

論文題目

麹菌 *Aspergillus oryzae* の液胞機能に関する研究

東京大学大学院農学生命科学研究科

応用生命工学専攻

平成 16 年度 博士課程入学

氏名 正路 淳也

指導教員 北本 勝ひこ

目次	1
序論	3
<u>第一章 制御された遺伝子発現への <i>A. oryzae thiA</i> プロモーターの適用</u>	9
背景	9
第一節 <i>A. oryzae thiA</i> プロモーターの発現解析	10
第二節 <i>A. oryzae thiA</i> プロモーターの <i>A. nidulans</i> への適用	12
考察	12
<u>第二章 <i>A. oryzae</i> における液胞膜の可視化</u>	20
背景	20
第一節 <i>A. oryzae Aovam3</i> の機能解析	21
第二節 EGFP と AoVam3p の融合タンパク質を用いた液胞膜の可視化	22
第三節 AoVps23p と EGFP の融合タンパク質を用いた late endosome/prevacuolar compartment の可視化	23
考察	25
<u>第三章 EGFP-AoVam3p を用いた液胞膜動態の解析</u>	34
背景	34
第一節 共焦点顕微鏡を用いた液胞膜動態の解析	34
第二節 EGFP と AoVam3p の融合タンパク質を用いた 様々な発達段階における液胞形態の観察	35
考察	37
<u>第四章 基部菌糸の液胞による細胞質オルガネラの取り込み</u>	48
背景	48
第一節 基部菌糸の液胞によるオルガネラの取り込みの解析	48
考察	49
総合討論	54
実験材料と方法	57
参考文献	69
補遺	80
第一節 <i>Aovam3</i> 条件発現株の形質	80
第二節 液胞形態に関わる環境、分子的要因の探索	81
要旨	95

發表論文一覽

99

謝辭

100

## 序論

最近の生命科学研究の進展は目覚ましく、特に出芽酵母などをモデルとして普遍的な細胞の生物学が分子レベルで理解されつつある。しかし出芽酵母は基本的に単細胞であるため、細胞間で起こる現象などはより高等な生物の理解に適用しにくい。糸状菌(filamentous fungi)はモデル生物出芽酵母よりやや複雑であることから、多細胞生物の一つのモデルとして位置づけられる。

糸状菌は筒状の細胞が縦に連なった菌糸(hypha)構造からなり、菌糸の分岐や融合によるネットワークの形成によって菌糸体(mycelium)を形成する。さらに糸状菌は有性孢子または無性孢子を形成し、これによって空間的な拡散を行うと考えられている。*Aspergillus oryzae* は有性生活環を持たず、不完全菌類に分類される糸状菌の一つである。*A. oryzae* の生育は、無性孢子である分生子(conidium)の全方向への(極性のない)伸長、すなわち分生子の膨潤(swelling)によって始まる。膨潤した分生子はやがて極性の軸を決定し、一方向に発芽管(germ tube)と呼ばれる一種の菌糸を発芽(germination)することで極性生長を開始する。菌糸はさらに極性生長を続け、その過程で分岐することによって新たな生長先端を作り出していく。ある程度伸長した菌糸は隔壁(septum)と呼ばれる構造を形成し、生長先端とより基部の菌糸を仕切る。これによって細胞が分割され、糸状菌の多細胞性が獲得される。ただしこの隔壁には隔壁孔(septal pore)と呼ばれる連絡通路が存在するため、隣接する菌糸は完全に隔てられているわけではない。実際にこの隔壁孔を通して、細胞質成分やオルガネラが移動できると考えられている。また後述するチューブ状の液胞(tubular vacuole)も、菌根菌 *Pisolithus tinctorius* において隔壁孔を貫通して隣接する細胞同士を連絡することがわかっている(Ashford, 1998)。このように *A. oryzae* を含む糸状菌の菌糸は分岐、隔壁形成などを続けながら基質内および表面を伸長するが、何らかのシグナルによって基質とほぼ垂直な方向、すなわち空気中へ菌糸を伸長し始める。これは気中菌糸(aerial hypha)と呼ばれる。糸状菌のモデルの一つである *Aspergillus nidulans* などにおいて気中菌糸はそれほど長く伸長しないが、*A. oryzae* や *Neurospora crassa* は容易に観察できる長さまで気中菌糸を伸長する。気中菌糸を形成することの生理的意義は完全には理解されていないが、一つの理由はその先に分生子を形成することである。気中菌糸の分化によって分生子柄、分生子頭などといった構造が形成され、そこに多数の分生子が形成される。分生子は成熟すると

風や水に運ばれて新たな環境へ移行し、そこで再び生活環を繰り返すと考えられる。このように糸状菌は、細胞の分化などの出芽酵母ではあまりみられない特徴を備えている。また分生子発芽後は常に顕著な極性生長を行うことから、細胞極性という点でも興味深い。さらに生長先端と菌糸基部など、同じ菌糸体内でも部位によって細胞活動が異なることもわかってきている(Masai et al., 2006)。また細胞外に多量の加水分解酵素を分泌することから、異種タンパク質生産のホストとしての研究も行われている(Gouka et al., 1997; van den Hombergh et al., 1997; Punt et al., 2002)。このように出芽酵母にはみられない興味深い特徴を備えているものの、実際にはそういった糸状菌特有の現象はあまり解明されていない。というよりむしろ、出芽酵母の知見をもとに同様の現象を示すことは必ずしも難しくないが、実験系もさほど整備されていないため糸状菌独特の現象の解明はより難易度が高く、解析が遅れているというのが実状である。

このような糸状菌の特徴的な側面の一つに、液胞構造がある。液胞と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、ほぼ動物細胞のリソソームに相当するといわれている(Klionsky et al., 1990)。液胞は細胞質イオンの恒常性維持や物質の分解を行うが、リソソームと異なり物質の貯蔵にも重要であることが示唆されている。このような液胞機能の中で、近年オートファジー(autophagy)という分解機構が注目を集めている(Klionsky and Ohsumi, 1999)。分泌経路や細胞外の物質を液胞で分解することは比較的容易であるが、細胞質の物質を液胞で分解することはトポロジーの変化を伴うため、より複雑である。オートファジーとはこの様に細胞質やそこにあるオルガネラを液胞内へ取り込み、分解する機構をいう(Klionsky and Ohsumi, 1999)。酵母においてオートファジーは窒素源飢餓時の栄養リサイクルや(Klionsky and Ohsumi, 1999)、炭素源の変化により不要になったペルオキシソームの分解(Monastryska et al., 2004; Farré and Subramani, 2004)などに関与している。また最近、オートファジーの細胞分化への関与も明らかになりつつある(Schadeck et al., 1998; Weber et al., 2001; Schadeck et al., 2003; Kikuma et al., 2006; Veneault-Fourrey et al., 2006)。オートファジーは形態的にマイクロオートファジーとマクロオートファジーに分けられる。マイクロオートファジーとはオルガネラなどが液胞と隣接し、液胞膜の内腔への出芽と取り込みに伴って液胞内に入り分解される機構である。マクロオートファジーは preautophagosomal structure (PAS) と呼ばれる二重膜構造に細胞質成分やオルガネラが取り込まれ、PAS の外膜が液胞膜と融合することによって内膜

