

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成10年度博士課程進学
氏名 丸山潤一
指導教官名 北本勝ひこ

論文題目 麹菌 *Aspergillus oryzae* の核動態に関する研究

麹菌 *A. oryzae* は我々日本人の経験と知恵を結集し受け継がれ、千年以上にわたって清酒・醤油・味噌などの醸造に用いられてきた。また、アミラーゼなどの酵素生産微生物としての活躍も約一世紀と長きにわたる。最近では、形質転換法の開発を契機に分子遺伝学的手法が導入された麹菌は、異種蛋白質生産の宿主として世界的にも注目されている。さらに、この10年ほどの間に麹菌の様々な遺伝子がクローニングされるなど、分子生物学的解析が飛躍的に進んでいる。

しかし、麹菌の菌糸成長や分生子形成などの形態的な観点からの解析は、まだ始まったばかりである。なかでも、麹菌の核輸送は菌糸成長や分生子形成に必要であり、醸造や産業利用に重要な役割をもつ。麹菌は菌糸のみならず分生子も多核であるため、変異株取得に多大な労力と時間を要するという問題があった。この性質は、基礎研究において麹菌への古典遺伝学の適用を困難にし、実用において変異育種の際に生育の阻害や分生子形成効率低下などの2次的影響をもたらすことが多々あった。逆に、この性質は麹菌に遺伝的安定性を付与することから、醸造にとっては望ましい形質である。以上のことから、核輸送の研究は麹菌がもつ醸造上の特性を解明するために、また遺伝学的解析や育種の改良を見据えたうえでも、意義あるものである。

Neurospora crassa や *Aspergillus nidulans* などの糸状菌の解析により、核輸送に cytoplasmic dynein (細胞質ダイニン) や dynactin complex (ダイナクチン複合体) が関与することが明らかになっている。cytoplasmic dynein は微小管依存性のモーターであり、マイナス端方向に移動する。エンドサイトーシス、ゴルジ体の形成、神経軸索のオルガネラの逆輸送、微小管依存性の有糸分裂など、細胞内の様々な輸送過程に関与している。

dynactin complex はcytoplasmic dynein とオルガネラなどの荷物とを連結し、その輸送を活性化すると考えられている。

A. oryzae においては、dynactin complex のコンポーネントであるアクチン関連蛋白質 Arp1 (actin-related protein) をコードする遺伝子 (*arpA*) が、既に当研究室でクローニングされている。*arpA* 破壊株は著しい生育阻害、菌糸の多分岐、核分配の阻害、分生子柄の形態異常を示した。アミラーゼに関するハロアッセイの結果より、*arpA* 破壊株における菌体重量あたりのアミラーゼ生産量が野生株より高いことが示唆された。これらの結果は、基礎的ならびに麹菌の応用的観点からも非常に興味深い現象である。そして、cytoplasmic dynein とdynactin complex の役割に関するさらなる研究が、麹菌利用の一助となることが期待される。

本研究では、麹菌 *A. oryzae* の核輸送・核動態に着目し、EGFP による *A. oryzae* の核の可視化、核動態観察、FACS (fluorescence-activated cell sorter) を用いた分生子内の核数の解析、cytoplasmic dynein heavy chain をコードする遺伝子 (*dhcA*) のクローニングと機能解析を行った。

1 EGFP を用いた *A. oryzae* の核の可視化

生きた細胞の核動態を観察するために、*A. nidulans* histone H2B をコードする遺伝子と、EGFP をコードするDNA断片との融合遺伝子 *h2b-egfp* を作成した。*A. oryzae* *niaD300* 株 (*niaD*) と *A. nidulans* FGSC89 株 (*argB*) に、それぞれのマーカーとともに融合遺伝子 *h2b-egfp* を導入した。取得した形質転換体を蛍光顕微鏡で観察し、*A. oryzae* および *A. nidulans* の菌糸の核に融合蛋白質H2B::EGFP の蛍光を確認した。また、冷却CCDカメラを装着した蛍光顕微鏡を用い経時的に追跡し、菌糸成長時には先端の核の成長方向への移動、有糸分裂時は染色体凝縮と娘染色分体の分離を観察した。以上の結果から、H2B::EGFP の発現により、細胞周期全般にわたり核の動態の可視化に成功した。

