

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 丸 山 潤 一

麹菌 *A. oryzae* は、清酒・醤油・味噌などの醸造、アミラーゼなどの酵素生産に用いられている重要な微生物であり、異種蛋白質生産の宿主として注目されている。最近、その分子生物学的解析が飛躍的に進みつつあるが、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、ほとんどなされていない。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。また、麹菌は菌糸のみならず分生子も多核である。以上のことから、麹菌の核輸送の研究は意義あるものである。他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。*A. oryzae* の dynactin complex の Arp1 (actin-related protein) をコードする遺伝子 (*arpA*) の破壊株では、著しい生育阻害、核分配の阻害、菌糸の多分岐、分生子柄の形態異常が既に観察されている。この結果は、基礎的ならびに応用的観点から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。本研究は、麹菌 *A. oryzae* の核輸送・核動態に関するものであり、3章からなる。

第1章では、生きた細胞の核動態を観察するために、*A. nidulans* histone H2B と EGFP との融合蛋白質 (H2B::EGFP) を *A. oryzae* で発現し、蛍光顕微鏡による詳細な観察を行っている。その結果、*A. oryzae* の菌糸ならびに分生子の核に H2B::EGFP の蛍光を確認し、菌糸成長時には先端方向への核輸送、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。また、*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ところ、66% が2個、24% が1個、10% が3個以上であった。大量の分生子の GFP 蛍光を定量的に解析するため、H2B::EGFP を発現させた分生子を FACS 解析に供したところ、相対蛍光強度が異なる2つのピークを観察した。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結果、最初と同様の核数分布を得た。以上のことから、*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を示唆した。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期待される。

第2章では、cytoplasmic dynein heavy chain をコードする遺伝子を *A. oryzae* よりクローニングし *dhcA* と命名し、その遺伝子の構造解析を行っている。

第3章では、*dhcA* 遺伝子の機能を調べるために、遺伝子破壊株の様々な表現型を解析した。*dhcA* 破

壊株は、著しい生育阻害、核分配の阻害、菌糸の多分岐を示した。また、*dhcA*破壊株にH2B::EGFPを発現したところ、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を観察した。以上の結果より、*dhcA*遺伝子は菌糸先端への核輸送に必要であることがわかった。そのほか、*dhcA*遺伝子が分生子形成時の正常な形態形成、液胞とエンドソームの適切な局在に必要であることを明らかにしている。また、アミラーゼに関するハロアッセイの結果、*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。*dhcA*破壊株の菌糸が示す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。今後は、EGFP発現による核などのオルガネラの動態観察を行うことにより、*dhcA*遺伝子の役割がより明確になることが期待される。

以上、本論文は *Aspergillus oryzae* の核動態について分子生物学的に解析したもので、学術上、応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。