とそれに包まれた細胞質成分が液胞内へ取り込まれる機構をいう。このうち特にマクロオートファジーは出芽酵母においてよく研究されており、Atg8p というタンパク質が、PAS 形成に関わることでオートファジーに必須な役割を持つこともわかっている(Kirisako et al., 1999; Ichimura et al., 2000)。これに対しメタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* や *Hansenula polymorpha* においては、環境変化に起因するペルオキシソームの分解がマイクロオートファジー、マクロオートファジーの両者によるものであることがわかっている(Monastryska et al., 2004; Farré and Subramani, 2004)。また Atg8p の相同タンパク質がマイクロ、マクロオートファジーの両方に働いていることも明らかになりつつある(Farré and Subramani, 2004)。

出芽酵母においてはオートファジーのみならず、液胞形成の機構もよく研究されている(Klionsky et al., 1990)。1980 年代後半にとられた、液胞への加水分解酵素の輸送に欠損を持つ変異株(Bankaitis et al., 1986; Robinson et al., 1988; Rothman et al., 1986; Rothman et al., 1989; Wada et al., 1992)の解析から、液胞への小胞輸送の詳細が明らかになっている。ゴルジ体から出芽した輸送小胞は直接(ALP 経路; Piper et al., 1997)、または late endosome を経て(CPY 経路)液胞へ輸送される(Becherer et al., 1996)。Late endosome というのは通常 prevacuolar compartment および multivesicular body と同一視されており、エンドサイトーシス経路とゴルジ体からの輸送経路が交わる場所であると考えられている(e.g., Bowers and Stevens, 2005)。本論文では late endosome/prevacuolar compartment と表記する。Late endosome/prevacuolar compartment は蛍光顕微鏡レベルで FM4-64 によって染色される液胞近傍の粒状構造として捉えられ(Vida and Emr, 1995)、電子顕微鏡レベルでは無数の小胞を中に含むオルガネラとして観察される(Prescianotto-Baschong et al., 2002)。Late endosome/prevacuolar compartment は一般に液胞膜、液胞内腔、ゴルジ体などへ向かうタンパク質の仕分けを行う場所として考えられている(Bowers and Stevens, 2005)。液胞の加水分解酵素や液胞で分解されるべき細胞膜タンパク質などはユビキチン化され、endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) complex にこのユビキチンが認識されることで late endosome/prevacuolar compartment の内腔へと出芽する小胞中に集められる(Babst et al., 1998; Katzmann et al., 2001; Babst et al., 2002a, b)。この小胞はくびれきれることで内腔にとどまり、multivesicular body としての形態が獲得される。その後内腔の小胞を含む小胞または late endosome/prevacuolar compartment

自身が液胞と融合することで、内腔の小胞は液胞内に移行し分解されると考えられている。

ゴルジ体から液胞への輸送の大半は小胞輸送によって行われる。この小胞輸送の特異性の少なくとも一部は、soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF) attachment protein receptors (SNAREs)と呼ばれる一群のタンパク質によって担われている(Rothman and Warren, 1994)。SNAREは通常カルボキシ末端に膜貫通領域を持つ膜タンパク質で、膜貫通領域に隣接した細胞質領域にSNARE motifと呼ばれる $\alpha$ -helix構造を持つ。輸送小胞上のvesicle (v)-SNAREとオルガネラ膜上の三つのtarget organelle (t)-SNAREがSNARE motifを介した特異的な結合を行うことにより、輸送小胞は目的のオルガネラと特異的に融合する(Rothman and Warren, 1994)。ゴルジ体から液胞への小胞輸送においてはlate endosome/prevacuolar compartment上のPep12p(Becherer et al., 1996)と液胞膜上のVam3p(Wada et al., 1997)という2つのsyntaxin様t-SNAREが働いている。特に後者のVam3pは、液胞への小胞輸送だけでなく、液胞同士の同形融合(Wada et al., 1997; Srivastava and Jones, 1998)、PASの液胞への融合(Darsow et al., 1997)にも関与することから、液胞機能において中心的な働きをしているといえる。さらにVam3pおよびその相同タンパク質は液胞膜にのみ局在することから、液胞のマーカータンパク質としても用いられている(Kutsuna and Hasezawa, 2002; Uemura et al., 2002; Wang et al., 2002)。

以上が出芽酵母を中心とした液胞研究の現状である。しかし前述の様に、糸状菌の液胞には特徴的な側面が存在する。通常出芽酵母において液胞は大きな球状の構造をとる。これに対して糸状菌の一種である菌根菌では、チューブ状の液胞構造が存在することが最近15年ほどの間に明らかになってきた(Shepherd et al., 1993a, b; Cole et al., 1997; Cole et al., 1998; Ashford, 1998; Uetake et al., 2002)。チューブ状液胞は近年、細胞分裂時の出芽酵母(Weisman, 2003)や植物の花粉管(Hicks et al., 2004)などにおいても見いだされているが、チューブ状液胞が恒常的に存在するのは糸状菌だけである。菌根菌*Pisolithus tinctorius*においてチューブ状の液胞は蠕動状の運動を行い(Shepherd et al., 1992a)、窒素やリンを多く含むことがわかっている(Cole et al., 1998; Ashford, 1998)。菌根菌は植物と共生する糸状菌であり、菌糸先端で取り込んだ窒素やリンを菌糸基部から植物体に渡し、見返りに植物体から糖を受け取って代謝が盛んな菌糸先端に輸送していると考えられている。このような菌糸体内における二方向への物質輸送の必要