2 *A. oryzae* の分生子の核数

A. oryzae ならびに *A. nidulans* のH2B::EGFP 発現形質転換体の分生子を蛍光顕微鏡で観察し、蛍光を確認した。*A. oryzae* は分生子も多核であることから、H2B::EGFP を発現した分生子内の蛍光の数を調べた。分生子が単核である *A. nidulans* ではすべて1個であったのに対し、*A. oryzae* では66%が2個、24%が1個、10%が3個以上であった。*A. oryzae* に単核の分生子が存在することを示したのはこれが初めてであり、またこれまで報告されてきた核数（4個から6個）と大きな隔たりがあった。そこで、醸造研究所の *A. oryzae* の保存株 (RIB (Research Institute of Brewing) strains) の中から清酒醸造に使用されている5株を選び、DAPI染色により分生子の核数を調べた。株によって分布が異なるが大部分が多核であり、2～5個のものが多かった。また、*A. oryzae* H2B::EGFP 発現株に比べて割合は非常に少ないものの、単核の分生子も形成する株が存在した。以上の結果より、*A. oryzae* において株によっては、数は少ないながらも単核の分生子が存在することが明らかになった。

3 FACS 解析と単核の分生子の単離

本研究では、大量の分生子のGFP 蛍光を定量的解析するために、FACS 解析に適した励起波長をもつEGFP を用いた。H2B::EGFP を発現させた分生子をFACS 解析に供したところ、*A. nidulans* では単一のピーク、*A. oryzae* では相対蛍光強度が異なる2つのピークを観察した。単核の分生子をもつ*A. nidulans* のピークと比較することにより、これと同じ蛍光強度をもつ*A. oryzae* のピークは単核のもの、それより大きい蛍光強度のピークは2つの核をもつ分生子に対応するものであると判断した。さらに、ソーティングにより*A. oryzae* の2つのピークの分生子を回収し、蛍光顕微鏡観察を行ったところ、それぞれ単核と2つの核のピークであることを確認した。また、回収した*A. oryzae* の単核の分生子からコロニーを形成させ、単核の分生子を形成するかを調べた。その結果、最初と同様の核数分布を示した。以上の結果から、*A. oryzae* は様々な核数をもつ分生子を形成するように遺伝的にプログラムされていることが示唆された。

4 *A. oryzae* のcytoplasmic dynein heavy chain をコードする遺伝子 *dhcA* のクローニング

cytoplasmic dynein heavy chain をコードする遺伝子 (*dhcA*) を *A. oryzae* よりクローニングした。*N. crassa* のcytoplasmic dynein heavy chain であるRo1 の配列をもとにプライマーを作成、PCR で得たDNA 断片をプローブにして、クローニングを進めた。その結果、*dhcA* 遺伝子は2つのイントロンをもち、4346 個のアミノ酸からなる蛋白質をコードすると推定した。*A. oryzae* DhcA は *A. nidulans* NudA と88%、*N. crassa* Ro1 と73%、ラット CyDn と49%、出芽酵母 Dyn1p と38%の相同性を有していた。また、他の生物種のcytoplasmic dynein heavy chain と同様に、*A. oryzae* DhcA ではATP 結合と分解に特徴的なP-loop が4ヶ所保存されていた。これらのことから、*A. oryzae dhcA* 遺伝子がdynein heavy chain として機能していることが考えられた。

5 *A. oryzae dhcA* 遺伝子の機能解析

A. oryzae における *dhcA* 遺伝子の機能を調べるために、遺伝子破壊株を作成した。硫酸塩資化に関与する *sC* 遺伝子をマーカーとして、*A. oryzae* のNS4 株 (*sC*⁻; *niaD*) をホストとして、形質転換を行った。PCR およびサザン解析により、*dhcA* 遺伝子破壊株の取得を確認した。*dhcA* 破壊株の生育は著しく阻害されたが、致死ではなかったため、*dhcA* 遺伝子は必須でないことが明らかになった。*dhcA* 破壊株の菌糸の核をDAPI を用いて染色したところ、核分配の阻害を観察した。この表現型より、*A. oryzae dhcA* 遺伝子は核分配に必要であることがわかった。

