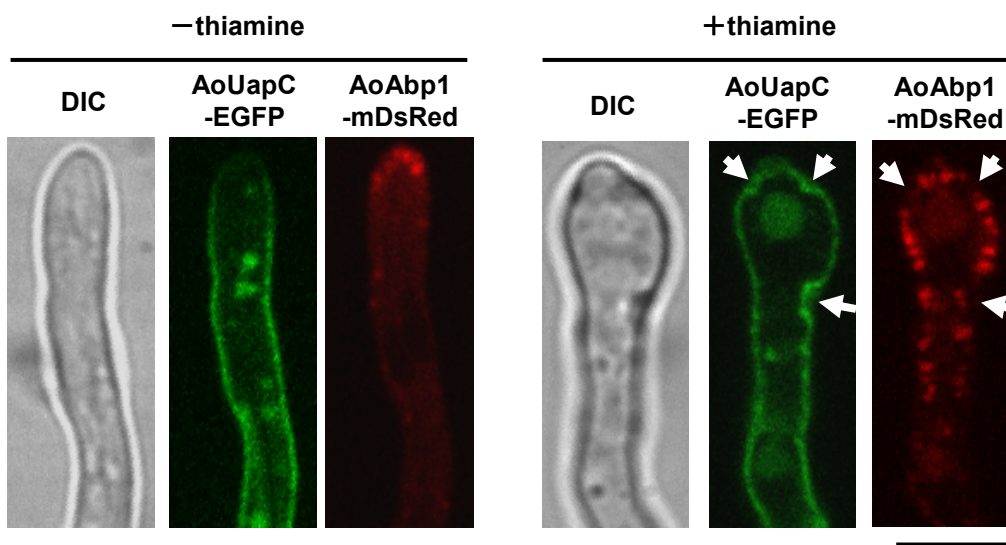


Fig. 1-11 *Aoend4* の発現抑制条件下におけるアクチンパッチの異常

TEUA1株の分生子をMM±チアミン液体培地に植菌し、30°Cで18時間培養した後、菌糸を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。*Aoend4*の発現条件下では、AoAbp1-mDsRedは菌糸先端部に主に局在していた。一方、*Aoend4*の発現抑制条件下では、AoAbp1-mDsRedの局在は菌糸先端部に限らない細胞膜上に見られた。また、AoAbp1-mDsRedは異常陥入構造には見られなかった(矢印)。スケールバーは、5 μm 。

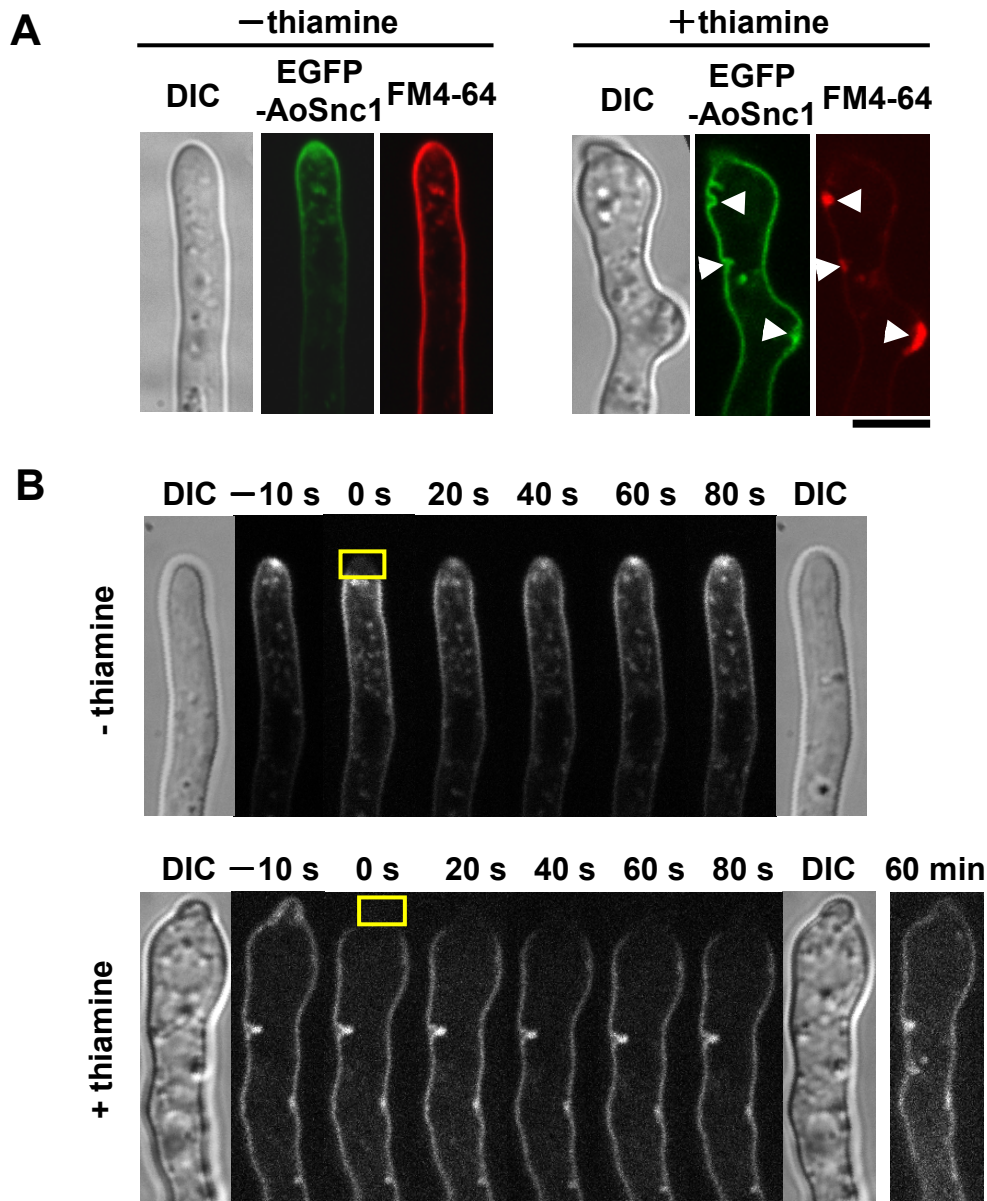


Fig. 1-12 *Aoend4*の発現抑制条件下における菌糸先端部でのエンドサイトーシスによるリサイクリングおよび分泌の異常

(A) TESn1株の分生子をCDm±チアミン液体培地に植菌して30°Cで18時間培養し、FM4-64染色を行った後、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。*Aoend4*発現条件下では、EGFP-AoSnc1は、FM4-64によって共染色された細胞膜およびエンドソームに局在し、主に菌糸先端部に局在していた。この局在は、菌糸先端部においてエンドサイトーシスによってリサイクリングされているからであると示唆された。一方、*Aoend4*発現抑制条件下では、EGFP-AoSnc1は菌糸先端部に限らず細胞膜全体に拡散して見られた。これは、エンドサイトーシス欠損により、菌糸先端部へEGFP-AoSnc1がリサイクリングされないためと考えられた。矢頭は異常陥入構造を示す。

(B) TESn1株の分生子をCDm±チアミン液体培地に植菌して30°Cで17時間培養し、共焦点レーザー顕微鏡にて菌糸先端部におけるFRAP解析を行った。表示時間は消光からの経過時間を示し、黄色枠内において消光を行った。エンドサイトーシス欠損条件下では、EGFP-AoSnc1の分泌の異常が見られた。スケールバーは、(A)、(B)ともに5 μ m。

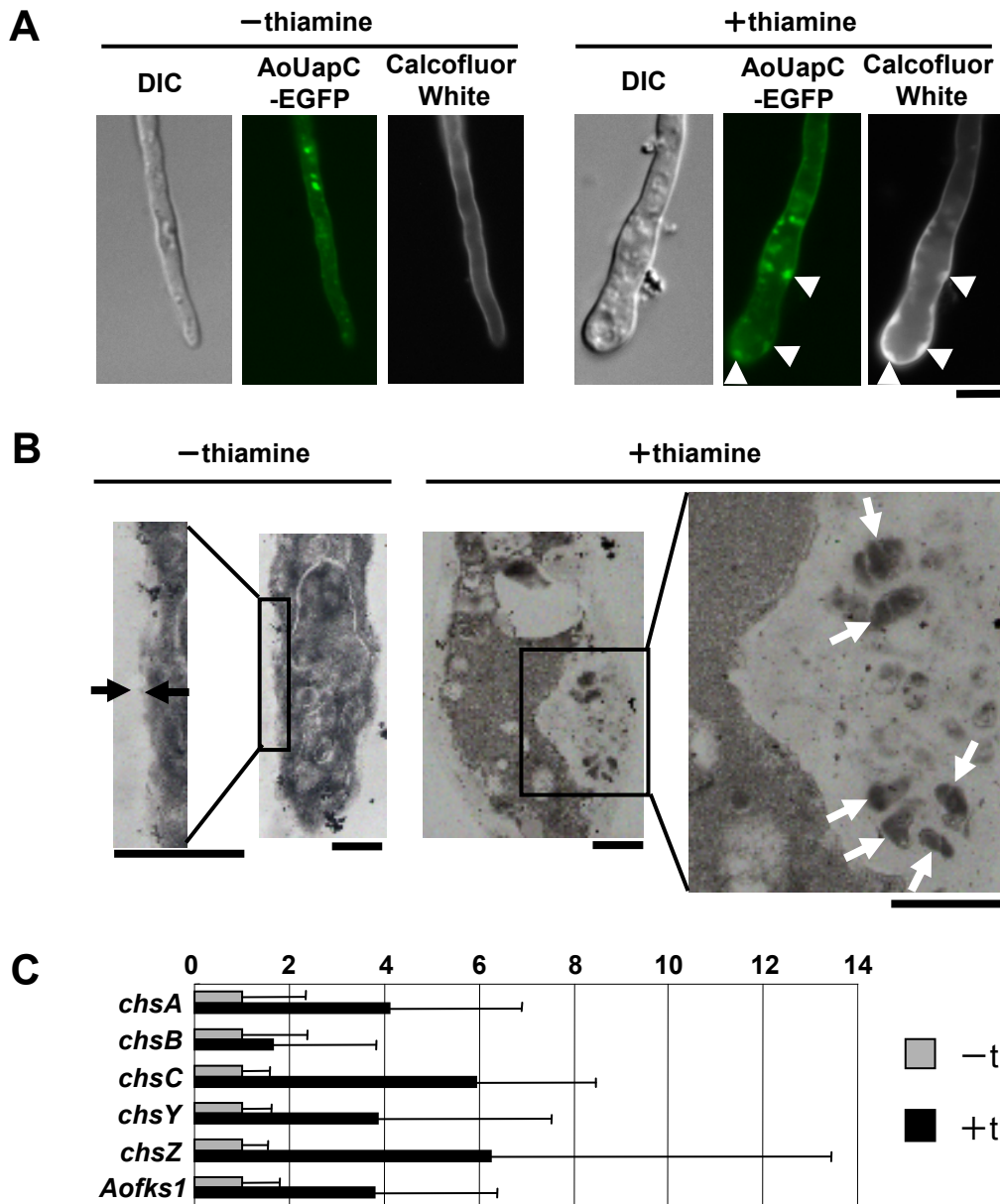


Fig. 1-13 *Aoend4* の発現抑制条件下における細胞壁の異常

(A) TEUE3株の分生子をM±チアミン液体培地に植菌し、30°Cで20時間培養した後、Calcofluor Whiteにより細胞壁の主要構成成分であるキチンを染色し、蛍光顕微鏡で観察した。*Aoend4*発現抑制条件下では、キチンが異常陥入構造に蓄積している様子が観察された(矢頭)。スケールバーは、5 μ m。

(B) 約 10^8 個のTEUE3株の分生子を200 mL M±チアミン液体培地に植菌し、30°Cで27時間振とう培養した後、菌体サンプルを回収し、透過型電子顕微鏡観察を行った。細胞壁は通常、黒矢印ではさまれた領域のように観察される。一方、*Aoend4*発現抑制条件下では、異常陥入構造に細胞壁が蓄積している様子が観察された。また、異常陥入構造には細胞壁以外の成分も観察された(白矢印)。スケールバーは、1 μ m。

(C) 約 10^7 個のTEUE3株の分生子を20 mL M±チアミン液体培地に植菌し、30°Cで24時間振とう培養した菌体からcDNAサンプルを調製し、細胞壁合成酵素群のリアルタイムRT-PCR解析を行った。各遺伝子の発現量は、GAPDHをコードする*gpdA*の発現量で標準化し、-チアミンの培養条件の発現量を1とした。5回の独立した実験の平均値と標準偏差を示した。

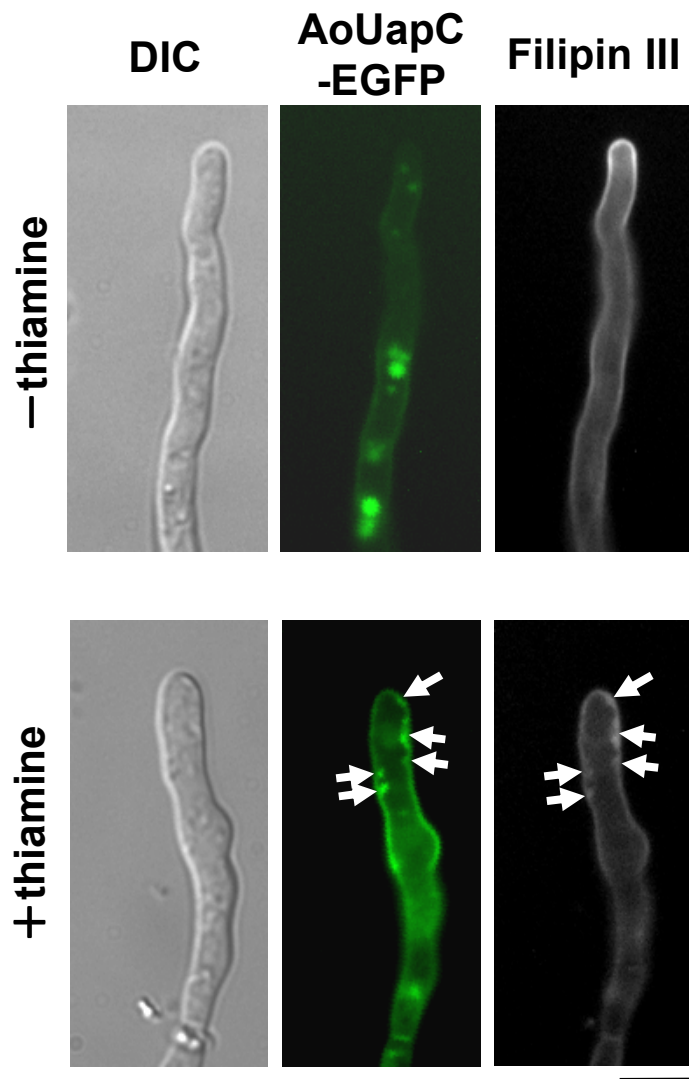


Fig. 1-14 *Aoend4* の発現抑制条件下におけるステロール局在の異常

TEUE3株の分生子をM±チアミン液体培地に植菌し、30°Cで12時間培養した後、Filipin IIIによりステロールを染色し、蛍光顕微鏡で観察した。ステロールは通常、菌糸先端部に主に局在する。一方、エンドサイトーシス欠損条件下では、ステロールはAoUapC-EGFPで観察される異常陥入構造に蓄積されている様子が観察された(矢印)。スケールバーは、5 μm。

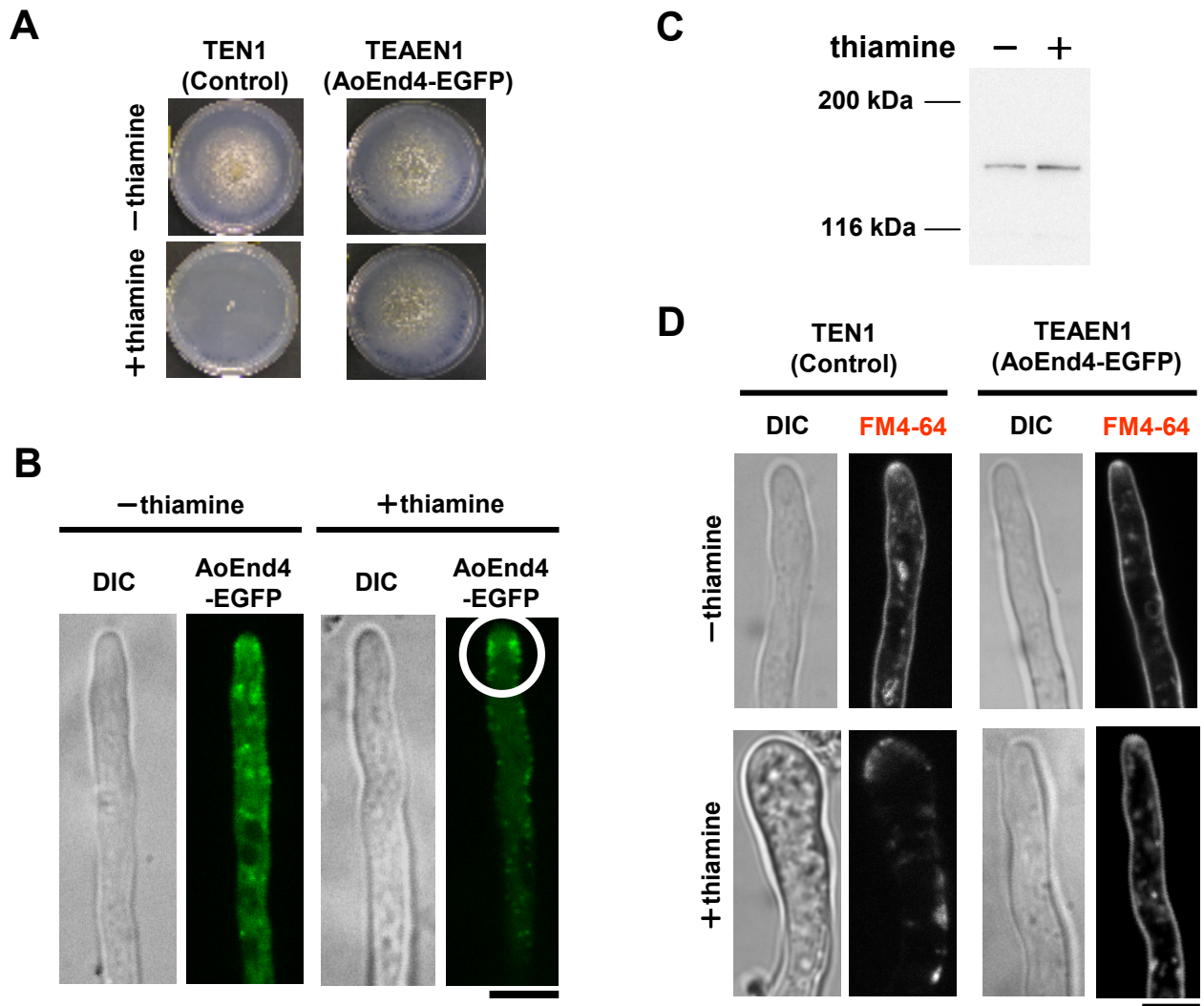


Fig. 1-15 *Aoend4*条件発現株の*Aoend4-egfp*による相補実験

(A) 約 10^2 個/ $10 \mu\text{L}$ の分生子をCDm±チアンプレートに植菌し、6日間、 30°C にて培養した。*Aoend4*条件発現株の背景でPamyB下、AoEnd4-EGFPを*niaD*遺伝子座において発現するTEAEN1株では、チアミンを添加し内在性の*Aoend4*の発現を抑制した条件下においても生育が相補された。一方、コントロール株では著しい生育阻害が見られた。以上から、AoEnd4-EGFPが機能的であることが示された。

(B) TEAEN1株の分生子をCDm±チアミン液体培地に植菌して 30°C で18時間培養し、AoEnd4-EGFPの局在を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。内在性の*Aoend4*が発現する条件下ではAoEnd4-EGFPの特定の部位での局在は観察されなかった。一方、内在性の*Aoend4*の発現を抑制すると、AoEnd4-EGFPはAoAbp1-mDsRedと同様に、菌糸先端部の最先端以外の細胞膜近傍に主に局在している様子が見られた(白円内)。

(C) 約 2×10^7 個のTEAEN1株の分生子を200 mL CDm±チアミン液体培地に植菌して、 30°C で38時間振とう培養した後、菌体からタンパク質を抽出した。抗GFP抗体を用いたウェスタン解析により、AoEnd4-EGFPの発現を確認した。

(D) 分生子をCDm±チアミン液体培地に植菌して 30°C で18時間培養し、FM4-64染色を行った30分後、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。内在性の*Aoend4*の発現抑制条件下では、AoEnd4-EGFP発現株のFM4-64のエンドサイトーシスが回復していた。

(B)、(D)ともにスケールバーは、 $5 \mu\text{m}$ 。

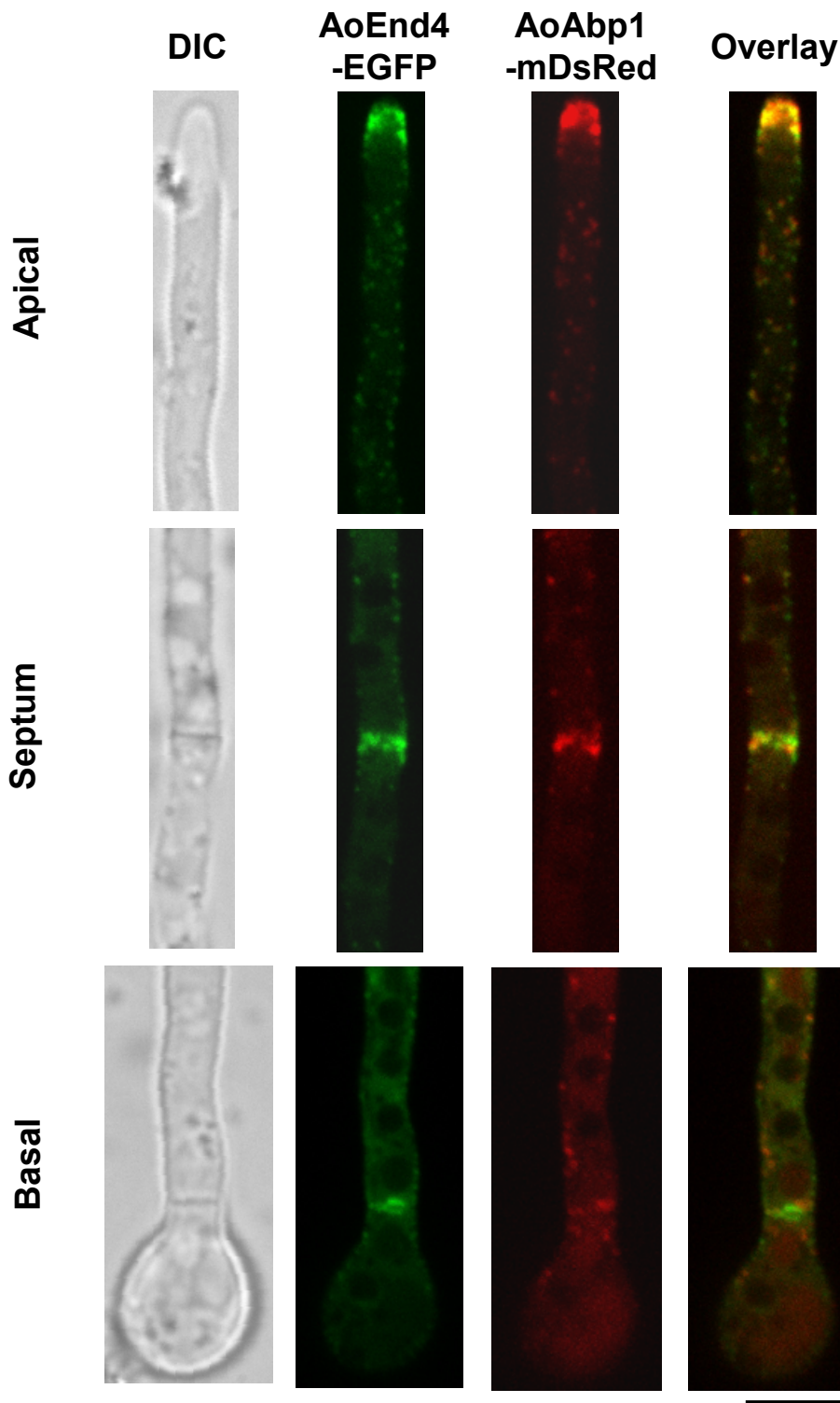


Fig. 1-16 AoEnd4およびAoAbp1の細胞内局在

TEAEA1株の分生子をCD+チアミン液体培地に植菌し、30°Cで20時間培養した後、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。AoEnd4-EGFPとAoAbp1-mDsRedは菌糸先端部においてよく共局在することが確認された。また、AoEnd4-EGFPとAoAbp1-mDsRedは細胞膜全体にパッチ状に見られ、隔壁にも先端部同様に多く局在する様子が見られた。このことから、エンドサイトーシスは菌糸先端部以外でも少なからず起こっており、生理的な役割を果たしていることが示唆された。スケールバーは、5 μm。

1 ATGCATCGCACCTATTCCATGCGCCAATCGCGCATGCCACCAGCATCGCAGATTGAGAAT
M H R T Y S M R Q S R M P T A S Q I E N 20
61 CCGCCTCCGCCGTTGTCCACGACCAAGACAAACCGATGGATTGGGAAAGGCGGCTTCGgt
P P P P L S T T K T N R W I G K G G F G 40
121 gagtgtgtccgagctcctccggtgtctcgcggcagatggaagtttctccttgcgagcag
181 gccccctgcagcgttggagctgctgcgcaaatggtgctgacaatacctactggcccag
241 GCCATGCCTTCCGTAAGAATGCCGCCGGCGCATTCCGACCCGATCTTGCAAGGAAGCTCT
H A F R K N A A G A F G P D L A R K L S 60
301 CCCAGCTCGTTAAGATGGAGAAGAATGTCATGCGCAGCATGGAAATGGTAGCCAAGGAGC
Q L V K M E K N V M R S M E M V A K E R 80
361 GTATGGAGACCGCTgtacgtggaagagatttgcacatgaatcatgggaatgccaactaac
M E T A 84
421 atgctcacagCAACAACCTGTCCATCTGGGGTGAGAACTGTGACGAAGATGTGTCCGACAT
Q Q L S I W G E N C D E D V S D I 105
481 CACGGACAAGATCGGCCGTGTTGCTCTATGAAATCGGAGAGTTGGAAGACCTCTATGTCGA
T D K I G V L L Y E I G E L E D L Y V D 125
541 CCGTTATGATCAGTACCGTGTCCACCATCAAGAGCATTTCGCAACATTGAAGCTTCCGTTCA
R Y D Q Y R V T I K S I R N I E A S V Q 145
601 GCCAGCCGAGACCgtaagttgatcttcggttgcgagtagccttagcttagagagattct
P S R D R 150
661 cacgaagaactatatagGCAAACAGAAGATCACCGATGAGATCGCCAAGCTCAAGTACAA
K Q K I T D E I A K L K Y K 164
721 GGACCCAAACTCTCCTCGGATCGTGGTTCTCGAGCAAGAGCTGGTTCGCGCAGAAGCCGA
D P N S P R I V V L E Q E L V R A E A E 184
781 GTCCCTCGTAGCCGAGGCTCAGCTTTCCAACATCACTCGCGAGAAGCTCAAGGCAGCTTT
S L V A E A Q L S N I T R E K L K A A F 204
841 CCAGTACCAGTTCGATGCACTCCGTGAGCACTGCGAGAAGGTGGCCATCATCGCTGGCTA
Q Y Q F D A L R E H C E K V A I I A G Y 224
901 CGGCAAGCACCTTCTGGATCTCATCGACGATACTCCAGTCACCCCTGGTGAAACTCGCGC
G K H L L D L I D D T P V T P G E T R A 244
961 CTCGTACGACGGATACGATGCTAGCAAGGCTATCATTGAGGACTGCGAAGAGGCACTTGC
S Y D G Y D A S K A I I Q D C E E A L A 264
1021 CAACTGGGTTACCTCTAAGGCCCGCGTCAAGTCCGACGTGTCACAGCGCACGCGCACCCCT
N W V T S K A A V K S D V S Q R T R T L 284
1081 ATCTCAGCGTCGCCGGGAGGCTATCGGCAAGAACCGCGATGGTGTGACCTCTCTACTCA
S Q R R R E A I G K N R D G V D L S T Q 304
1141 GGACCAGCCCATGAGGGGCGATCGGGATTCGTGGGTCCCTGCTGACCAGCACCCAACCTA
D Q P M R G D R D S W V P A D Q H P T Y 324
1201 CGTTGAAGATGGTGAGGAAGTCGCTAGCACCGTGGACGGAGAGGCTCGGGGTCGAGAAGA
V E D G E E V A S T V D G E A R G R E E 344
1261 AGAACGCGAGCCTGTCAGCGTCTAA
E R E P V S V * 351

Fig. 1-17 *Aopil1*遺伝子の塩基配列とAoPil1のアミノ酸配列

*Aopil1*遺伝子は1,285塩基から、AoPil1は351アミノ酸残基から構成される。

AoPil1	MHRTYSMRQSRMPTASQIENPPPPLSTTKTNRWIGKGGFGHAFRKNAAAGAFGPD LARKLS	60
Pil1p	MHRTYSLRNSRAPTASQLQNPPPPSTTKG-RFFGKGLAYSFRRSAAGAFGP ELSRKLS	59
Lsp1p	MHRTYSLRNQRAPTAAELQAPPPPSSTKS-KFFGKASIASFRKNAAGNFGPELARKLS	59
	*****:*:. * ***:>::: **** *:** :>::**... :**:.*** ***:*:*****	
	QLVKMEKNVMRSMEMVAKERMETAQQLSIWGENCDEDVSDITDKIGVLLYEIGELEDLYV	120
	QLVKIEKNVLRSMELTANERRDAAKQLSIWGLENDDDVSDITDKLGVLIYEVS ELDQFI	119
	QLVKTEKGVLRAMEVVASERREAAKQLSLWGADNDDVSDVTDKLGVL IYELGELQDQFI	119
	**** *.*:*:*:*.** :>::**:*:* : *:*****:***:***:***:*.**:* ::	
	DRYDQYRVTIKSIRNIEASVQPSRDRKQKITDEIAKLKYKDPNSPRIVVLEQELVRAEAE	180
	DRYDQYRLTLKSIRDIEGSVQPSRDRKDKITDKIAYLKYKDPQSPKIEVLEQELVRAEAE	179
	DKYDQYRVTLKSIRNIEASVQPSRDRKEKITDEIAHLKYKDPQSTKIPVLEQELVRAEAE	179
	*:*****:*:*****:*.*.*****:*****:* *****:*.:* **********	
	SLVAEAQLSNITREKLKAAFQYQFDALREHCEKVAIIAGYGKHLDDLIDDPVTPGETRA	240
	SLVAEAQLSNITRSLRAAFNYQFDSIIEHSEKIALIAGYGKALLELLDDSPVTPGETRP	239
	SLVAEAQLSNITREKLKAAYSYMFDSLRELSEKFALIAGYGKALLELLDDSPVTPGEARP	239
	*****.***:*:. * **:: * .**.*:***** **:*:*:*****:*. .	
	SYDGYDASKAIIQDCEEALANWVTSKAAVKSDVSQRTRTLSQRRREAIGKNRDGVLDLSTQ	300
	AYDGYEASKQIIIDAESALNEWTLDSAQVKPTLSFKQDYEDFEP-EEGEEEEEEEDGQGRW	298
	AYDGYEASRQIIMDAESALESWTLDMAAVKPTLSFHQTVDDVYE-DEDEEEEEPEIQNG	298
	:*****:**: ** *.**.*. * . * ** . :* : . : ::::	
	DQPMRGDRDSWVPADQHPTYVEDGEEVASTVDGEARGREEEREPVSV	347
	SEDEQEDGQIEEPEQEEEGAVEEHEQVGHQQSESLPQQTTA-----	339
	DIPGQVVEEEVEWTTEVPVDDEAHEADHVSQNGHTSGSENI----	341
	. : : . : : . . .	

