

## 論文の内容の要旨

応用生命工学専攻  
平成11年度博士課程入学  
氏名 黒木 豊  
指導教官名 北本 勝ひこ

論文題目 麹菌 *Aspergillus oryzae* の液胞膜 ATPase に関する研究

麹菌 *Aspergillus oryzae* は、我が国で清酒や味噌、醤油などの伝統的な醸造に古くから利用されている産業的に重要な微生物であり、我々の食文化に欠かすことのできない日本を代表する微生物である。また、麹菌の持つ極めて高いタンパク質分泌生産能が注目され、酵素生産などのバイオテクノロジーの分野においても幅広く用いられている。麹菌が生産するアミラーゼやプロテアーゼなどの産業的に重要な多種類の酵素、その遺伝子やプロモーター、並びにそれらの分泌生産に関わる研究が活発に進められてきた。しかし、一方、麹菌は有性世代をもたないことから、交配による遺伝学的解析が不可能であり、その高い有用性にもかかわらず分子生物学的な基礎研究は十分とはいえなかった。

1998年に、麹菌 *A. oryzae* の EST (Expressed Sequence Tags) 解析プロジェクトが私の所属する研究室を含む日本の複数の研究グループにより開始された。液体培養や固体培養などの様々な条件で培養した菌体から調製した mRNA より cDNA ライブラリーを作製し、塩基配列の解析を行うものであった。現在までに合計約 17,000 の EST の塩基配列が決定され、約 6,000 のクラスターに分類されている。すなわち、麹菌の持つ約 10,000 の遺伝子のうち約 60% の遺伝子の部分配列情報が利用可能となっている。さらに、2001年8月に麹菌 *A. oryzae* の全ゲノム解析が製品評価技術基盤機構により開始され、2002年初めには、ドラフト配列が決定される予定である。

### 1. *A. oryzae* の EST 解析

麹菌 *A. oryzae* は、生育可能な pH 域が 3~12 と広く、長い歴史をもつ清酒用種麹の

製造過程では木灰添加によるアルカリ性環境により、ほぼ純粋な分生子生産が達成されている。木灰添加の意義は灰のアルカリ度による雑菌繁殖の抑制、木灰に含まれるカリウムやリンなどの無機物による麹菌発育促進作用、麹菌の分生子着生を阻害する酸性化合物の中和などと考えられており、これらの手法は微生物学的に実に巧妙で我が国独自のものである。しかし、アルカリ性環境における麹菌の生育状況および遺伝子の発現制御については現在までほとんど明らかにされていない。そこで、アルカリ性環境下で生育した麹菌 *A. oryzae* より調製した cDNA から 1,500 あまりのクローンについて EST 解析を行った。他の培養条件下で解析された EST との比較検討を行った結果、アルカリプロテアーゼやアルカリフォスファターゼなど以外に酵母の液胞膜 ATPase の *VMA1*、*VMA3*、*VPH1* 遺伝子と高い相同性を持つ配列がアルカリ性環境で強く発現していることを見い出した。本研究では、これらの遺伝子をクローニングし、構造及び機能について解析を行った。液胞膜 ATPase は ATP のエネルギーを使って、液胞、リソソーム、エンドソームなどのオルガネラ内部酸性化を保つために重要な役割を担うプロトン輸送性 ATPase である。酵母の液胞膜 ATPase は 13 種類の subunit から構成され、細胞質側の親水性 subunit 群  $V_1$  ドメインと膜内在性の疎水性 subunit 群  $V_0$  ドメインが結合して Proton pump を形成する。*Vma1p*、*Vma3p*、*Vph1p* はそれぞれ  $V_1$  subunit A、 $V_0$  subunit c、 $V_0$  subunit a に相当する。