走査型電子顕微鏡を用いて分生子柄の形態を調べたところ、*dhcA* 破壊株の分生子柄に異常な形態を観察した。また、*dhcA* 破壊株の分生子も異常な形態を示し、分生子内の核数がホスト株NS4 に比べて増加した。これらの結果から、*dhcA* 遺伝子が分生子形成時の正常な形態形成に必要であることを示した。

次に、*dhcA* 遺伝子のエンドソームや液胞の局在への役割を調べるため、*dhcA* 破壊株をcell tracker blue (CMAC) 存在下で培養し、蛍光顕微鏡で観察した。野生株RIB40 では先

端にエンドソームや液胞を示す蛍光はほとんど見られず、菌糸が基部に近づくにつれて液胞状のものがみられた。一方、*dhcA* 破壊株では先端にエンドソームや液胞が多く存在した。このことにより、*dhcA* 遺伝子はエンドソームと液胞の適切な局在に必要であることが明らかになった。

また、*dhcA* 破壊株の菌糸は多分岐の形態を示した。糸状菌において分泌蛋白質は菌糸先端から分泌されていることから、*dhcA* 遺伝子破壊による分泌への影響に興味もたれた。そこで、アミラーゼに関するハロアッセイを行った。*dhcA* 破壊株は生育が悪いものの、野生株 RIB40 とほぼ同様の大きさのハロを形成した。このことから、*dhcA* 破壊株は菌体重量あたりのアミラーゼ生産量が高いことが示唆された。多分岐という形態は有用蛋白質生産の観点から注目を集めており、このような菌糸形態と分泌効率との関連は興味深いものである。

6 *A. oryzae dhcA* 破壊株における H2B::EGFP の発現

核動態における *dhcA* 遺伝子の役割の詳細な解析を目的として、*dhcA* 破壊株に H2B::EGFP を発現した。蛍光顕微鏡を用いて菌糸を観察したところ、H2B::EGFP 発現下でも核分配の阻害を確認した。経時的観察の結果、先端方向への輸送が遅くなる核や、先端と逆の基部の方向に移動する核が認められた。さらに、H2B::EGFP 発現細胞を用い、先端の核と菌糸先端との距離を計測した。その結果、野生株では $12.2 \pm 2.7 \mu\text{m}$ ($n = 12$)、*dhcA* 破壊株では $24.4 \pm 7.8 \mu\text{m}$ ($n = 12$) であった。以上の結果より、*dhcA* 破壊株では菌糸先端への核輸送に障害が起こっていることがわかった。

まとめ

本研究では麴菌の核動態について調べるため、EGFP による核の可視化と分生子の核数の解析、核輸送に関与する遺伝子のクローニング、機能解析を行った。

麴菌の核の可視化に用いた H2B::EGFP 発現系は、核動態の詳細な解析に非常に役立つと期待される。分生子の核数の解析では、麴菌の分生子は大部分が多核であるが、株によっては低頻度ながら単核のものも存在することを初めて示した。FACS 解析の利用は、単核の分生子を形成する変異株の単離や、多核の分生子を形成する機構の解析に寄与すると思われる。

さらに、*dhcA* 遺伝子が正常な核輸送、分生子形成時の形態形成、エンドソームと液胞の適切な局在に必要であることを明らかにした。これは *arpA* 遺伝子と同様の結果であり、*A. oryzae* においても cytoplasmic dynein と dynactin complex は協同して働いていることが考えられる。今後は、H2B::EGFP 発現系を用いて詳細な核動態の観察を行い、麴菌における *arpA* 遺伝子と *dhcA* 遺伝子の役割をより明確にする予定である。

我が国の長い醸造の歴史で独自に培ってきた経験・技術を活かしつつ、分子遺伝学的手法ならびに最新の解析道具・実験機器を駆使することにより、麴菌の核動態の解析が今後発展していくことが大いに期待される。