

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 樋口 裕次郎

真核生物は、オルガネラ間での物質輸送の手段として細胞内小胞輸送系を発達させている。その一過程であるエンドサイトーシスは真核生物において広く保存されており、シグナル伝達、細胞極性の再構築、外界からの栄養分取得等において重要な役割を有する。本研究は麹菌 *Aspergillus oryzae* におけるエンドサイトーシスの機構とその生理学的意義を明らかにすることを目的として行われたものであり、論文は序章、研究結果を記述した3つの章、および総括と展望からなる。

第一章では、*Aoend4* 条件発現株を用いた解析について述べている。*END4/SLA2* は *S. cerevisiae* において解析の進んでいるエンドサイトーシス関連遺伝子であるが、*Aoend4* はその *A. oryzae* におけるホモログである。*Aoend4* 条件発現株を作製し、その発現抑制条件下での観察を行ったところ、菌糸の生育が著しく阻害され、先端生長に異常を来していることが示唆された。また、この条件下では *AoUapC-EGFP* および *FM4-64* といったマーカーのエンドサイトーシスが起こっていないことを確認した。

次にエンドサイトーシスと先端生長との関わりをより詳細に解析した。分泌小胞に局在する SNARE である *AoSnc1* を用いて菌糸先端部におけるリサイクリングを可視化したところ、*EGFP-AoSnc1* が主に菌糸先端部に局在し、先端部をリサイクリングすることが示唆された。一方、*Aoend4* 発現抑制条件下では *EGFP-AoSnc1* は細胞膜全体に局在し、エンドサイトーシスによるリサイクリングに異常が起きていると考えられた。

Aoend4 の発現抑制条件下では、エンドサイトーシスによる取り込み不全が原因と考えられる細胞膜陥入構造が観察される。この陥入構造は細胞壁の染色試薬である *Calcofluor White* により染色されたこと、また電子顕微鏡による観察から、細胞壁成分が蓄積したものと考えられた。

第二章および第三章では、yeast two-hybrid (YTH) スクリーニングによるエンドサイトーシス関連因子の探索について述べている。SH3 (Src-homology 3) ドメインを C 末端に2つ有するという特徴的な構造を持つタンパク質である *AoAbp1* を bait としたスクリーニングを行ったところ、合計 2.2×10^6 のコロニーから最終的に4遺伝子を見出した。このうちの一つが AAA (ATPases associated with diverse cellular activities) ATPase をコードすると予想される

遺伝子であったことから、*aipA* (AoAbp1 interacting protein) と名付け、以降の解析を行った。*AipA* は 784 アミノ酸からなり、N 末端付近に coiled-coil 領域、C 末端付近に AAA ATPase ドメインを持つ。*S. cerevisiae* においては *AipA* のオルソログは *Sap1p* と *Yta6p* の 2 つが存在し、共に AAA ATPase と推定されているが、それらの生理的機能はわかっていない。*AipA* と *AoAbp1* の相互作用部位を特定するため、YTH による *AipA* の欠失解析を行った。その結果、*AipA* の coiled-coil ドメインおよび AAA ATPase ドメインは *AoAbp1* の SH3 ドメインと相互作用せず、両ドメインの間の領域が *AoAbp1* との相互作用部位であることがわかった。さらに、*AoAbp1* の 2 つの SH3 ドメインと GST との融合タンパク質を調製し、*A. oryzae* において 6×Myc-*AipA* を発現する株の細胞抽出液を用いて GST プルダウンアッセイを行い、これらが *in vitro* において結合することを確認した。次に EGFP-*AipA* および *AoAbp1*-mDsRed 発現株を作製して局在を観察した。その結果、両者が菌糸先端部においてよく共局在したことから、*AipA* がエンドサイトーシスにおいて機能している可能性が考えられた。

AipA の機能解析を行うため、*aipA* 破壊株の作製を行った。*aipA* 破壊株ではさまざまな培地条件においても顕著な生育阻害が見られず、*AipA* と機能の重複したタンパク質の存在が示唆された。一方、*aipA* 高発現株では生育の低下およびエンドサイトーシスの阻害が見られた。生育低下は ATPase ドメインに点変異を導入した変異 *aipA* の高発現では見られなかったことから、*AipA* が機能的であるためには *AipA* の AAA ATPase ドメインが正常に機能する必要があることが示唆された。

以上、本論文は *A. oryzae* を用いて糸状菌におけるエンドサイトーシスの分子機構とその生理学的意義を明らかにしたものであり、学術的・応用的に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。