

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻

平成15年度博士課程 入学

氏 名 菊間 隆志

指導教員名 北本 勝ひこ

論文題目 麹菌 *Aspergillus oryzae* のオートファジーに関する研究

真核細胞にはオートファジーと呼ばれる分解系が存在し、ユビキチン-プロテアソーム系と並び細胞内の主要な分解機構として機能している。オートファジーは自身の細胞内成分を液胞/リソソーム内の加水分解酵素によって分解する系の総称であり、哺乳動物細胞では1) マクロオートファジー、2) ミクロオートファジー、3) シャペロン介在性オートファジーの3つのタイプが知られている。この中で最も分解活性が高いと考えられているのがマクロオートファジーであり、通常オートファジーと表現した場合、マクロオートファジーを意味する。マクロオートファジー（以下オートファジー）の最も重要な機能は、栄養飢餓に対する適応である。オートファジーは栄養飢餓に応答して顕著に誘導され、隔離膜により細胞内成分を囲い込み、液胞/リソソームに輸送し再利用する。近年では、オートファジーが栄養飢餓に対する生存戦略としてだけでなく、通常時の細胞内浄化、抗原提示、病原性細菌に対する防御、発生および分化、細胞死、癌を含む疾患などにも関与することも報告されている。

オートファジーの分子機構については、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において多数のオートファジー不能変異株が取得されたことにより研究が始まり、その原因遺伝子は *ATG* (autophagy-related) と命名されている。その中で、*ATG8* がコードする *Atg8* は、ホスファ

チジルエタノールアミン (PE) と結合し、オートファジーにおいて観察される構造体 (preautophagosomal structure (PAS), 隔離膜, オートファゴソーム, オートファジックボディー) の膜上に存在することから、これらのマーカーとして利用されている。しかし、オートファジーの機能多様性から考えると、単細胞生物である酵母による研究には限界がある。そこで、本研究では多細胞真核微生物である糸状菌 *A. oryzae* を用いて解析を行った。

1. *A. oryzae* におけるオートファジーの可視化^{1),2),3)}

A. oryzae においてオートファジーを可視化するため、*ATG8* の *A. oryzae* におけるホモログ遺伝子を *A. oryzae* ゲノムデータベースより検索し、クローニングした。この遺伝子は推定 118 アミノ酸残基からなるタンパク質をコードし、*S. cerevisiae* *Atg8* と 79% の相同性を示した。さらに、C 末端に PE との結合に必須なグリシン残基も保存されていたことから、この遺伝子を *Aoatg8* と命名した。

次に、蛍光タンパク質 EGFP および DsRed2 と *AoAtg8* の融合タンパク質 (EGFP-*AoAtg8*, DsRed2-*AoAtg8*) を発現する株を取得し、蛍光顕微鏡により観察した。富栄養条件下の菌糸においては、EGFP-*AoAtg8* および DsRed2-*AoAtg8* の蛍光は細胞質または液胞近傍のドット状の構造体に観察された。この構造体は *S. cerevisiae* における PAS であると考えられた。さらに、窒素源枯渇培地に置換し 4 時間後の菌糸を観察した結果、蛍光は液胞内に観察された。これは、オートファジーによって *AoAtg8* が液胞内に輸送されたものであると予想された。また、共焦点レーザー顕微鏡により、オートファゴソーム形成中の隔離膜であると思われるカップ状の構造体や、隔離膜が細胞質成分を隔離して形成されたオートファゴソーム様のリング状の構造体に EGFP-*AoAtg8* の蛍光が観察された。これらの結果は、*A. oryzae* においても *S. cerevisiae* と同様のオートファジー機構が保存されていることを示唆した。

オートファジーは酵母、細胞性粘菌、線虫、ショウジョウバエなどにおいて分化や発生にも関与するという報告があることから、*A. oryzae* の分化におけるオートファジーの関与を検討した。富栄養条件下において EGFP-*AoAtg8* および DsRed2-*AoAtg8* の蛍光を観察したところ、膨潤した分生子や発芽中の分生子および発芽管では、蛍光が液胞内に観察された。さらに、富栄養条件下における気中菌糸および分化中の分生子柄を観察したところ、分生子柄の頂囊やフィアライドに強い蛍光が検出された。これらの結果により、*A. oryzae* においてオートファジーが分生子発芽や分生子形成に関与することが示唆された。

さらに、オートファジーが基本的に非選択的な分解系であることに着目し、細胞質中に発現させた蛍光タンパク質の液胞への取り込みを観察することによって、オートファジーを検出することを試みた。細胞質中に DsRed2 を発現する株を窒素源枯渇条件下にシフトし

蛍光顕微鏡で観察した。その結果、DsRed2 の蛍光は液胞内で観察された。一方、富栄養条件下においては、液胞への局在は観察されなかった。分生子発芽時や分生子柄においては、EGFP-AoAtg8 の蛍光と同様に、富栄養条件下においても液胞への局在が観察され、オートファジーの分生子発芽や分生子形成への関与がさらに強く示唆された。

