

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 正路 淳也

液胞は植物や真核微生物の有する酸性コンパートメントであり、物質の分解と貯蔵、細胞質イオンの恒常性維持に重要とされている。真核微生物のモデルである出芽酵母では、液胞へのタンパク質輸送に欠損を持つ 50 以上の変異体の解析から、液胞への小胞輸送の詳細な機構が明らかにされてきた。一方ここ十数年の菌根菌における研究から、糸状菌における液胞の特徴的な側面が明らかになってきた。その一つは極めて動的なチューブ状液胞の存在であるが、その特異な形態と運動性から、チューブ状液胞は菌根菌において宿主植物と菌糸先端間での栄養輸送を行っている可能性が示唆されている。しかし菌根菌は分子生物学的な手法の適用が難しいことから、この仮説はその後検証されないまま今日に至っている。

本研究では、糸状菌 *Aspergillus oryzae* における *VAM3* 相同遺伝子 *Aovam3* を単離し、EGFP-AoVam3 融合タンパク質を用いることで液胞膜観察系の確立を行うとともに、*Aovam3* 条件発現株作製のためのプロモーター候補として *A. oryzae thiA* プロモーターの解析を行った。また、確立された液胞膜観察系を活用し、分生子発芽や気中菌糸といった発達段階における液胞形態の観察を行った。この過程で、基部の菌糸において細胞質成分の分解が起こっている可能性が示唆されたため、さらに基部菌糸におけるオルガネラの液胞による取り込みについても解析を行った。

第 1 章では *A. oryzae thiA* プロモーターによる発現の解析を行った。炭素源に依存しないプロモーターの候補として、*A. oryzae* において thiamine 生合成に関わる *thiA* のプロモーター (*PthiA*) に着目し、EGFP を用いたレポーターアッセイによりその発現を解析した。その結果、thiamine 濃度が 1 nM 以下の時には *PthiA* 下流の EGFP の発現がみられたが、100 nM 以上の thiamine 存在時に発現は基底レベルまで低下し、10 nM の thiamine を含む条件では中間程度の発現がみられた。このことから *PthiA* は遺伝子の条件発現に有効であることが分かった。

第 2 章では EGFP-AoVam3 融合タンパク質の局在解析を行った。EGFP-AoVam3 は主に液胞膜上に存在したが、液胞内腔を染色する CMAC を用いて染色すると、一部の EGFP 蛍光は CMAC によって染色されない粒状の構造体に観察された。これら粒状構造体は液胞近傍に存在し、後期エンドソーム構造であることが考えられた。そこで AoVam3p が実際に後期エンドソームにも局在するかを調べるため、出芽酵母 Vps23p の相同タンパク質を用いた後期エンドソームの可視化を行った。その結果、AoVps23-EGFP 融合タンパク質は

EGFP-AoVam3により可視化された後期エンドソーム様構造に類似したコンパートメントに局在した。

第3章では *A. oryzae* 液胞形態の解析をより詳細に行った。EGFP-AoVam3 は液胞の膜上に局在したが、2日ないし3日培養した菌糸体の基部の菌糸においては、EGFP 蛍光が発達した液胞の内腔に見られた。融合タンパク質においてEGFPは細胞質側に露出するように設計されているため、このようなEGFPのトポロジーの変化には液胞膜の内腔への陥入および出芽が必要である。また、ガラス表面に伸長した菌糸（ガラス表面菌糸）と気中菌糸という限られた栄養下におかれた菌糸の液胞観察を試みたところ、ガラス表面菌糸、気中菌糸ともに、液体培地中で培養した菌糸と比べチューブ状液胞が発達していることを見出した。特にガラス表面菌糸においてチューブ状液胞は、極めて密な網目状構造をとっていた。このことから、*A. oryzae*においてチューブ状液胞は限られた栄養しか得られない菌糸への栄養輸送に関わっている可能性が示唆された。

第4章では菌糸基部における細胞質成分、オルガネラの分解について検討した。EGFP融合タンパク質を用いて核、ペルオキシソーム、ミトコンドリアを可視化した株を観察したところ、1日培養の時点でEGFP 蛍光はそれぞれのオルガネラに局在していた。しかし2日培養後の基部菌糸においては、いずれの株においても液胞内腔にもEGFP 蛍光が見られた。さらにオートファジーに必須な *Aoatg8* を破壊した株において同様の実験を行ったところ、いずれのオルガネラマーカーも液胞内へ取り込まれなくなった。以上の結果から、*A. oryzae*の基部菌糸においてはペルオキシソーム、ミトコンドリア、核といったオルガネラのオートファジーによる取り込みが起こっていることが示唆された。

以上本研究では、EGFP-AoVam3を用いた液胞観察系を確立させ、液胞膜の簡便で高解像度の観察を行った。それにより、従来の方法では困難だった気中菌糸の観察が可能になるとともに、基部の菌糸における液胞膜の取込みといった新規の知見も得られ、糸状菌の液胞がこれまで考えられていたよりもさらに多様な構造であり、菌糸の部位に応じて特化した役割を担っている可能性も示唆された。このように本研究は液胞の糸状菌特異的な側面を明らかにしたものであり、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。