Fig. 1-18 麹菌AoPil1と出芽酵母Pil1p、Lsp1pの アミノ酸配列相同性比較

麹菌AoPil1は、出芽酵母Pil1pおよびLsp1p双方とアミノ酸配列レベルで58%の相同性を示した。Pil1pとLsp1pは69%の相同性を示した。

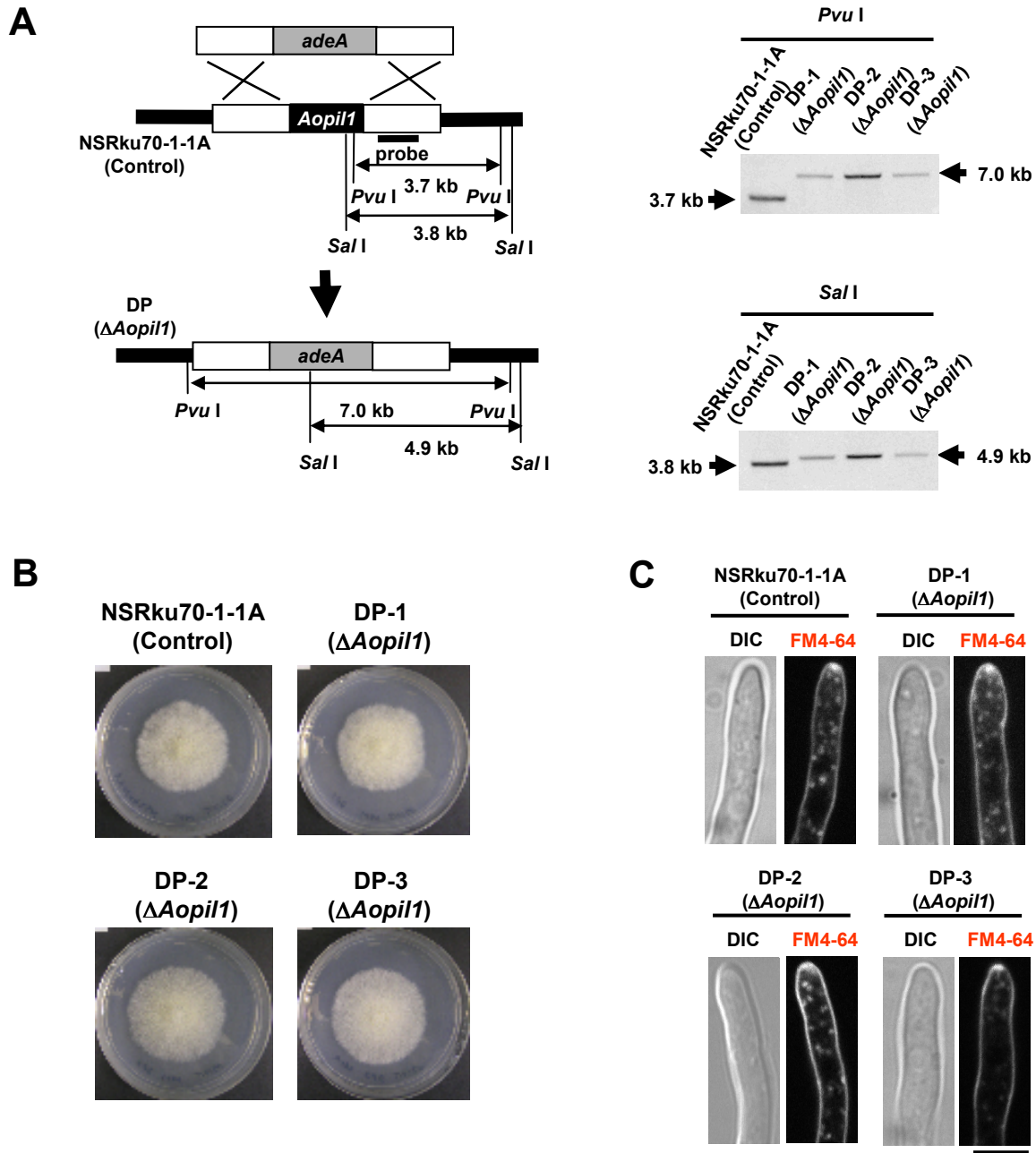
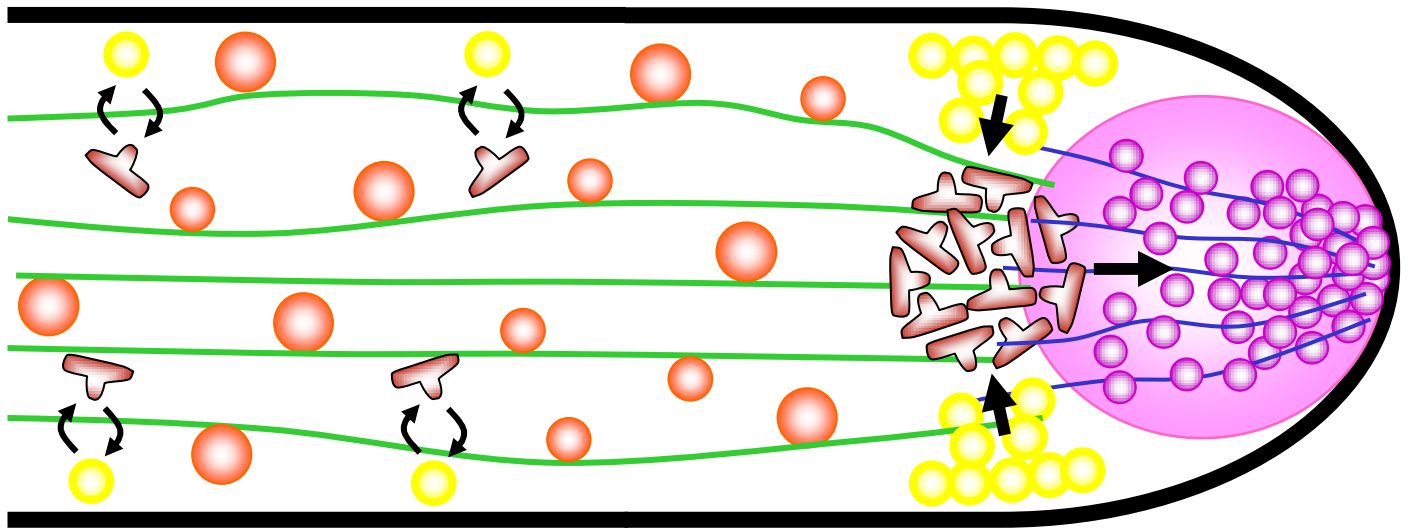


Fig. 1-19 *Aopil1* 破壊株の作製とその表現型解析

(A) *Aopil1* 破壊のストラテジーとサザン解析の結果。3株の*Aopil1* 破壊株を取得した。
 (B) 約 10^2 個/ $10\ \mu\text{L}$ の分生子をMMプレートに植菌し、6日間、 30°C にて培養した。コントロール株と比べて、*Aopil1*破壊株の生育の低下は確認できなかった。
 (C) *Aopil1*破壊株におけるFM4-64染色によるエンドサイトーシスの解析。分生子をMM液体培地に植菌して 30°C で20時間培養し、FM4-64染色を行った60分後、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。*Aopil1*破壊株においては、FM4-64のエンドサイトーシスに異常は見られなかった。スケールバーは、 $5\ \mu\text{m}$ 。



- Vesicular trafficking flow — Microtubule — Actin cable
 ● Secretory vesicle ● Endocytic vesicle ● Early endosome
 † ERC; Endocytic recycling compartment ● Spitzenkörper

Fig. 1-20 *A. oryzae*における菌糸先端でのエンドサイトーシスのモデル図

先端生長に必要な因子、例えば細胞壁合成酵素やv-SNAREは、菌糸最先端部から少し基部側の細胞膜からエンドサイトーシスされた後、小胞によってERCへと送られ、Spitzenkörperを経て、再び菌糸最先端部へと輸送される。エンドサイトーシスにおいて機能するAoEnd4やそれと共局在するAoAbp1が菌糸先端部以外の細胞膜上にも観察されることから、そうした部位でもエンドサイトーシスが起こっており、細胞膜成分や細胞膜タンパク質のリサイクリングに機能していると考えられる。

30

-225	gcttttaacttctctacactcagtggttcttatcatccaccacccc	1441	GAAGCGGAACAGCGCCGCTGCAGCAGCAATGGGAGGAGCAGCAGCGGCAACAGATCCTC
-180	tttttttgaattccattgacttttcaatcgctcttctattgtcggcgccgaggttttg		E A E Q R R L Q Q Q W E E Q Q R Q Q I L 332
-120	cccgtaagacacaatcgattgctgctggttgactcggcccaccggtcccgcgcac	1501	GCGCAACAGCAAGCCCAACCGATTTTGGGAACAGCAACGCTTTCAGGCGGAGCAACAG
-60	atagttgtctgctcccctgatccccccccgacaatttacaggtctgcagcccgtcaca		A Q Q Q A Q H D F E E Q Q R L Q A E Q Q 352
1	ATGAGTCGgtaagtgttttgggacgtttggcaacggggattgagcgtataagataacta	1561	CGGCTTGCACAGGAGCAACTTCTGCGCACCAGTACCAGACACAGACTCAGGGTCGGCTG
	M S R 3		R L A Q E Q L L R D Q Y Q T Q T Q G R L 372
61	atcaatctgaaccactagCACGGAGGCAGATTGGCGATTAACATTCGCAAAGCTACCAG	1621	GCCGAGCTCGAACAAGAGAACTTGAACGCGCGAGCCAGATGAGCGGGACCAGCTTATG
	T E A D L A I N I R K A T S 17		A E L E Q Q E N L N A R A Q Y E R D Q L R M 392
121	CATCGgtaagtcatgccccgaagtatctctctcactctggtacgtggttcttgggtga	1681	CTGCAGCAATACGATCGTGTGTGAAAGACCTGGAAGAGCAGATGAACCACTGACCTCG
	I E 19		L Q Q Y D R R V K D L E E Q M N Q L T S 412
181	cgcactgtaaatagAGGAAAGCGCTCCGAAACgtagtgatttccctcccctattgtcctat	1741	AACTTGAATATGCAAAGTGCCTCAAAGATGAGCAGATCCGATCTCTCCAGGAGCAAGTC
	E S A P K R 25		N L N M Q S A S K D E Q I R S L Q E Q V 432
241	ctctatccagttctatttcgaccctgatgcccgtcatcgtacctccattgatccggttacac	1801	AACACATGGCGGTCCAAGTATGAGGCGCTGGCGAAGCTTACTCCCAGCTCCGACAGGAG
			N T W R S K Y E A L A K L Y S Q L R Q E 452
301	cagGGAAACATGTTCCGAGCTGCATTGTGTATACATGGGACCACAAATCATCTGCCGCTT	1861	CACCTAGACCTCTTGCAGACAACCAAGACCTCAAGTAAAGGCGGCTCGGCACAGGAG
	K H V R S C I V Y T W D H K S S A A F 44		H L D L L Q T T K S L K L K A A S A Q E 472
361	TCTGGGCTGGCATGAAAGTgtatgttgctcagataactactggtcctttatattgcaact	1921	GCGATCGAACGGCGCGAGAAGCTTGAAGAGAGCTCAAACGAAGAACCTAGAGCTAGCC
	W A G M K V 50		A I E R E E K L E R E L K T K N L E L A 492
421	gaccgccttcgatgcagTCAACCGTCTTGCCGACGAGGTACAGACGTTCAAAGCCCTG	1981	GATATGATCCGGGAAAGGACCGTGCCTACACGACCGGGATCGTTGACTGAAAATAAC
	Q P V L A D E V Q T F K A L 64		D M I R E R D R A L H D R D R L T G N N 512
481	ATAACGATACATAAGGTTCTGCAAGAGGGACATCCCATCGTGGTTCGGGAGGCGCAGCAG	2041	AAGGAAGAGCTGGAGAAGGTCAAGAGAGAGCTGCGCCTTGCATCGAGCGGCGGAGAAT
	I T I H K V L Q E G H P I V V R E A Q Q 84		K E E L E K V K R E L R L A I E R A E N 532
541	CACGCCAATTTGGATAGACAGTCTGATGCGCGGTGTAGGAGGCGATCCGCGgtacg	2101	GCCGACGCTCAGAAAGGTACCGAGATCTTACCCTGTGTCCAAATACAACCGGGAGATG
	H A N W I D S L M R G V G G D G I R G 103		A E R Q K G T E I S T L L S K Y N R E M 552
601	caaagcttacaggctgaacgacgcactcgaatcggtttatgctgacagcggtatagGCT	2161	GCCGATTTGGAAGAAGCTCTCAGAgtaagtcttctcgcaggaagaataggaatgccag
	Y 104		A D L E E A L R 560
661	ATGGTCTCTTATCCGAGAATATGTTTTCTTCTGAGTCCAAGTTGGCGTTTCACCGGA	2221	gcattgaccagggacagAACAAAACCGTGTCTCGAAGATATTTCTTCTCGAAATGCAG
	G P L I R E Y V F F L E S K L A F H R N 124		N K N R A L E D I S S R N A D 575
721	ATCATCCCGAATTTAACGgtatttggcggaaacgaagtgtgaattaccggatccagggcta	2281	ACCGCAAGGTGACCATGATGCGGTGCTCCGCGAGAAGGATGAAGATCGAGGTCTACAD
	H P E F N G 130		R Q G D H D A V L R E K D E E I E V Y K 595
781	agtgtttggcagGTCGTTTTGAATATGAGGAGTACATCAGTCTGAAGACGATCAATGATC	2341	AGTCCGGAATGGAACAGGCTCTTATGGAACTGGAGAACTCAAATGgtatgcacttgag
	L F E Y E E Y I S L K T I N D P 146		S G M E Q A L M E L E E L K M 610
841	CGAATGAAGGtaagcagcccagtgctctcttaatacatatgcttgccttacaggaatctag	2401	tcggtaaatgacggggaggatggegagtaactgctaccagAACCAAGGCGATGTCGACAA
	N E G 149		N Q G D V D N 617
901	TTACGAGACTATCTCGACCTCATGACTTTGCAAGACCAGATAGATGCGTTCCAGAAATT	2461	TGCGCTGGATTTCGAGATTGACACCGTTTTGTCATAGCACCGTTGCCAAGATCAACGATAT
	Y E T I S D L M T L Q D Q I D A F Q K L 169		A L D S Q I D T V L H S T V A K I N D I 637
961	GATCTTTTCGCATTTCCAATCAGGGACAAATAACGAGTGTGCGATTTCTGCACTAGTACC	2521	CATCGACTCTGTGCTCCAACAGGTGTGCAACGAGTGCATGACGCCGTGTATGAGCTCGA
	I F S H F Q S G T N N E C R I S A L V P 189		I D S V L Q T G V Q R V D D A L Y E L D 657
1021	GTTGGTGCAGGAGACTACGGCATTATAAATTTATCAGTACAGTGTGAGAGCCATGCA	2581	CTCCAGTATGCAGGCTGTAACCAGAAATGCGTCCCCACCATACTGCTCTCAAATAGA
	L V Q E S Y G I Y K F I T S M L R A M H 209		S S M Q A G N Q N A S P P Y V L S Q I E 677
1081	TACGAgtaggtcttacccttccatcttctgctgttttaggtaagctgaccttgcctatagCCACG	2641	GAAGGCCCTCTGCATCCGCCACTGAGTTCTCTACAGCGTTCAACAACCTCATCGCCGACGG
	T T 212		K A S A S A T E F S T A F N N F I A D G 697
1141	GGTGACGCCGAGCCCTGGAACCACTCCGTTGGTTCGTTATGATGCTCAACACTATCGACTT	2701	CCCCAATAGTACCCATGTGAGATTATTCGGACGGTTCTATCTTCCGGCTCGGTTGC
	G D A E A L E P L R G R Y D A Q H Y R L 232		P N S T H A E E I I R T V S I F S G S V A 717
1201	GTTTCGTTCTACTACGAGTGTGCAACTTGCCTATCTGACCAAGCCTTATCACTATTCTT	2761	CGATGCTCCAGTACACAAGGGATTGACACGGTTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
	V R F Y Y E C S N L R Y L T S L I T I P 252		D V L S N T K G L T R F A N D D K S A D 737
1261	AAGCTTCTCAAACCCACCAACCTGCTTCCGACGATGATGAACGTCCTCCGCTTACCC	2821	CCAATTGATCAATGCTGCCCCAAGTCCGCACAGGCCAGGTGCGGTTCTTCCGTGGACT
	K L P Q N P P N L L S D D D E R P A L P 272		Q L I N A A R K S A Q A T V R F F R G L 757
1321	AGACGACCGACGAAAGAAATCGAGCAGGAGCCCACTCCGCGCCAAAGGCCCAACCCGCT	2881	CCAGTCTTTCCGGCTGGAGGTTTGGAGGCTGATCACAAGACCGATGTGGTTATTAACAA
	R R P T K E I E Q E P T P P P K A P P A 292		Q S F T R L E G L E A D H K T D V V I N N 777
1381	GATCCCGAACCCATTAACGACTTTTGGACCACAGAAGCCAAGCCAGCAAGAGGAATTT	2941	CAACCTAGAGGTACAGAGGGACCTGCAGTCACTATCGAAACTGTGCGACCTTTGCGCC
	D P E P I N D F W T T E A K R Q Q E E F 312		N L E V Q R D L Q S L S K L V E T F A P 797

Fig. 1-1 Aoend4遺伝子の塩基配列とAoEnd4のアミノ酸配列

```

3001 CAAGAGTACCAAGATCAGTACTAATGGCGATCTGGGCGACCTTGTGGATCAGGAACTGAC
      K S T K I S T N G D L G D L V D Q E L T 817
3061 CAAGGGGGTACGCTATCGACGCGCGCGCGGATTGGCCAAGCTCAAGAAAAAGCC
      K A A D A I D A A A A R L A K L K K K P 837
3121 TCGTGATGGCTTCTCGACATACGAGTTACGTATCAACGATGTGATTGTGGAGGGGCCAT
      R D G F S T Y E L R I N D V I V E A A I 857
3181 TGCAGTTACTAATGCAATTGCGGAACTGATTAAGGCCGCCACTGAGTCCCAGCAGGAGAT
      A V T N A I A E L I K A A T E S Q Q E I 877
3241 TGTTCGCGAAGGCCGGGTAGCTCATCGAGAACGGCGTTCTACAAGAAGAATAATCGTTG
      V R E G R G S S S R T A F Y K K N N R W 897
3301 GACAGAGGGACTAATCTCGGCCGCCAAGGCTGTTGCTACTTCCACCAACTCTTATCGA
      T E G L I S A A K A V A T S T N T L I E 917
3361 GACGGCCGACGGGGTCAATTTCTGGTCTGTAACCTCCGGAACACTGATCGTGGCCAGTAA
      T A D G V I S G R N S P E Q L I V A S N 937
3421 CGACGTGGCCGCTAGTACGGCACAGTTGGTGGCGGCCAGTCGCGTCAAAGCATCGTTCAT
      D V A A S T A Q L V A A S R V K A S F M 957
3481 GAGCAAGACCAAGATCGCTTAGAGGCAGCTAGTAAAGCAGTCGGTGC GGCCATGTCGGGC
      S K T Q D R L E A A S K A V G A A C R A 977
3541 TCTGGTCCGTCAGGTACAGGAAATCATTGCCGAGCGGAACCAGGATGGCTCGGAGAAGGT
      L V R Q V Q E I I A E R N Q D G S E K V 997
3601 TGA CTACGCCAAGCTTAGCTCGCACGAGTTCAAAGTGC GCGAAATGGAGCAACAGgtacg
      D Y A K L S S H E F K V R E M E Q Q 1015
3661 tctcgtttccccctccctctctaccatctacggatcgggtgtggatgctgcacaggggt

3721 tagttacagGTTGAGATTCTTCAACTGGAGAATAGCCTTGCTCAGGCGCGGCAGCGTTTG
      V E I L Q L E N S L A Q A R Q R L 1032
3781 GGAGAGATGCGCAAGATCTCGTACCAGGAGGACTGA
      G E M R K I S Y Q E D * 1043

```

Fig. 1-1 Aoend4遺伝子の塩基配列とAoEnd4のアミノ酸配列

Aoend4遺伝子は3,816塩基から、AoEnd4は1,043アミノ酸残基から構成される。

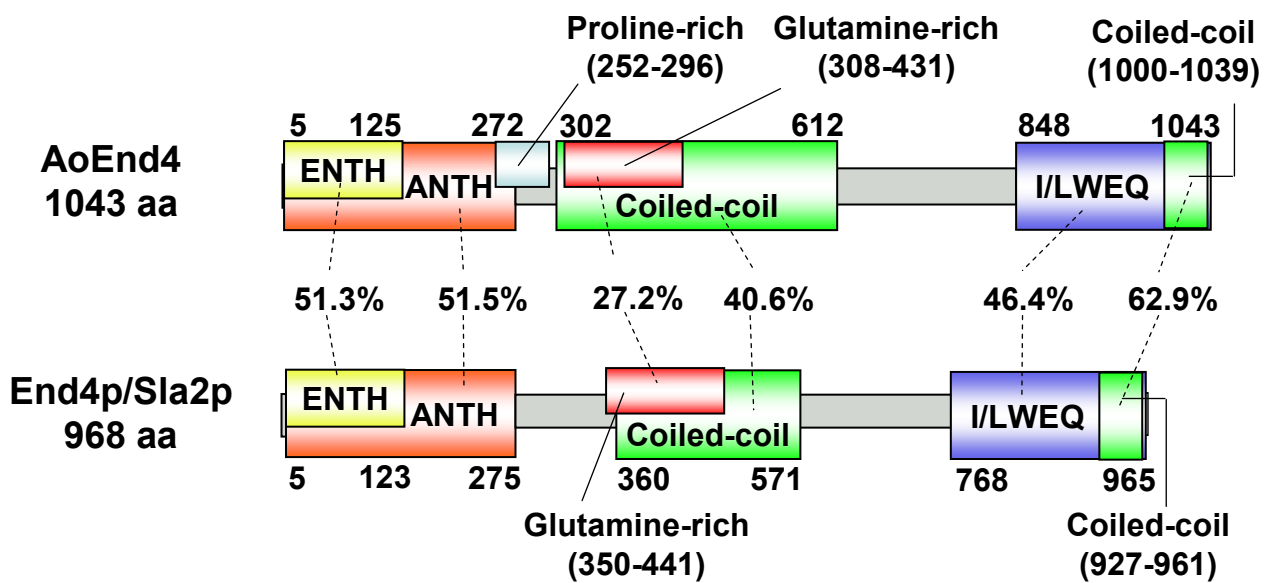


Fig. 1-3 麹菌AoEnd4と出芽酵母End4p/Sla2pのモチーフ解析

A. oryzae AoEnd4と*S. cerevisiae* End4p/Sla2pのモチーフ解析。アミノ酸残基数と対応するドメインとの相同性を示した。

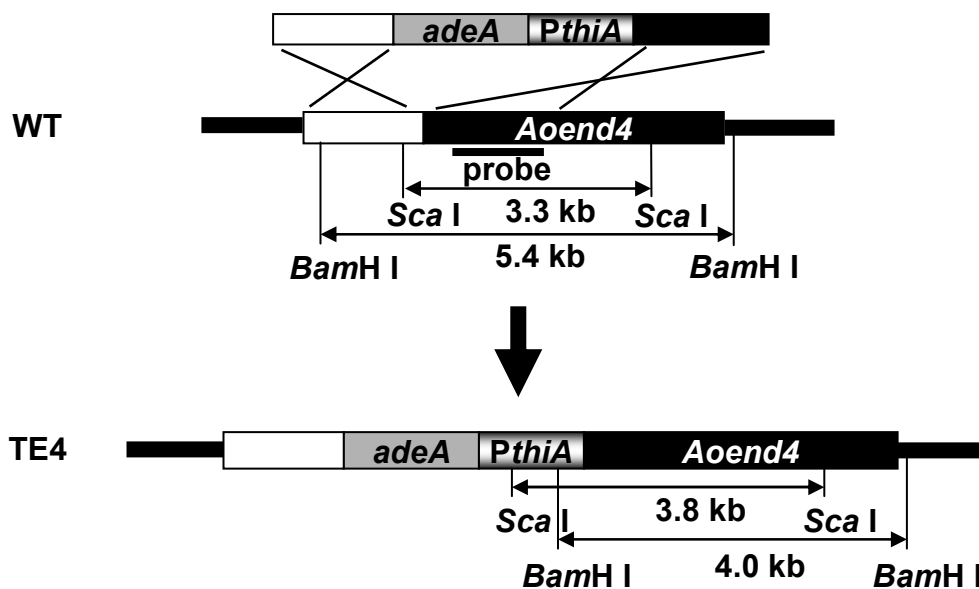
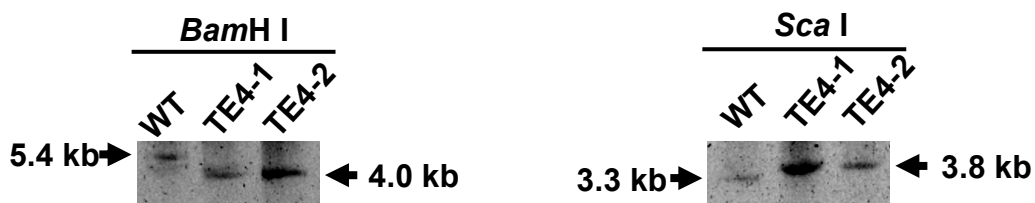
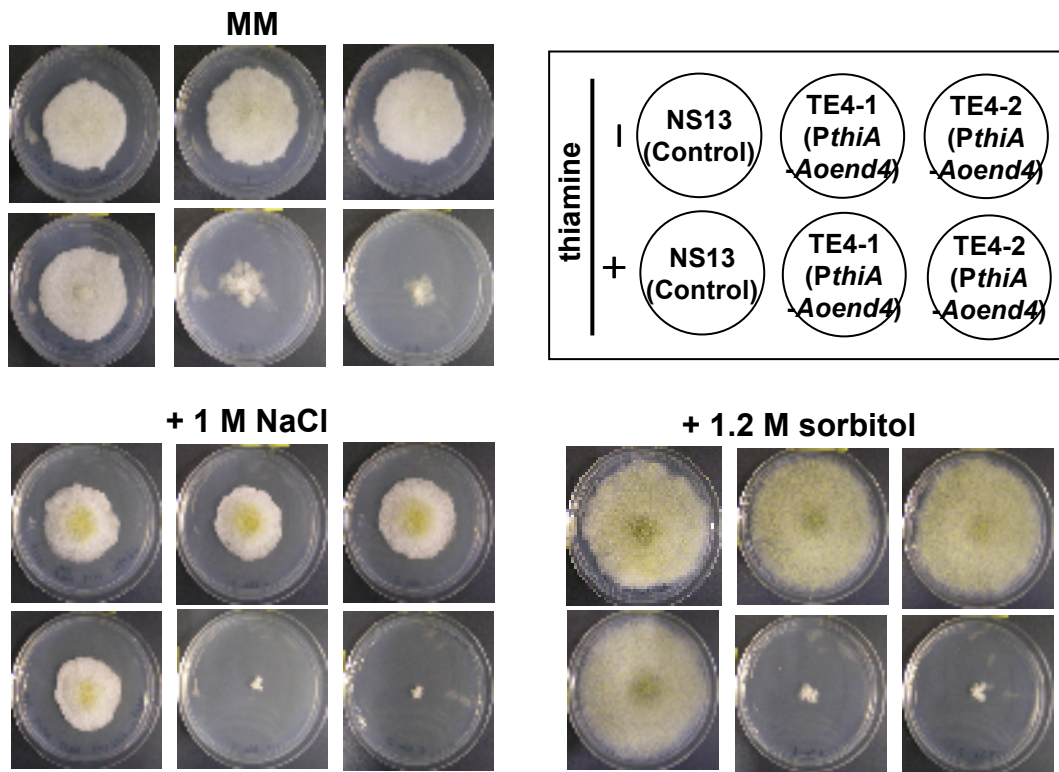
A**B**

