

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻

平成 13 年度博士課程入学

氏 名 石 一智

指導教員名 北本 勝ひこ

論文題目 麹菌 *Aspergillus oryzae* の核運搬機構に関する研究

麹菌 *Aspergillus oryzae* は日本酒、味噌、醤油などの伝統的な発酵食品に使用される産業的に重要な糸状菌である。発酵食品を生産する際、*A. oryzae* の分生子はそのスターター微生物として蒸し米などの食品原材料上に加えられ、発芽し菌糸成長を始める。成長した菌糸は様々な加水分解酵素を菌体外に分泌することで発酵食品生産に役立っている。分生子の発芽率は品質に影響を及ぼすことから、分生子の発芽能およびその保存安定性は発酵食品生産における重要な因子である。分生子は栄養源の枯渇などが引き金となり気中の分生子柄 (Stalk、Vesicle、Phialide) の先端に無性的に形成される細胞である。分生子形成は基底菌糸から発達し、空気中に Stalk、Vesicle、Phialide、分生子の順番で進行する。麹菌を除く多くの *Aspergillus* 属糸状菌においては基底菌糸から Vesicle までつながる 1 つの細胞は多核であるが、Phialide から分生子は単核であることが知られている。一方、*A. oryzae* では Phialide から分生子まで一部は単核であるが、多くは多核の状態を維持する。即ち、*A. oryzae* は 1 つの分生子から形成されたコロニー由来の分生子集団に約 70% の多核分生子と約 30% の単核分生子を含む。多核分生子の存在は古くから観察されていたものの、その形成機構に関する詳細に関しては現在に至るまでほとんど理解されていない。

麹菌はなぜその生活環を通じて多核の状態を維持し続けるのだろうか。この現象を理解するために、本研究では分生子形成時における核運搬過程に焦点を当てて解析を進めた。また、*A. oryzae* や、鰹節製造に用いられる *A. glaucus* のように産業に使用されている *Aspergillus* 属糸状菌は多核分生子を有することが知られているが、この性質が単核という性質と比べたときどのような差異を有しており、この差異は生物学的さらには産業的にどのような意味を有しているのかについての示唆を得ることも本研究の目的とした。

多核分生子は母細胞である Phialide からの核移動で作られる

A. oryzae の多核分生子の形成過程を調べるため、分生子形成過程における核運搬過程の追跡を試みた。これまで、空気中で進行する分生子形成時における核動態を糸状菌の生細胞において追跡した例はないことから、まず観察手法の確立を試みた。*A. nidulans* は単核分生子を形成する *Aspergillus* 属糸状菌であり、透過型電子顕微鏡や DAPI 染色と蛍光顕微鏡を用いた解析によりその分生子形成時における核動態がよく研究されている。そこで、まず *A. nidulans* をモデルとした解析を行った。ヒストン H2B-EGFP の発現により核が可視化された *A. nidulans* 株をスライドガラス培養し、これを共焦点レーザー顕微鏡によって経時的に観察することで分生子形成過程における核運搬過程を追跡した。その結果、*A. nidulans* では、Stalk、Vesicle、Phialide、分生子の順に核が 1 つずつ運搬され、単核の分生子が形成されることがわかった。この一連の核動態は透過型電子顕微鏡観察により報告されている動態と同じであったことより、分生子形成時における核運搬過程を追跡する方法を確立できたと判断した。

次に同様の方法により *A. oryzae* における多核分生子形成機構を調べた。その結果、*A. nidulans* とは異なり、*A. oryzae* においては複数個の核が Vesicle と Phialide 間で移動することがわかった。さらに、Phialide と分生子間でも複数個の核の移動が観察された。また、分生子内で核分裂は観察されなかった。したがって、*A. oryzae* の多核分生子は分生子内での核分裂により形成されるのではなく、Phialide から分生子間において複数個の核が運搬されることにより形成されることがわかった。なお、上述のように *A. oryzae* においても単核分生子は形成されるが、これは多核分生子と同じ Phialide から生じ、*A. nidulans* の単核分生子と同様に 1 個の核が分生子へ運びこまれることで形成された。

多核分生子は単核分生子よりも早く発芽する

A. nidulans の単核分生子は核分裂したのち発芽することが知られている。一方、*A. oryzae* の分生子の発芽時における核動態を経時的に調べたところ、培養 5 時間で 3 核の分生子の 80.2%が発芽したのに対して、2核では 35.3%、単核では 4.5%が発芽した。このことから、多核分生子は単核分生子よりも早く発芽することがわかった。これは、多くの単核分生子が *A. nidulans* と同様に核分裂後に発芽管を伸長させるのに対して、多核分生子は核分裂することなく発芽するためであると考えられる。一般に日本酒や味噌製造で使用される *A. oryzae* 株は穀物から分離された株よりも多核の割合が高いことが知られている。一方、発酵食品生産は開放系で行われることより、他の微生物が製造過程で混入する危険性がある。これらを考慮すると、多核の *A. oryzae* が醸造産業で使用されてきた理由の一つは、多核分生子が単核分生子よりも早く発芽するため、多核分生子を多く作る株が選択されたためであると考えられる。