2. *A. oryzae* におけるオートファジー機能の解析^{1),2)}

AoAtg8 の機能および *A. oryzae* におけるオートファジーの生理的意義を明らかにするために、*Aoatg8* 遺伝子破壊株を作製した。この破壊株を寒天培地上に生育させたところ、気中菌糸および分生子の形成に欠損が見られた。最小培地においては、野生株と比較して、若干の生育阻害が観察された。また、実際にオートファジーが欠損しているかどうかを検討するために、この破壊株の細胞質中に DsRed2 を発現する株を作製した。この株を窒素源枯渇培地に置換したところ、DsRed2 の液胞への取り込みは観察されなかった。このことから、*Aoatg8* 破壊株はオートファジーを欠損していることが分かった。これらの結果から、AoAtg8 はオートファジーに必須のタンパク質であり、オートファジーが気中菌糸形成および分生子形成に関与していることが示唆された。

EGFP-AoAtg8 の局在解析により、オートファジーが分生子発芽時にも誘導されていることが示唆された。そこで、分生子発芽時におけるオートファジーの関与を検討するため、*Aoatg8* 破壊株に *thiA* プロモーター制御下で AoAtg8 を発現させるプラスミドを導入し、*Aoatg8* 条件発現株を作製した。この条件発現株は、発現が誘導されるチアミン非存在下では表現型が回復し、気中菌糸および分生子形成が観察された。一方、発現が抑制される 100 nM 以上のチアミン存在下では破壊株と同様の表現型を示した。分生子を回収し、窒素源枯渇培地で分生子発芽を観察した結果、チアミン存在下において発芽が遅れが生じた。しかし、植菌から 16 時間以上経過すると野生株と変わらない発芽率を示すことから、オートファジーは少なくとも部分的に分生子発芽の初期の段階で機能していることが示唆された。

3. DNA マイクロアレイを用いた *Aoatg8* 破壊株の網羅的発現解析

Aoatg8 破壊株においてどのような遺伝子発現の変動があるかを DNA マイクロアレイにより検討した。*Aoatg8* 破壊株および野生株を、破壊株の表現型が最も顕著に現れる PD 寒天培地に植菌し、50 時間培養した菌体および PD 液体培地において 24 時間培養した菌体から回収した RNA を用いて DNA マイクロアレイ解析を行った。その結果、*A. oryzae* ゲノムデータベース上に存在する *S. cerevisiae* の 18 個の *ATG* 遺伝子と高い相同性を示す遺伝子の中で、PD 寒天培地上に生育した破壊株において発現量が減少したものは存在せず、特に *ATG1*,

ATG9, *ATG13* のホモログは 2.6~4.0 倍の上昇を示した。*Atg13* は Tor の制御を受け *Atg1* と複合体を形成しオートファジーを誘導する。従って、オートファジーの欠損によりシグナルがこの複合体で停止し、発現が上昇したものと考えられた。また、PD 寒天培地において顕著に発現が減少した遺伝子として分生子柄形成の中心的な制御因子である *brlA*、*hydrophobin* をコードする遺伝子 *hypA (rolA)*、*hypB* が検出された。これらは、気中菌糸および分生子形成の欠損という *Aoatg8* 破壊株の表現型に一致した。また、PD 寒天培地と PD 液体培地では破壊株において窒素源および炭素源利用に関する遺伝子の発現パターンが相反していた。以上の結果より、オートファジーを介した気中菌糸形成や分生子形成および栄養源獲得のための遺伝子発現変動の全体的な傾向が明らかとなったと考えている。

まとめ

本研究では、産業上重要な麹菌 *A. oryzae* におけるオートファジーの可視化および破壊株、条件発現株の観察により、*Aoatg8* の気中菌糸、分生子形成と分生子発芽への関与という新たな知見を得た。また、*Aoatg8* 破壊株の DNA マイクロアレイ解析により、オートファジー欠損による *ATG* 遺伝子群のマクロの視点での発現制御が示され、さらに気中菌糸形成に関する遺伝子群の発現制御の一端が明らかになった。*A. oryzae* は古来より日本の発酵産業に利用されてきたという事実とともに、有用タンパク質生産の宿主としての機能も期待されている。しかしながら、*A. oryzae* における生命現象の分子レベルでの解析は最近になって始まったばかりである。オートファジーは真核生物における生存に関して重要な機能を果たしており、*A. oryzae* はそのモデルとしての役割に留まらず、分子レベルでの解析は産業利用にも応用できるものと期待している。

- 1) Kikuma, T., Ohneda, M., Arioka, M., Kitamoto, K. (2006) Functional analysis of the *ATG8* homologue *Aoatg8* and role of autophagy in differentiation and germination in *Aspergillus oryzae*. *Eukaryot. Cell*, **5**, 1328-1336.
- 2) Kikuma, T., Arioka, M., Kitamoto, K. (2006) Autophagy during conidiation and conidial germination in filamentous fungi. *Autophagy*, **3**, in press.
- 3) Mabashi, Y., Kikuma, T., Maruyama, J., Arioka, M., Kitamoto, K. (2006) Development of a versatile expression plasmid construction system for *Aspergillus oryzae* and its application to visualization of mitochondria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**, 1882-1889.