Fig. 1-4 *Aoend4* 条件発現株の作製

(A) *Aoend4*条件発現株作製の戦略。 *Aoend4* 条件発現株 (TE4株) は、*Aoend4*遺伝子座において、*Aoend4*を*PthiA*の制御下で発現する。

(B) サザン解析により、TE4株を2株取得したことを確認した。

A



B

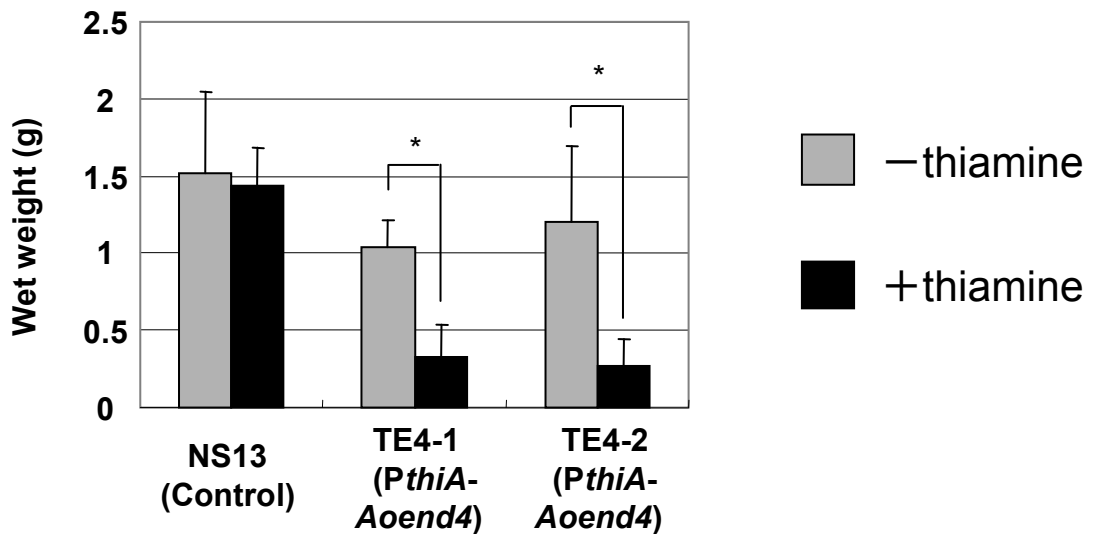


Fig. 1-5 *Aoend4* の発現抑制条件下における生育阻害

(A) 約 10^2 個/10 μ Lの分生子を各プレートに植菌し、15日間、30°Cにて培養した。チアミンを添加し、*Aoend4* の発現を抑制した条件下では、著しい生育阻害が見られた。さらに、1 M NaCl 添加による塩ストレス、1.2 M sorbitol 添加による浸透圧ストレス条件下では一層の生育阻害が見られた。
 (B) 約 10^7 個の分生子を100 mL MM液体培地に植菌し、30°Cで4日間培養した後、湿菌体重量を測定した。5回の独立した測定を行い、*t* 検定による有意差を*で示した ($p < 0.05$)。

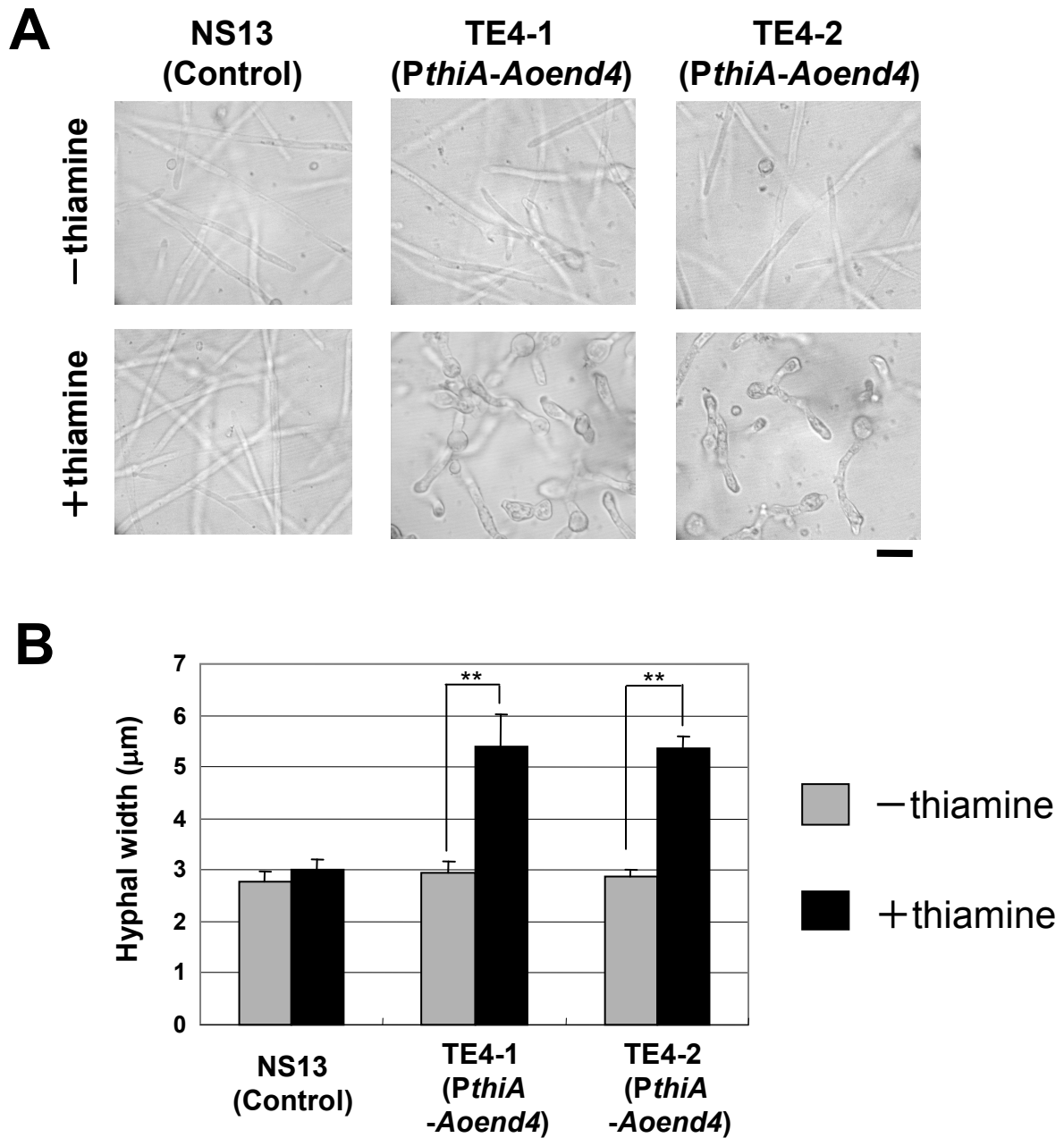
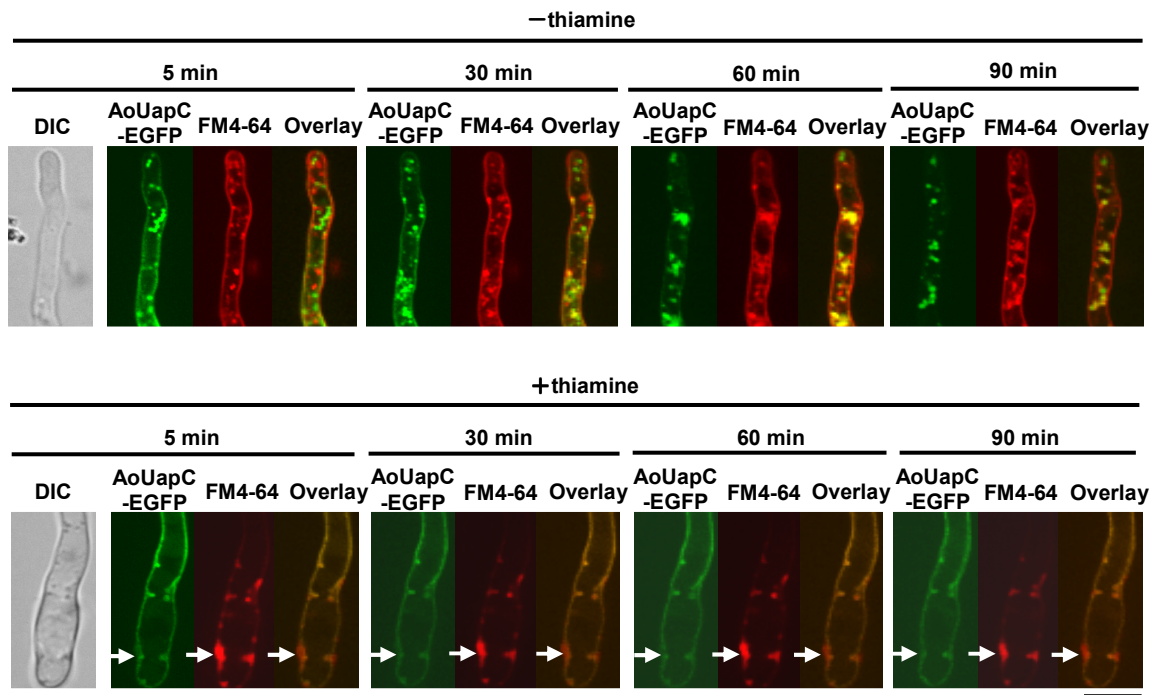


Fig. 1-6 *Aoend4* の発現抑制条件下における菌糸の形態異常

(A) 分生子をガラスベースディッシュ上のMM±チアミン液体培地に植菌し、30°Cで18時間培養した後、菌糸を倒立型顕微鏡の明視野で観察した。スケールバーは10 μm。

(B) 分生子をガラスベースディッシュ上のMM±チアミン液体培地に植菌し、30°Cで20時間培養後、菌糸先端から10 μm以内で最大の幅を測定した。各条件下で、20本の菌糸において測定した結果を示す。4回の独立した実験を行い、*t* 検定結果を**で示した ($p < 0.01$)。



**Fig. 1-7 *Aoend4* の発現抑制条件下における
エンドサイトーシスの異常**

TEUE3株の分生子をM-men±チアミン液体培地に植菌し、30°Cで22時間培養した後、菌糸を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。FM4-64染色とM-int培地にシフトすることによるAoUapC-EGFPのエンドサイトーシスの誘導を同時に行った。表示した時間はエンドサイトーシス誘導からの経過時間。AoUapC-EGFPでラベルされた異常陥入構造にFM4-64が蓄積していた (矢印)。スケールバーは、5 μm。

1	ATGGCATCCCTTAACCTTTCATCCAATGGGCCTTCAATAGTAAAGAGCTATCAAGCTGTT	1561	CAGGCTACGGACCCTACTGCAAACGATGCCACGGCAACAGAGCCTCAAGTCCCCCAAAGT
	M A S L N L S S N G P S I V K S Y Q A V		Q A T D P T A N D A T A T E P Q V P Q S
61	GTCAACTTTCGCCACCAAACTCTTCTTCGCCTACATATGGCAATGGGCAGTGT	1621	GTCAGTGTCTTCGAGACCAATTTGCGGACAAGTCACTTGATGACTCGGCTCCCGAGGCT
	V N S S P P T N S S S P T Y G Q W A V F		V S A L R D Q F A D K S L D D S A P E A
121	TCAGTTTCAGCACCCTTGTAGTGCTTTTCAGCAAGACACGGGCAGCAAGGAGCGTT	1681	AGGTCCGATGAGCCGTGGGATACAGGACGTTCTGTACCTCTGCCCGCTTACCAACGGGA
	S V S A P L V S A F Q Q D T G S K E S V		R S D E P W D T G R S V P L P G L P T G
181	CTAAAGGTCCAGAGCACCGGAGgtcagtcacacgctcaataacgaggaacactcgggctg	1741	CCTGTGCAACCAGAAGCTAGCCAGGCCCCGAAGCTCACCAAGTGGCTCCGAGCCCTCT
	L K V Q S T G D		P V Q P E A S Q E P E A H Q V A P S P P
241	actgaatatgtttaagATGGTGAACCTGCCGATCTTATTGACGAATTCTCCGAAGGAAAG	1801	GAGCAGCCTCGGTCCCTACTCCAACCCCTCCAGTACGGGAAGCATCGCTATCCGTGTT
	G E L A D L I D E F S E G K		E Q P R S P T P T P P V R E A S P I R V
301	ATGCAATTCGCCTTTGTAAAGTCCACGACCCAAATACTGGACTTCCCAAGAGTGTGCTT	1861	GCCATGCCTGTGGACGTGGTGCCACAGATATTCATGATGACCAGCGCTCGCCACCCGCT
	M Q F A F V K V T D P N T G L P K S V L		A M P V G R G A T D I H D D Q R S P P A
361	ATTGCATGGTGTGGGAGGGCGTTCCCGAACGGACGAAGGTTATTTACTAGTACCTA	1921	GTTTTCGCCACGAAAAGTCTTCGTGACAGCGGTGCCGAAAAGATGCAGACCTTGCAGATGAC
	I A W C G E G V P E R T K G Y F T S H L		V L P T E S L R Q T V P K D A D L A D D
421	TCGTGGCTCTCAAATTTGTTACATgttagtgaccttagtgcacacgctctcctagagca	1981	ACGCAAGATGTCGCCCCGGCAACGGCAGAGGCTACAGTTGGGAGCAACCTCCAGACCAAC
	S A V S K L L H		T Q D V A R A T A E A T V G S N L Q T N
481	cttatcccatcatagactatgctgctgaccttacgctgctagGGTTACCATGTTCAAATC	2041	GGCATTCAAGCCGTGGTGCAGTACGATTATGAAAGAGCGGAAGACAATGAGATTGAGCTC
	G Y H V Q I		G I Q A V V Q Y D Y E R A E D N E I E L
541	ACTGCACGTGCGGACGGGACTTGACTGCAGAAGGAATTATACGGAAAGTTGGGGACGCA	2101	AGGGAAGGTGAATATGTGACGGAGATTGAAATGGTTGACAAGACTGGTGGTTGGGTTCA
	T A R A D G D L T A E G I I R K V G D A		R E G E Y V T E I E M V D K D W W L G S
601	TCCGGTGTAAATACTCTGCAGGAGCTGGACAGCCGGCCGCGCTCTACAAAGCCGCCA	2161	AACGCTCGTGGTGAGAGGGTCTCTTCCCGAGTAACTATGTTGAGCTACTGGAAGACAAG
	S G A K Y S A G A G Q P A A A P T K P P		N A R G E R G L F P S N Y V E L L E D K
661	ATCTCATCCAAGCCAGTTTTCACACCATCGCGGACCGATGGTATCAGCTCGAATGCCACA	2221	CCGAGAATTTACCTCGCCGACTTGCATGAGCACAATTTGGACACAAACATTCAAGAG
	I S S K P V F T P S R T D G I S S N A T		P Q N S T S P D L H E H N L D T N I Q E
721	CCAGCTGTCCCCAGAAAACCTCTCCAGAAAAGATACGGACAATGATGGCTGGGGCCAGAT	2281	CCTCATGCGGAAAATAGTGGCGCCTTTAGCCTCGAGCTCAGCTAATGGACCCACTGCTACA
	P A A P Q K P L Q K D T D N D G W G P D		P H A E I V A P L A S S S A N G P T A T
781	GCCCTCCAGTACCAGGACAGAACTTGAAAAGGTGCAGCCGGCCTACCAACCAACCAGG	2341	GCGTTGTATGATTATGAAGCCGCGGAAGACAACGAGCTTAGTTTCCGAGGGGAGCTGAG
	A P P V T R T E L E K V Q P A Y Q P T R		A L Y D Y E A A E D N E L S F P E G A E
841	GTTAACAATACAGCCCTTAGATCAGGAAAAGCCACATGTAGCAAACTGCAGGTTCAACAT	2401	ATCACTACATCgtaagtttttccctccccgcaccctttcgattttctgtctttcccacg
	V N I Q A L R S G K P H V A N M Q V Q H		I T H I
901	ACCACCGAAGATCATAGCGACGTTGTCAAGGGCGGCTATCAACCAGTGGGCAAAGTAGAC	2461	ttcataatcgacgtatgaagtgttcgaaaacttctatggctaactgctaagtggcatgtag
	T T E D H S D V V K G G Y Q P V G K V D		
961	ATTGCTGCCATAAGGAGGCAGGCACGTGAGGCAGGCAGAAATGAAGGATGACCCGGCCGAA	2521	GAATTCGCCGACGATGACTGGTGGTTTGGTAAATATCACAATAAAGAAGGCCTCTCCCA
	I A A I R R Q A R E A G E M K D D R P E		E F P D D D W W F G K Y H N K E G L F P
1021	CCAGTGAAGGGAGCATAACGAACAGTTGGCAAGATTGATATTGCTGCTATTCGAGCCAGG	2581	GCAAATATGTAGAACTTCGAAAAGTGA
	P V K G A Y E P V G K I D I A A I R A R		A N Y V E L R K *
1081	GCTCAAAAACCCAGCGAGTTGATGGCAGACGATAGCAAATTAGCTGCACCAATAACGCC		
	A Q K P S E L M A D D S K L A A P N N A		
1141	GAGAGCAAGCGGAATCCGGAACACTACAAAATCCAGGACACTCCGAGCGTTTAAACAAGT		
	E R Q A E S G N Y T N P G H S E R L T S		
1201	CTACCGAAGCCAAAGTGCAGAAATAAGTTCGGAGCGAACAGTTCGTTTCGTTGGGACAAA		
	L P K P K V A N K F G A N Q S F V G T K		
1261	CCTCCTCTGCCTAGTGGATCCATGCCAAAACCAACTTCAGCAGTTGCGCCCGTCCGTAGC		
	P P L P S G S M P K P T S A V A P V G S		
1321	GCAAGCAGAACTTTTGCAGATGAGGGAGGAAGACTCCCGCAACTTTTGGCAGAGAGA		
	A S R T F A D E G G K T P A Q L W A E R		
1381	AAAGCGAAGGAACGGGGACAAGCTACTGCATCTGATGTACCACCATTTGGGGCAGGAGGAG		
	K A K E R G Q A T A S D V P P L G H E E		
1441	CCCTCGTTCAAACACAGCACAGCGGAGCCGAGTGGAAAGAGCTCATAACGCGGTAGA		
	P S L Q T Q H S G R A E W K S Y S G R		
1501	ACGTGGACCCCTGTTTCAGACCACACACTGGAAAGTCTCTCGGCAGCAATACATCTCAC		
	T W T P V Q T T H T G K S L G S N T S H		

**Fig. 1-8 *Aoabp1*遺伝子の塩基配列
とAoAbp1のアミノ酸配列**

*Aoabp1*遺伝子は2,604塩基から、AoAbp1は788アミノ酸残基から構成される。

AoAbp1	--MASLNLSNNGPSIVKSYQAVVNSSPPTNSSSPTYGQWAVFSVSAPLVSAFQQDTGSKE	58
Abp1p	MALEPIDYTTHSREIDAAYLKIIVRGSDDPTT-----WLIISP-----NAK	40
	: : : : * * : * * * * : : * : * : :	
	SVLKQSTGDGELADLIDFSEGKMQFAFVKVTDPTNGLPKSVLIAWCGEGVPERTKGYF	118
	KEYEPESTG-SSFHDFLQLFDETKVQYGLARVSPPGSDVEKIIIIIGWCPDSAPLKTRASF	99
	. : : * * * . . : * : : * . * * : * : : : : * : : : * : : * . * * . . * : * : . *	
	TSHLSAVS-KLLHGYHVQITARADGLTAEGIIIRKVGDASGAKYSAGAGQPAAAPTCKPPI	177
	AANFAAVANNLFKGYHVQVTARDEDDLLENELMKISNAAGARYSIQTSSKQQGKASTPP	159
	: : : : * * : * : : * * * * : * * * : : : * : : * * * * : * *	
	SSKPVFTPSRTDGISSNATPAAPQKPLQKDTDNDGWGPDAPPVTRTELEKVPAYQPTRV	237
	-VKKSFTPSKSPAPVSKKEPVKTPSPAP-----	186
	* * * * * : . * : * . . . *	
	NIQALRSKGPHVANMQVQHTTEDHSDVVKGGYQPVGKVDAIAAIRQAREAGEMKDDRPEP	297
	-----AAKISSRVNDNDDDDWNEPELKERDFDQAP-----LKP	220
	: : . . : * : * . . : : * :	
	VKGAYEPVGKIDIAAIRARAQKPSSELMADDSKLAAPNNAERQAESGNYTNPGHSERLTSL	357
	NQSSYKPIGKIDLQKVIAEEKAKEDPRLVQKPTAAGSKIDPSSDIANLKNESKLRDSEF	280
	: . : * : * * * * : : * . : . : . * * . . : : : . * . * : : * : : :	
	PKPKVANKFGANQSFVGTKPLPSGSMKPTSAPVAVPGSASRTFADEGGKTPAQLWAERK	417
	N-----SFLGTTKP-----PSMTESSLKNDKVIKGRNEKSPAQLWAERK	322
	* * : * * . * * . * . : * : * * * * * * *	
	AKERGQATASDVPPLGHEEPSLQTHSGRAEWKSSYSGRWTWTPVQTHHTGKSLGNTSHQ	477
	AK-----Q	325
	** * *	
	ATDPTANDATATEPQVPQSVSALRDQFADKSLDDSAPEARSDPEPWTGRSVPLPGLPTGP	537
	NSGNAETKAEAPKPEVPE-----DEPEGEPDVKDLKSKFEGL	362
	: . : . * * : * : * * * : * * * * * * . * . *	
	VQPEASQEPPEAHQVAPSPPE-QPRSPTPTPPVREASPIRVAMPVGRGATDIHDDQRSPPA	596
	AASEKEEEEEMENKFAPPPKSEPTIIISPKPFSKPQEPVKAEEAEQPKTDYKKIGNPLPGM	422
	. . * . * . : : * * . * : : * * * : . * : . . : : : * *	
	VLPTESLRQTVPKDADLADDTQDVARATAEATVGSNLQTNGIQAVVQYDYERAEDNEIEL	656
	HIEADNEEPEENDDDDWDDDEAAQPPLPS-----RNVASGAPVQKEEPEQEEIAPSL	476
	: : : . . . : * * * * : : * : . : : . . * * * : . * : *	
	REGEYVTEIEMVDKDWLGSNARGERGLFPSNYVELLEDKPNSTSPDLHEHNLDTNIOE	716
	PSR-----NSIPAPKQEEAPEQAPEEEIEEEEAEAAAPQLPSR---SSAAP	518
	. . * . . : : * . : * : : : * * : * : : * * : * : . .	
	PHAEIVAPLASSANGPTATALYDYEAAEDNELSFPEGAEITHIEFPDDDDWFGKYHNK-	775
	PPPPRRATPEKKPKENPWATAEYDYDAAEDNELTFVENDKIINIEFVDDDDWFLGELEKDG	578
	* . * . . . : * . . .	
	-EGLFPANYVELRK	788
	SKGLFPSNYVSLGN	592
	: * * * * * : * * . * :	

Fig. 1-9 麹菌AoAbp1と出芽酵母Abp1pのアミノ酸配列相同性比較

麹菌AoAbp1は出芽酵母Abp1pとアミノ酸配列レベルで23%の相同性を示した。

第2章 麹菌におけるエンドサイトーシス関連因子の探索

序

エンドサイトーシスにおいて機能すると考えられる AoAbp1、AoEnd4 の局在解析から、糸状菌におけるエンドサイトーシスは、菌糸先端部において活発に行われていると示唆された。また、*Aoend4* の発現抑制によってエンドサイトーシスを欠損した菌糸では、先端生長が著しく阻害されたことから、エンドサイトーシスは先端生長と密接に関連していると考えられた。以上の結果と、先端生長が糸状菌において特徴的な機構であることを考え合わせると、菌糸先端部におけるエンドサイトーシスにおいて、糸状菌に特徴的な機構が存在する可能性が考えられた。

動物細胞や出芽酵母の研究によって、エンドサイトーシスには多くのタンパク質が関与することがわかってきている。糸状菌の菌糸先端で活発に起こっていると考えられるエンドサイトーシスに特徴的な機構が存在するならば、他の生物種でこれまでに報告されていないエンドサイトーシスに関する新規因子が見つかる可能性がある。そこで、エンドサイトーシスにおけるタンパク質間相互作用において機能する SH3 (Src-homology 3) ドメインを C 末端に 2 つ有するという特徴的なタンパク質である AoAbp1 に着目した。AoAbp1 は、*S. cerevisiae* Abp1p に比べて C 末端領域が 200 アミノ酸残基程長く、タンパク質間の相互作用に関わる SH3 ドメインを 1 つ多く持つ (Fig. 2-1A)。こうした特徴から、AoAbp1 において、Abp1p では見られないタンパク質間相互作用が見つかる可能性が考えられた。そのため、AoAbp1 を餌 (bait) とし、*A. oryzae* の cDNA ライブラリーを餌食 (prey) とした yeast two-hybrid (YTH) スクリーニングによって、*A. oryzae* におけるエンドサイトーシス関連因子の探索を行った。YTH は、DNA レベルの実験でタンパク質レベルでの解析を行えることから、個々のタンパク質の性質に応じた実験手法をとる必要が無い場合、スクリーニングには適した実験系である。ただ、一般的に偽陽性が多いという問題が存在していた。しかし近年、レポーターを複数用いることによって、偽陽性をなるべく減らすための実験系が構築されている。さらに本研究では、*A. oryzae* においてこれまで報告例が無い YTH スクリーニングの実験系構築の意味も含めて研究を行った。

結果

2-1 AoAbp1 を bait にした yeast two-hybrid スクリーニング

本研究で使用した YTH スクリーニングの実験系および解析の流れをそれぞれ Fig. 2-1、2-2 に示した。Gal4p の DNA-binding domain (DNA-BD) に融合した bait と Gal4p の activation domain (AD) に融合した prey に相互作用があるときは、Gal4p の DNA-BD と AD が転写因子として機能し、レポーター遺伝子を活性化する (Fig. 2-1B)。Gal4p に応答するレポーター遺伝子として、本研究では栄養要求性の *HIS3* と *ADE2* を使用した。

まず、YTH スクリーニングを行うため、*A. oryzae* の cDNA ライブラリーを発現する *S. cerevisiae* 株を作製した。*A. oryzae* の cDNA ライブラリーは、野生株である RIB40 株を最少培地の CD 液体培地で 24 時間培養した菌体から抽出したトータル RNA を使用して作製した。培養には、完全培地である DPY 培地と最少培地である CD 培地の選択肢が考えられた。CD 培地を選択した理由には 2 点挙げられる。1 点目は、CD 培地は DPY 培地に比べて、24 時間液体培養した際に、ある程度の量まで発現する遺伝子の種類が多い点である。もう 1 点は、DPY 培地ではアミラーゼなどのある特定の遺伝子の発現量が極めて多くなるのに対し、CD 培地では DPY 培地に比べて遺伝子間の発現量にばらつきが少ない点である (Kimura *et al.*, 2008)。作製した cDNA ライブラリーには、両端に相同組換え用の配列が付加されている。同様の配列を持ち *LEU2* マーカーを有するベクターの pGADT7-Rec と cDNA ライブラリーを *S. cerevisiae* AH109 株に形質転換した。こうして作製した YTH スクリーニング用の *S. cerevisiae* cDNA ライブラリー株の独立コロニー数は、約 1×10^5 であった (以下、タイターと呼ぶ)。この値は、*A. oryzae* の持つ遺伝子数約 1.2×10^4 のおよそ 10 倍弱であった。

次に、YTH スクリーニングの bait 用の株を作製した。*TRP1* マーカーを有する pGBKT7 ベクターに全長の *Aoabp1* の cDNA を導入したプラスミドを *S. cerevisiae* Y187 株に形質転換した。その後、SD/-Trp (tryptophan) プレートで選択し、YTH スクリーニング bait 用の株を取得した。ネガティブコントロール用の株として、pGBKT7 ベクターを形質転換した株を取得した。Bait 用株が SD/-Trp/-His (histidine) および SD/-Trp/-Ade (adenine) プレートで生育しないことを確認し、bait のみで *HIS3*、*ADE2* レポーターが活性化しないことを確認した (data not shown)。