性から、チューブ状の液胞がこの輸送に関わっていることが示唆されている (Ashford, 1998)。また、より最近の研究では、液胞内の拡散定数は細胞質と比べて高く、菌糸の先端生長を十分にサポートできる早さで物質が拡散し得ることが示されている (Darrah et al., 2006)。しかし分子生物学的手法の適用が難しいことから、菌根菌のチューブ状液胞が実際に細胞内、細胞間の栄養輸送に関わっているか、直接的な証拠は得られていない。また *A. oryzae* など菌根菌以外の糸状菌においてもチューブ状液胞の存在が見いだされたが (Ohneda et al., 2002)、菌根菌のように二方向への物質輸送の必要性がないこれらの糸状菌になぜチューブ状液胞が存在するのか、明確な答えは得られていない。

このように糸状菌液胞の特徴的な側面が知られているものの、その後の解析は遅れていた。他方で当研究室では主に *A. nidulans* を用い、逆遺伝学的アプローチから液胞形成機構の解析を行っていた (Tarutani et al., 2001; Ohsumi et al., 2002; Oka et al., 2004)。しかし *A. oryzae* や *A. nidulans* においてはチューブ状の液胞は存在するものの頻度は高くなく、容易に観察できなかった。また菌根菌よりも分子生物学的手法が適用しやすいとはいえ、当時は破壊株の作製や出芽酵母を用いた相補性試験、一部の試薬による細胞染色などできることは限られており、世界的にみても現在ほど観察方法や細胞染色の選択肢はなかった。このような理由から逆遺伝学的手法による解析を行っても、面白い現象を見つけられるほど様々な実験を行えず、出芽酵母で知られている現象の確認以上の成果は難しかった。つまり一方で菌根菌におけるチューブ状液胞という興味深い現象があり、分子レベルでの解析が待たれていたが、分子生物学的アプローチをする側としてもその興味深い現象に到達し、それを解析するためのツールを持っていなかったということである。従って糸状菌の液胞研究においては、観察方法など実験手法の確立が急務であった。

このような背景から筆者はまず、液胞を自由かつ簡便に観察できる実験系の構築を試みた。この標的としては出芽酵母 Vam3p の *A. oryzae* における相同タンパク質 AoVam3p を選んだ。Vam3p 相同タンパク質は出芽酵母や植物において液胞膜の可視化に利用されているという実績があり、液胞膜の高解像度で簡便な観察を実現してくれる可能性が高かったためである。

また当時 *A. oryzae* においては遺伝子の条件発現が可能なプロモーターはほとんど存在せず、必須遺伝子の条件発現株を作製して解析を行うことができなかった。筆者は *Aovam3* の破壊株を取得できなかったことから *Aovam3* の条

件発現株の作製を計画し、そのためのプロモーター候補として *A. oryzae thiA* プロモーターの発現解析も行った。

なお、際立った進展がえられなかった結果と一部の確認実験に関しては、巻末に補遺としてまとめた。

## 第一章 制御された遺伝子発現への *A. oryzae thiA* プロモーターの適用

### 背景

最近 *A. nidulans*、*A. oryzae* を含む多くの糸状菌の全ゲノム配列が明らかにされ(Machida et al., 2005)、逆遺伝学的なアプローチによるポストゲノム研究の加速が期待されている。このような遺伝子機能の解析ツールとして、発現制御可能なプロモーターの存在は極めて重要である。例えば siRNA やアンチセンス RNA を用いた遺伝子発現の抑制や様々な融合タンパク質の発現において、特定の生育段階で発現を制御できる利点は大きい。また基底レベルの発現量が十分低ければ、必須遺伝子の条件発現に用いることで遺伝子欠損の影響を観察することも可能である。

このような発現制御可能なプロモーターとして、*A. oryzae* においては *amyB* プロモーターが(Tada et al., 1991)、*A. nidulans* においては *alcA* プロモーターが(Felenbok et al., 2001)広く用いられてきた。特に *A. nidulans* の *alcA* プロモーターは基底レベルの発現が極めて低いことから、必須遺伝子の条件発現株作製にも用いられている(e.g., 飯島, 2002、浅野, 2004)。しかしこの二つのプロモーターは共通の大きな欠点を持っている。*amyB* は  $\alpha$ -amylase (Tada et al., 1991)、*alcA* は alcohol dehydrogenase (Felenbok et al., 2001)といずれも炭素源代謝に関わる酵素をコードしているため、これらの遺伝子発現の制御には培地中の炭素源を変える必要があることである。炭素は重要な栄養源であることから、培地中の炭素源の変化は糸状菌の生育、形態に大きな変化をもたらす。例えば *A. nidulans* は炭素源がエタノールである場合、炭素源がグルコースである時と比較して気中菌糸を多く形成する(Som et al., 1994)。このため *amyB* または *alcA* プロモーター制御下で遺伝子発現を行い発現量の変化に起因する形態変化を観察する場合、現れた形態が遺伝子発現の違いによるものか炭素源の違いによるものか判別しにくい場合がある。このため逆遺伝学的手法のツールとしてのプロモーターには、炭素源に依存せず発現制御可能なものが望ましい。

筆者は液胞膜上の推定 t-SNARE をコードする *Aovam3* の条件発現株作製のため、炭素源によらず制御可能なプロモーターの探索を行った。その結果、thiamine 生合成に関与するタンパク質をコードする *A. oryzae thiA* のプロモーターを候補として見いだした。これは *A. oryzae thiA* が thiamine 存在下においてノザン解析で検出されない程度まで転写量が低下すること(Kubodera et al., 2000)、

また *Schizosaccharomyces pombe* において thiamine 合成系の酵素をコードする *nmt1* のプロモーターが遺伝子の条件発現に用いられ、成功を収めていたこと (Maundrell, 1993) による。本章では遺伝子の発現制御を行うためのツールとして *A. oryzae thiA* プロモーターが適用可能か否かを検証するために行った、*thiA* プロモーター制御下の遺伝子の発現解析について記述する。

### 第一節 *A. oryzae thiA* プロモーターの発現解析

糸状菌のプロモーターにおけるシスエレメントとして、開始コドンから最長で 1 kb 弱上流に存在するものが知られていた (Punt et al., 1995)。本研究では厳密に制御可能なプロモーターが望ましかったことから、*thiA* 遺伝子の開始コドンから 1.3 kb 上流までの領域を *thiA* プロモーター (*PthiA*) と定義し、polymerase chain reaction (PCR) によるクローニングを行った。その後 *PthiA* の下流に *egfp* 遺伝子を持ち、*niaD* 選択マーカーを含むプラスミド (pBNT-GFP, Fig. S-1) を作製し、*A. oryzae niaD300* 株を形質転換することで TPG 株を得た。また当研究室の正井によって作製された、*amyB* プロモーター下に *egfp* を持ち、*niaD* 選択マーカーを含むプラスミドで *A. oryzae niaD300* 株を形質転換することで得られた NaE 株を対照として用いた。TPG1, 4 株および NaE1, 2 株のサザン解析を行うことで、いずれの株も *niaD* 遺伝子座において組み換えられたプラスミドを 1 コピー有することを確認した (Fig. S-2)。また TPG1 株が親株である *niaD300* 株と比較して同等の生育と形態を示すことを確認した (Fig. 1-1)。

