

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 大根田 守

---

麹菌 *Aspergillus oryzae* は、日本の醗酵食品に古くから用いられてきた産業上重要な微生物である。また、麹菌の高いタンパク質分泌能力と安全性が注目され、有用タンパク質生産の宿主としての利用が期待されているものの、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* の液胞機能と液胞タンパク質輸送に関するものであり、4章からなる。

第1章では、*A. oryzae* の液胞の可視化について述べている。*A. oryzae* における液胞タンパク質の挙動や液胞内環境の変化を知るための指標として、*A. nidulans* 由来の液胞酵素 *carboxypeptidase Y* と蛍光タンパク質 EGFP の融合タンパク質を *A. oryzae* で発現させた。これによってこれまで微分干渉顕微鏡では観察するのが困難であった菌糸先端付近の小さい液胞や液胞の動態を生きた細胞において詳細に観察することが可能となった。また、液胞における EGFP 蛍光強度は細胞外 pH などの生育条件によって変化したが、液胞内の酸性化を阻害する *Bafilomycin A1* を培地中に添加することによって液胞内の EGFP 蛍光強度が増大したことから、液胞内の酸性化が EGFP 蛍光強度を低下させる原因であると推定した。更に、EGFP 蛍光によって微分干渉顕微鏡では観察されないリング又はチューブ状の構造体が可視化されることを見出した。それらの動態と出現条件を解析した結果、チューブ状の構造体からリング状の構造体に変化する様子を *time-lapse image* として撮影することに成功し、栄養飢餓状態の細胞にリング状の構造体が多数出現することを見出した。

第2章では、*A. oryzae* CPY::EGFP 発現株からの液胞タンパク質 *missort* 変異株の取得について述べている。これまで *A. oryzae* では分生子が多核であることなどから変異株の取得が困難であったが、それらを FACS (fluorescence-activated cell sorter) や蛍光マイクロプレートリーダーなどの分析機器の使用により克服し、合計 6 万株からなる変異株ライブラリーの中からそれぞれの目的にあった変異株を単離した。まず始めに、出芽酵母の *vps* 変異株の様に、液胞型 ATPase サブユニットを液胞膜状に局在化することができずに液胞内の酸性化に欠損を持つものなどを想定して、FACS を用いて分生子内 EGFP 蛍光の強い *hfc* (*hyper-EGFP fluorescence in conidia*) 変異株を 18 株単離した。また、同様に FACS を用いて CPY::EGFP を細胞外に分泌することで分生子内 EGFP 蛍光が低下した *dfc* (*dark EGFP fluorescence in conidia*) 変異株を 20 株単離した。更に、蛍光マイクロプレートリーダーを用いて分泌された CPY::EGFP によって培地中の EGFP 蛍光が増大した *hfm* (*hyper-EGFP fluorescence in the medium*) 変異株を 22 株単離した。

第3章では取得した液胞タンパク質 *missort* 変異株の表現型を解析した。分生子内に強い EGFP 蛍光を示す *hfc-1* 変異株は、*A. oryzae* の液胞型 ATPase のサブユニット A をコードする *vmaA* 破壊株と同様に、アルカリ性培地での生育が極度に低下していた。また、液胞など

の酸性コンパートメントを染色する CMAC を液胞内に取り込むことができないことから、液胞内の酸性化に欠損を持つことが示唆され、初めに想定した通りの変異株が取得されていることが確認された。酸性培養時の *dfc-14* 変異株及び *hfm-4* 変異株の培地からは野生株に比べて 10 倍以上の EGFP 蛍光が検出され、アルカリ性培養時の *hfm-21* 変異株の培地からは野生株の 36 倍の EGFP 蛍光が検出された。また、内在性液胞酵素である tripeptidylpeptidase I (TPP I) はアルカリ性条件下で発現が誘導されることが知られているが、多くの変異株でアルカリ性培養時に野生株の 6~8 倍の TPP I 活性が培地中から検出された。酸性培養時の *hfc-3*, *dfc-14*, *hfm-4* 変異株及びアルカリ性培養時の *hfc-4* 変異株では、出芽酵母の Class B *vps* 変異株のように細分化した液胞が観察され、アルカリ性培養時の *dfc-14*, *hfm-4* 変異株では出芽酵母の Class E *vps* 変異株のように液胞周辺のドット状の構造への CPY::EGFP の蓄積が認められた。また、*A. oryzae* に特有の表現型として、液胞の細分化に伴い多分岐などの菌糸の形態異常が多くの変異株で認められ、殆どの変異株が細胞外の pH によって異なる表現型を示した。

第 4 章では、液胞タンパク質 *missort* 変異株のうち、*hfc-1* 変異株のアルカリ感受性を利用した原因遺伝子の同定について述べている。*A. oryzae* 野生株のゲノムを用いて作成したコスミドライブラリーと、自律複製領域 *AMA1* を含むプラスミドにより *hfc-1* 変異株を co-transformation した。得られた形質転換体の中からアルカリ性培地での生育が回復したものを取得し、そこからプラスミドをレスキューした。プラスミドに含まれるゲノム断片の塩基配列を解読し、*A. oryzae* ゲノムデータベースを用いてゲノム断片の全配列情報を取得した。その配列から推定される ORF のなかに出芽酵母の液胞タンパク質輸送に関与する *DNF3* が含まれることを見出した。更に、*A. oryzae* 野生株から PCR によってクローニングした *DNF3* 遺伝子を *hfc-1* 変異株に導入し、アルカリ感受性の相補を確認した。

以上、本研究は *A. oryzae* の液胞形態、液胞機能、液胞タンパク質輸送を可視化する系を構築し、それを指標に液胞関連の変異株を取得、解析すると共に、プラスミドレスキューによる変異株原因遺伝子同定法を確立したものであり、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。