YTH スクリーニングとして、AoAbp1 を発現する bait 株 (*MAT α*) と *A. oryzae* の cDNA ライブラリーを発現する prey 株 (*MAT α*) のメイティングを行い、bait および prey を共に発現する 2 倍体をスクリーニング用の SD/-Leu (leucine) /-Trp/-His/-Ade プレートで選択した。レポーターの *ADE2* の発現量が低いとコロニーは赤色を呈する。そのため、白くて大きなコロニーのクローンは、レポーターの発現量が高く bait と prey の相互作用が強いと考えられる。2 回のスクリーニングによって、合計 2.2×10^6 のコロニーをスクリーニングし、その内コロニーの大きなものから 42 のコロニーを植え継いだ。それらのクローンから、コロニーPCR によって cDNA インサートのダイレクトシーケンスを行い、DOGAN (<http://www.bio.nite.go.jp/dogan/Top>) および酒類総合研究所 (<http://nrif2.nrib.go.jp/>) の *A. oryzae* ゲノムデータベースを用いて cDNA インサートの配列解析を行った。その結果、16 の独立した ORF を見出した (Table 2-1, 2-2)。

2-2 AoAbp1 と相互作用するタンパク質をコードする遺伝子の同定

YTH スクリーニングにより見出された 16 の独立した ORF の一部を含む prey の内、DOGAN および酒類総合研究所の *A. oryzae* ゲノムデータベースのアノテーション情報を基に、細胞内輸送に関連があるかもしくは機能未知遺伝子の一部である 7 つの prey について、YTH による再現性確認を行った (Table 2-3, Fig. 2-3)。その結果、Prey2、Prey10、Prey11、Prey12、Prey13 はポジティブクローンとして再現性が確認された (Prey2 の結果は Fig. 2-5 を参照)。一方、Prey14 は再現性が得られず、Prey15 は偽陽性のクローンであると判断した。以上から、再現性の確認された 5 つのクローンが得られた。この内の 2 つ、Prey10 と Prey11 は、同一遺伝子の一部であったことから、YTH スクリーニングの結果、AoAbp1 と相互作用するタンパク質をコードする遺伝子を最終的に 4 つ見出した。それら 4 つの遺伝子は全て *A. oryzae* においてこれまでに機能解析の報告が無く、遺伝子名が付けられていなかった。そこで、本研究においてそれらの遺伝子を *aipA* (AO090003000368)、*aipB* (AO090005000576)、*aipC* (AO090023000527)、*aipD* (AO090005001020) (AoAbp1 interacting protein) と名付けた。*aipA* に関しては、次項 2-3 にて記述する。

aipB は、1,261 アミノ酸残基から構成される myosin class I heavy chain をコードすると推測される。*AipB* の *S. cerevisiae* におけるホモログは Myo3p/Myo5p であり、それ

ぞれ AipB と 52%、55%の相同性を示す (Myo3p と Myo5p 同士は 75%)。また、AipB は *A. nidulans* におけるホモログである MyoA とは 86%の相同性を示す。Myo3p/Myo5p、MyoA はエンドサイトーシスにおいて機能することが示唆されている (Geli and Riezman 1996; Yamashita and May 1998)。モチーフ検索によると、AipB は、myosin head (motor) ドメイン、myosin tail ドメイン、SH3 ドメインを有する。このことから、AipB は SH3 ドメインを介して、AoAbp1 のプロリンリッチドメインと相互作用するのかもしれない。*S. cerevisiae* においては、Abp1p と Myo3p/Myo5p との相互作用は YTH 解析で報告されていない。

aipC は、*S. cerevisiae* の *APPI* (actin patch protein) の翻訳産物と 20%の相同性を示し、586 アミノ酸残基から構成されるタンパク質をコードすると予想される。AipC、App1p はともに既知のドメインを持たない。App1p の機能はわかっていないが、Abp1p、Rvs161p、Rvs167p と相互作用することが YTH 解析により報告されており、アクチンフィラメントの形成に関与していると推測されている。

aipD は、339 アミノ酸残基から構成されるタンパク質をコードすると予想される機能未知遺伝子である。BLAST 検索の結果、他の *Aspergillus* 属糸状菌では、*A. niger* と e^{-81} 、*A. nidulans* と $2e^{-71}$ 、*A. fumigatus* と $5e^{-44}$ と比較的高い相同性を示す遺伝子が一つずつ存在していた。一方、同じ糸状菌でも *N. crassa* とは $2e^{-6}$ 、*M. grisea* とは 0.005 と、高い相同性を示す遺伝子は存在しなかった。また、*S. cerevisiae* では *LAS17* と e^{-12} という低い相同性を示した。*Las17p* は、枝分かれしたアクチンフィラメントを核化する Arp2/3 タンパク質複合体を活性化するヒト WASP のホモログであり、633 アミノ酸残基から構成される。*Las17p* で BLAST 検索を行うと、*aipD* とは異なる、WASP をコードするとアノテーションされた AO090120000140 の翻訳産物が $4e^{-43}$ の相同性で見出された。他の *Aspergillus* 属糸状菌においても同様の相同性を有したホモログが一つずつ存在することが分かった。以上から、*aipD* は *LAS17* のホモログとしてではなく、*Aspergillus* 属糸状菌に特徴的なタンパク質をコードすると考えられる。モチーフ検索の結果、AipD は、SH3 ドメインと相互作用するプロリンリッチ領域を持つ (121-338 アミノ酸残基) ことから、この領域と AoAbp1 の SH3 ドメインとが相互作用する可能性が考えられる。

2-3 エンドサイトーシス関連因子としての AAA ATPase 様タンパク質をコードする遺伝子の同定

Prey2 のアミノ酸配列をモチーフ検索すると、AAA (ATPases associated with diverse cellular activities) ATPase ドメインが見つかった (Fig. 2-4)。この AAAATPase ドメインと推定された領域の一部はイントロンから翻訳されたものであったが、prey2 は AAA ATPase をコードすると予想される遺伝子 *aipA* の翻訳産物 AipA の一部であることが分かった (Fig. 2-4)。AAAATPase はその名の通り、細胞内のさまざまな部位において機能する ATPase であり、これまで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ものが報告されている (White and Luring, 2007)。Prey2 を用いて、AoAbp1 の全長および各断片を bait とした YTH 解析を行った (Fig. 2-5)。その結果、prey2 は AoAbp1 の全長と相互作用することが確認された。さらに、prey2 が AoAbp1 の 2 つの SH3 ドメインそれぞれと相互作用することが示された。このことから、AipA がエンドサイトーシス関連因子であることが示唆された。以降の *aipA* に関する詳細な解析は第 3 章にて記述する。

考察

本章の研究により、*A. oryzae* では初めてとなる YTH スクリーニングの実験系が構築された。今後、YTH の実験系は *A. oryzae* でのタンパク質の相互作用を切り口とした有用な解析ツールの一つになると思われる。本研究では、糸状菌におけるエンドサイトーシスの新規因子を探索する目的で、エンドサイトーシス関連因子の AoAbp1 全長を bait とし、*A. oryzae* の cDNA ライブラリーを prey にした YTH スクリーニングを行った。その結果 4 つの遺伝子を見出し、*aipA~D* (AoAbp1 interacting protein) と命名した。

YTH スクリーニングにおいて重要な点として、bait の選定、ライブラリーの質、スクリーニング方法が挙げられる。まず 1 点目の bait の選定に関してであるが、本研究では AoAbp1 の全長を bait に使用した。YTH スクリーニングの際には、タンパク質の全長が大きい際は全長を使用せず、相互作用に関連する特定のドメインや領域がわかっている場合には、それらを bait に使用することで効率的に目的とするタンパク質を探索する手法がある。AoAbp1 の場合、一般的にタンパク質間相互作用に関わるプロリンリッチ領域や 2 つの SH3 ドメインを bait に使用することが考えられた。しかし、2 つの SH3 ドメインを bait に使用した場合は、prey 非依存的にそれ自体でレポーターを活性化してしまったため、スクリーニングには使用できなかった (Fig. 2-5)。また、ある程度相互作用する因子が存在すると考えられるタンパク質を bait に用いないと、偽陽性ばかり釣れてしまう可能性がある。こうした問題は、後で述べるスクリーニング方法との兼ね合いで解決できる場合もある。2 点目の、今回作製し使用したライブラリーの質に関して、*A. oryzae* の cDNA はトータル RNA を用いて調製し、その際にはキット (QIAGEN) を使用した。添付のマニュアルによると、抽出したトータル RNA にゲノム DNA が 5%程度コンタミする可能性があると書かれている。そのため、トータル RNA を DNase 処理することも考えられたが、処理中に RNA が失われる可能性があるため、今回は DNase 処理を行わなかった。以上から、今回使用したライブラリーは、純粋な cDNA ライブラリーとは言えず、実際に、AipA の一部であった Prey2 タンパク質はイントロンを含む領域からの翻訳産物であった。しかし、再現性確認を行うことで偽陽性であるかそうでないかは判断でき、Prey2 はポジティブクローンであることが確認された。結論として、今回使用した cDNA ライブラリーは、スクリー

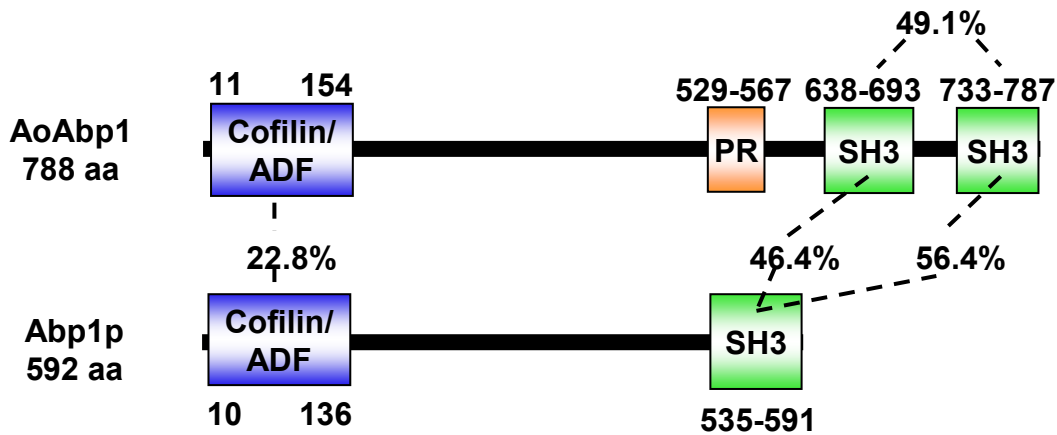
ニングを行うのに十分な品質であったと言えるだろう。最後に、スクリーニング方法に関してであるが、今回は *HIS3* と *ADE2* の 2 種類の栄養要求性のレポーターを用いた。*HIS3* レポーターは発現量が低くても生育可能であることから、*HIS3* レポーターのみを用いた場合、bait と prey の相互作用が比較的弱い場合でも検出できる。しかし、偽陽性も多くなるので、通常 *HIS3* レポーターのみによる YTH 解析には、His3p の競合阻害剤である 3-AT (3-amino-1,2,4-triazole) を添加してバックグラウンドを抑えて使用する。一方、*ADE2* レポーターは、発現量が低いとコロニーは成育できず、また赤色を呈することから、比較的 bait と prey の相互作用が強い場合に用いられる。今回はスクリーニングおよびその後の解析において、*HIS3* と *ADE2* レポーターを併用することで偽陽性をなるべく減らし、また、bait である AoAbp1 と比較的相互作用が強いと考えられる prey に関して解析を行った。

Saccharomyces genome database (SGD) では YTH 解析により、Abp1p と 20 のタンパク質が相互作用すると報告されている (Table 2-4)。それらのタンパク質の多くは、アクチン細胞骨格の組織化やエンドサイトーシスに関連した機能を有する。今回 *A. oryzae* では、AoAbp1 と相互作用する 4 つのタンパク質を見出した。その内、AipC は App1p のホモログであり、App1p は Abp1p と YTH で相互作用することが報告されている。一方、AipC 以外の Aip タンパク質の *S. cerevisiae* におけるホモログは、Abp1p と相互作用するとは報告されていない。AoAbp1 は Abp1p より SH3 ドメインを 1 つ多く有し、さらに全長でも大きいことから、単純に Abp1p よりも多くの因子と相互作用することも考えられる。逆に、*S. cerevisiae* で Abp1p と相互作用すると報告されているタンパク質の *A. oryzae* におけるホモログのほとんどは、今回のスクリーニングでは見出されなかった。当然、Abp1p と AoAbp1 で対応するホモログ全てと相互作用するとは限らないが、AipC のように相互作用するものの中にはあるだろう。この点に関しては、スクリーニング方法の違いが一因であると考えられる。今回は *HIS3* と *ADE2* レポーターの両方を使用し、AoAbp1 と相互作用が強いと予想されるもののみを解析したために、多くの因子が見つからなかったと考えられる。*ADE2* レポーターを使用せず、*HIS3* レポーターのみを使用する等、スクリーニング方法を変更することで、AoAbp1 と比較的弱い相互作用相手を見つけられる可能性がある。しかし、繰り返しになるが、弱い相互作用を検出できる代わりに、偽陽性の数も当然増えるので作業としては大変なものになるだろう。さらに、ライブラリーの質と検定数もスクリ

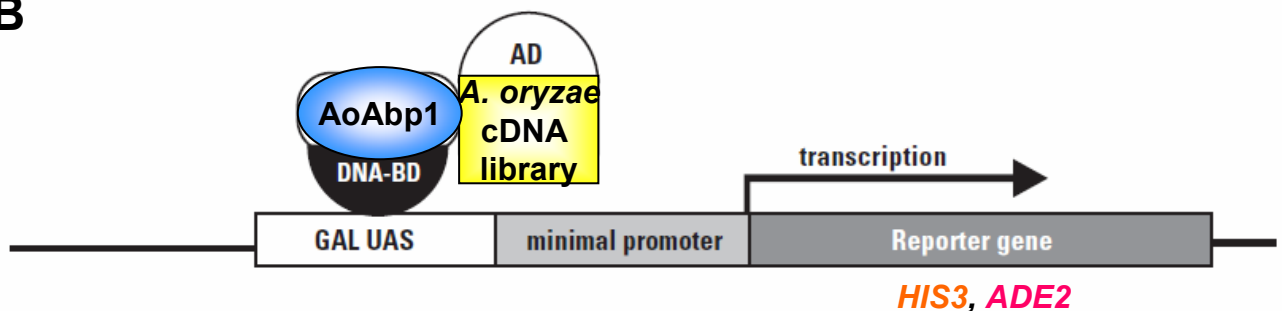
ーニング結果の主要な要因であることは言うまでもない。今回のスクリーニングでは、*A. oryzae* の遺伝子数約 1.2×10^4 に対し、cDNA ライブラリーのタイター数は 1×10^5 、検定数は 2.2×10^6 であった。今回の cDNA の調製に用いたトータル RNA 内で発現量の低い遺伝子はライブラリーに反映されないため、cDNA ライブラリーのタイター自体が充分ではなかった可能性も考えられる。しかし、この cDNA ライブラリーを用いてのスクリーニング検定数は、タイターの 22 倍と充分であった。以上から、AoAbp1 と相互作用する因子をさらにスクリーニングする場合は、より高いタイターの cDNA ライブラリーを用いることが良策である。*S. cerevisiae* の YTH データは、複数のスクリーニングや研究結果をまとめたものなので、AoAbp1 との相互作用相手に関しては、今回明らかになったもの以外に他にも存在する可能性が高いだろう。

今回の YTH スクリーニングで、AoAbp1 は少なくとも 4 つのタンパク質と相互作用することが示唆された。*S. cerevisiae* の Abp1p が、YTH 解析以外の方法で報告されているものを含めて、40 ものタンパク質と物理的に相互作用することを考慮すると、AoAbp1 もそれと同等かそれ以上のタンパク質と相互作用する可能性がある。エンドサイトーシス関連因子の中で、*S. cerevisiae* において特に解析の行われているタンパク質間での相互作用およびそれらのタンパク質と機能的に対応すると考えられる *A. oryzae* のタンパク質間相互作用を Fig. 2-6 にまとめた。今回の結果から、*A. oryzae* と *S. cerevisiae* ではエンドサイトーシス関連因子において AoAbp1 を中心にして異なるタンパク質間相互作用が存在する可能性が考えられた。AoAbp1 が菌糸先端部に主に局在し、エンドサイトーシスにおけるアクチンパッチ形成に関与しているとするならば、AoAbp1 と相互作用し今回同定された 4 つの Aip タンパク質もそれと近いところで機能すると予想される。

A



B



The two-hybrid principle. The DNA-BD is amino acids 1–147 of the yeast GAL4 protein, which binds to the GAL UAS upstream of the reporter genes. The AD is amino acids 768–881 of the GAL4 protein and functions as a transcriptional activator.

Matchmaker™ Library Construction & Screening Kits User Manual (Clontech)

Fig. 2-1 YTHスクリーニングの実験系

(A) YTHスクリーニングに用いたAoAbp1と*S. cerevisiae* Abp1pの一次構造の比較。AoAbp1は、Abp1pに比べC末端領域が200アミノ酸残基程長く、タンパク質間の相互作用に関わるSH3ドメインを1つ多く持つ。こうした特徴から、AoAbp1において、Abp1pでは見られないタンパク質間相互作用が見つかる可能性が考えられた。

(B) 本研究で用いたYTHスクリーニングの実験系。Baitには、全長のAoAbp1を、preyには*A. oryzae*のcDNAライブラリーを用いた。レポーターには、*HIS3*、*ADE2*の2種類の栄養要求性遺伝子を用いた。

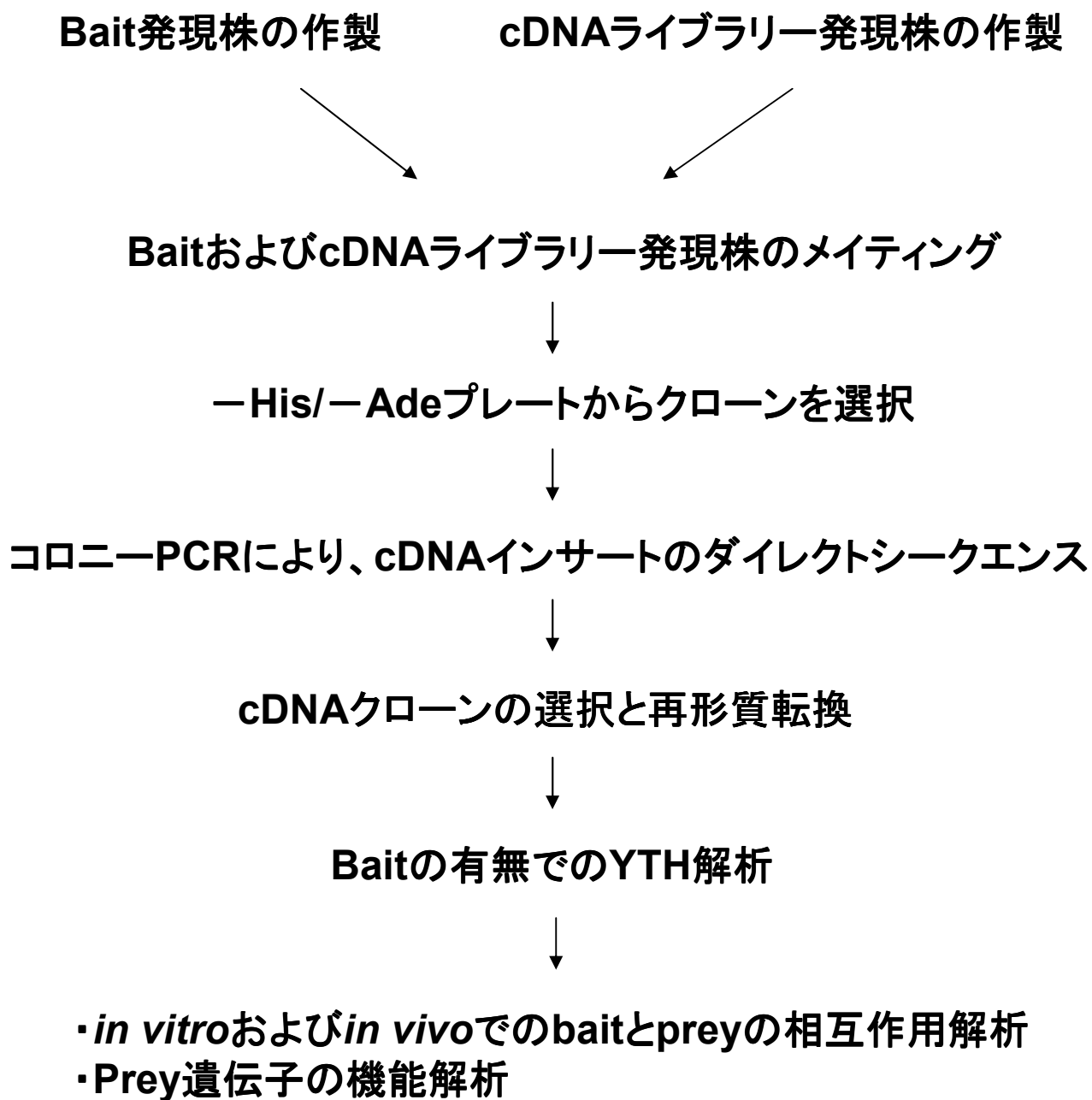


Fig. 2-2 YTHスクリーニングの流れ

Table 2-1 YTHスクリーニングの結果ー1

<i>A. oryzae</i> cDNAライブラリーのタイター	1×10^5
スクリーニングコロニー数	2.2×10^6
cDNAインサートのシーケンス数	42
独立したORFの数	16
再現性が確認されたクローン数	5

Table 2-2 YTHスクリーニングの結果-2

Clone	Chromo- some	Super Contig	Locus	Gene ID	Annotation
1	7	011	864110-862886	AO090011000338	60S ribosomal protein L7
2	7	011	864110-862886	AO090011000338	60S ribosomal protein L7
3	8	010	929275-930205		
4	1	005	2724179-2726361	AO090005001020	predicted protein
5	7	206	339052-339401	AO090206r00003	28S rRNA
6	2	003	28621-28511		
7 (Prey2)	2	003	985814-987955	AO090003000368	AAA+-type ATPase
8	2	003	28621-28511		
9	2	003	985814-986104*	AO090003000368	AAA+-type ATPase
10 (Prey2)	2	003	985814-987955	AO090003000368	AAA+-type ATPase
11	6	038	880038-881928	AO090038000337	putative α -1,2-mannosidase
12	2	001	876095-877166		
13	2	001	1421532-1419149	AO090001000544 AO090001000543	β -glucosidase-related glycosidases permeases of the major facilitator superfamily
14		47Q_0173	13093-13366		
15	2	003	437164-437856		
16	2	003	1020407-1021918		
17		47Q_0173	13093-14042		
18	2	003	808949-807907	AO090003000299	DNA helicase
19	2	003	437563-437856*		
20	3	023	90753-90112		
21	7	011	1644988-1645368		
22	2	003	3458352-3458111		
23	7	011	1644988-1645368		
24	7	011	679135-679447		
25	1	009	593878-594125	AO090009000219	isocitrate lyase
26	8	010	590976-590074	AO090010000223	40S ribosomal protein S2/30S ribosomal protein S5
27	1	005	3598253-3598188		
28	2	003	3458352-3458111		
29	2	001	1548289-1547903	AO090001000590	dehydrogenase
30	7	rDNA-te13			
31 (Prey10)	3	023	1384347-1385151	AO090023000527	predicted protein
32	2	001	214326-213024	AO090001000097	nucleoside phosphorylase
33 (Prey11)	3	023	1384758-1385158	AO090023000527	predicted protein
34 (Prey12)	1	005	1502520-1503475	AO090005000576	myosin class I heavy chain
35 (Prey12)	1	005	1502520-1503475	AO090005000576	myosin class I heavy chain
36 (Prey13)	1	005	2724431-2726701	AO090005001020	predicted protein
37 (Prey10)	3	023	1384347-1385151	AO090023000527	predicted protein
38	7	011	864110-862884	AO090011000338	60S ribosomal protein L7
39	2	003	3608069-3608864		
40	3	026	52583-53060	AO090026000016	predicted protein (dehydrogenase)
41 (Prey14)	7	011	1646054-1647031	AO090011000638	chaperone mortalin HSP70 superfamily localized in mitochondria
42 (Prey15)	8	103	644116-642272	AO090103000244	predicted protein

*cDNAインサートを片側からのみ確認。42のクローンから16の独立したORFが見出された。

Table 2-3 YTHスクリーニングの結果ー3

Prey	Chromo- some	Super Contig	Locus	Description
2	2	003	985814-987955	AO090003000368 AAA+-type ATPase (AipA)
10	3	023	1384347-1385151	AO090023000527 predicted protein (AipC)
11	3	023	1384758-1385158	AO090023000527 predicted protein (AipC)
12	1	005	1502520-1503475	AO090005000576 myosin class I heavy chain (AipB)
13	3	005	2724431-2726701	AO090005001020 predicted protein (AipD)
14	7	011	1646052-1647035	AO090011000638 chaperone mortalin HSP70 superfamily
15	8	103	644116-642272	AO090103000244 predicted protein

AoAbp1をbaitにしたYTHスクリーニングによって見出された16の独立するORFから、細胞内輸送に関連すると考えられるものや機能未知のタンパク質をコードすると予想される遺伝子の一部である上記の7つのpreyの再現性確認を行った (Fig. 2-3、2-5を参照)。Locusは、preyのcDNAインサートをシーケンスして読まれた領域。遺伝子領域およびアノテーションは、DOGANデータベース (<http://www.bio.nite.go.jp/dogan/Top>) および酒類総合研究所データベース (<http://nribf2.nrib.go.jp/>) に基づく。

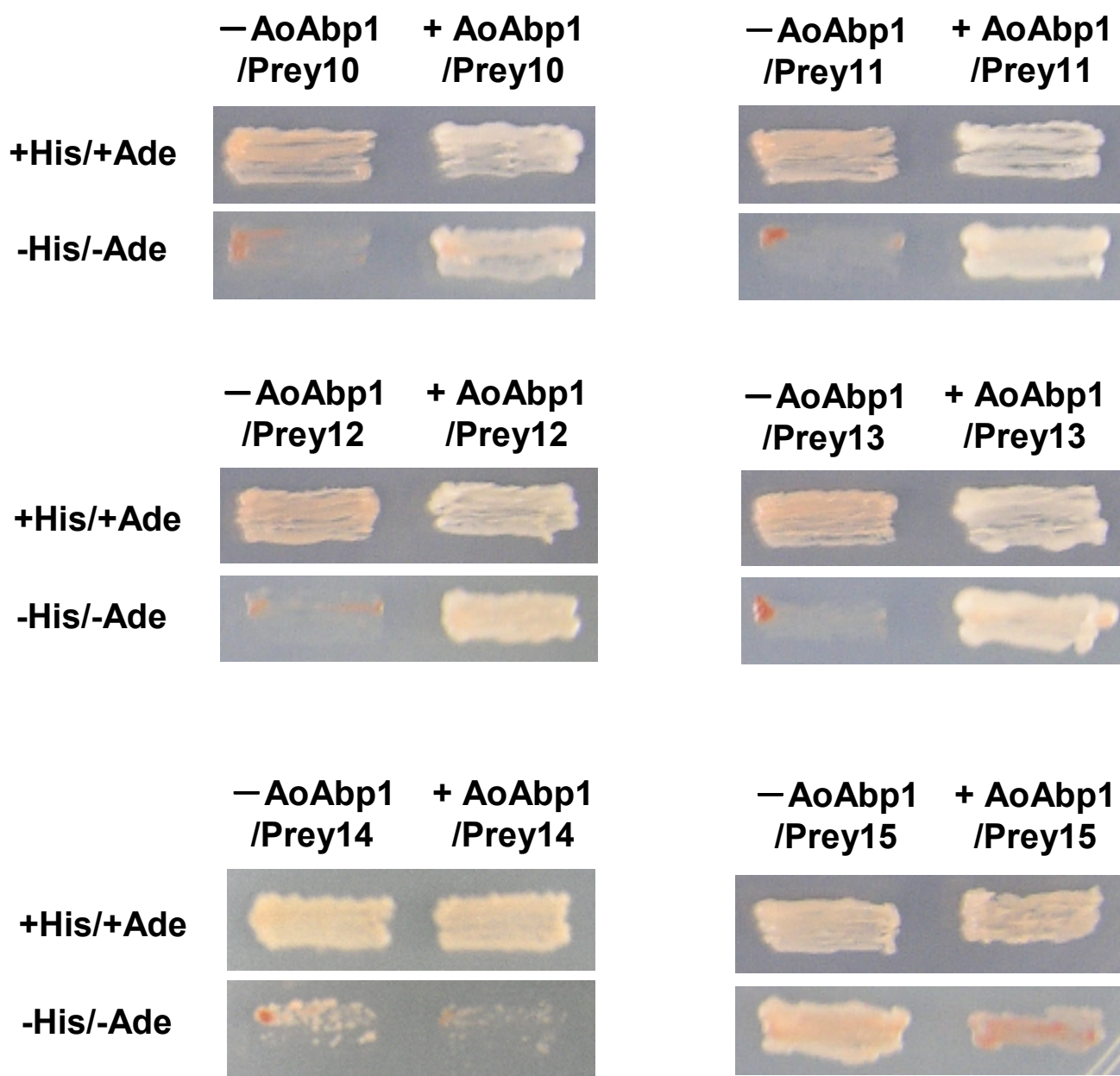


Fig. 2-3 YTHスクリーニングの再現性確認

Prey2, Prey10, Prey11, Prey12, Prey13がポジティブクローンとして再現性が確認された (Prey2の結果はFig. 2-5を参照)。Prey14は再現性が得られず、Prey15は偽陽性のクローンであると判断した。