TPG1 株および *niaD300* 株のいずれの株も、培地中の thiamine の有無にかかわらず同等の生育と形態を示した (Fig. 1-1)。このことから thiamine は *A. oryzae* の生育に大きな影響を与えないことが示唆された。CD 培地で培養時、TPG 株において細胞質に強い enhanced green fluorescent protein (EGFP) 蛍光が観察された (Fig. 1-2)。これに対して 0.3  $\mu\text{M}$  または 10  $\mu\text{M}$  の thiamine を添加した CD 培地で培養した場合、TPG 株において EGFP 蛍光は観察されなかった (Fig. 1-2)。これにより *PthiA* の制御下に置かれた EGFP の発現が培地中の thiamine の有無によって制御できること、さらに 0.3  $\mu\text{M}$  以上の thiamine 存在下では発現がほぼ基底レベルまで低下することが明らかになった。これと一致してノザン解析でも、10  $\mu\text{M}$  thiamine 存在下で *egfp* mRNA 量の低下が観察された (data not shown)。以上の結果から、*PthiA* の支配下で遺伝子発現を行うことで、*A. oryzae* の生育に大きな影響を与えることなく thiamine により遺伝子発現をオン、オフできることが

示唆された。

*PthiA* 下流の遺伝子の発現と培地中の thiamine 濃度の関係をより詳しく調べるため、様々な濃度の thiamine を含む CD 培地において TPG 株を生育させ菌糸体の蛍光を測定した。その結果、培地中の thiamine 濃度が 1 nM 以下の場合高い EGFP 蛍光が観察され、100 nM 以上の時 EGFP 蛍光はバックグラウンドレベルまで低下した。また培地中の thiamine 濃度が 10 nM の時、EGFP 蛍光の強度は両者の中間程度だった(Fig. 1-3)。このことから、*PthiA* 下流の遺伝子の発現強度は培地中の thiamine 濃度を加減することによって調節可能であることが示唆された。

*PthiA* 下流の遺伝子の発現についてさらに調べるため、定量的 reverse transcription (RT)-PCR により *egfp* レポーターの mRNA 量の定量を行った。*thiA* は転写後も発現制御が行われていることが知られていた(Kubodera et al., 2003)。この時 5'-untranslated region (UTR)に存在する二つの intron が thiamine 非存在下では切り出され、*thiA* の翻訳が行われる。Thiamine 存在下ではこのスプライシングが起こらず、翻訳は抑制される(Kubodera et al., 2003)。このため RT-PCR を行うにあたって、スプライシングされた転写産物とスプライシングされていないものを分けて検出できるようにプライマーを作製した(それぞれ Fig. 1-4A の a, c と b, c)。また全 *egfp* mRNA を検出するためのプライマーも作製した(Fig. 1-4A, d, e)。比較対照として *amyB* プロモーター下で EGFP を発現する NaE 株を用いた。*amyB* プロモーター下の遺伝子の発現はグリセロールで抑制され、デキストリンで誘導される。またグルコース存在下では中間程度の発現がみられることが知られている(Tada et al., 1991)。これと一致して、NaE 株における *egfp* mRNA 量は炭素源をグリセロールとした時に低く、デキストリンとした時に高く、グルコースの場合は中間であった(Fig. 1-4B, lane 10-12)。TPG 株において全 *egfp* mRNA 量は培地中の thiamine 濃度の上昇に伴って減少する傾向があったが(Fig. 1-4B, lane 7-9)、有意な差は得られなかった。翻訳されうるスプライシングされた *egfp* mRNA の量は thiamine を含まない時に高く、10  $\mu$ M の thiamine を含む時には基底レベルにとどまった(Fig. 1-4B, lane 1, 3)。これに対し 10 nM の thiamine を含む時、スプライシングされた mRNA の量は両者の間の値をとる傾向にあった(Fig. 1-4B, lane 2)。この結果は *PthiA* 下流の遺伝子の発現が 10 nM thiamine 存在下で中間程度になることを支持している。また遺伝子発現の制御に転写後調節が大きく寄与していることが明らかになった。

## 第二節 *A. oryzae thiA* プロモーターの *A. nidulans* への適用

背景の項でも述べた様に、*A. nidulans* の *alcA* プロモーターは *A. oryzae amyB* プロモーターと同様の欠点を持つ。*A. nidulans* は糸状菌のモデル生物の一つであり、全ゲノム配列も決定されている(Galagan et al., 2005)ことから、*A. oryzae PthiA* を *A. nidulans* でも使用できれば糸状菌の分子生物学の進展により大きな貢献となるはずである。このような理由から筆者は *A. oryzae PthiA* が *A. nidulans* でも発現制御可能か否か検証を行った。*A. oryzae PthiA* の下流に *egfp* を持ち、*A. nidulans argB* マーカーを有するプラスミド pBATG を作製し、これを用いて *A. nidulans* A89 株を形質転換した。得られた ATG 株において、thiamine 非存在下では細胞質中に EGFP 蛍光が観察された。これに対し 10  $\mu$ M thiamine を培地中に添加した場合、ATG 株において EGFP 蛍光は観察されなくなった(Fig. 1-5)。この結果から、*A. nidulans* においても *A. oryzae PthiA* が機能し、thiamine 依存的に発現制御が行えることが示唆された。