## 2. *A. oryzae vmaA* 遺伝子のクローニングと構造解析

酵母の液胞膜 ATPase サブユニットの *Vma1p* ホモログをコードする遺伝子を *A. oryzae* よりクローニングし、*vmaA* と命名した。*A. oryzae* の EST で得られた配列をプローブとして、*A. oryzae* ゲノムライブラリーからプライクハイブリダイゼーションを行い、得られたクローン及び対応する cDNA について塩基配列を決定した。その結果、1 つのイントロンを含み 605 アミノ酸からなるタンパク質をコードする遺伝子 (*vmaA*) を見い出した。予想される *VmaA* アミノ酸配列は *Neurospora crassa* の *Vma1p* と 71%、*Saccharomyces cerevisiae* の *Vma1p* と 69%、Human の ATP6A2 と 49% の相同性を有していた。また、他の生物種の液胞膜 ATPase と同様に、*A. oryzae VmaAp* には ATP 結合領域が保存されていた。以上より、*A. oryzae vmaA* 遺伝子が液胞膜 ATPase subunit A として機能していると考えられた。

*S. cerevisiae* の *Vma1p* は利己的遺伝子 VDE (*VMA1*-derived endonuclease) が挿入された形で翻訳され、プロテイン・スプライシングにより成熟化することが知られている。*A. oryzae VmaAp* に VDE は存在しなかったが、*vmaA* 遺伝子中の推定上のホーミング位置付近には、切断に必須の配列が保存されていることを見い出した。

培地の pH による *vmaA* の転写量をノーザン解析により検討した。*A.oryzae* 野生型 RIB40 株を、酸性、中性、アルカリ性で培養し、菌体から total RNA を調製した。*vmaA* cDNA をプローブとしてノーザン解析を行い、他の培養条件下と比較してアルカリ性条件下で強く発現していることを見出した。

*vmaA* 遺伝子 cDNA の全長を *S. cerevisiae* の *vma1* 破壊株において発現させたところ、アルカリ性 pH および高  $\text{Ca}^{2+}$  培地における生育感受性の相補が観察された。

次に麹菌における *vmaA* 遺伝子の機能について解析するため、*A.oryzae* の *vmaA* 遺伝子破壊株を作製し、その表現型について観察を行った。硫酸塩資化に関与する *sC* 遺伝子をマーカーとして、*A.oryzae* 染色体上の *vmaA* 遺伝子を相同組み換えによって破壊し、PCR およびサザン解析により、*vmaA* 遺伝子破壊株の取得を確認した。*vmaA* 遺伝子破壊株の寒天培地上での生育を野生株と比較したところ、*vmaA* 破壊株は特にアルカリ性培地での生育が強く阻害され、pH9.0 以上では生育できないことを観察した。顕微鏡観察では、アルカリ性培地で菌糸の直径が細くなることや液胞が小さくなっていることを見出した。

### 3. *A.oryzae vmaC* 遺伝子のクローニングと構造解析

液胞膜 ATPase Vma3p ホモログをコードする遺伝子を *A.oryzae* よりクローニングし、*vmaC* と命名した。*A.oryzae* の EST で得られた配列を基にゲノムライブラリーからプライクハイブリダイゼーションを行い、*vmaC* 遺伝子を単離した。対応する cDNA 塩基配列との比較から 5 つのイントロンを含み 161 アミノ酸からなるタンパク質をコードすると推定された。予想される VmaCp アミノ酸配列は *N.crassa* の Vma3p とは 81% の相同性を示し、*S.cerevisiae* の Vma3p とは 78%、Human の ATP6C とは 70% の相同性、また植物の *Arabidopsis thaliana* AVA1p とは 63% の相同性を有していた。また、他の生物種の液胞膜 ATPase と同様に、*A.oryzae* VmaCp にも DCCD binding site が保存されていた。これらのことから、*A.oryzae vmaC* 遺伝子が液胞膜 ATPase subunit c として機能していると考えられた。

*A.oryzae* VmaCp のアミノ酸配列のハイドロパシー分析により、VmaCp は疎水性の 4 回膜貫通タンパク質であると推定された。さらに、*vmaC* 遺伝子の転写量をノーザン解析により検討したところ、*vmaA* 同様アルカリ性培養条件下で強く発現していることを見い出された。