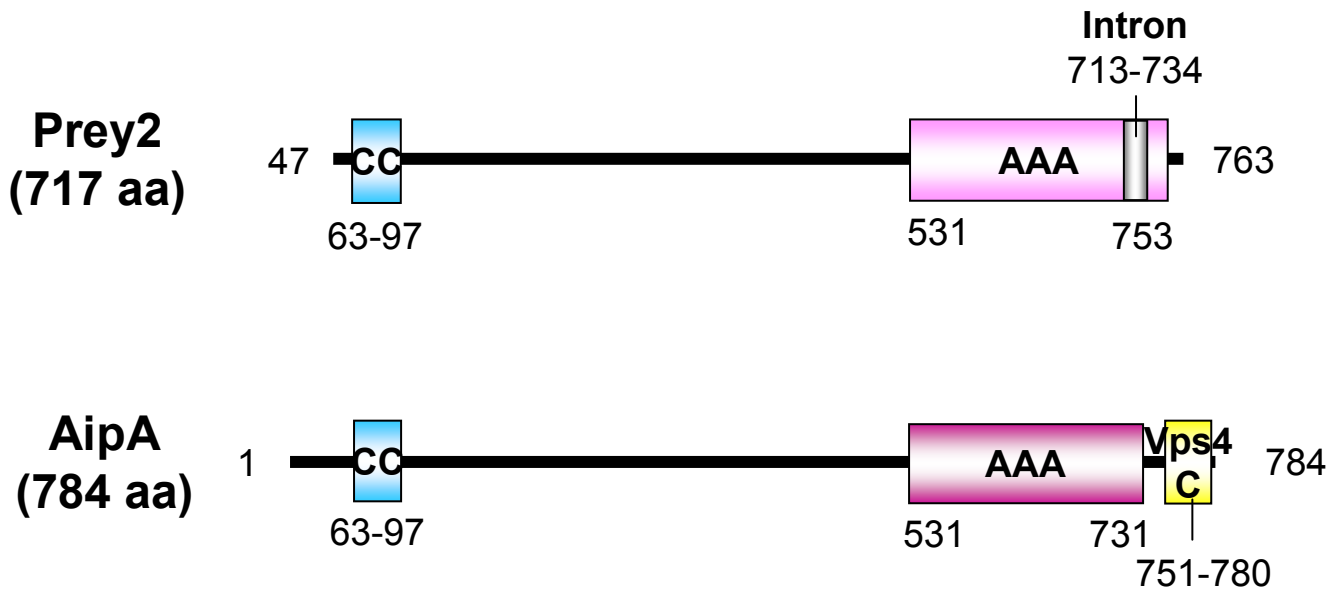


Fig. 2-4 AipA (AoAbp1 interacting protein) の一次構造

Prey2においてAAA ATPaseドメインと推定された領域の一部である22アミノ酸残基は、イントロンから翻訳されたものであり、それによるフレームのずれは無かったことが分かった。そこで、prey2と相同性を示すタンパク質をコードする遺伝子を1つ見出し、これを *aipA* (AoAbp1 interacting protein) と名付けた。

CC, Coiled-Coil; AAA, ATPase family associated with various cellular activities; Vps4 C, Vps4 C-terminal oligomerization domain

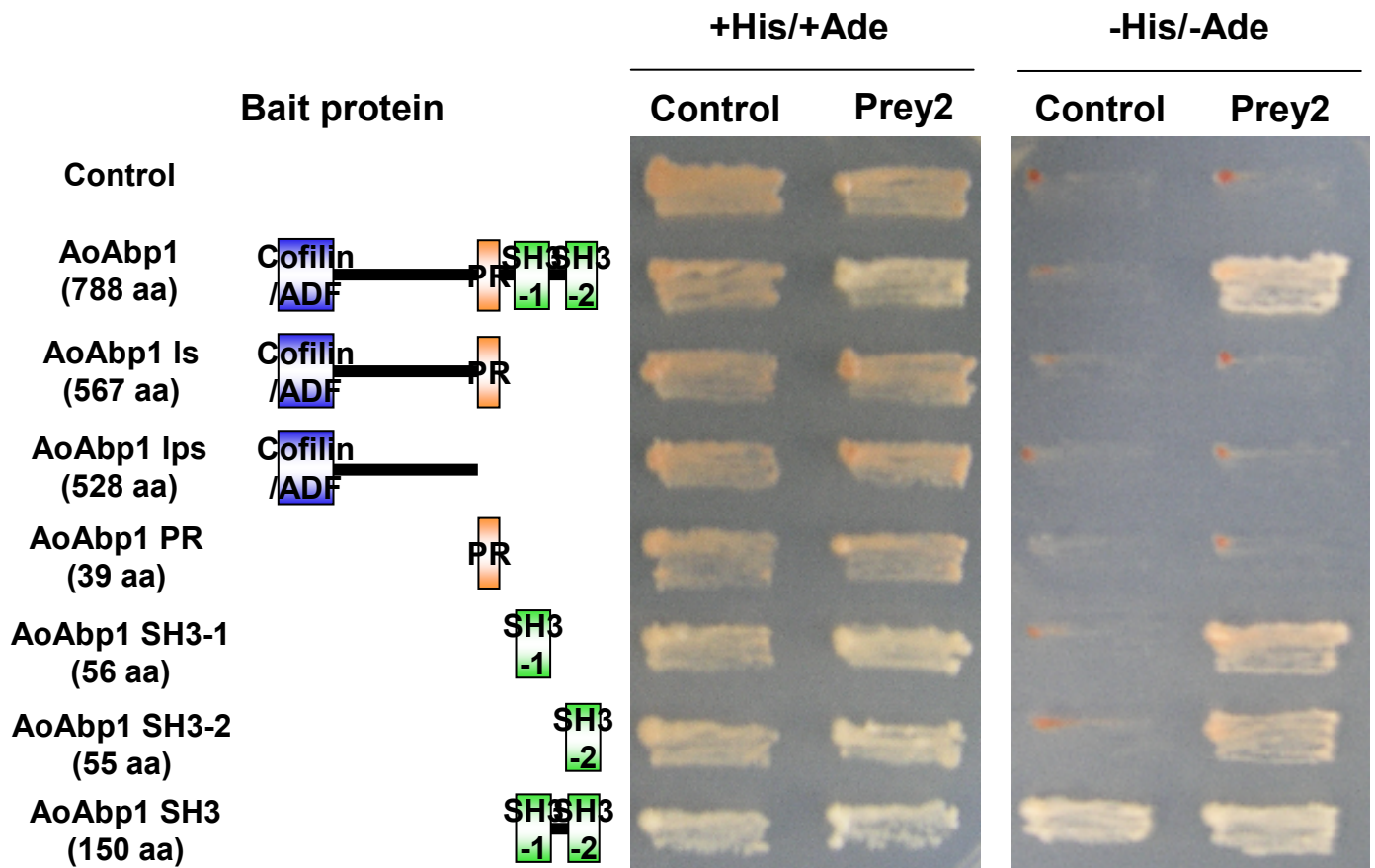


Fig. 2-5 AoAbp1とPrey2とのYTH解析

Prey2はAoAbp1全長と相互作用した。さらに、prey2は、AoAbp1のそれぞれのSH3ドメインと相互作用し、proline-rich領域を含むその他の領域とは相互作用しないことが明らかとなった。AoAbp1の2つのSH3ドメインをbaitに用いると、prey2非依存的にレポーターが活性化されたため、今後の実験には使用しなかった。

Table 2-4 YTH解析によりAbp1pと相互作用することが報告されている20のタンパク質

Protein	Description
Srv2p	CAP (cyclase-associated protein) subunit of adenylyl cyclase complex; N-terminus binds adenylyl cyclase and facilitates activation by RAS; C-terminus binds ADP-actin monomers, facilitating regulation of actin dynamics and cell morphogenesis.
Prk1p	Protein serine/threonine kinase; regulates the organization and function of the actin cytoskeleton through the phosphorylation of the Pan1p-Sla1p-End3p protein complex.
App1p	Protein of unknown function, interacts with Rvs161p and Rvs167p; computational analysis of protein-protein interactions in large-scale studies suggests a possible role in actin filament organization.
Inp52p	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 5-phosphatase, synaptojanin-like protein with an N-terminal Sac1 domain, plays a role in endocytosis; hyperosmotic stress causes translocation to actin patches.
Ark1p	Serine/threonine protein kinase involved in regulation of the cortical actin cytoskeleton; involved in control of endocytosis.
Hua2p	Cytoplasmic protein of unknown function; computational analysis of large-scale protein-protein interaction data suggests a possible role in actin patch assembly.
Rvs167p	Actin-associated protein, subunit of a complex (Rvs161p-Rvs167p) involved in regulation of actin cytoskeleton, endocytosis, and viability following starvation or osmotic stress; homolog of mammalian amphiphysin.
Clp4p	Cdc42p activated signal transducing kinase of the PAK (p21-activated kinase) family, involved in septin ring assembly and cytokinesis; directly phosphorylates septins Cdc3p and Cdc10p; other yeast PAK family members are Ste20p and Skm1p.
Ysc84p	Protein involved in the organization of the actin cytoskeleton; contains SH3 domain similar to Rvs167p.
Pdr3p	Transcriptional activator of the pleiotropic drug resistance network, regulates expression of ATP-binding cassette (ABC) transporters through binding to cis-acting sites known as PDREs (PDR responsive elements).
Mth1p	Negative regulator of the glucose-sensing signal transduction pathway, required for repression of transcription by Rgt1p; interacts with Rgt1p and the Snf3p and Rgt2p glucose sensors; phosphorylated by Yck1p, triggering Mth1p degradation.
Rpo31p	RNA polymerase III subunit C160, part of core enzyme; similar to bacterial beta-prime subunit.
Hsl7p	Protein arginine N-methyltransferase that exhibits septin and Hsl1p-dependent bud neck localization and periodic Hsl1p-dependent phosphorylation; required along with Hsl1p for bud neck recruitment, phosphorylation, and degradation of Swe1p.
Std1p	Protein involved in control of glucose-regulated gene expression; interacts with protein kinase Snf1p, glucose sensors Snf3p and Rgt2p, and TATA-binding protein Spt15p; acts as a regulator of the transcription factor Rgt1p.
Lsb3p	Protein containing a C-terminal SH3 domain; binds Las17p, which is a homolog of human Wiskott-Aldrich Syndrome protein involved in actin patch assembly and actin polymerization.
Ycr099cp	Putative protein of unknown function.
Chl1p	Conserved nuclear protein required to establish sister-chromatid pairing during S-phase, probable DNA helicase with similarity to human BACH1, which associates with tumor suppressor BRCA1; associates with acetyltransferase Ctf7p.
Rsc3p	Component of the RSC chromatin remodeling complex; essential gene required for maintenance of proper ploidy and regulation of ribosomal protein genes and the cell wall/stress response; highly similar to Rsc30p.
Hal9p	Putative transcription factor containing a zinc finger; overexpression increases salt tolerance through increased expression of the ENA1 (Na ⁺ /Li ⁺ extrusion pump) gene while gene disruption decreases both salt tolerance and ENA1 expression.
Bem3p	Rho GTPase activating protein (RhoGAP) involved in control of the cytoskeleton organization; targets the essential Rho-GTPase Cdc42p, which controls establishment and maintenance of cell polarity, including bud-site assembly.

SGD (*Saccharomyces genome database*) のデータを基に作成した。

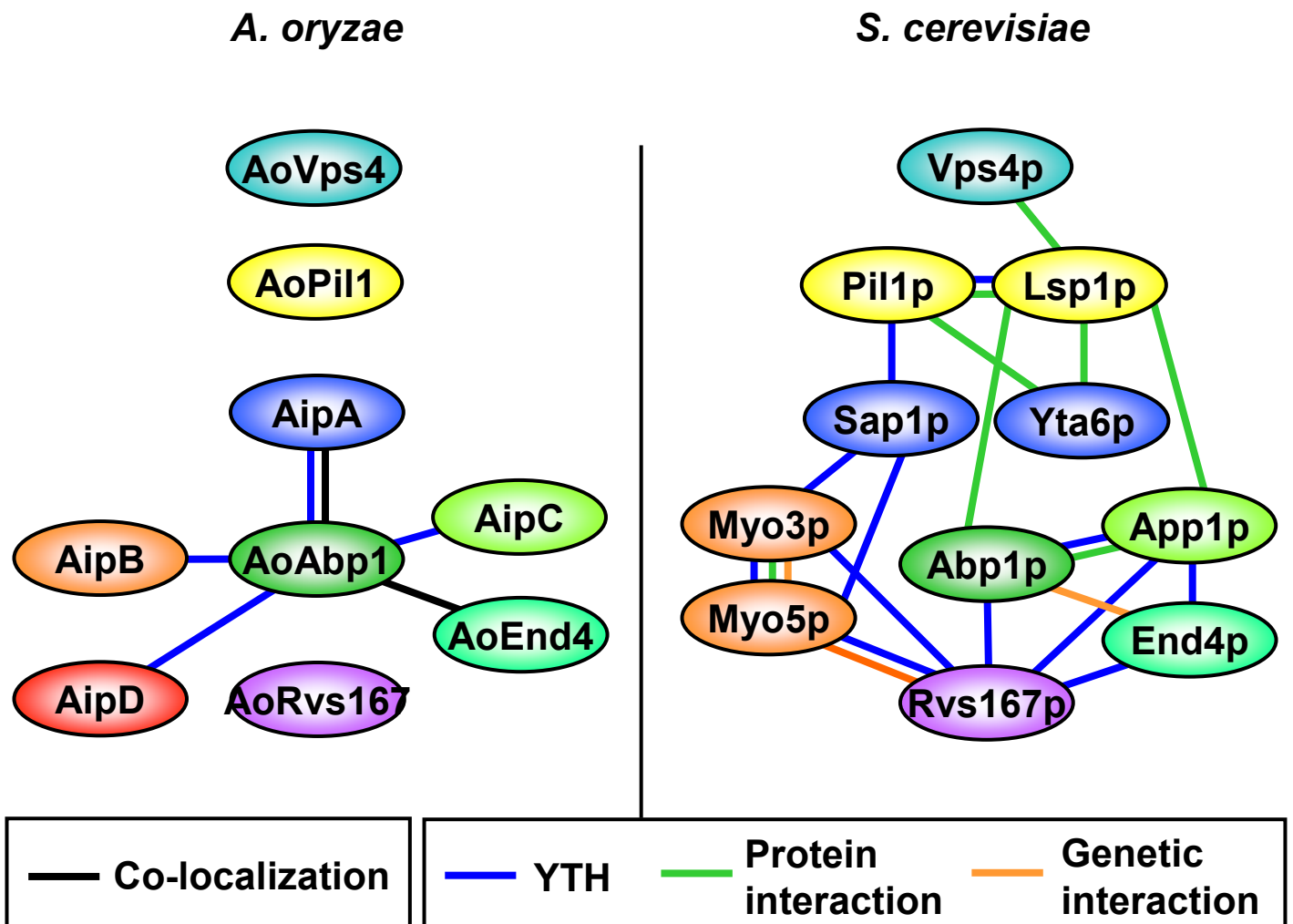


Fig. 2-6 *A. oryzae*と*S. cerevisiae*におけるエンドサイトーシス関連タンパク質の相互作用

*A. oryzae*と*S. cerevisiae*でホモログの関係にあるタンパク質同士を同色で示した。*A. oryzae*と*S. cerevisiae*ではエンドサイトーシス関連因子においてAoAbp1を中心にして異なるタンパク質間相互作用が存在する可能性が考えられた。AoAbp1が菌糸先端部に主に局在し、エンドサイトーシスにおけるアクチンパッチ形成に参与しているとするならば、AoAbp1と相互作用し今回同定された4つのAipタンパク質もそれと近いところで機能すると予想される。

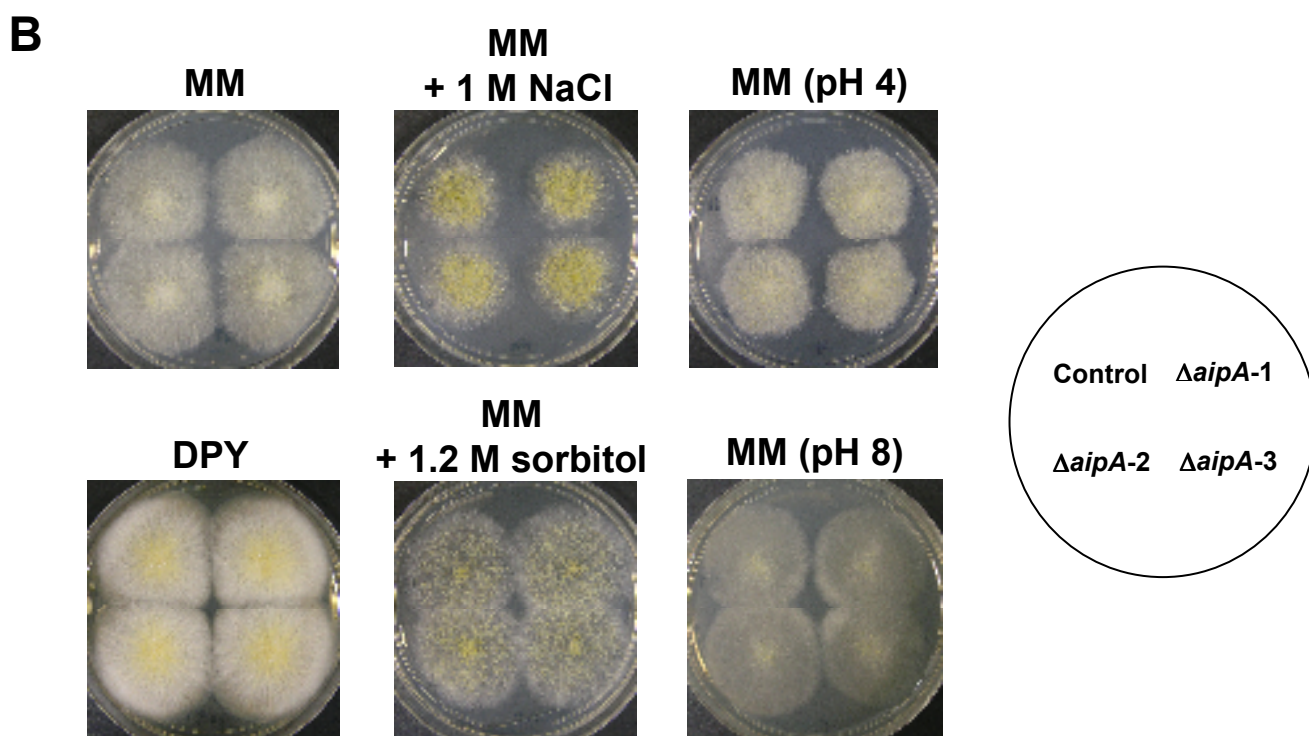
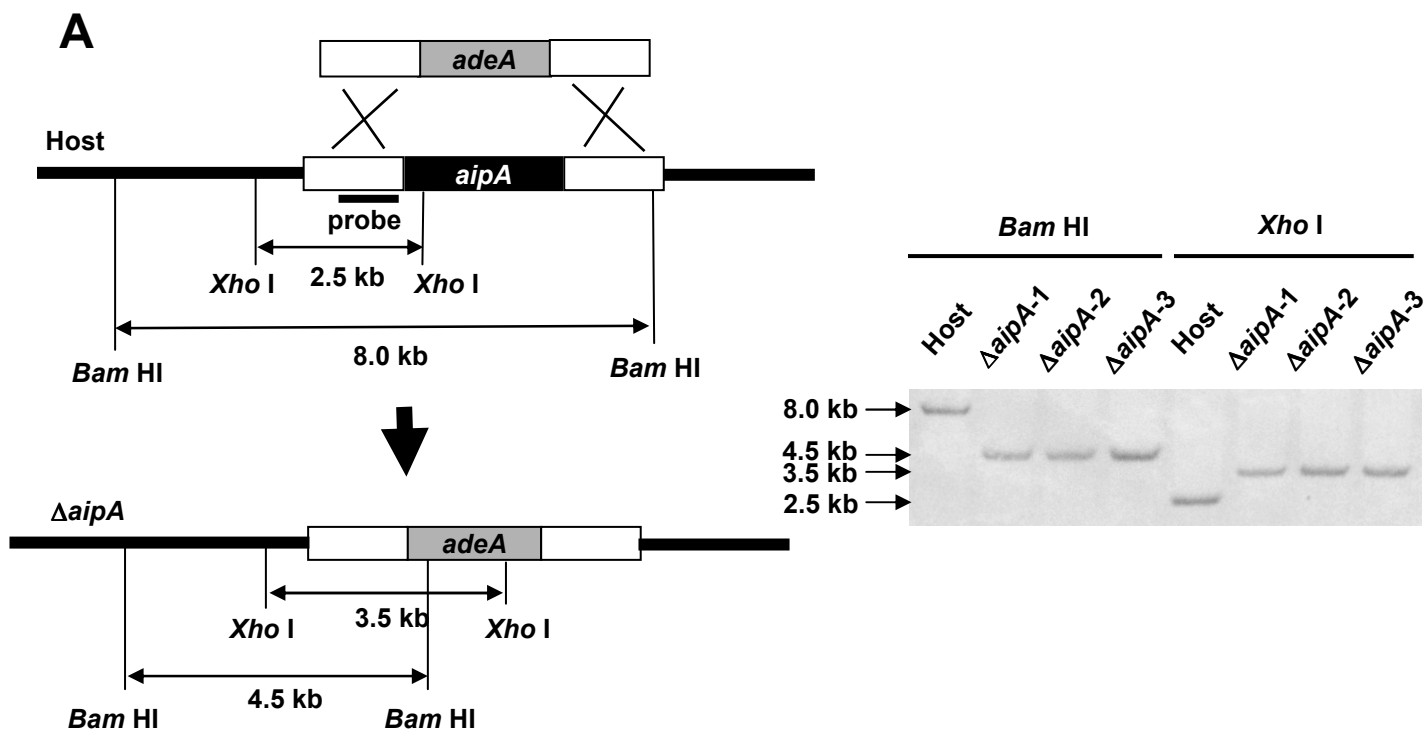


Fig. 3-8 *aipA*破壊株の作製とその生育比較

(A) サザン解析により3つの独立した*aipA*破壊株の取得を確認した。
 (B) 各株約 10^2 個/ $10 \mu\text{L}$ の分生子をさまざまなプレート上で 30°C 、4日もしくは5日間培養し比較した。コントロール株に比べて、 $\Delta aipA$ 株において顕著な生育阻害は見られなかった。

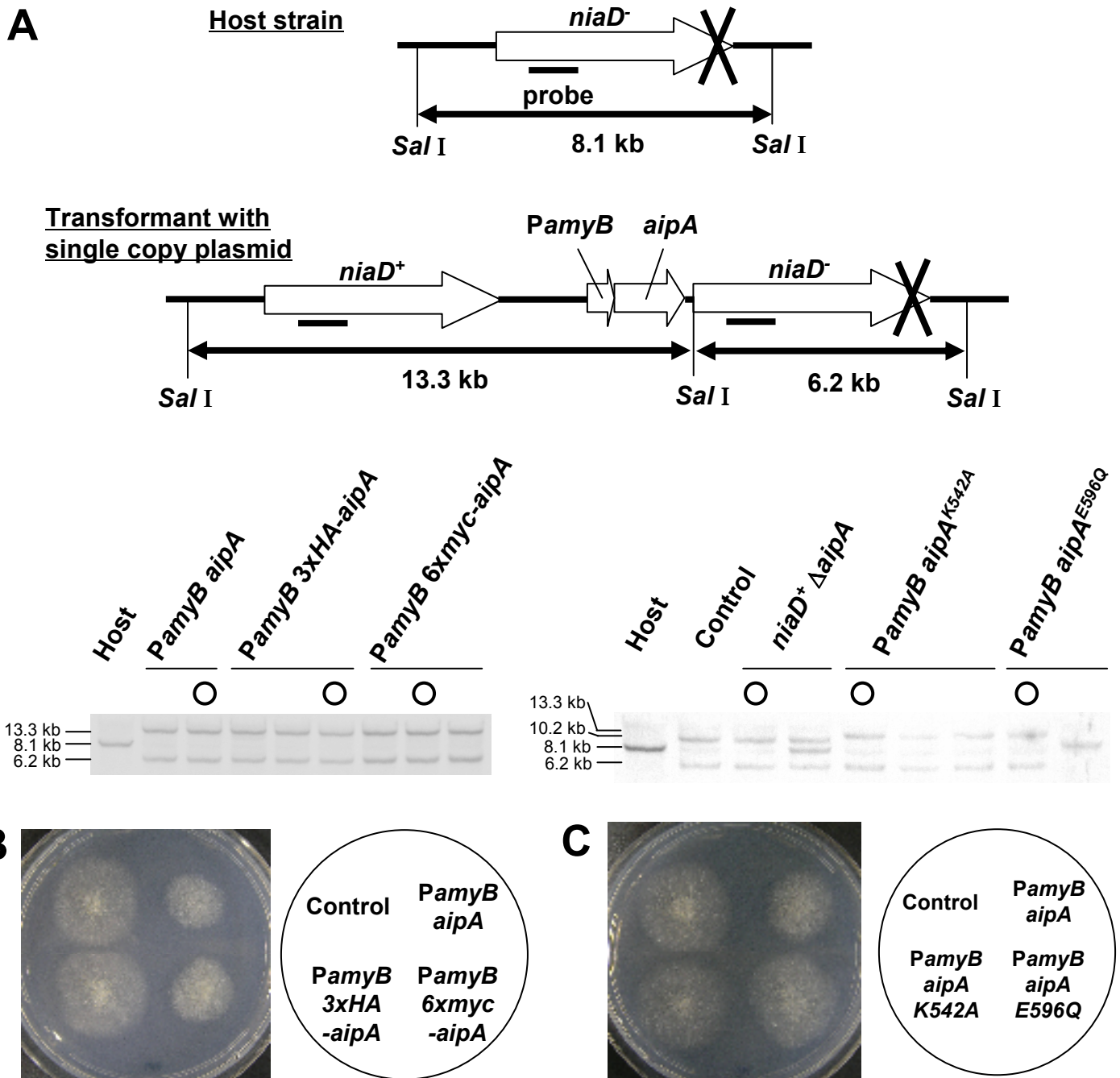


Fig. 3-9 aipA高発現株の作製とその生育比較

(A) *niaD*遺伝子座に*aipA*をPamyB下で高発現する株のサザン解析による確認。模式図ではタグ無しのコンストラクトを示すが、AipAのN末端に3×HAもしくは6×Mycタグを融合して発現する株も作製した。サザン解析のメンブレン写真において、丸印を付したレーンの株を以降の実験に使用した。コントロール株は、親株に*niaD*マーカーのみを導入した株。(B)、(C) 約 10^2 個/ $10\ \mu\text{L}$ の分生子を、PamyBの高発現誘導用のCDm-mal最少培地上で、 30°C にて5日間培養した。*aipA*および6×myc-*aipA*を高発現する株では生育阻害が見られた。しかし、3×HA-*aipA*を高発現する株では生育阻害が見られず、3×HA-AipAが機能的でないことが示唆された(B)。AAA ATPaseドメインに変異を導入した*aipA^{K542A}*および*aipA^{E596Q}*を高発現する株では生育阻害が見られず、AipA^{K542A}とAipA^{E596Q}が機能的でないことが示唆された(C)。

	<u>Walker A</u>	<u>Pore-1</u>
AipA	531 GMLLFGPPGTG K TMLARAVATESKSTFFSVSASTLTSKWHGESEKLVRALFGLAKALAPS	
Sap1p	640 GMLLFGPPGTG K TMLARAVATESHSTFFSISASSLTSKYLGESEKLVRALFAIAKKLSPS	
Yta6p	506 GMLLFGPPGTG K TMIAKAVATESNSTFFSVSASSLLSKYLGESEKLVRALFYMAKKLSPS	
Vps4p	168 GILLYGPPGTG K SYLAKAVATEANSTFFSVSSSDLVSKWMGESEKLVKQLFAMARENKPS	
	::*:*:*:*:*:*:*: :*:*:*:*:*:*:*:*:*: * * *:*: *:*:*:*:*:*:*:*:*: * * :*:*: * *	

	<u>Walker B</u>	<u>Pore-2</u>
AipA	591 IIFVDE E IDSLLSARSSGTENEASRRSKTEFLIQWSDLQRAAAGRESP----RDKKAGGDP	
Sap1p	700 IIFVDE E IDSIMGSRNNENENESSRRIKNEFLVQWSSLSSAAAGSNKSNNTNNSDTNGDEDD	
Yta6p	566 IIFIDE E IDSMLTARSD-NENESSRRIKTELLIQWSSLSSATAQ-----SEDRNNTLD	
Vps4p	228 IIFIDE E VDALTGTRGE-GESEASRRIKTELLVQMNGVG-----NDS	
	***:*:*:*:*:*: :*.. *.*:*:* *.*:*:* * ..:	

