

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 山崎 晴丈

第一章では、糸状菌 *Aspergillus nidulans* に存在すると推定されるキチナーゼ (キチナーゼ (EC 3.2.1.14)) をコードする遺伝子のうち、class III キチナーゼをコードする遺伝子 (*chiA*, *chiH*, *chiR*) の機能解析を行っている。

まず *chiA* についてその周辺を含む全塩基配列を確認したところ、*chiA* の遺伝子産物である ChiA は 961 アミノ酸からなる蛋白質であり、N 末端に分泌シグナル、活性中心を含む領域、それに続く約 620 アミノ酸の Ser、Thr、Pro に富む領域 (STP 領域)、さらに C 末端には GPI (Glycosylphosphatidylinositol) anchored protein に特徴的な配列 (GPI anchor motif) を持つと推定され、実際に ChiA が GPI アンカーの付加を受けていることを強く示唆する結果を得た。

chiH, *chiR* についてはゲノム情報からその存在が明らかとなったが、5'-RACE、3'-RACE の結果から、*chiH* の遺伝子産物である ChiH は 558 アミノ酸からなる蛋白質であり、N 末端に分泌シグナル、活性中心を含む領域、それに続く約 180 アミノ酸の Gln に富む領域からなると推定された。また同様に *chiR* の遺伝子産物である ChiR は 305 アミノ酸からなる蛋白質であると推定され、活性中心を含む領域以外に特徴的な配列は見出されなかった。

chiA, *chiH*, *chiR* の単独破壊株を作製したが、野生型株と同様の生育を示した。さらに *chiA*, *chiH* または *chiA*, *chiR* の二重破壊株を取得したが、それらも野生型株と同様の生育を示した。しかし、*chiH*, *chiR* に関しては、それら二重破壊株の取得を目的として、350 株以上の形質転換体についてサザン解析を行ったが、二重破壊株は取得できず、これら両遺伝子の欠失は合成致死となる可能性が考えられた。そこで *chiR* の破壊株において、*chiH* の発現を *A. nidulans* において培地の炭素源により発現の制御可能な *alcA* プロモーターの支配下で抑制したところ、野生型株に比べ胞子の発芽や菌糸生長に遅れら見られた。さらに *chiA*, *chiR* 二重破壊株において、*chiH* の発現を制御できる株を作製しその表現型についても解析を行ったが、*chiA* の破壊の影響は見られなかった。これらのことから *chiH* と *chiR* は、*chiA* とは独立した互いに重複した機能を有しており、生育に重要な役割を果たしていることが示唆された。また、*chiH* は分生子形成期に特に発現が上昇していた。このことから *chiH*, *chiR* 両遺伝子が存在する状態では、*chiH* は分生子形成期、*chiR* は菌糸生長期に主に機能していると推察された。

第二章では、class V キチナーゼをコードする *chiB* の機能解析を行っている。ゲノム情

報から、*chiB* の遺伝子産物である ChiB の活性中心をコードする配列 5'側には分泌シグナルをコードする配列が存在することが推定され、ChiB は分泌シグナルを持ち、分泌経路を通過して菌体外に分泌される蛋白質であると予想された。しかし 5'-RACE による解析により、分泌シグナルとなり得るアミノ酸配列をコードする配列が mRNA 形成の段階でスプライスされ除去されること、また、分泌シグナルを伴って翻訳されると考えた場合に推定される開始コドンに変異を導入しても ChiB の生産に影響がないことが示され、ChiB はアミノ末端に分泌シグナルを持たないことが示唆された。

ChiB に対する抗体を用いて経時的に ChiB の生産量を検討したところ、細胞抽出液、培養上清の両方において、培養後期に発現が増加し、それに伴いキチナーゼ活性も上昇した。*chiB* の破壊株では細胞抽出液、培養上清中のどちらのキチナーゼ活性も殆ど失われることから、ChiB の活性が用いた方法で測定されるキチナーゼ活性の大部分を占めていると考えられた。また、野生型株に比べ *chiB* の破壊株では、培養後期の自己溶菌に伴う菌体乾燥重量の減少に遅れが見られた。さらに炭素源の枯渇により ChiB の生産が誘導され、それと共に細胞抽出液、培養上清の両方において、キチナーゼ活性も誘導されることが明らかとなった。これらのことから、*chiB* が *A. nidulans* において自己溶菌に重要な働きを持つことが示された。

以上本研究において、糸状菌の生育に重要な働きをしていると考えられるキチナーゼ遺伝子を初めて同定した。今後すべてのキチナーゼ遺伝子の機能に関する網羅的な解析を進めることにより、糸状菌の形態形成機構の解明へと発展してゆくと考えられるが、本研究で得られた知見はそれに大きく寄与することが期待される。また、糸状菌の中には病原菌として動植物に深刻な被害を与える菌の存在も知られており、抗真菌剤の早期開発が望まれている。本研究はキチナーゼが抗真菌剤の標的となる可能性も示唆しており、創薬面への貢献も期待される。以上のことから審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位として価値あるものと認めた。