

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 木村 信弥

麹菌 *d* 甲印肋間印脈は、高い分泌能を持つことから有用タンパク質生産の宿主として利用されている。しかし、異種タンパク質生産においては、宿主由来のプロテアーゼは生産したタンパク質を分解してしまうため問題となっている。一方、細胞内分泌経路においても、異種タンパク質分解の可能性が示されている。

本論文は、異種タンパク質生産量を改善するために、DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析を行い、プロテアーゼによる分解の問題の解決を試みるとともに、変異型 α -アミラーゼの細胞内局在を詳細に解析したものであり、3章からなる。

第1章では、*A. oryzae* における全遺伝子対応型の DNA マイクロアレイ解析により、生産した異種タンパク質分解に関与するプロテアーゼの絞り込みを行い、その効果を確認した。ゲノム情報から推定される 134 のプロテアーゼ遺伝子について、培養経過に伴う遺伝子発現解析を網羅的に行った。発現パターンのクラスタリングから培養後期に発現量が増加するプロテアーゼ遺伝子群が同定され、その中にはこれまでに異種タンパク質を分解するプロテアーゼとして報告されている *pepA*、*tppA*、*alpA* などの遺伝子の他に、それらとクラスタを形成する中性プロテアーゼ遺伝子 *nptB* を見いだした。そこで、*nptB* 遺伝子破壊株を作成しヒトリゾチームの生産を行ったところ、生産量の改善が認められた。さらに、*nptB* と培養後期で発現上昇が認められたプロテアーゼ遺伝子 *dppV* と *dppIV* を同時に破壊した株でウシキモシン生産を行ったところ、生産量が親株に比べて約 34% 増加した。

第2章では、*A. oryzae* の小胞体 (ER) と変異型分泌タンパク質の局在解析を行った。まず、*A. oryzae* のカルネキシン遺伝子 *AoclxA* の遺伝子座に EGFP を挿入し、*AoClxA*-EGFP として発現することで ER の可視化を行ったところ、菌糸の先端側に多く局在する様子が観察された。また、分泌経路の開始点と考えられる ER のサブドメイン transitionalER (tER) について、COPII 被覆小胞構成因子をコードする遺伝子 *Aosec13* に EGFP を融合させて、その遺伝子座で *AoSec13*-EGFP として発現したところ、ER と同様に極性のある分布が観察された。ER と tER を同時に可視化してそれらの挙動を調べた結果、tER は ER とは異なる運動性を持つ特徴的なサブドメインであることが示唆された。

次に、*A. oryzae* の代表的な分泌タンパク質である α -アミラーゼ *AmyB* の局在について調べたところ、菌糸最先端において *Spitzenkorper* 様の構造体が見られ、ER および tER は、それに続くように先端側に極性をもって局在した。また、ゴルジ体は、菌糸の先端側に多く存在し、極性を持つ tER と近接して観察された。以上のことから、分泌に関与するオルガネラは、菌糸先端付近に配置されていることがわかった。

続いて、*AmyB* のジスルフィド結合欠損型の変異体を作製し、その細胞内局在を ER

および tER の局在とともに調べた。変異型 AmyB は効率的に Unfolded Protein Response (UPR) を誘導しており、強力な ER ストレス誘導タンパク質であることが示唆された。変異型 AmyB を発現すると、ER の極性は失われ、基部側にも発達して変異型 AmyB を多く蓄積し、基部側から先端側にかけて変異型 AmyB の勾配を形成していた。しかし、tER の極性は変異型 AmyB を発現しても維持されていた。そして、tER と変異型 AmyB は、それぞれ逆方向の勾配を形成していた。これらの結果から、菌糸の先端側の ER では分泌が積極的に行われているのに対して、基部側の ER では異常なタンパク質を蓄積する可能性が考えられた。

第 3 章では、*A. oryzae* の変異型分泌タンパク質分解機構の解析を行った。菌糸基部側に蓄積した変異型 AmyB は、48 時間培養後においては、ER とともに液胞に取り込まれることが観察されたが、これは、培養フェーズ依存的なオートファジーによる ER の液胞への取込みが起こることを示唆している。そこで、オートファジー欠損株 (Δ Aoatg8) を用いて変異型 AmyB の液胞への取込みを観察した結果、 Δ Aoatg8 株においては変異型 AmyB および ER の液胞への取込みが起こらなかった。以上のことから、蓄積したミスフォールドタンパク質が、長時間培養で誘導されるオートファジーにより分解除去されることを糸状菌で初めて示した。

以上、本論文は、糸状菌における異種タンパク質生産についての分子細胞生物学的解析を行ったものであり、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。