	<u>Sensor 1</u>	<u>SRH</u>
AipA	647 SRVLVLAATNMPWDIDEAARRRFVRRQYIPLPEHHVREKQLRRTLLSHQVHDLTDQDIDAL	
Sap1p	760 TRVLVLAATNLPWSIDEAARRRFVRRQYIPLPEDQTRHVQFKKLLSHQKHTLTESDFDEL	
Yta6p	617 SRVLVLGATNLPWAIDDAARRRFSRKLVIPLPDYETRLYHLKRLMAKQKNSLQDLDYELI	
Vps4p	268 QGVLVLGATNIPWQLDSAIRRRFERRIYIPLPDLAART M FEINVGDTPCVLTKEGYRT L	
	****.****:*:* :*.* **** *:*: *****: .* :. :.. * . * :	

	<u>Sensor 2</u>	
AipA	707 VQLTDGIVGSDITALAKDAAMGPLR	731
Sap1p	820 VKITEGYSGSDITSLAKDAAMGPLR	844
Yta6p	677 TEMTEGFSGSDLTSLAKEAAMEPIR	701
Vps4p	328 GAMTEGYSGSDIAVVVKDALMQPIR	352
	:*:* *:*:*: :.*:* * *:*:	

Fig. 3-10 AAA ATPaseドメインの比較

AipAと*S. cerevisiae*におけるホモログSap1pおよびYta6p、さらにAAA ATPaseファミリータンパク質で解析の進んでいるVps4pのAAA ATPaseドメインのアライメントを示す。4種のタンパク質におけるAAA ATPaseドメインは、よく保存されている。Vps4pのK179AおよびE233Q変異株では、ATPase活性に欠損があると報告されている。Vps4p^{K179A}はATPに結合できず、ATPase活性を示さない。Vps4pのK179 (緑) およびE233 (青) は、AipA、Sap1p、Yta6pの対応するアミノ酸残基でも保存されている。VPS4の温度感受性変異株では、M307T、L327Sの2箇所が変異している (橙)。しかし、AipA、Sap1p、Yta6pにおけるVps4pのM307、L327に対応するアミノ酸残基は保存されていない。

SRH; secondary region of homology

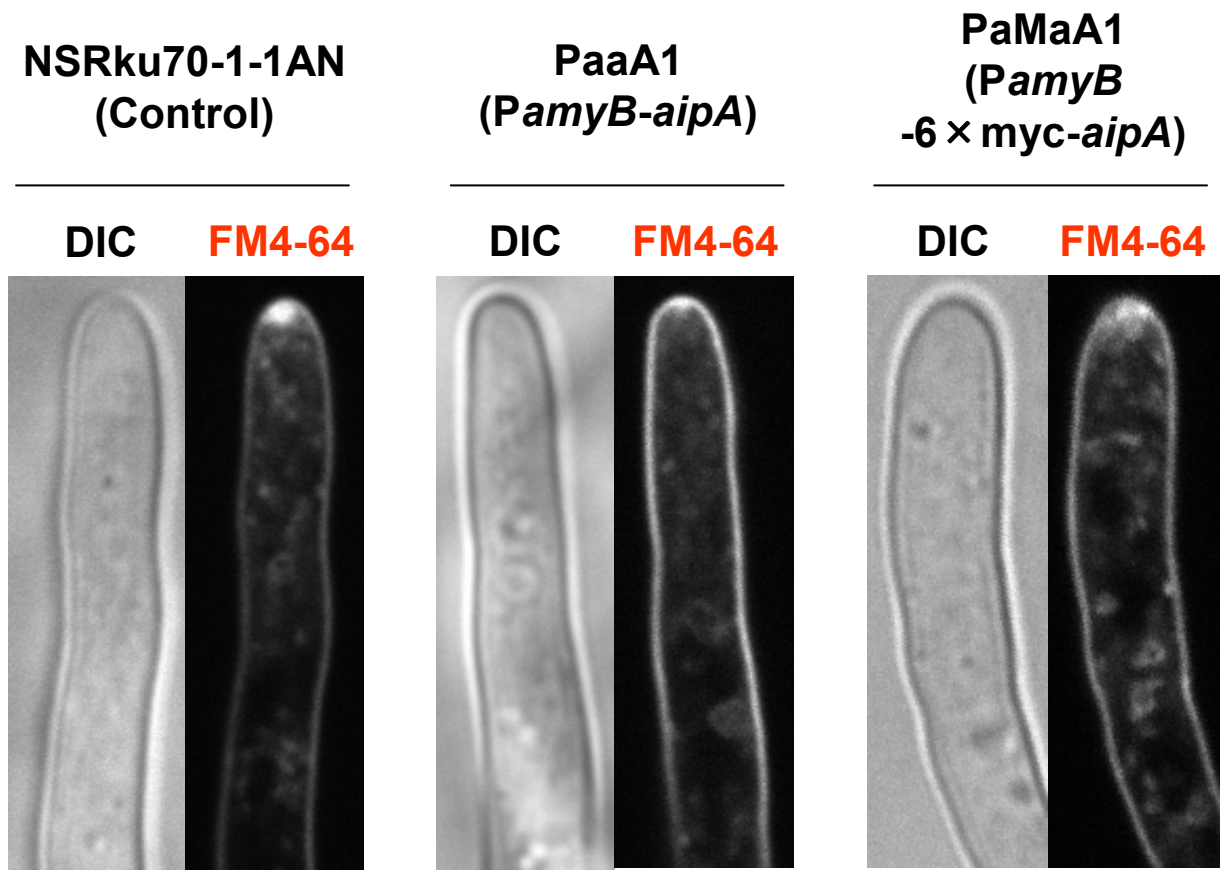


Fig. 3-11 *aipA*高発現株におけるFM4-64染色

分生子をCDm-mal液体培地に植菌して30°Cで25時間培養し、FM4-64染色を行い、室温で1時間静置した後、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。コントロール株、*aipA*高発現株、6 × *myc-aipA*高発現株においてFM4-64の取り込みに差は見られなかった。スケールバーは5 μm。

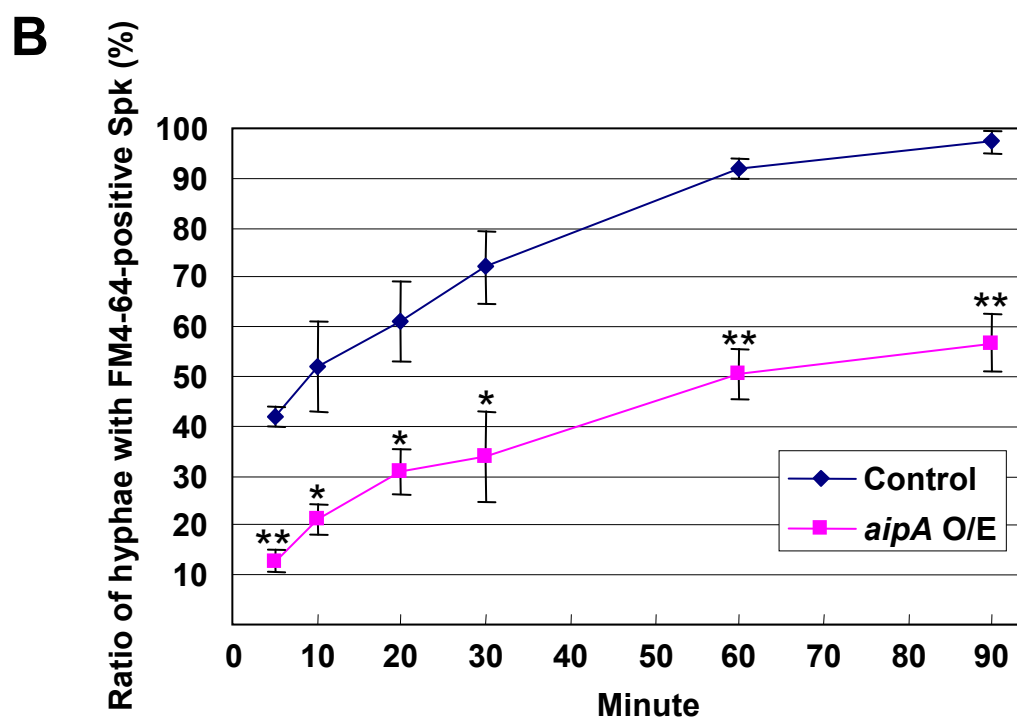
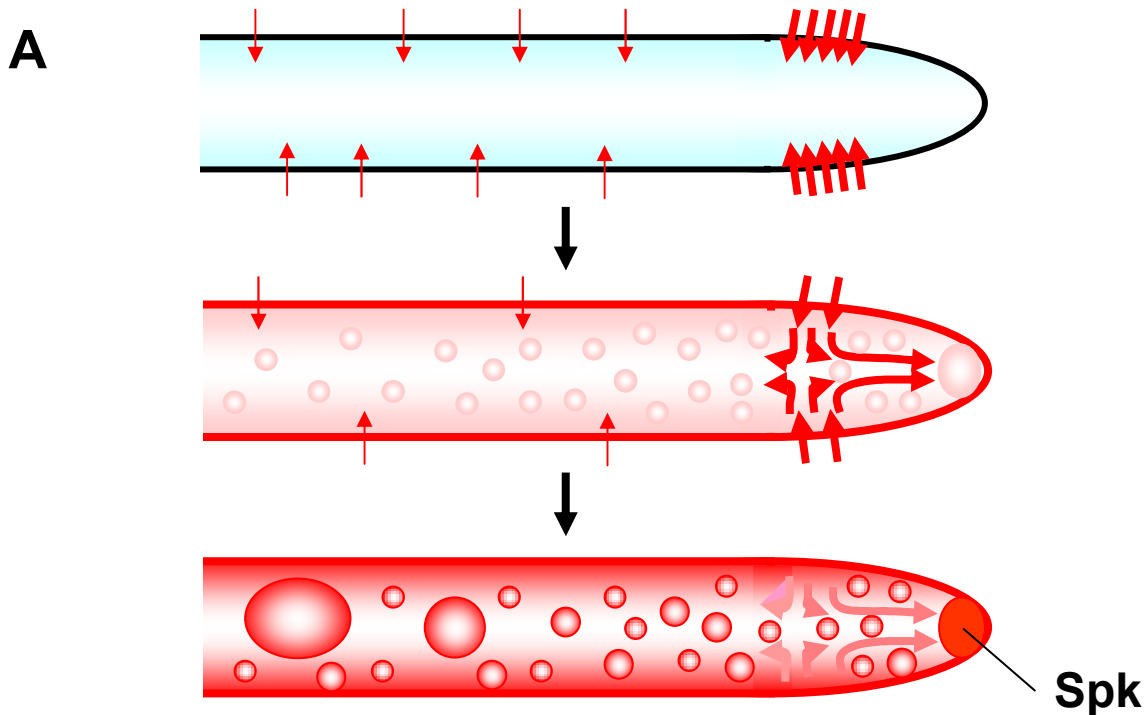


Fig. 3-12 *aipA*高発現株におけるFM4-64染色による経時的解析

分生子をCDm-mal液体培地に植菌して30°Cで18時間培養し、FM4-64染色を行った後、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

(A) 菌糸先端部での経時的なFM4-64の取り込みとSpitzenkörper (Spk) 可視化のモデル図。

(B) Spkの見られた菌糸の割合を各時間ごとに測定した。*; $p < 0.05$ 、**; $p < 0.01$ 。

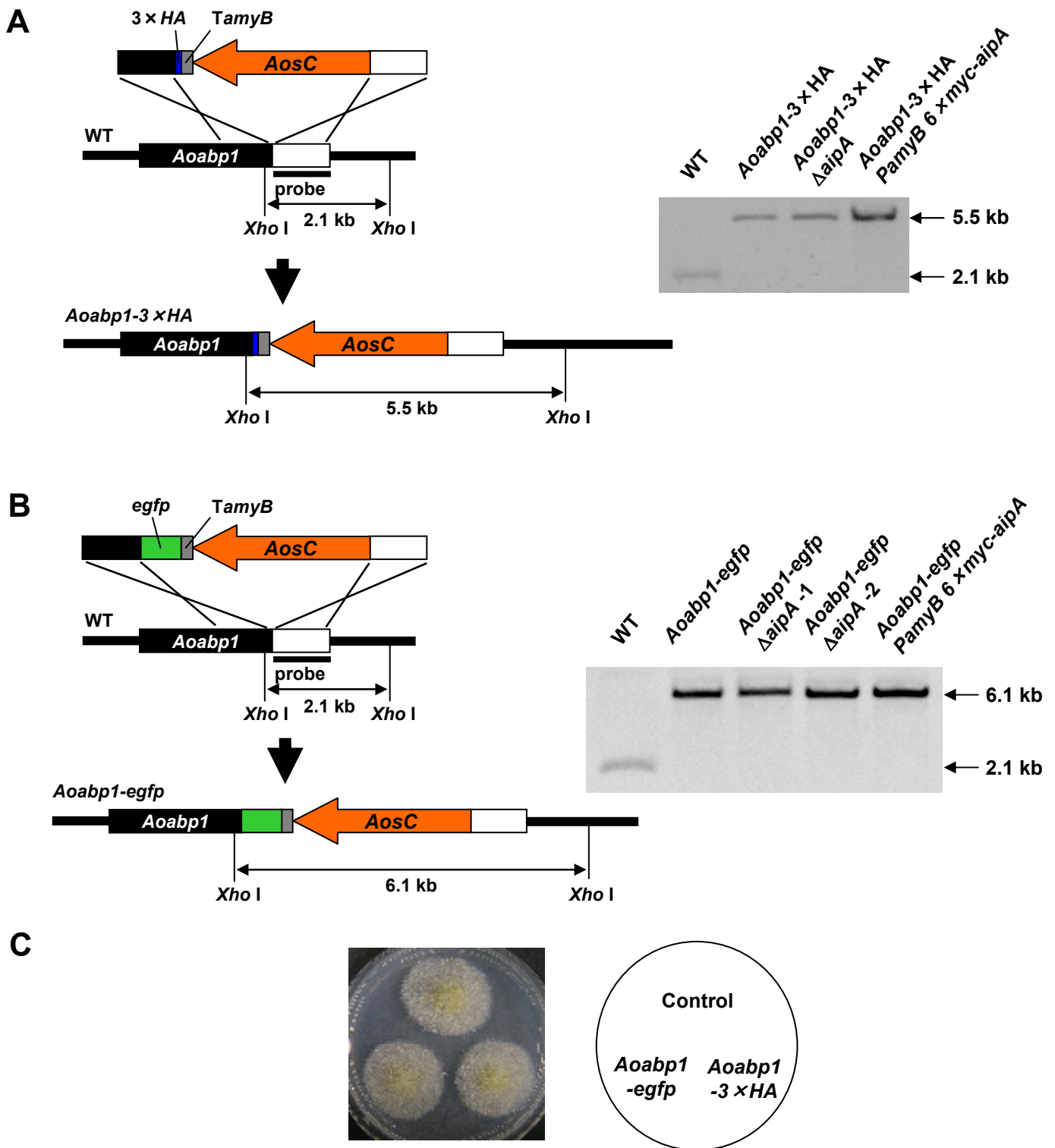


Fig. 3-13 *Aoabp1*遺伝子座で*Aoabp1-3 x HA*および*Aoabp1-egfp*を発現する株のサザン解析とそれらの株の生育比較

WT、*aipA*破壊、*aipA*高発現の背景で、*Aoabp1-3 x HA*および*Aoabp1-egfp*を発現する株を取得した。(A) *Aoabp1*遺伝子座への*Aoabp1-3 x HA*発現用DNAカセット導入の模式図とサザン解析の結果。(B) *Aoabp1*遺伝子座への*Aoabp1-egfp*発現用DNAカセット導入の模式図とサザン解析の結果。(C) 各株約 10^2 個/ $10 \mu\text{L}$ の分生子をM培地上で 30°C 、4日間培養し生育比較した。WTの背景の*Aoabp1-3 x HA*および*Aoabp1-egfp*発現株は、コントロール株と同様の生育を示した。

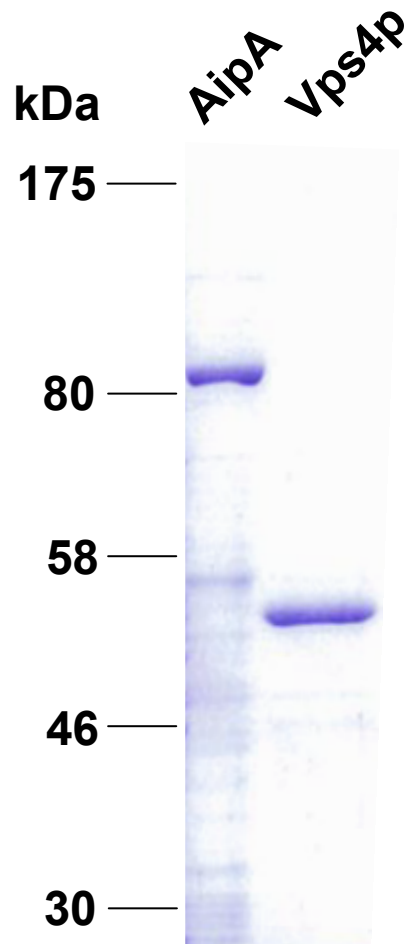


Fig. 3-14 組換えAipAとVps4pの精製

GST-AipAもしくはGST-Vps4pを含む大腸菌溶解液を、PreScission Proteaseを用いたglutathione sepharoseカラム内消化に供し、AipAとVps4pを精製した。AipAとVps4pの予想分子量は、それぞれ85.0 kDaと48.2 kDa。SDS-PAGE後のクマシー染色の結果、AipAはほぼ予想分子量のサイズにバンドが検出された。一方、Vps4pは、若干大きめのサイズに検出されたが、この結果は以前報告されたものと同様の結果であった (Babst *et al.*, 1997)。

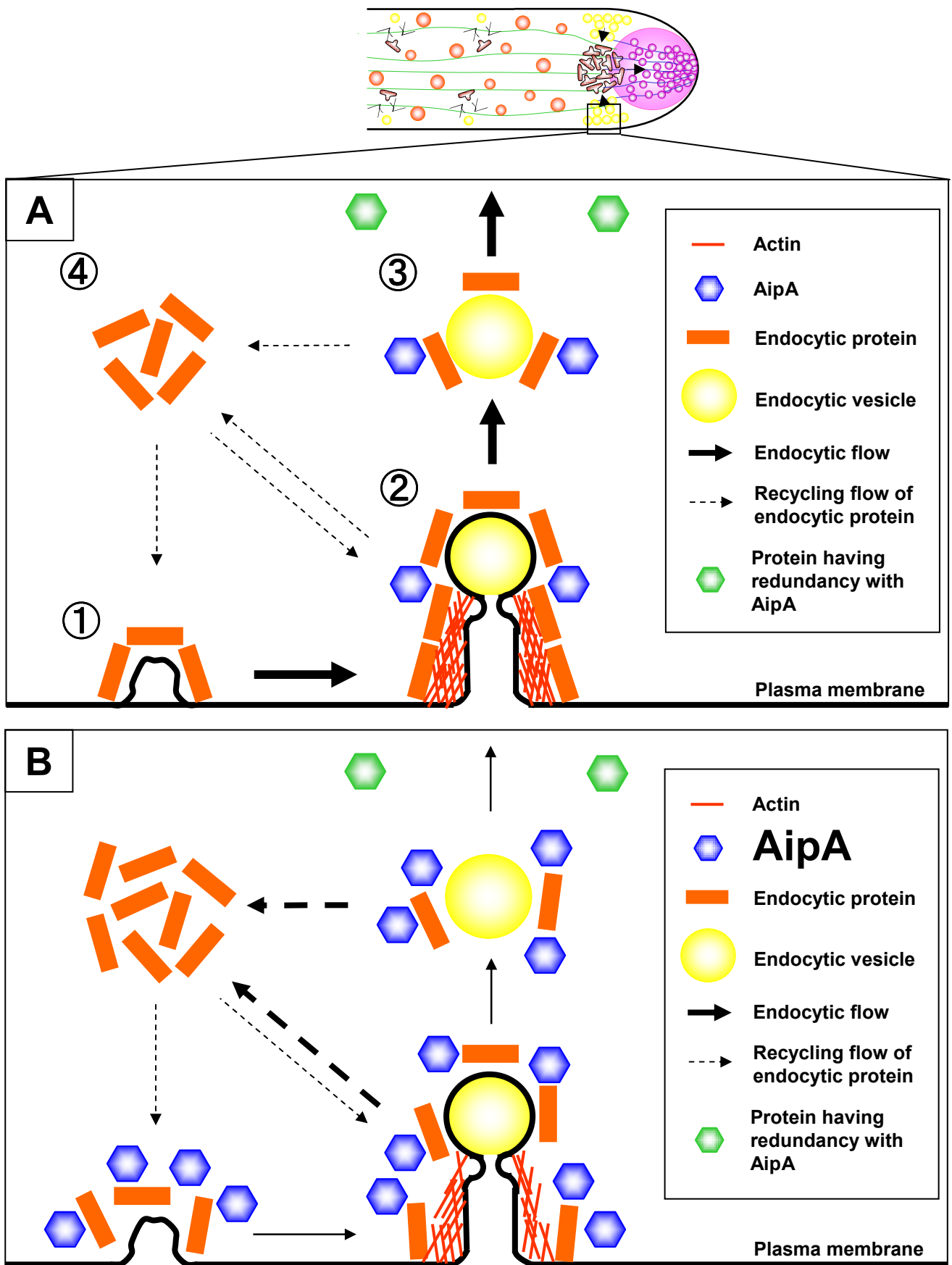


Fig. 3-15 AipAの機能に関するモデル図

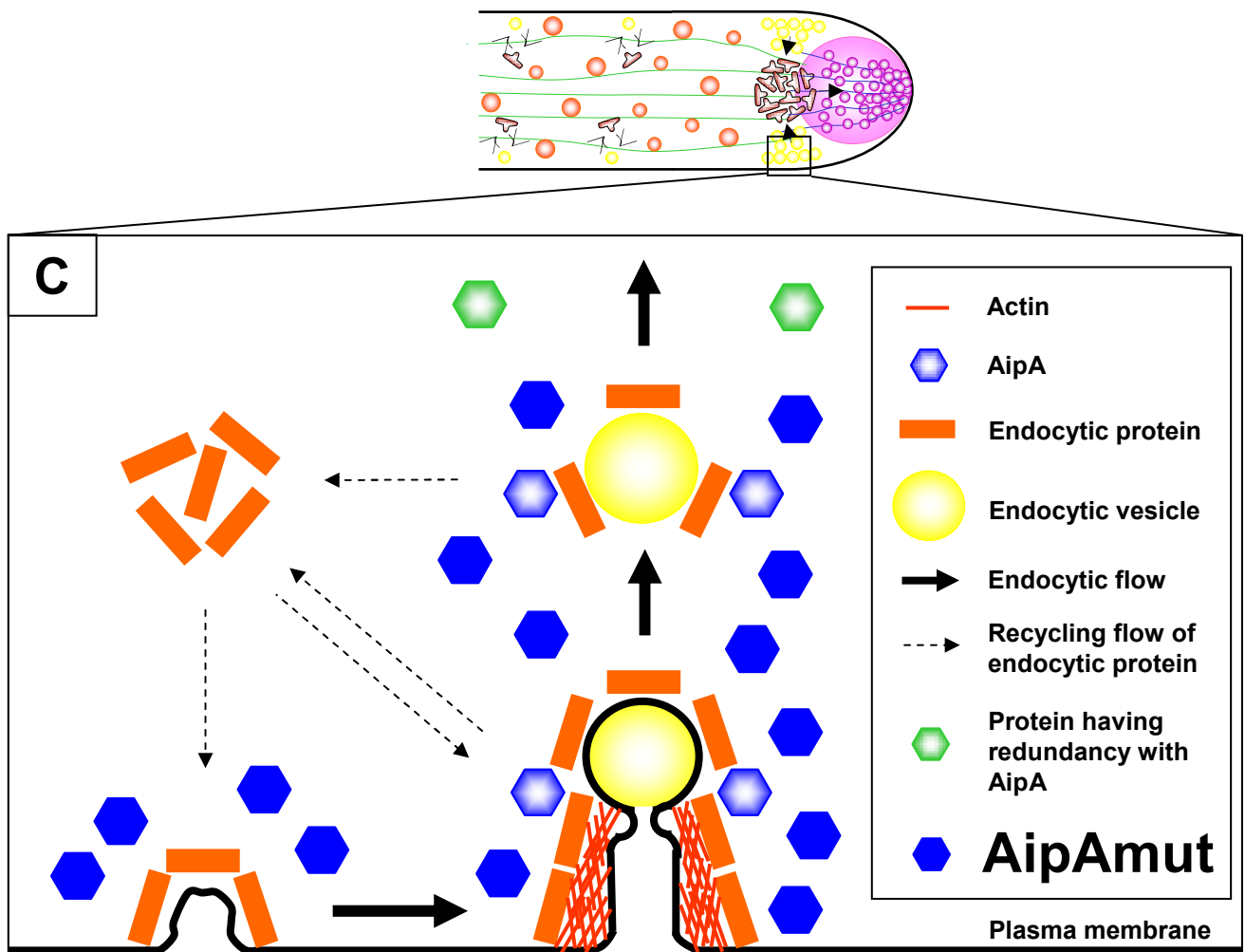


Fig. 3-15 AipAの機能に関するモデル図

(A) WTの株におけるAipAの機能に関するモデル図。

- ①エンドサイトーシス関連タンパク質群の働きにより陥入が形成される。
- ②発達したアクチンパッチにより、陥入が細胞内へと伸長していく。
- ③エンドサイトーシス小胞が形成され、その後のエンドサイトーシス経路へと送られる。
- ④AipAの働きにより、エンドサイトーシス関連タンパク質群がエンドサイトーシス小胞から解離し、細胞質に遊離する。そして、再びエンドサイトーシスにおいて機能できるように、リサイクリングを促進している。

また、AipAと機能の重複したタンパク質が存在する可能性も考えられる。

(B) WTのAipAを高発現した株におけるモデル図。

AipAがAoAbp1を含むエンドサイトーシス関連タンパク質群を必要以上に細胞質へと遊離させてしまうことにより、エンドサイトーシスの効率が減少すると予想される。

(C) 変異AipA (K542A、E596Q) を高発現した株におけるモデル図。

変異AipAは機能的ではなく、またそれら自体が多量に存在することによる細胞毒性も無いため、エンドサイトーシスへの影響は無いと予想される。

第3章 AAAATPase 様タンパク質の機能解析

序

AoAbp1 を bait にした YTH スクリーニングの結果見出した AipA は、AAA (ATPases associated with diverse cellular activities) ATPase ドメインを有していた。AAAATPase ファミリーのタンパク質は、原核生物からヒトに至るまで良く保存されており、これまで多くのタンパク質の解析がなされている (Fig. 3-0A) (White and Lauring, 2007)。一般的に、AAAATPase ファミリーのタンパク質は、C 末端領域に高度に保存された AAAATPase ドメインを有する (Fig. 3-0B)。しかし、AAAATPase ドメイン以外の領域はあまり保存されていない。AAAATPase は六角形のリング状構造の 6 量体を形成し、さらに 6 量体が 2 つ重なって 12 量体として機能する。12 量体の中空構造の部位で、ATPase 活性を用いて基質となるタンパク質の構造を変化させ、複合体の解離や分解・リフォールディングを行うと考えられている (Fig. 3-0C) (White and Lauring, 2007)。

AoAbp1 がエンドサイトーシスにおいて機能することから、AoAbp1 と相互作用する AipA もまたエンドサイトーシスにおいて機能することが予想されるが、エンドサイトーシスにおいて機能する AAAATPase は全生物種を通じてこれまでに報告がない。そこでまず、AipA と AoAbp1 の相互作用を YTH 以外でも検証し、さらに AipA の機能解析を試みた。

結果

3-1 麹菌 *aipA* 遺伝子のクローニング

野生株の RIB40 株を DPY 液体培地で 24 時間培養した菌体から抽出したトータル RNA を用いた RACE 解析により、*aipA* 遺伝子全長をクローニングした (Fig. 3-1)。その結果、AipA は 784 アミノ酸残基から構成されると予想された。また、10 サンプルの 5' RACE 解析の結果、すべてのクローンで同一の結果が得られ、5'-UTR 領域に 19 アミノ酸残基からなる uORF が一つ存在することを見出した (Fig. 3-1)。*A. nidulans* におけるゲノム解析の結果、解析した ORF の約 20% で uORF が存在し、遺伝子の翻訳を負に制御していることが報告されている (Galagan *et al.*, 2005)。AipA においても uORF が発現量を翻訳レベルで調節している可能性が考えられる。