*vmaC* 遺伝子の cDNA を *S. cerevisiae* の *vma3* 破壊株において発現させたところ、アルカリ pH および高  $\text{Ca}^{2+}$  培地における生育感受性を相補した。しかし、VMA3 遺伝子と高い相同性を有する VMA11 遺伝子の破壊株のアルカリ性 pH および高  $\text{Ca}^{2+}$  感受性を相補しなかった。

相同組換えによって *vmaC* 遺伝子破壊株を作製し、その表現型について観察を行った。野生株と比較してアルカリ性培地における *vmaC* 破壊株の生育は抑制されていたが、pH10.5 の培地上でも生育可能であった。顕微鏡観察により、アルカリ性培地で生育する *vmaC* 破壊株の液胞の膨張が認められた。

#### 4. *A. oryzae* *vphA* 遺伝子のクローニングと構造解析

液胞膜 ATPase Vph1p ホモログをコードする遺伝子を *A. oryzae* よりクローニングし、*vphA* と命名した。*A. oryzae* の EST で得られた配列を基に前述と同様の手法により *vphA* 遺伝子を単離した。*vphA* 遺伝子は 6 つのイントロンを含み 854 アミノ酸からなるタンパク質をコードすると推定された。予想される VphAp アミノ酸配列は *N. crassa* の Vph1p と 72%、*S. cerevisiae* の Vph1p と 67%、*Schizosaccharomyces pombe* の Vph1p とは 66% の相同性を有していた。

*vphA* 遺伝子の cDNA を *S. cerevisiae* の *vph1* 破壊株に発現させたところ、アルカリ性 pH および高  $\text{Ca}^{2+}$  培地における生育阻害を相補した。しかし、*VPH1* 遺伝子と高い相同性を有する *STV1* 遺伝子の破壊株のアルカリ性 pH および高  $\text{Ca}^{2+}$  感受性は相補しなかった。

#### まとめ

本研究では *A. oryzae* の液胞膜 ATPase  $V_1$  subunit A、 $V_0$  subunit c、及び  $V_0$  subunit a をコードすると推定される *vmaA*、*vmaC*、*vphA* 遺伝子をクローニングし、解析を行った。*vmaA*、*vmaC* 遺伝子破壊株は共に野生株と比較して生育が遅いことが観察された。*vmaA* 破壊株の生育 pH 範囲は pH 5.0 ~ 8.5 でアルカリ性側での生育が強く抑制されるのに対し、*vmaC* の破壊株は pH 5.0 ~ 10.5 で生育可能であった。さらに顕微鏡により双方の破壊株の表現型を観察したところ、アルカリ性培地で *vmaA* 破壊株は菌糸直径及び液胞の縮小が見られたが、*vmaC* 破壊株では逆に液胞の膨張が認められた。酵母においては液胞膜の Homotypic な膜融合に際して、液胞膜 ATPase の  $V_0$  ドメインが融合の開始部位の形成に関与すると報告されている。これらの破壊株を使用することにより、液胞形成に関する  $V_1$  ドメインと  $V_0$  ドメインの果たす役割を解明することが可能と思われる。

1. Kuroki, Y., Juvvadi, R. P., Arioka, M., Nakajima, H., Kitamoto, K. Cloning, expression and functional characterization of *vmaA*, the gene encoding a 69-kDa catalytic subunit of the Vacuolar  $\text{H}^+$ -ATPase from *Aspergillus oryzae* (submitted)
2. Kuroki, Y., Juvvadi, R. P., Arioka, M., Nakajima, H., Kitamoto, K. Molecular cloning and functional analysis of *vmaC*, the gene encoding a 16-kDa proteolipid subunit of the Vacuolar  $\text{H}^+$ -ATPase from *Aspergillus oryzae* (submitted)