## 考察

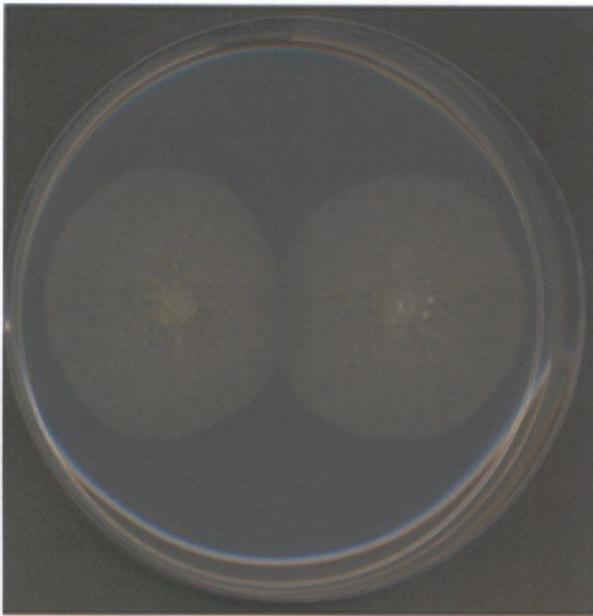
全ゲノム配列が決定された生物においては遺伝子のクローニングが簡便に行えることから、逆遺伝学的手法による研究は極めて有効である。特に発現制御可能なプロモーターは研究の方向性の選択肢を増やすという点で重要なツールとなりうる。筆者は炭素源に依存せず発現制御可能なプロモーターとして *A. oryzae PthiA* に着目した。*PthiA* 下流の遺伝子の発現は thiamine 非存在下で誘導され、thiamine 存在下で基底レベルまで低下した。このことから *PthiA* は遺伝子の条件発現にも適用可能であることが期待できる。実際に当研究室で *Aovam3* (Shoji et al., 2006a)、*Aoatg8* (Kikuma et al., 2006)、*Aovps24* (辰巳, 2007)、*Aoend4* (樋口, 2007)などいくつかの遺伝子の条件発現株が *PthiA* を用いて作製されている。これらによって得られた結果を総合すると、抑制条件下において *PthiA* 下流の遺伝子の発現は厳密にゼロとはならないものの、極めて低いレベルに抑えることができるようである(e.g., Kikuma et al., 2006)。このことから *A. oryzae* において、条件発現株のためのプロモーターとして *PthiA* は最も有効な、あるいは唯一の選択肢となっている。また thiamine の添加は *A. oryzae* の形態、生育に大きな影響を与えることがないため、条件発現株において thiamine の有無による形態の変化はほぼ例外なく *PthiA* 制御下の遺伝子発現の差異によるものと考えられる。さらに *PthiA* 下流の遺伝子の発現強度は培地中の thiamine 濃度によつ

て調節可能であることから、例えば高発現が生育に悪影響を与える様な遺伝子の発現にも適している。

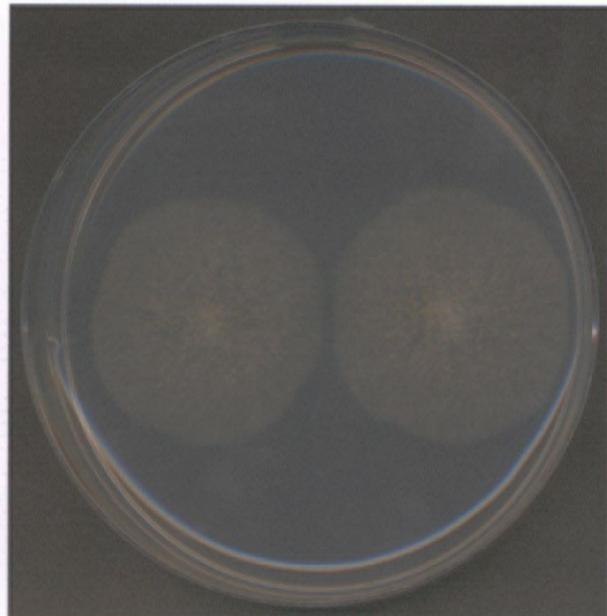
しかし例えば *amyB* プロモーターと比較した場合の欠点もいくつか存在する。一つは塩基性 pH において *PthiA* の制御が効かなくなる点である。pH を 8 に合わせた培地で培養した場合、TPG 株において thiamine の有無に関わらず細胞質中に EGFP 蛍光が観察された(data not shown)。Thiamine は弱塩基であるため、塩基性 pH 下で電荷を失うことで transporter による細胞内への取り込みが起らなくなるのかもしれない。あるいは thiamine は塩基性 pH において不安定なので、容易に分解を受けて減少するのかもしれない。さらに富栄養な液体培地で培養したとき、*A. oryzae* は密度の高い直径 5 mm 程度の球状菌糸体を形成するが、thiamine 存在下でもこの菌糸体の中心付近では EGFP 蛍光が観察された(data not shown)。おそらく栄養を取り合うことにより部分的に thiamine が枯渇し、菌糸密度が高いため拡散による thiamine の供給も追いつかなくなるのだろう。また RT-PCR の結果からもみられる様に *PthiA* からの発現はグルコース存在下の *amyB* プロモーターからの発現と同程度である。従って遺伝子の高発現を行う場合には *PthiA* よりも *amyB* プロモーターの方が適している。さらに完全培地として用いられる DPY 培地等には通常 yeast extract を添加するが、yeast extract 中には thiamine が相当量含まれている(The Difco Manual; 通常のプロトコルで作製した DPY 中に約 6  $\mu$ M)。このため *PthiA* を用いて遺伝子発現をする時は、富栄養の培地は用いにくい。

以上のような理由から、*PthiA* は *amyB* プロモーターにかわるプロモーターというより、研究ツールとしての新しい選択肢と捉えるべきであろう。しかし、これは必ずしも期待しただけのツールとなり得なかったという意味ではない。研究を行う際には一つの結果から何かを示すのではなく、複数の実験から新たな知見が示唆されるものである。従って一つ選択肢が増えるということは、実験の組み合わせの数としては多数の選択肢が増えたことになる。実際に *PthiA* は条件発現株作製のプロモーターとしての実績が積み重ねられつつあり、条件発現株の形質と局在解析などを組み合わせることで *A. oryzae* における遺伝子解析の進展に貢献している。また *A. nidulans* などの他の糸状菌にも適用可能なことも大きな強みである。*PthiA* からの発現制御は転写制御よりも転写後制御が大きく寄与しているようである。この転写後制御は、mRNA の 5' UTR と thiamine または thiamine pyrophosphate との直接的な結合により行われるものと