BLAST (<http://blast.genome.jp/>) 検索の結果、*S. cerevisiae* では AipA ホモログは、Sap1p (Sin1, a protein involved in negative regulation of transcription, associated protein) と Yta6p (yeast Tat [tyrosine and tryptophan amino acid transporter] -binding analog) の 2 つが存在することが示唆された (Fig. 3-2)。AipA は Sap1p と e-value で e^{-119} 、一次構造レベルでは 34% の相同性を示した。また、AipA は Yta6p と e-value で e^{-106} 、一次構造レベルでは 33% の相同性を示した。Sap1p と Yta6p は一次構造レベルで 35% の相同性を示した。モチーフ検索の結果、AipA は N 末端付近に coiled-coil 領域を、C 末端付近に AAA ATPase ドメインを、さらに C 末端に Vps4 C 末端オリゴマー化ドメインを持つと推定された (Fig. 3-3)。AAA ATPase ドメイン同士の相同性を比較したところ、AipA と Sap1p では 71%、AipA と Yta6p では 63%、Sap1p と Yta6p では 69% と比較的高い相同性を示し、AAA ATPase ドメインが保存されていることが推測された。次に、AAA ATPase ドメインより N 末端側の領域での相同性を比較したところ、AipA と Sap1p では 18%、AipA と Yta6p では 20%、Sap1p と Yta6p では 20% と一次構造レベルでの相同性は低かった。Sap1p と Yta6p は、共に AAA ATPase と推定されているものの、それらの生理機能はわかっていない。また、Sap1p と Yta6p はともに Abp1p と相互作用するとは報告されていない。動物細胞の AipA ホモログの中では、*H. sapiens* Fidgetin-like 1 が $4e^{-80}$ と最も高い相同性を示した (Fig. 3-3)。Fidgetin-like 1 もまた、C 末端領域に AAA ATPase ドメインを有する AAA ATPase ファミリーのタンパク質である。Fidgetin は、ショウジョウバエの細胞の分裂後期において、微小管の脱重合を促

進する因子との報告がある (Zhang *et al.*, 2007)。さらに AipA は、*S. cerevisiae* Vps4p と e-value で $3e^{-64}$ の相同性を示した。一次構造レベルでは、AipA と Vps4p 全長同士の相同性は 31%、AAA ATPase ドメイン同士は 55%、AAA ATPase ドメインより N 末端側の領域の相同性は 20%であり、同じ AAA ATPase ファミリーのタンパク質のため比較的高い相同性を示したと考えられる (Fig. 3-3)。Vps4p はエンドサイトーシス経路のオルガネラである multivesicular body (MVB) の形成過程において機能すると考えられることから、AipA がエンドサイトーシスにおいて機能すると仮定すると、Vps4p の *A. oryzae* におけるホモログ AoVps4 と AipA は細胞内の空間的に比較的近い場所で働いているのかもしれない。

また、BLAST 検索により、真菌類における AipA ホモログに関して Table 3 にまとめた。*A. oryzae* と同じ他の *Aspergillus* 属糸状菌では、AipA ホモログを 1 つずつ有していた。一方、*S. cerevisiae* 等の酵母類は AipA ホモログを 2 つずつ持ち、それらは *S. cerevisiae* の Sap1p と Yta6p に対応するものと考えられた。糸状菌に属する *N. crassa* は、今回の検索方法では AipA ホモログは見つからず、*N. crassa* において、最も e-value の高い AipA ホモログは Vps4p ホモログとしてアノテーションされていた。ゲノムレベルで *N. crassa* と近縁の *M. grisea* には AipA ホモログが 1 つ存在することから、*N. crassa* のゲノム解析でのアノテーション情報に不備がある可能性が考えられた。以上から、糸状菌には AipA ホモログは 1 つずつ存在すると予想された。

3-2 AipA と AoAbp1 の相互作用解析

AipA と AoAbp1 の 2 つの SH3 ドメインそれぞれが YTH 解析により相互作用することが示されたが (Fig. 2-5)、それらが *in vitro* においても相互作用するかを次に解析した (Fig. 3-4)。AoAbp1 の 2 つの SH3 ドメインと GST との融合タンパク質 (GST-AoAbp1 SH3s) を大腸菌を用いて調製した。また *A. oryzae* において、*niaD* マーカーを有し *PamyB* 下で $6 \times myc\text{-aipA}$ を発現するプラスミドを *niaD* 遺伝子座に導入した株を作製し、その細胞抽出液を調製した。それらを用いて GST プルダウンアッセイを行ったところ、GST-AoAbp1 SH3s と $6 \times Myc\text{-AipA}$ が結合することが確認された。

次に、AipA と AoAbp1 の相互作用部位を特定するため、YTH による AipA の欠失解析を行った (Fig. 3-5A)。その結果、AipA の coiled-coil ドメインおよび AAA ATPase ドメインは AoAbp1 の SH3 ドメインと相互作用せず、両ドメインの間にあたる 315～

422 アミノ酸残基の領域が AoAbp1 の SH3 ドメインと相互作用することが明らかとなった。一般的に、SH3 ドメインはプロリンリッチドメインと相互作用することが知られている。そこで、AipA の 315~422 アミノ酸残基の領域を詳細に調べた (Fig. 3-5B)。すると、AipA の 315~422 アミノ酸残基の領域では、14 のプロリン残基が見られ、特に、346~370 アミノ酸残基の領域では、25 アミノ酸残基内に 8 つのプロリン残基が見られた。モチーフ解析では、AipA にはプロリンリッチドメインが検出されなかった。しかし、AipA の 346~370 アミノ酸残基の領域はプロリンリッチであることから、この領域で AoAbp1 の 2 つの SH3 ドメインと相互作用している可能性が考えられた。そこで、AipA の 315~422 アミノ酸残基の領域をプロリンリッチな 346~370 アミノ酸残基の領域とそれ以外で分けて YTH 解析を行った (Fig. 3-6)。その結果、予想通りプロリンリッチな 346~370 アミノ酸残基の領域と AoAbp1 の 2 つの SH3 ドメインが相互作用することが明らかとなった。AoAbp1 において SH3 ドメインが 2 つ連続していることが、AipA のプロリンリッチ領域の認識を高めている可能性が考えられる。

さらに、AipA と AoAbp1 との相互作用を *in vivo* においても解析するため、それらのタンパク質の細胞内局在を解析した。AipA の C 末端には Vps4 C 末端オリゴマー化ドメインが存在し、C 末端に蛍光タンパク質を融合すると AipA が機能的でなくなり本来の局在を示さない可能性が考えられたため、EGFP を AipA の N 末端に付加した。PpgkA 下で *egfp-aipA* を発現する *A. nidulans* sC マーカーを持ったプラスミドを AoAbp1-mDsRed 発現株に形質転換することで、EGFP-AipA および AoAbp1-mDsRed 共発現株を作製した。それらのタンパク質の発現をウェスタン解析で確認した (Fig. 3-7A)。その結果、EGFP-AipA の分子量は 134.1 kDa と算出され、予想分子量の 112.0 kDa (AipA は 85.0 kDa) よりも大きく検出された。また、AoAbp1-mDsRed の分子量はウェスタン解析の結果からは 145.9 kDa と計算されたが、予想分子量は 109.9 kDa (AoAbp1 は 84.5 kDa) であり、予想分子量よりもかなり大きめに検出された。共焦点レーザー顕微鏡で EGFP-AipA および AoAbp1-mDsRed 共発現株を観察したところ、それらは菌糸先端部においてよく共局在した (Fig. 3-7B)。エンドサイトーシスにおいて機能すると考えられる AoAbp1 と共局在したことから、AipA もまたエンドサイトーシスにおいて機能している可能性が考えられた。AoAbp1 はアクチンに結合するタンパク質と考えられ、アクチンと共局在することから (Fig. 1-9B)、AoAbp1 の局在はアクチン依存的であることが予想される。AipA の局在もまた AoAbp1 同様にアクチン依存的で

あるかを解析するため、アクチン重合阻害剤である latrunculin B 処理を行った。すると、EGFP-AipA と AoAbp1-mDsRed は細胞質に拡散して観察された (Fig. 3-7C)。このことから、EGFP-AipA と AoAbp1-mDsRed の局在はアクチン依存的であることが示された。

3-3 *aipA* 変異株を用いた表現型解析

AipA の機能解析を行うため、*aipA* 破壊株の作製を行った (Fig. 3-8A)。*aipA* 上流 1 kb、*adeA* マーカー、*aipA* 下流 1 kb を有する DNA 発現カセットを NSRku70-1-1 株に形質転換することで *aipA* 破壊株を取得した。しかし、*aipA* 破壊株ではさまざまな培地条件においても顕著な生育阻害が見られなかった (Fig. 3-8B)。このことから、AipA と機能の重複したタンパク質が存在する可能性が考えられた。

次に、*aipA* 高発現株の作製を行った。*PamyB* 下で *aipA* もしくは *aipA* の上流に 3×HA ないし 6×myc タグを付加して高発現するコンストラクトのプラスミドを、*niaD* 遺伝子座に導入した株を作製した (Fig. 3-9A)。それらの株を *PamyB* による高発現誘導用の Cdm-mal 最少培地のプレート上で培養したところ、*aipA* および 6×myc-*aipA* を高発現する株では生育の阻害が見られた (Fig. 3-9B)。一方、3×HA-*aipA* を高発現する株では生育阻害が見られなかった (Fig. 3-9B)。以上の結果から、*aipA* の高発現は生育阻害を引き起こすこと、また、6×Myc-AipA は機能的であると考えられるが、3×HA-AipA は機能的ではないことが示唆された。

S. cerevisiae において Vps4p の K197A および E233Q 変異株では、ATPase 活性に欠損があることで、正常な機能が損なわれていることが報告されている (Babst *et al.*, 1997; Babst *et al.*, 1998)。そこで、AipA と *S. cerevisiae* におけるホモログ Sap1p および Yta6p、Vps4p の AAA ATPase ドメインのアライメントを作成し、Vps4p の K197 および E233 に対応するアミノ酸残基を調べた (Fig. 3-10)。4 種のタンパク質における AAA ATPase ドメイン全体はよく保存されており、Vps4p の K197 および E233 は、AipA、Sap1p、Yta6p の対応するアミノ酸残基でも保存されていた。*VPS4* では温度感受性変異株も取得されており、M307T、L327S の 2 箇所が変異している。しかし、AipA、Sap1p、Yta6p における Vps4p の M307、L327 に対応するアミノ酸残基は保存されていなかった。以上を踏まえ、AAA ATPase ドメインに変異を導入した *aipA*^{K542A} および *aipA*^{E596Q} を高発現する株を作製した (Fig. 3-9A)。その結果、それらの株では生育阻害が見られ

なかった (Fig. 3-9C)。このことから、AipA^{K542A} と AipA^{E596Q} は機能的ではなく、AipA が機能的であるためには、AipA の AAA ATPase ドメインが正常に機能する必要があることが示唆された。

実際に AipA がエンドサイトーシスにおいて機能しているかを解析するため、生育阻害が見られた *aipA* 高発現株を用いた FM4-64 染色を行った (Fig. 3-11)。その結果、*aipA* および $6 \times myc\text{-}aipA$ 高発現条件下においては、FM4-64 染色後 60 分経過した時の細胞内への取り込みがコントロール株と同様であった。このことから、少なくともこの観察条件では、*aipA* 高発現条件においても FM4-64 のエンドサイトーシスに欠損は無いと判断された。しかし、観察条件を検討し、より詳細な解析をすることで FM4-64 の取り込みに差が見られる可能性も考えられた。そこで、FM4-64 染色後に経時的に観察を行った (Fig. 3-12)。FM4-64 は、菌糸の先端部において活発にエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ、その内の大部分は菌糸最先端部への輸送経路により、分泌小胞の集合体である Spitzenkörper (Spk) が染色されるようになると考えられる (Fig. 3-12A)。そこで、Spk の観察される割合を経時的に解析することでエンドサイトーシスを定量的に評価した (Fig. 3-12B)。その結果、コントロール株では、FM4-64 染色 5 分後には 40%強の菌糸において Spk が観測され、その後時間経過とともに Spk の観察される菌糸の割合は増加していき、90 分後にはほぼ 100%近い菌糸において Spk が観測された。一方、*aipA* 高発現株では、FM4-64 染色 5 分後には 10%強の菌糸において Spk が観測され、その後時間経過とともに Spk の観察される菌糸の割合は増加していくものの、90 分後でもそれはほぼ 60%弱に止まった。*aipA* 高発現株では生育阻害が見られていることから、解析時において既に Spk が存在していない菌糸が多い可能性も考えられたため、FM4-64 染色後 90 分において Spk の観察された菌糸の割合の半分が観察されるまでにかかる時間をそれぞれの株で測定した。すると、コントロール株では 8.9 ± 0.9 分であったのに対して、*aipA* 高発現株では 20 ± 3.6 分であった。この結果から、*aipA* 高発現株では、FM4-64 のエンドサイトーシスに異常があると考えられた。しかし、この結果は大きく分けて、エンドサイトーシスによる取り込み、取り込み後の Spk への輸送という 2 つの段階の影響を同時に解析しているため、どちらか一方もしくは両方の段階での欠損が見られたと考えられ、この解析結果だけからはどの段階で欠損があるのかをはっきりさせることはできない。そこで今後、AoUapC-EGFP を用いた解析を行うことにより、エンドサイトーシスの段階での欠損

であるかどうかを解析する必要がある。

aipA 変異株の背景で AoAbp1 の挙動を解析するため、WT、*aipA* 破壊、*aipA* 高発現の背景で、*Aoabp1* 遺伝子座において *Aoabp1-3×HA* および *Aoabp1-egfp* を発現する株を作製した (Fig. 3-13A, B)。これら *3×HA* および *egfp* を *Aoabp1* 下流に導入したことによる生育阻害は見られなかったことから、AoAbp1-3×HA および AoAbp1-EGFP が機能的であることが示唆された (Fig. 3-13C)。今後、これらの株を用いて、AoAbp1 に関する AipA の詳細な機能解析を行っていく。

さらに、AipA が AAA ATPase としての性質を有しているかを解析するため、大腸菌における組換え AipA の生産を行った (Fig. 3-14)。ポジティブコントロールとして、Vps4p の生産も同時に行った。精製した Vps4p の組換えタンパク質を用いた解析により、Vps4p は ATPase 活性を有し、オリゴマーを形成すると示唆されている (Babst *et al.*, 1997; Babst *et al.*, 1998; Saksena *et al.*, 2009)。そこで、精製したタンパク質を使用して、AipA が Vps4p 同様の性質を有するかを今後解析する。

考察

YTH スクリーニングによって見出された AipA は、AAA ATPase ドメインを有し、AAA ATPase ファミリーのタンパク質であると考えられた。AipA は、組換えタンパク質を用いた GST プルダウンアッセイにより *in vitro* において AoAbp1 との相互作用が示され、蛍光タンパク質を用いた局在観察により *in vivo* においても AoAbp1 と共局在することが明らかとなった。AoAbp1 はエンドサイトーシスのマーカータンパク質と考えられ、またエンドサイトーシスにおいて機能する AoEnd4 と同様の特徴的な局在を示す。こうしたことから、AipA もまたエンドサイトーシスにおいて機能することが考えられる。

AipA ホモログは、糸状菌には 1 つずつ存在し、酵母には 2 つずつ存在すると推測された。*S. cerevisiae* の AipA ホモログである Sap1p と Yta6p は、AAA ATPase ドメインを有することから、AAA ATPase ファミリーのタンパク質であると分類されているものの、その機能はわかっていない。Sap1p は転写抑制因子である Sin1p と YTH で相互作用することから見出された (Liberzon *et al.*, 1996)。Yta6p は 12 の YTA (yeast Tat [tyrosine and tryptophan amino acid transporter] -binding analog) ファミリータンパク質の一つとして見出され、母細胞の皮層 (cortex) に局在し、娘細胞には局在しないことが分かっている (Schnall *et al.*, 1994; Beach and Bloom 2001)。SAP1、YTA6 の破壊株はともに生育可能であり、目立った表現型は報告されていない。Sap1p と Yta6p がともに AipA ホモログであることを考えると、Sap1p と Yta6p が重複した機能を持つ可能性が考えられ、SAP1 と YTA6 の同時変異株を用いた解析がなされれば、それらの機能が明らかになるかもしれない。

AAA ATPase ファミリーのタンパク質は一般的に、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 (White and Lauring, 2007)。前者において働くタンパク質として、SNARE 複合体の解離において機能する NSF (N-ethylmaleimide-sensitive factor)/Sec18p、MVB の形成過程で ESCRT (endosomal sorting complexes required for transport) -III 複合体の解離に機能する Vps4p が挙げられる。後者では、p97/VCP/Cdc48p が存在し、これらのタンパク質は ERAD (endoplasmic reticulum-associated degradation) において、ミスフォールド (misfolded) されたタンパク質をレトロトランスロケーション (retrotranslocation) する機能を持ち、プロテアソームでのタンパク質分解に関与

している。AAA ATPase ファミリーのタンパク質は、クラス I とクラス II に分類され、それぞれ 1 分子中に AAA ATPase ドメインを 2 つおよび 1 つずつ持つ。NSF/Sec18p と p97/VCP/Cdc48p はクラス I に、Vps4p と AipA はクラス II に属する。

Vps4p は、AipA による BLAST 検索の結果、*S. cerevisiae* のタンパク質の中では Sap1p、Yta6p に次いで相同性が高かった。Vps4p は AAA ATPase ファミリーのタンパク質の中で解析の進んでいるタンパク質の一つである (Babst *et al.*, 1997; Babst *et al.*, 1998; Saksena *et al.*, 2009)。精製した Vps4p の組換えタンパク質を用いた解析により、Vps4p は ATPase 活性を有し、オリゴマーを形成すると示唆されている。一次構造から、AipA のホモログとしては Sap1p、Yta6p が該当するものの、AipA と Vps4p はともに AAA ATPase ファミリーのクラス II に属するため機能的に類似していることも予想される。そこで、AipA の機能を解析する上で、Vps4p の知見が参考になると考えられる。実際に、Vps4p の ATPase 不活性化変異点である K197、E233 はともに AipA にも保存されており、*aipA*^{K542A} および *aipA*^{E596Q} 高発現株では *aipA* 高発現株で見られた生育阻害が見られず、ATPase 活性が生理的に重要であることが示唆された。今後、Vps4p と同様に、AipA、AipA^{K542A}、AipA^{E596Q} の組換えタンパク質を用いた解析により、ATPase 活性やオリゴマー形成に関する解析が必要である。

AipA は C 末端に Vps4 C 末端オリゴマー化ドメインを有し、このドメインを介して 6 量体構造を形成すると予想される。そのため、もし C 末端にタグを付加すると 6 量体構造を形成できなくなり、AipA が機能的でなくなる可能性が高い。そこで本研究では、タグを N 末端に付加した。高発現系の生育比較解析において、6×myc-*aipA* 高発現株は、タグ無し *aipA* 高発現株と同様の生育阻害を示したことから、N 末端への 6×Myc タグの付加は AipA の機能を阻害しないと予想できる。一方、3×HA-*aipA* 高発現株は生育阻害を示さなかったことから、N 末端への 3×HA タグの付加は AipA の機能を阻害すると考えられる。以上のことは、AipA の N 末端領域が AipA の機能において重要であることを示唆している。一般的に、AAA ATPase ファミリーのタンパク質の N 末端領域には、機能的に重要な領域が存在すると示唆されているものの、その詳細はあまりわかっていない (White and Lauring, 2007)。

本研究では、*aipA* 破壊株において生育阻害を指標にしたマクロな視点からの解析だけでは表現型を見出すことはできなかった。より詳細に細胞生物学的、生化学的に解析することで表現型が見つかり、AipA の機能が推測されることも考えられる。しか

し、一つの可能性として、AipA と機能的に重複するタンパク質が存在することで *aipA* 破壊株において表現型が見られていないことも十分に考えられる。AipA と機能的に重複するタンパク質の候補としてまず挙げられるのが、*S. cerevisiae* Vps4p のホモログ AoVps4 である。上述のように、Vps4p は MVB というエンドサイトーシス経路のオルガネラで機能する。ゆえに AoVps4 は、AipA と空間的に比較的近いところに存在し、*aipA* を破壊した際に、AipA の機能を代替できる可能性が考えられる。さらに、AipA で BLAST サーチをすると、他の AAA ATPase ファミリーのタンパク質の中でも AoVps4 が一番相同性の高いタンパク質として検索されることもこの仮説を支持している。以上から、*aipA* の機能を理解するためには、*Aovps4* も同時に解析することが必要であると考えられる。

AipA は、AoAbp1 と相互作用することから考えると、エンドサイトーシスにおいて機能すると考えられる。そこで、AipA の機能に関しては、AAA ATPase ファミリーのタンパク質の一般的な機能から類推して、大きく 2 通り考えられる。まず 1 つ目として考えられるのは、AipA が AoAbp1 などのエンドサイトーシスにおいて機能するタンパク質をエンドサイトーシス小胞から解離させ、細胞質にリサイクリングすることで再びエンドサイトーシスにおいて働くのを促進させているという機能である (Fig. 3-15)。2 つ目としては、AipA が AoAbp1 などのエンドサイトーシスにおいて働くタンパク質の分解に機能するというものである。しかし、エンドサイトーシスの過程で働くタンパク質をその場で分解する必要性は無いため、この可能性は低いと考えられる。1 つ目として考えられる AipA の機能は、Vps4p の機能からの類推からしても自然である。本研究では、*aipA* 破壊株を用いた解析からは表現型が見られず、AipA の機能を推定することはできなかった。しかし、*aipA* 高発現株で生育阻害が見られたのは、AipA が過剰に存在することで AoAbp1 を含むエンドサイトーシス関連タンパク質群を必要以上に細胞質へと解離させてしまうことにより、エンドサイトーシスの効率が減少したことに起因すると予想される。このことは Fig. 3-12 の FM4-64 を用いたエンドサイトーシスの解析結果からも示唆された。一方、AAA ATPase ドメインに変異を導入した *aipA* の高発現株では生育阻害が見られなかったのは、変異 AipA は機能的ではなく、またそれら自体が多量に存在することによる細胞毒性も無いため、エンドサイトーシスへの影響は無いからであると推測される。今後は、この AipA の機能に関する予想を証明する実験、つまり *aipA* の変異株で AoAbp1 を含めたエンドサイ

トースス関連因子の解析を行っていく必要がある。さらに、AipA を bait にした YTH スクリーニングにより AipA と協同して働く因子の探索を行うことも AipA の機能を理解するための有用な手段となろう。

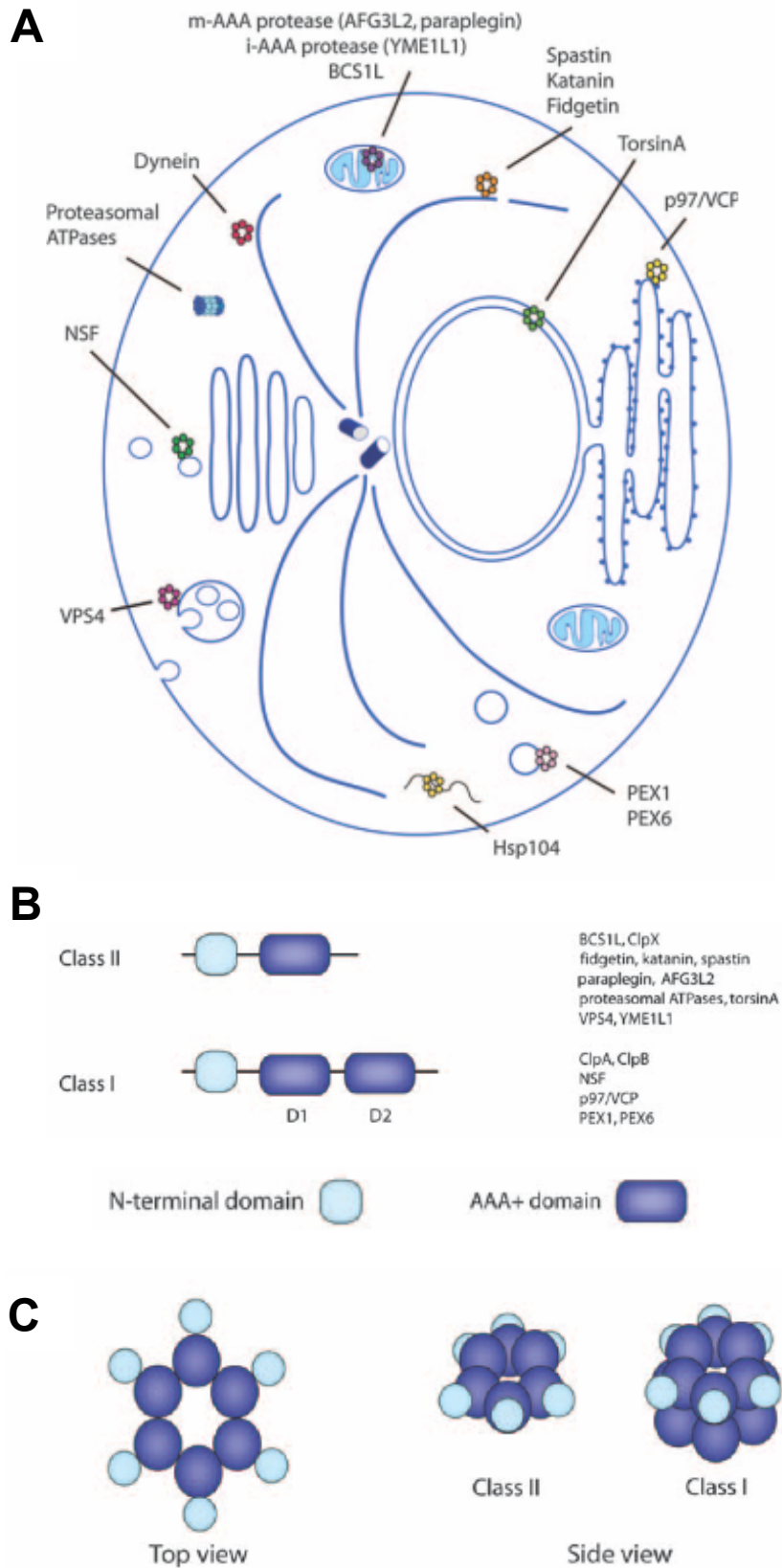


Fig. 3-0 AAA ATPases

White SR and Lauring B, (2007) *Traffic* 8: 1657-1667.

