

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 黒木 豊

麹菌 *Aspergillus oryzae* は、我が国で清酒や味噌、醤油などの伝統的な発酵食品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、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ている。また、酵素生産などのバイオテクノロジーの分野においても研究が進んでいるものの、基礎生物学的観点からの研究は遅れている。本研究は、麹菌 *A. oryzae* のアルカリ性での生育に関するものであり、4章からなる。

第1章では、*A. oryzae* のアルカリ性での EST (Expressed Sequence Tag) 解析に関して述べている。*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。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 *A. oryzae* より調製した cDNA から約 1,500 のクローンについて EST 解析を行い、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、酵母液胞膜 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多く発現していることを見出した。液胞膜 ATPase は ATP のエネルギーを使って、液胞などのオルガネラ内部酸性化のために重要な役割を担うプロトン輸送性 ATPase である。

第2章では、*A. oryzae vmaA* 遺伝子のクローニングについて述べている。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。さらに、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、3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。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。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ところ、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い出した。*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 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、*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。*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が観察された。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い出した。

第3章では、*A. oryzae vmaC* 遺伝子のクローニングについて述べている。酵母 *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。

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。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。*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が見いだされた。*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 Ca^{2+} 培地における生育感受性を相補した。*A. oryzae 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ところ、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。

第 4 章では、*A. oryzae vphA* 遺伝子のクローニングについて述べている。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。*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。*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 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感受性は相補しなかった。

以上、本研究は *A. oryzae* のアルカリ性で発現している遺伝子の解析から得られた知見をもとに、液胞膜 ATPase の主要なサブユニットをコードする遺伝子を単離、解析したものであり、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。