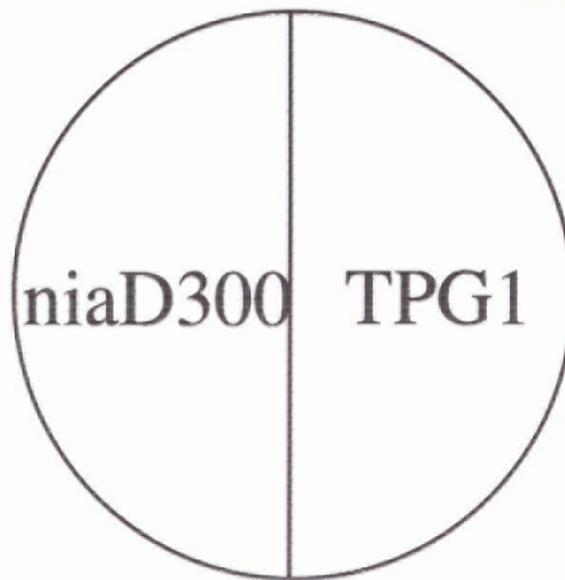
考えられている(Miranda-Rios et al., 2001; Winkler et al., 2002; Sudarsan et al., 2003; Kubodera et al., 2003)。つまり転写後制御が mRNA の 5' UTR という *PthiA* に含まれている配列と thiamine 誘導体にのみ依存し、生物間で異なるタンパク質を介さないことから、*A. oryzae* でみられた発現制御が、*A. nidulans* においても同等の厳密さで再現できるのであろう。以上のような理由から *PthiA* の開発によって、*A. oryzae* のみならず糸状菌全般の研究に対し意義のある貢献ができたのではないかと考えている。



-thiamine

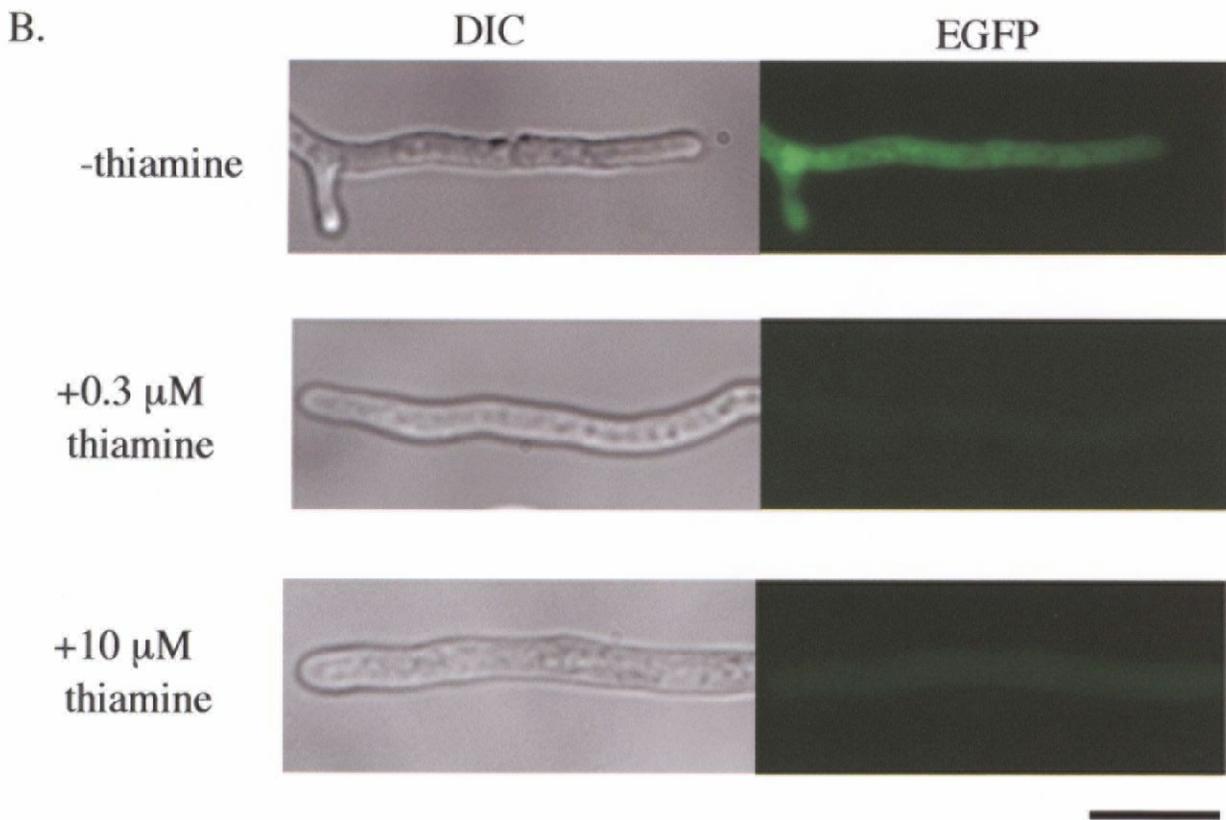


+thiamine



**Fig. 1-1. Phenotypes of niaD300 and TPG1 strains in the presence or absence of thiamine**

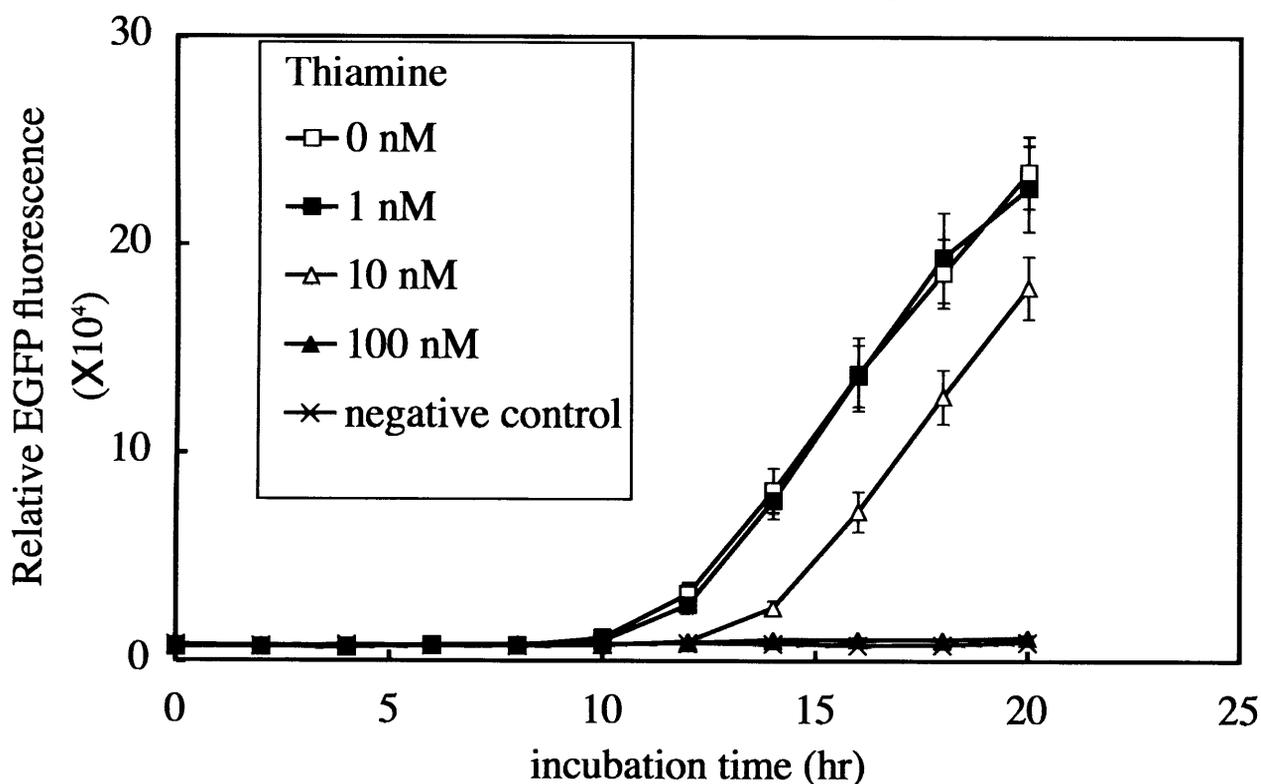
To check the phenotypes of TPG, the strain expressing *egfp* under the control of the cloned *PthiA*, niaD300 (control) and TPG1 were inoculated on M agar plate and grown at 30 °C for 5 days. Left panel: M medium; Right panel: M medium containing 10  $\mu$ M thiamine.



