

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 一宮 維幸

糸状菌は人の生活と正と負の両面で深く関わっている真核微生物である。糸状菌の持つ有用性と有害性は、糸状菌の形態と密接に関わっていると考えられる。糸状菌を含む真菌類では細胞壁がその生物の形態を維持している。本論文は、糸状菌 *Aspergillus nidulans* を材料として細胞壁合成について解析を行ったものである。

第 1 章から第 3 章まででは糸状菌の細胞壁の主要構成成分であるキチンの合成に関わる酵素であるキチン合成酵素とそれらをコードする遺伝子に着目しその生理的な役割について解析を行った。申請者の所属する研究グループでは、*A. nidulans* より 5 つのキチン合成酵素遺伝子 *chsA*、*chsB*、*chsC*、*chsD* および *csmA* (それぞれクラス II、III、I、IV および V に属するキチン合成酵素をコードしている) を単離し、その解析を行ってきた。その過程で、*chsB* 欠失株あるいは *chsB* の発現を抑制した株では菌糸の伸長が非常に遅く、多数の分岐がみられること、*chsA*、*chsC* および *chsD* の各遺伝子欠失株は大きな表現型の変化を示さないことなどが明らかになった。また数種の二重遺伝子欠失株が作製されており、そのうち *chsA chsC* 二重遺伝子欠失株 (ΔAC 株) は、無性孢子形成器官 (分生子柄) の数の減少とその形態異常がみられた。また ΔAC 株の生育は塩、界面活性剤、キチン結合性色素などに感受性を示すことから、細胞壁に変化が生じていることが示唆されていた。これらのことから、*chsA* と *chsC* が菌糸生長と分化において重複した機能を持つことが示唆されていた。

第 1 章では ΔAC 株の表現型について解析を行った。 ΔAC 株の細胞壁の異常を明らかにするために、まず透過型電子顕微鏡により菌糸を観察した。その結果 ΔAC 株の菌糸では形質膜のすぐ外側に電子密度の低い層が不均一に存在していることが分かった。菌糸中の隔壁は非常に厚くなっており、野生型株と比べて大きな孔の開いた隔壁もみられた。さらに近接して形成されている隔壁もみられた。これらの異常な構造は *chsA* または *chsC* の一遺伝子欠失株では観察されなかった。またキチン含量を測定したところ、固体培地上では ΔAC 株の菌糸のキチン含量は野生型株の 128% に増加しており、 ΔAC 株における細胞壁異常の存在が支持された。隔壁形成の位置の異常は蛍光顕微鏡観察によっても確認された。また ΔAC 株では核の分布も不均一であることが明らかになった。

分生子柄形成異常については、分生子柄形成の制御に関わる転写因子をコードする *brlA* および *abaA* の mRNA 量が、 ΔAC 株では野生型株やそれぞれの単独欠失株と比べて大きく減少していることが明らかになった。*abaA* の転写は *brlA* により正に制御されていることが知られており、 ΔAC 株の分生子柄形成異常は *brlA* の mRNA 量の減少により引き起こされたことが示唆された。

第 2 章では *ChsA* の機能を推定するために、その細胞内局在部位の解析を行った。*ChsA* に 6 コピーの HA タグを付加し (*ChsA*-HA)、これを ΔAC 株の染色体上の *argB*

部位において発現する株を作製した。この株では分生子形成能が大きく回復しており、その回復の度合は ChsA を発現させた場合と比較して大きな差がみられなかったことから、ChsA-HA は ChsA とほぼ同様の機能を持つことが推定された。この株の細胞抽出液に対するウェスタン解析の結果、ChsA-HA の推定分子量である 121 kDa に近い約 123 kDa とそれより大きい約 146 kDa の位置にバンドが検出された。間接免疫蛍光法により ChsA の細胞内局在部位を検討した結果、弱い蛍光が細胞質にドット状に観察され、また強い蛍光が隔壁の、特に中心部に観察された。この強い蛍光は一部の隔壁でのみ観察されたことから、ChsA が菌糸中の隔壁形成に機能しており、隔壁形成後にはそこにとどまらないことが示唆された。

第 3 章ではクラス I-IV キチン合成酵素遺伝子の機能の関連性について検討した。まず *chsB* の発現を抑制できる *chsD* 欠失株を作製し、解析を行った。その結果、*chsB* の発現を抑制することで *chsD* の機能の重要性が増すことが示された。また *chsA* と *chsC* の菌糸生長における役割の違いを明らかにするために、*chsD* の場合と同様に、*chsB* の発現を抑制できる *chsA* および *chsC* 欠失株を作製し、解析を行った。その結果、*chsB* の発現を抑制したときには *chsA* を欠失することにより、気中菌糸が少なくなることが分かった。また *chsC* を欠失した場合には、コロニーの菌糸密度が低くなることが分かった。

また *chsB* プロモーター下で *chsA* を発現させても、*chsB* の発現を抑制した際の形態異常やキチン含量の低下などの表現型が抑圧されないことを示した。このことから *chsA* と *chsB* の欠失株の表現型の違いは転写制御の違いによるのではなく、キチン合成酵素自体の性質によることが示唆された。

第 4 章では出芽酵母において細胞壁へのストレスに応答するためのシグナル伝達経路において中心的な役割を果たしていることが知られていたプロテインキナーゼ C (PKC) をコードする *Pkc1p* のホモログを *A. nidulans* より単離し、解析を行った。この遺伝子 (*pkcA*) は 1085 a.a. よりなるタンパク質をコードしていると推定され、またこれまでに単離されていた真菌類の PKC と高い相同性を示す複数の領域がよく保存されていた。*pkcA* 欠失株の作製を試みた結果、*pkcA* が生育に必須な遺伝子であることが示された。そこで *pkcA* のプロモーターを発現制御可能なものに置換した株を作製した。*pkcA* の発現を抑制する条件では生育が野生型株よりも遅く、菌糸先端や途中において頻繁に溶菌がみられた。これらの表現型は浸透圧安定化剤の添加によっても抑圧されなかったことから、*pkcA* の発現抑制により細胞壁以外にも異常が生じていることが示唆された。

以上本論文は、*A. nidulans* のキチン合成酵素群は、酵母の場合と比較してより高度に機能分化するとともに複雑に関連しつつ機能していることを明確にし、また *A. nidulans* の形態形成においていくつかのキチン合成酵素の協同する機能の重要性を示したものであり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査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。