-229 actcttacctctcaactcactctctcgtgtgctcttcgttcaaaccgtc
 -180 tttctttctttttttctcttctttcttctctccctacaaatgagcaggagtgtggtccccg
 M S R S W S P
 -120 tccttgtgcccattccttccccagactccgattaactagtattacactactacgactatc
 S L C H S F P Q T P I N *
 -60 atccatagcgcgcgggctcctgcaattccgcgcaagatccttgggattaattgatca
 1 ATGATGCGTCCCAAACCGCGTCTTCCCTCCAGAAGACCTACGATGACTGTTATCTGATG
 M M R P K P A S S L Q K T Y D D C Y L M 20
 61 TGCTCGACTGCCGTCTACTCGAAGGACAGgtctgcccgttcttaattccaattgactc
 C S T A V Y F E G Q 30
 121 cattcgtcactgatcgtctcttcgcgacagAACACGAAGAAGAAGCTTTAAAGTCTTGGC
 N N E E E A L K S W R 41
 181 GCTCCGCCCTCGAAACCATCTACTATCATAACGCCTATCGGGTCCCTCCAAGTACACCC
 S A L E T I Y Y H N A Y R V P S K Y T P 61
 241 CCAAGAACGAAACGGAAGGCTCTTCAGGATTCATCCCGCAGTTAGAGCTCCAATGTC
 K N E T E K A L Q D S I R Q L E L Q C R 81
 301 GGGAGCGCGTGCATCTACTCGAGGCCCTCCGTGAGAGCAGAAAGGATACGCTCTGGTAAAT
 E R V D L L E A L R E S R K D T S G K S 101
 361 CCCCTCCATTACCACCTGGTTATCGCGGTTGGATTGGAGAGGAACTGTCCCCCGAGTCG
 P P F T T G Y R G W I G E G T V P A V G 121
 421 GGTATACCGATCTATCTAAACCGCCTACTATCCCCGGACGCCCCACCACCTGTCACCA
 Y T D L S K P P T I P G R P P P P V T T 141
 481 CTGCTAGCTCGGAGTCTGCTGGGAACGAGACGGGTCATCAGTCCCAATGGCGGGTCTGTC
 A S S E S A G N E T A G S S V P M A G R P 161
 541 CCGGATTGCGCAAGCAATCCTCTTCGGCAAAGACTACGTCTTCTCGCAATTCAGCC
 G L R K T Q S S S A K T S S R N S S P 181
 601 CCGAACGTCGGAAGCGATGCCCTCTACACTACGCAACGCCGATCTGAAGAAGCCGCCA
 E R R K A M P S T L R N A D L K K P A K 201
 661 AAAAGAAAGTACGCCCGCAGCAAAAGACCTGCGGCCGGCCGAGCTTCTCAAGCCGCGG
 K K V R K D L R P A A A S Q A A G 221
 721 GTCTGGCCTGGGGAAGTCTTTATCGGACTCCATCAGAAAAGACCGTCCGCGATGCTG
 L A W G S L Y R T P S S E K T V S D A A 241
 781 CCCTAGCGTCTCCCGTCTGACCGCTGCAAATGATCCAGTTTTGCAAAGGAGTCAATAC
 L A S S R L T A A N D P S F R K E S I P 261
 841 CACCCGTTTCGAAGTCCGGCGATGGGGTACCCCAAGGAAAGCGTCCCTCCAGAGGATT
 P R S K S G D G V P P R K S V P P E D S 281
 901 CCGGAGAGGAGCGTCCGTCGGGAGGAAACTTCGCGTCCCGGTCCAGACCCGCGAAGGT
 G E E R R S G R K L R V P G Q T P R R S 301
 961 CACCGCGAAGTCTACTCTGCACCAACTTCAACACCTACATCCACCCCTCAGGCTCCGG
 P A K S T P A P T S T P T S T P Q A P A 321
 1021 CTGGCATCCGGCAGCGTCCGGCAATCGCAACCATCCGCTTCTGTGTCGACAGGCTCCA
 G I R Q P S G N R T H S A S V S T G S K 341
 1081 AGGATACTGTTACGCCAGTGCCTCCCGAAGCCTTCTGTCAAACCAAAGCCGTAGCGT
 D T V Q P R A S P K P S V K P K P V A L 361
 1141 TGAGGTCTTACCAACCGCTACACCCCTCCGGAGGATCTGCGGGTGCAGCAACTACCT
 R S Y Q P P T P S G A G A A T T S 381
 1201 CGAACAACTGCAGGCTGGGTCTGCAAGCACGCCAGAAATTACCCCTGCTTCCACTG
 N N L Q A G S A S T P R R I T P A S T G 401
 1261 GTGAAGATGCGTTGAGCGACAATATAGATCGCATTCGATTTCCCGAACGAGTCCCGAAC
 E D A L S D N I D R M S I S R T S P E R 421
 1321 GACGGGCTACTCCGCGCATCAGGCGCGTGTACCCCGCGTCACTAGCGATCCCGAAT
 R A T P R I R R A V T P P S S S D P E S 441
 1381 CTCTTGGTCCCAAATCAACCGATGCCGACGAGGACGACGTGGACGTTGAGGACGAGGATG
 L G P K S T D A D E D D V D V E D E D D 461
 1441 ACGCAATTATGGATATACTGAACAAGCTCCCGAAAGGGTGGACGTGGCAACCGCCCGAC
 A I M D I L N K L P K G V D V A T A R Q 481
 1501 AGATCCTTAACGATATTGTAGTCCGCGGGGATGAAGTACACTGAGCAGCATTTGCCGGTTC
 I L N D I V V R G D E V H W D D I A G L 501
 1561 TAGATGGGGCCAAAAGGCCCTCAAAGAAGCCGTCTATCCGTTCCCTCCGTCAGATC
 D G A K K A L K E A V V Y P F L R P D L 521
 1621 TGTTCCTGGTTTGCAGAACCCAGCCCGGGTATGCTCCTCTTTGGACCTCCAGGGACGG
 F S G L R E P A R G M L L F G P P G T G 541
 1681 GTAAGACGATGCTTGCAGCGCGGTAGCTACGGAATCCAAATCGACGTTCTTCTCGGTTT
 K T M L A R A V A T E S K S T F F S V S 561
 1741 CCGCATCCACATGACCTCGAAATGGCAGCGGTGAGAGCGAAAAGCTTTCGCCGCCCTGT
 A S T L T S K W H G E S E K L V R A L F 581
 1801 TCGGCTCGGTAAGCGCGTCCGATCATCTTTGTGGACGAAATCGACTCACTAT
 G L A K A L A P S I I F V D E I D S L L 601
 1861 TGTCCGCTCGTCCGGCAGAGAACGAGGCTTACGACGCTCAAAGACCGAGTTC
 S A R S S G T E N E A S R R S K T E F L 621
 1921 TGATTCACTGGTCCAGATTTGCAGCGCGCCGCGGCGGAGGTCGTAATCGCCTAGGGACAAGA
 I Q W S D L Q R A A A G R E S P R D K K 641
 1981 AAGCCGCGGAGACCCAGCCGCTCCTCGTCCGCGCTACAATATGCCCTGGGACA
 A G G D P S R V L V L A A T N M P W D I 661
 2041 TCGATGAGCGCGCGCCGCTCGCTTCGTCGCGGACAATATATCCCTCTCCAGAACATC
 D E A A R R R F V R R Q Y I P L P E H H 681
 2101 ACGTCCGCAAAAACAACCTCCGGACATTACTAAGTACCAGGTGCATGACTTGACAGATC
 V R E K Q L R T L L S H Q V H D L T D Q 701
 2161 AAGATATCGACGCTTAGTCCAACCTACAGACGgtattgttcttacttcttccgect
 D I D A L V Q L T D G 712
 2221 caaccaccagtatcccaaagtaacaaagcataactcagGCTTCTCAGGCTCCGACATAA
 I V G S D I T 719
 2281 CAGCCCTCGCAAAGACGCGCAATGGGCCCCCTCCGCAACCTCGGCGAAGCCCTCCTCC
 A L A K D A A M G P L R N L G E A L L H 739
 2341 ACACCCCATGGACCAATCCGCGCCATCCGATTCCAAGACTTCGAAGCCAGTCTCTCCT
 T P M D Q I R A I R F Q D F E A S L S S 759
 2401 CAATCCGACCCAGCGTCAGCCAGGAAGGACTAAAGGAGTATGAAGATTGGGCCCCGACAA
 I R P S V S Q E G L K E Y E D W A R Q F 779
 2461 TCGGCGAGAGAGGTGGATAGacctttcccttttctctctatatatcttctctctt
 G E R G G * 784
 +41 ttttgtttccttatgattcatcttgggaccgttgcatcatgacacctgacggggtg
 +101 gaggatcgggttggcagggcgaattgggtctgataggatgcataccttgggctatggtt
 +161 cttgggttccggctctggttatgtggtacgataggtatggtatgggttatgattatgaa
 +221 tgtctgctggatgaacgcaatgggattggcttgggttggcagcagctgtactggtactgt
 +281 acgtagtgagtacctgatcggaacagatcacatatcaatgaatggatatacatggact
 +341 a

Fig. 3-1 *aipA*遺伝子の塩基配列とAipAのアミノ酸配列

*aipA*遺伝子は2,480塩基から、AipAは784アミノ酸残基から構成される。5'-UTRに19アミノ酸残基のuORFが見られた。

AipA	--MMRPKPASSLQKTYDDCYLMCSTAVYFEGQNNEEALKSWRSALETIYYHNAYRVPSK	58
Sap1p	MDSQRSHHILTRLTKIRRRPQQPLTDFTELYSRIANETIYYLNLEEKRYKEALQGWKAL	60
Yta6p	--MAHEKFSIPENFTLAQSLQLLYSVVKQYKNLADLI INSKGNKDTVTYGIHKHNLDTL	58
	: : . . . : . . . : * . :	
	YTPKNETEKALQDSIR-----QLELQCRERVDLLEALRESR	94
	TTDVLQKQTLIEHNYPNQSYTKDEVSLQNGIRELYHKSVMHLKRVKLVREEPAPRNDM	120
	LVYVNEGLRRIEKTYT-----LKKGLGNLVVDHPELRSII	93
	. : : . : *	
	KDTSGKSPFFTGYRGWIGEG----TVPVAVGYTDLSKPPTIPGRPPPVTTASSESSAGN	149
	PSSKTYTNHSSSFTRSTEPPVFMVPGRMKTLRNRNACGYKTAYSNPSSLSSYGNSTSI	180
	EDFQILG-----QDIRIARRKAETLMAEANGSPSSLSSSSSVLGL	132
	. . : : *	
	ETGSSVPMAGRPLRKTQSSSAKTTSSRNSSPERRKAMPSTLRNADLKKPAKKKVSPPRK	209
	KRGEDAENIRVNFVPSKPLSNNASRQHKNP IEHNDPPLKKELEYSDKYISEPILIDLTN	240
	GTGNGLRFPKLWRMGSKRDKLKEADEKEAKINKQADNIRRARKLEEKKLGAKLQYERDL	192
	*.. : . . : *	
	DLRPAASQAAGLAWGSLYRTPSSEKTVSDAALASSRLTAANDPSFRKESIPPRSKSGDG	269
	DEDDHDVGIKGNHVFDEEESDGFEDVSDYDNFSEVDVEEEEEKEERRRIKTLAETQ	300
	ELQ-----REKLIELKVKEVEFEVAQKLE---EERVKREEEERKREQAEEKKRIST	241
	: . . . * * : :	
	VPPRKSVPPEDSGEERSSGRKLRVPGQTPR-----RSPAKSTPA	308
	QQMSDLSVTSSTSSNKSVSSSENVPGSCIQSLPTTAPALPSLPPPLLNVDASSTGALK	360
	LKHERKTNYKSRASLDFSSSSKSGKIDNLSIKRR-----SLDVVRTSGERVRT	291
 * . . *	
	PTSTPTSTPQAPAGIRQPSGNRTHSASVSTGSKDTVQPRASPKPSVKPKPVALRSSYQPP	368
	PHSLETSTTMDSSKIRNPQISKLKMNHVPYKGTKSTPTLITKSTPTFITRSKSNTPKI	420
	PVRKSMEAAEIGMAAQLAWSYQNGANHSKVSNNNGSHSNELQIRYKPTPPLKKRYDYKKP	351
	* .. : . . : :	
	TPSGGSAGAATTSNNLQAG-----SASTPRRITPASTGED	403
	IKSNASSPTSSLTVPNSVIQPKTAAMAARKVLNSKVASNPALNTTKKSHPIKSKTAK	480
	TVNRPIIKSPTLNRQN-----SKSSRNIPNTSKLK	381
	. : : . :	
	ALSDNIDRMSISRTSPERRATPRIRRAVTPPSSSD-----PESL	442
	VPNSSKKTSSHPSRVPSNSKPYSHGASQNKPKNQTTSMKTNRKPAPQKKIGSPKIE	540
	ASKSNTNKVSRREQNLEPSSPVLVSATAVPAESK-----PMRS	420
 : * : * * * * *	
	GPKSTDAEDDDVDEDEDDA-----IMDILNKLPGVDVATARQILNDIVVRGD	491
	DVGTEDATEHATSLNEQREEFEIDKKVLRLELEDEIIDSLQGVDRQAQKQIFAEIVVHGD	600
	KSGTPDKESSASSLDSRKE-----DILKSVQGVDRNACEQILNEILVTDE	466
	: * . . . : . . : * * * : * * * : * * * :	
	EVHWDDIAGLDGAKKALKEAVVYPFLRPDLFSGLREPARGMLLFGPPGTGKTMLARAVAT	551
	EVHWDDIAGLESYSLKEAVVYPFLRPDLFRGLREPVRGMLLFGPPGTGKTMLARAVAT	660
	KVYWEDIAGLRNKNLKEAVVYPFLRPDLFKGLREPVRGMLLFGPPGTGKTMIARAVAT	526
	: * : * * * * * . * * : * :	
	ESKSTFFSVSASTLTSKWHGESEKLVRALFLGAKALAPSIIFVDEIDSLLSARSSGTENE	611
	ESHSTFFSISASSLTSKYLGESEKLVRALFAIAKKLSPSIIFVDEIDSLMGRNNENENE	720
	ESNSTFFSVSASSLTSKYLGESEKLVRALFYMAKKLSPSIIFIDEIDSLMTARSD-NENE	585
	** : * * * * * : * :	
	ASRRSKTEFLIQWSDLQRAAAGRESPRDKKAG---GDPSRVLVLAAATNMPWDIDEAARR	667
	SSRIKNEFLVQWSSLSAAAGSNKSNNTNNTNGDEDDTRVVLAAATNLPWSDIDEAARR	780
	SSRIKTELLIQWSSLSAATAQSEDRNN-----TLDSRVLVLGATNLPWAIDDAARR	637
	: * * * * * : * * * * * . * * * * * : * * * * * * * * * * * * * * * * :	
	RFVRRQYIPLPEHHVREKQLRRTLLSHQVHDLTDQDIDALVQLTDGIVGSDITALAKDAAM	727
	RFVRRQYIPLPEDQTRHVQFKLLSHQKHTLTDSDFDLVKITEGYSGSDITSLAKDAAM	840
	RFSRKLTYIPLPDYETRLYHLKRLMAKQKNSLQDLDELITEMTEGFGSDITSLAKEAAM	697
	** * : * * * * * : . * : . . : * : * :	
	GPLRNLGEALLHTPMDQIRAIRFQDFEASLSSIRPSVSOEGLKEYEDWARQFGERGG	784
	GPLRDLGDKLLETTEREMIRPIGLVDFKNSLVYIKPSVSDGLVKEYEKASQFGSSGS	897
	EPIRDLGDKLMFADFDIRGIEIKDFQNALTIKKSVSSESLQKYEEWSSKFGSNGS	754
	* : * * * * * : * : . . : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * :	

Fig. 3-2 麹菌AipAと出芽酵母Sap1p、Yta6pの アミノ酸配列相同性比較

麹菌AipAは、出芽酵母Sap1pおよびYta6pとアミノ酸配列レベルでそれぞれ34%、33%の相同性を示した。Sap1pとYta6pは35%の相同性を示した。

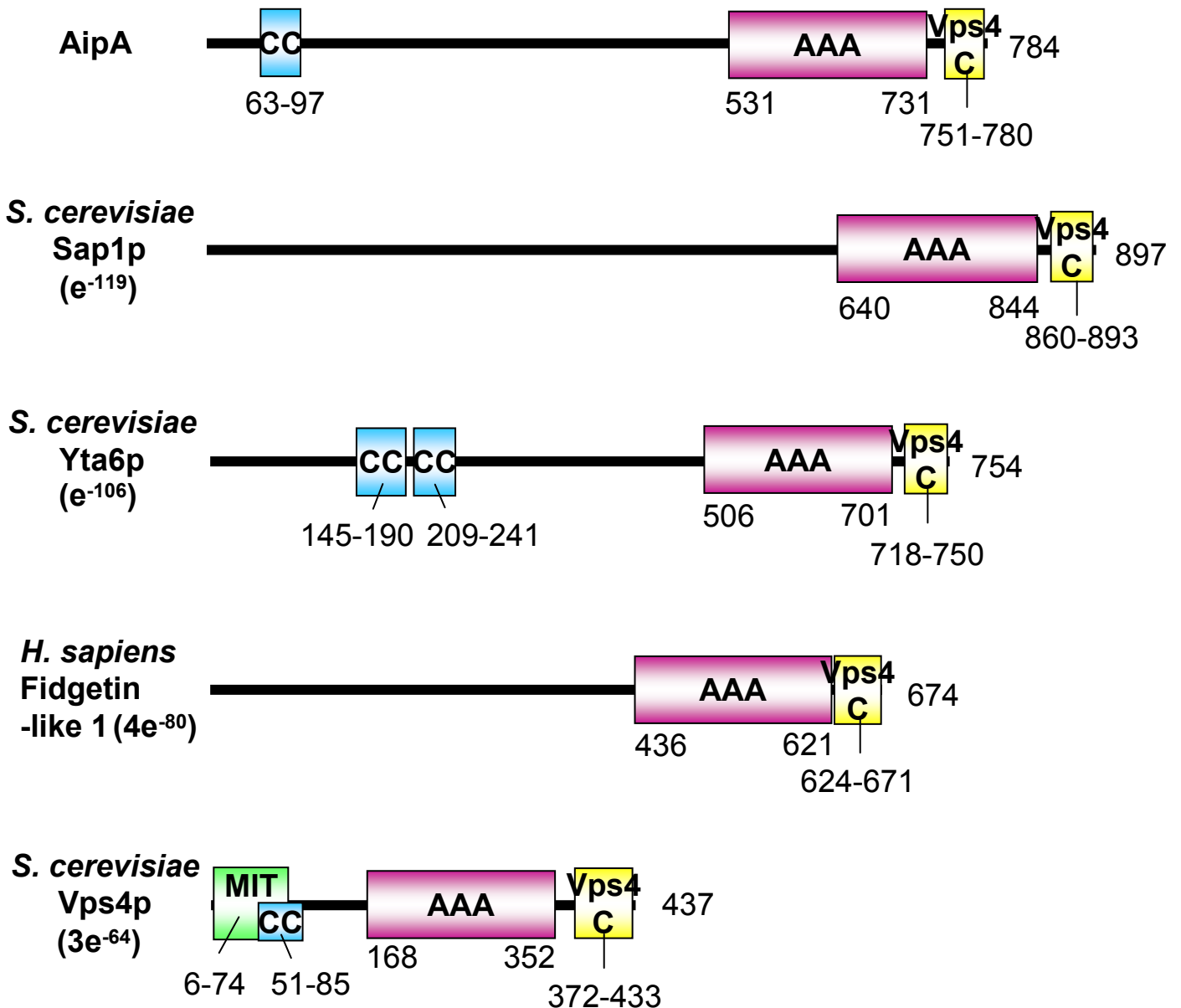


Fig. 3-3 AipAホモログの一次構造

RACE解析により、AipA全長は784アミノ酸残基から構成されると予想された。各AipAホモログのAipAに対する塩基配列レベルでの相同性を括弧内に示した。CC, Coiled-Coil; AAA, ATPase family associated with various cellular activities; Vps4 C, Vps4 C-terminal oligomerization domain; MIT, microtubule interacting and transport domain.

Table 3 真菌類におけるAipAホモログ

Organism	Number of AipA homologs
<i>A. oryzae</i>	1 (AipA)
<i>A. fumigatus</i>	1
<i>A. niger</i>	1
<i>A. nidulans</i>	1
<i>S. cerevisiae</i>	2
<i>A. gossypii</i>	2
<i>S. pombe</i>	2
<i>C. albicans</i>	1
<i>M. grisea</i>	1
<i>N. crassa</i>	0

BLAST (<http://blast.genome.jp/>) 検索により、各菌種におけるAipAホモログの数を調べた。AipAに対するAoVps4のe-valueは $2e^{-62}$ であったため、AipAに対して e^{-70} 以上のe-valueを有するホモログの数を示した。*N. crassa*において、最もe-valueの高いAipAホモログはVps4pホモログとしてアノテーションされていた。ゲノムレベルで*N. crassa*と近縁の*M. grisea*にはAipAホモログが1つ存在することから、*N. crassa*のゲノム解析でのアノテーション情報に不備がある可能性が考えられ、糸状菌にはAipAホモログは1つずつ存在すると予想された。

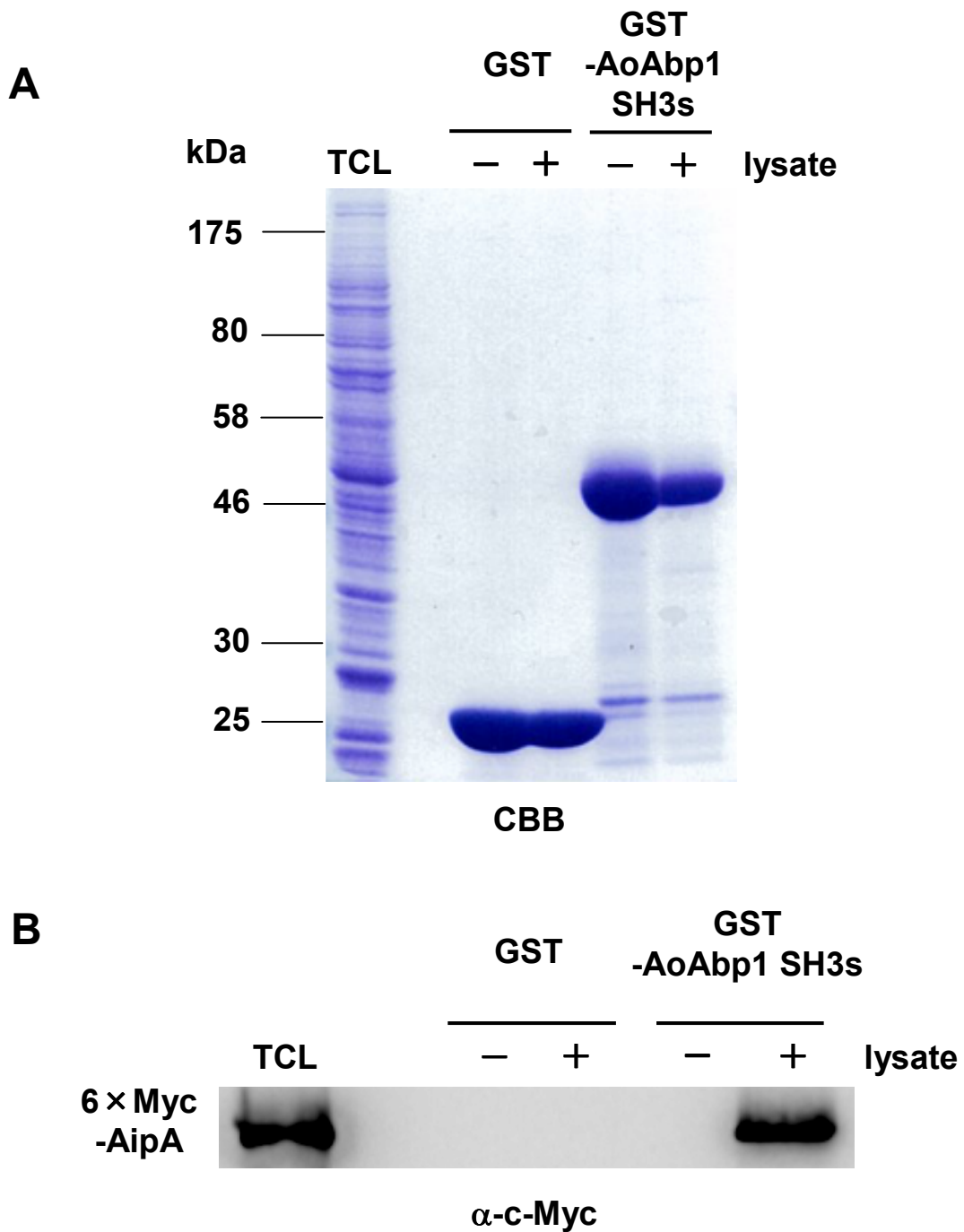


Fig. 3-4 AoAbp1の2つのSH3ドメインは*in vitro*でAipAと相互作用する

*PamyB*下で $6 \times myc\text{-aipA}$ を *niaD*遺伝子座で発現する株をDPY液体培地で30°C、20時間培養した菌体抽出物をGSTプルダウンアッセイに用いた。GSTプルダウン後、glutathione sepharoseから溶出したGST、GST-AoAbp1 SH3sをCBB染色した (A)。ウェスタン解析には、抗c-Myc抗体を用いた (B)。TCL (total cell lysate) のレーンには、GSTプルダウンアッセイに用いたサンプル量の0.1%をロードした。

A

315 ST**P**Q**A**P**A**GIRQ**P**SGNRTHSASVSTGSKDTVQ 345
 346 **P**RA**S****P**K**P**SVK**P**K**P**VALR**S**SYQ**P****P****T****P** 370
 371 SGG**S**A**G**A**A**TT**S**NN**L**Q**A**GS**A**ST**P**RRIT**P**ASTGEDALS**D**NI**D**RMSIS**R**TS**P**ERR 422

B

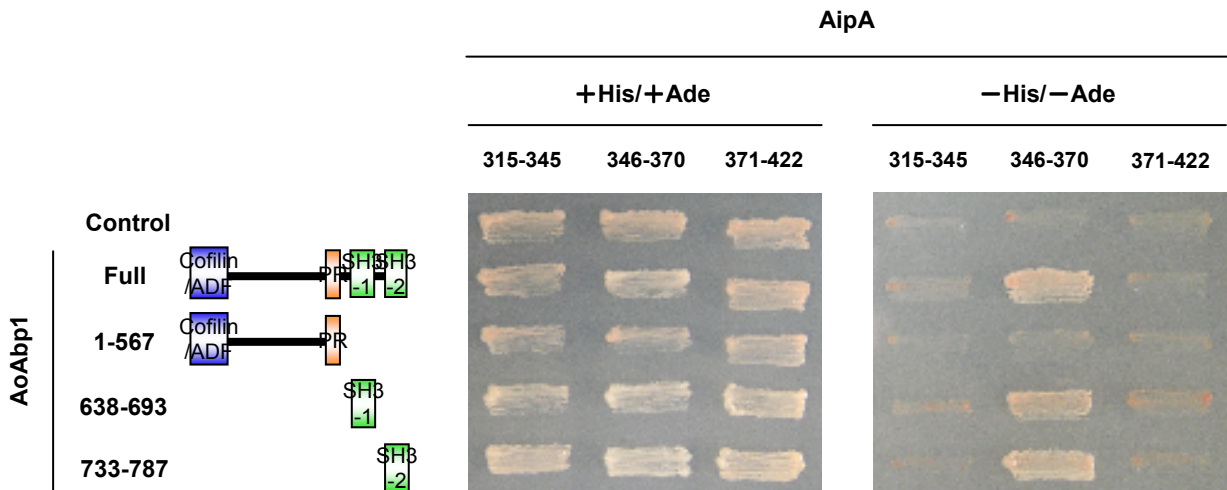


Fig. 3-6 AipAの346-370 aaのプロリンリッチ領域がAoAbp1のSH3ドメインと相互作用する

(A) AoAbp1のSH3ドメインと相互作用するAipAの315～422アミノ酸残基の領域を、プロリン残基が数多く見られる346～370アミノ酸残基とそれ以外の3領域に分割した。図中の数字はアミノ酸残基数を表す。

(B) YTH解析により、AipAの346～370アミノ酸残基のプロリンリッチな領域が、AoAbp1のSH3ドメインと相互作用することが明らかとなった。図中の数字はアミノ酸残基数を表す。

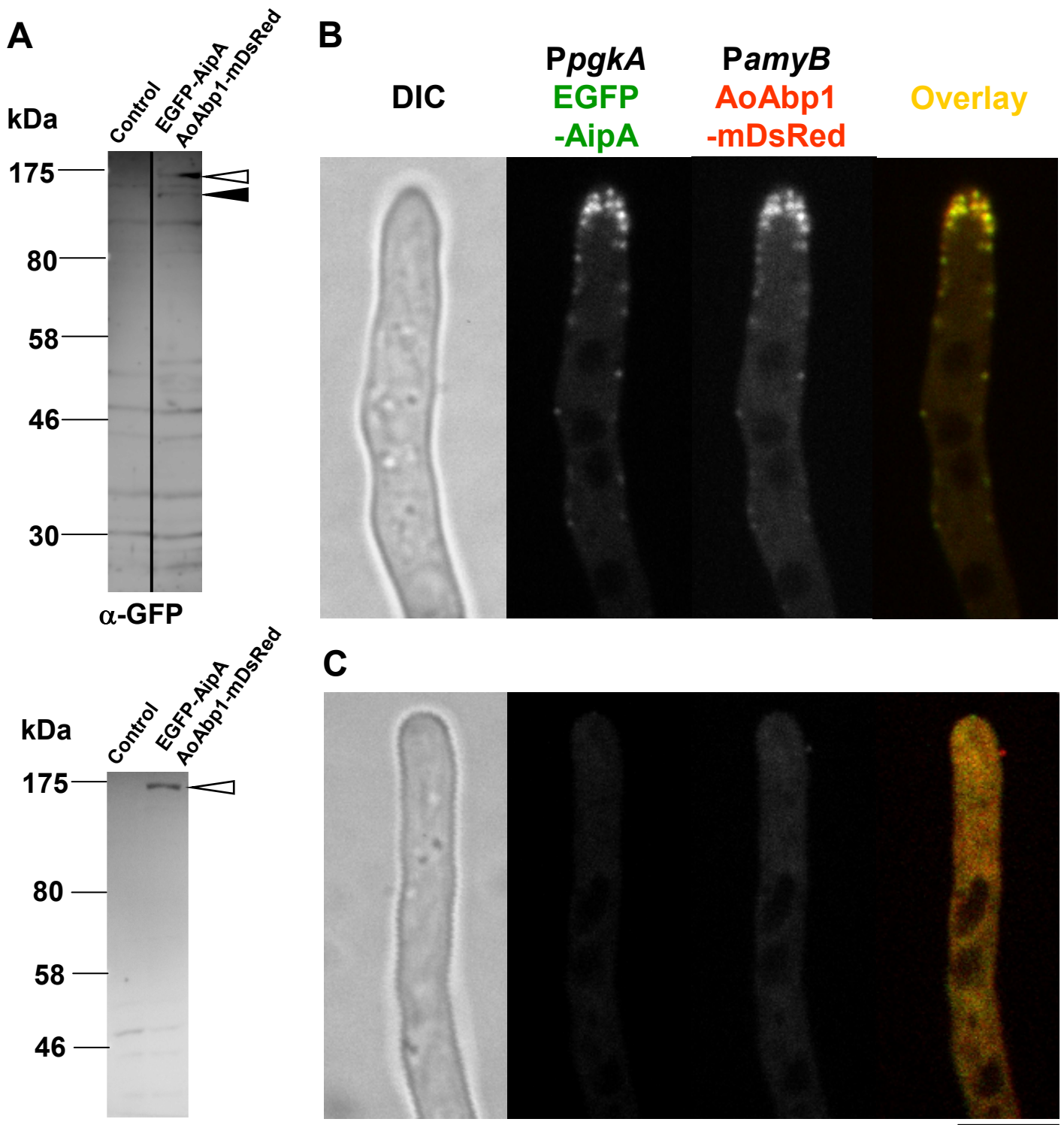


Fig. 3-7 AipAとAoAbp1の細胞内局在

(A) 約 10^7 個のAADPEA1株の分生子を20 mL DPY液体培地に植菌して、30°Cで24時間振とう培養した後、菌体からタンパク質を抽出した。抗GFP、抗DsRed抗体によるEGFP-AipA (黒矢頭) およびAoAbp1-mDsRed (白矢頭) のウェスタン解析。抗GFP抗体はDsRedと交差反応性を示した。

(B) AADPEA1株の分生子をCD液体培地に植菌し、30°Cで17時間培養した後、菌糸を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。EGFP-AipAおよびAoAbp1-mDsRedは菌糸先端部で共局在した。

(C) AADPEA1株の分生子をCD液体培地に植菌し、30°Cで21時間培養した後、アクチン重合阻害剤であるlatrunculin Bで7分間処理して菌糸を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。EGFP-AipA、AoAbp1-mDsRedは共に、アクチン依存的な局在を示した。スケールバーは5 μ m。