

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 菊間隆志

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タンパク質分解機構として機能している。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。本研究は糸状菌 *A. oryzae* を用いて多細胞真核微生物のオートファジーに関して解析したものであり、序章に続く3章からなる。

第一章では、*A. oryzae* におけるオートファジーの可視化について述べている。*ATG8* の *A. oryzae* におけるホモログ遺伝子 (*Aoatg8*) をゲノムデータベースより検索し、クローニングした。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、発現株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 (preautophagosomal structure) 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想定された。これらの結果は、*A. oryzae* において *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したものである。次に、*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* 発現株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。

第二章では、*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、解析している。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。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シフトしたところ、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明らかになった。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のみ、野生株と同様に気中菌糸および分生子形成が観察された。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

に遅れが生じたことから、オートファジーは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。

第三章では、*Aoatg8* 破壊株においてどのような遺伝子発現変動があるかを調べるため、DNA マイクロアレイを用いた網羅的発現解析結果について述べている。*Aoatg8* 破壊株および野生株を、PD 寒天培地に植菌し、50 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、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* などが検出された。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。

以上、本研究は、産業上重要な麹菌 *A. oryzae* におけるオートファジーに関しての初めての研究であり、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。