**Fig. 1-2. EGFP expression under the control of *PthiA***

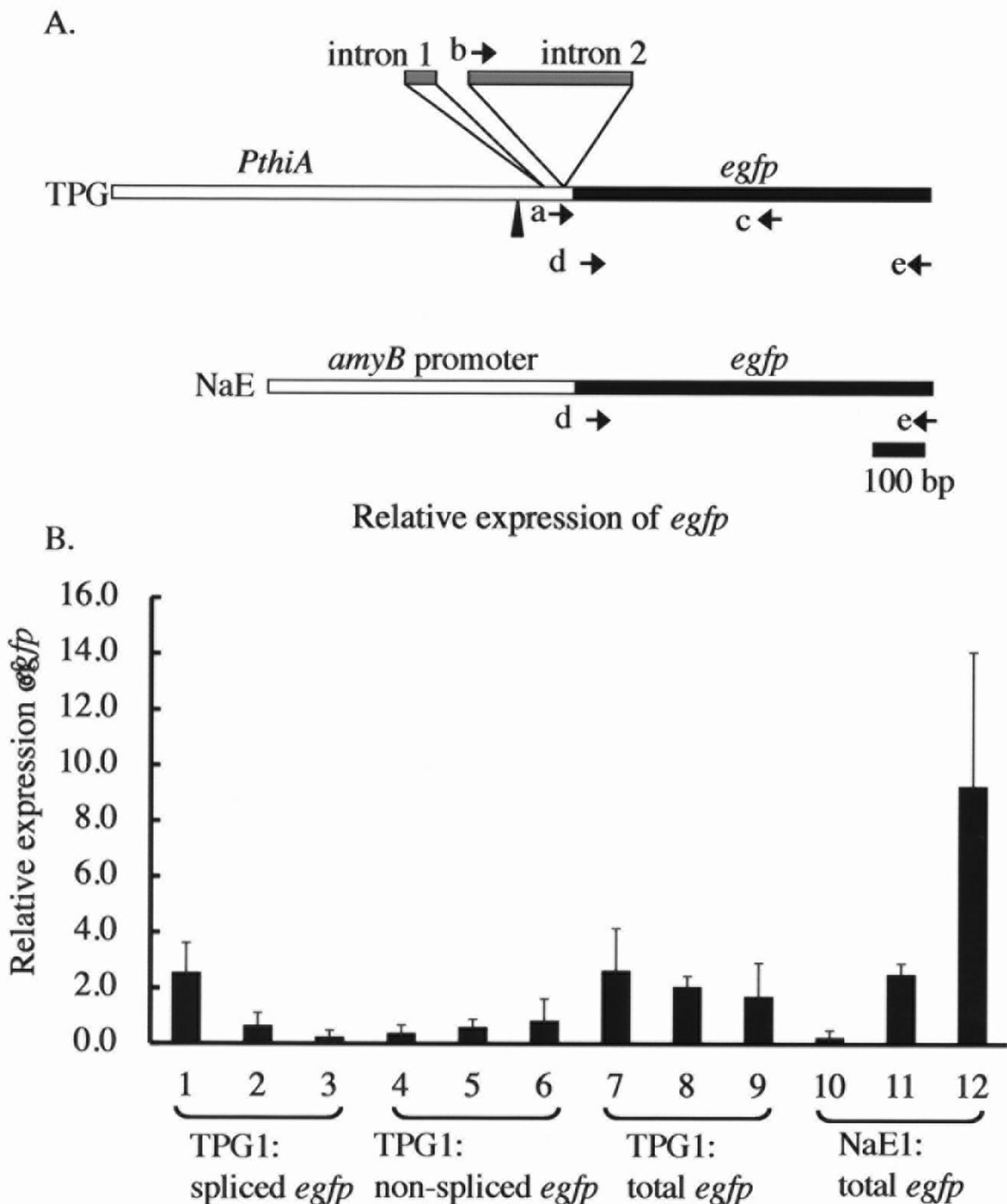
Conidia of TPG1 were inoculated in CD liquid medium containing the indicated concentrations of thiamine and incubated for 20 hr. Left panels: DIC images; right panels: EGFP fluorescence. Scale bar, 10 μm.

