

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 正井 久美子

麹菌 *Aspergillus oryzae* は日本の伝統的な発酵食品の製造に利用されている糸状菌であり、優れた酵素分泌能力から、異種タンパク質生産の宿主としての利用が期待されている。麹菌は多細胞からなり、その細胞部位により異なる機能を有すると想定されている。例えば、先端細胞は多種の加水分解酵素を分泌し、基質の中に成長する菌糸は栄養素などを他の部位に供給し、気中菌糸は分生子形成のため分生子柄をつくる。この様に現象としては理解されているが、詳細な機能解析は行われていない。本研究は、*A. oryzae* のコロニー菌糸体に観察される異なる3つの部位の違いを分子生物学的なアプローチを用いて解析を行ったものであり、5章からなる。

第一章では、*A. oryzae* の菌糸における分泌タンパク質の可視化と局在の解析を行っている。分泌タンパク質であるリボヌクレアーゼ T1 (RntA) と緑色蛍光タンパク質 EGFP の融合タンパク質 RntA-EGFP を発現し、細胞内での局在を観察した。菌糸先端の細胞では RntA-EGFP は均等に分布され、特に細胞の先端部に強度の蛍光が観察された。また、隔壁にも蛍光が認められた。さらに詳細な分泌タンパク質の細胞内での分布を調べるため、温度ストレスおよび分泌経路の阻害剤 (brefeldin A, cytochalasin A, nocodazole) 処理における RntA-EGFP の局在や構造体の変化を観察した。

第二章では、*A. oryzae* 菌糸体の新規培養方法 (square-plate culture method) について述べている。この方法は、四角い寒天培地の上にメンブレンをのせ、その一端に直線状に分生子を植菌し、菌糸の生長を一方向になるようにした培養方法である。このようにして、菌糸体には3つの形態的に異なる部位、すなわち、培地の表面に沿って生長している透明な菌糸先端部位 (tip region)、気中菌糸をつけた白色部位 (white region)、それに分生子柄が発達し着色された分生子が確認される部位 (basal region) が識別され、これらの部位はコロニーから容易に切り取られ、各部位からタンパク質やRNAなどを抽出できることを示した。

第三章では、*A. oryzae* の生育部位によるタンパク質の局在と遺伝子発現の解析を行っている。*A. oryzae* の菌糸体における α -アミラーゼの分泌を抗体を用いて解析したところ、tip region で顕著な分泌が認められた。核は tip region に一番多く存在し white region や basal region では数が劇的に減った。また tip region では粒状の液胞が観察されたのに対し white region や basal region では液胞がコンパートメント内の空間の大半を占めていた。これらの違いは各部位の機能に相違があることを示唆し、各部位の機能は遺伝子レベルで制御され、転写産物やタンパク質の種類が各部位の特徴に影響していることが考えられた。そこで、*A. oryzae* で機能が確定されている遺伝子の発現の変化を RT-PCR 法を用い解析を行った。分泌タンパク質をコードする α -アミラーゼやグルコアミラーゼの発現量は勾配型のパターンを示し tip region に一番多かった。また、分生子特異的に発現する hydrophobin 遺伝子 *rolA/hypA* は basal region にしか発現が認められなかった。

第四章、第五章では、cDNA マイクロアレイ NRIB3000 を用いた部位特異的遺伝子発現の解析を行い、見いだされた発現上昇遺伝子の機能解析を遺伝子破壊により調べている。各部位に多量に発現している遺伝子を Clusters of Orthologous Groups of Proteins (COG) による遺伝子機能分類を行い各部位の機能の特徴を見出した。その結果、tip region で多量に発現している遺伝子はタンパク質の合成に関する遺伝子の転写が上昇していることが示唆された。また、basal region で多量に発現している遺伝子の中にはトランスポーターなどをコードする遺伝子が数多く検出された。

以上、本研究は、麹菌 *A. oryzae* において新たな培養法を設定し、菌糸部位特異的な新規遺伝子のスクリーニングを行い、優れた分泌能力の基本となる因子や生理機構を解明することを目指したものであり、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。