多核の分生子は単核の分生子よりも変異処理に強い

多核分生子は単核分生子よりも 1 細胞内のゲノムのコピー数が多いことより、直接 DNA に損傷を与える物理的または化学的処理に対して生存率が高くなると考えられる。この可能性を検討するため、核数分布の異なる 5 種の *A. oryzae* 株由来の分生子に紫外線照射し、その生存率を測定した。その結果、分生子内の核数が多い株ほど生存率が高く、低い株ほど生存率が低いことがわかった。しかし、この結果は異なる遺伝的背景を持つ株どうしを比較したものであり、核数以外の因子が生存率に関与した可能性を否定できない。そこで一つの株由来の分生子集団から単核が多く濃縮された分生子集団とそうでない分生子集団を分離し、それらにおける紫外線照射後の生存率を調べた。その結果、単核が濃縮された分生子集団は濃縮されていない集団よりも生存率が低いことがわかり、分生子内の核数は紫外線照射後の生存率に影響を与えることが示された。以上より、多核分生子は醸造産業で使用される *A. oryzae* の分生子保存中の遺伝的安定性に寄与していると考えられた。

単核分生子を多く形成する *A. oryzae* 変異株の取得

上述のように多核分生子の形成には核運搬機構が関与する。この分子機構を解析するために、分生子内の核数分布が変化する変異株の取得を試みた。ヒストン H2B-EGFP により核が可視化された *A. oryzae* NHG10 株に対して変異処理を行い、分生子を FACS によってその核数毎に分ける方法を用いて単核分生子を多く形成する uni10 株を分離し

た。NHG10 株の単核分生子を形成する割合は約 30%であるのに対して、uni10 株における単核分生子の割合は約 80%であった。この表現型より変異形質を *mun* (multinucleate conidium defect) と命名した。その後さらに同様の性質を持つ変異株を 8 株分離した。これらの変異株は uni10 株と差異が認められないことより、解析には主に uni10 株を用いた。uni10 株は NHG10 株と比べて分生子形成や発芽には影響が認められなかった。しかし蛍光顕微鏡を用いて核を観察したところ、uni10 株は NHG10 株と比べて核が大きいことがわかった。そこで Propidium Iodide により DNA を染色することで核当りの DNA 含量を測定したところ、uni10 株由来の分生子の核あたりの DNA 量は NHG10 株のそれよりも 2 倍程度多いことが示された。このことより、uni10 株は 2 倍体であることが示唆された。しかし、菌糸由来のプロトプラストにおける核当りの DNA 含量を測定したところ、NHG10 株と uni10 株に差異は認められなかった。

mun 形質を相補あるいは抑圧する遺伝子のスクリーニング

mun 形質の優劣を判別するため、野生株との細胞融合実験を行った。その結果、細胞融合株は単核ではなく、多核の分生子を多く形成することがわかり、*mun* 変異は劣性変異であることが示唆された。続いて *mun* 形質を相補あるいは抑圧する遺伝子を取得するため、*A. oryzae* RIB40 ゲノムの Fosmid ライブラリーと co-transformation 用ベクターを用いて形質転換した。スクリーニングは変異株の探索と同様に、GFP 蛍光を指標に FACS で形質転換体から多核分生子を分離することで行った。約 2000 の形質転換体より、親株と同様に多核分生子を多く形成する株を 2 株取得した。これらの株から Fosmid を脱落させる実験を行ったところ、取得した 2 株のうち 1 株は単核分生子を多く形成する変異株の表現型を示し、脱落した Fosmid 中に *mun* 形質を野生型に回復させる遺伝子が含まれることが示唆された。現在、*mun* 遺伝子の探索を鋭意進めている。

本研究により、*A. oryzae* の多核分生子は分生子内での核分裂により形成されるのではなく、Phialide から分生子間において複数個の核が運搬されることにより形成されることがわかった。また、多核分生子は単核分生子よりも早く発芽した。加えて、多核分生子は単核分生子よりも紫外線に対して高い生存率を有していた。これらのことは多核分生子を形成する *A. oryzae* が醸造産業で使用されてきた理由の一つであると考えられる。また、核の運搬による多核分生子が形成する機構を解析するために、分生子内の核数分布が変化する変異株とその相補株を取得した。今後、相補遺伝子の解析から *A. oryzae* における多核分生子形成の分子機構に対する理解が深まるものと期待している。