### EGFP fluorescence of TPG1



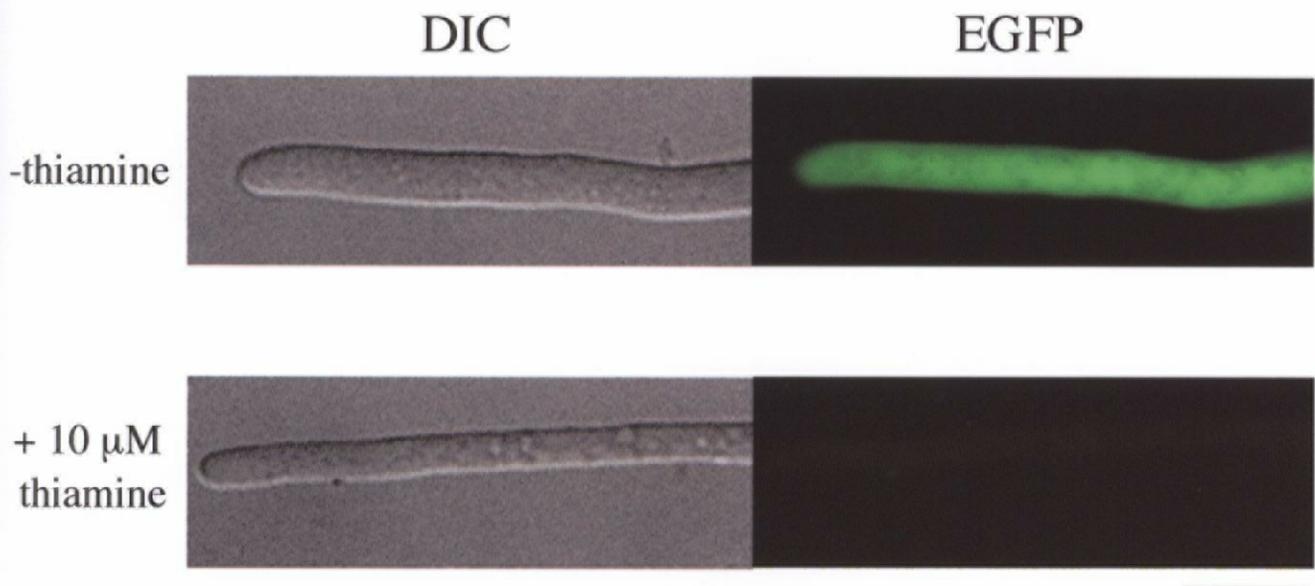
**Fig. 1-3. Intensity of EGFP fluorescence in the mycelia grown at varying thiamine concentrations**

$10^6$  conidia of either TPG1 or RIB40 (negative control) were inoculated in 200  $\mu$ l M medium containing 0, 1.0, 10, 100 nM or 1.0, 10, 100  $\mu$ M (data not shown) thiamine in a well of a 96-well microplate. The microplate was incubated at 30 °C with constant shaking and EGFP fluorescence was measured every 2 hr for 20 hr. Error bars indicate standard deviations of 12 samples.



**Fig. 1-4. RT-PCR analysis of *egfp* expression under the control of *PthiA* or *amyB* promoter**

(A) Schematic illustration of the *egfp* expression system in TPG and NaE strains. Introns in 5'-UTR in *PthiA* are indicated as gray boxes. Arrows represent primers used for RT-PCR: a, *PthiA*-N5'; b, *PthiA*-S5'; c, *egfp*-M3'; d, EGFP 5'-EcoRI; e, EGFP 3'-EcoRI (see Materials and Methods). A putative transcription start site in *PthiA* is indicated by an arrowhead. (B) Relative expression of *egfp* normalized by  $\gamma$ -actin is shown. Lanes 1, 4, 7: M medium; Lanes 2, 5, 8: M medium containing 10 nM thiamine; Lanes 3, 6, 9: M medium containing 10  $\mu$ M thiamine; Lane 10: CD with glycerol + 1% polypeptone; Lane 11: CD with glucose + 1% polypeptone; Lane 12: CD with dextrin + 1% polypeptone. The graph shows the averages  $\pm$  standard deviations of two independent experiments.



**Fig. 1-5. Thiamine-dependent regulation of *A. oryzae* *PthiA* in *A. nidulans***

Conidia of ATG3 were inoculated in MM liquid medium containing 0.02  $\mu$ g/ml biotin without or with 10  $\mu$ M thiamine and incubated for 20 hrs at 30 °C. Left panels: DIC images; right panels: EGFP fluorescence. Scale bar, 10  $\mu$ m

## 第二章 *A. oryzae* における液胞膜の可視化

### 背景

液胞は真核微生物や植物においてみられる酸性コンパートメントであり、一般に動物細胞のリソソームに相当すると言われている。液胞は細胞質イオンの恒常性維持、不要物の分解などに関わるが、リソソームとは異なり物質の貯蔵にも働いていることが示唆されている(Klionsky et al., 1990; Ashford, 1998)。

1980年代後半から行われた複数のグループによるスクリーニングにより、出芽酵母においては50以上にのぼる液胞形成に欠損のある変異株が取得された(Bankaitis et al., 1986; Robinson et al., 1988; Rothman et al., 1986; Rothman et al., 1989; Wada et al., 1992)。これらの変異株の解析によって、出芽酵母の液胞への物質輸送および液胞形成機構の詳細が現在までに明らかになってきた。

一方最近十数年の研究で、糸状菌において液胞の特徴的な側面が明らかになってきた。その一つは糸状菌の菌糸体において液胞が、部位によって異なる形態を示すということである(Hyde et al., 2002)。糸状菌の菌糸先端(apical)では液胞は小さく未発達で、菌糸基部(basal)においては大きく発達している。さらに中間の subapical な領域においては、チューブ状の液胞構造が観察される。このチューブ状液胞は菌根菌 *Pisolithus tinctorius* においてよく研究されている。チューブ状液胞は蠕動様の運動を行い(Shepherd et al., 1993a)、隔壁孔を通して隣り合う菌糸をつないでいる(Shepherd et al., 1993b)。さらに糸状菌の液胞は窒素やポリリン酸を多く含むと考えられている(Ashford, 1998; Cole et al., 1998)。菌根菌は菌糸先端から窒素やリンといった栄養分を取り込み、それを基部の菌糸から宿主植物に与える。また宿主植物からは糖を受け取り、これを代謝が最も活発な菌糸先端へと輸送する必要がある。以上のような状況証拠から、チューブ状の液胞はこのような菌糸内、菌糸間の栄養輸送に関わっていると考えられている(Ashford, 1998)。しかし菌根菌の液胞研究では細胞染色による観察しか行われてこなかったため、アーティファクトを見ているという指摘もあり、異なるアプローチからの証明が待たれていた。だが菌根菌は分子生物学的な手法が適用しにくいなど実験上の制約も多く、上述の仮説に関する直接的な証拠は未だ得られていない。

一方当研究室で行われた研究により、*A. oryzae* にもチューブ状液胞が存在することが明らかになった(Ohneda et al., 2002)。しかし菌根菌ではない *A.*

*oryzae* においてなぜチューブ状の液胞が存在する必要があるのかという点については不明であった。

このように糸状菌の液胞については、チューブ状の液胞という興味深い現象が見つかったにも関わらず、主に実験手法の限界からその後の解析が滞っていた。筆者は分子生物学的手法が適用しやすいという *A. oryzae* の利点を生かし、分子レベルから糸状菌液胞の機能を解明することを目的とし、最初に液胞動態を観察するための実験系の確立を行った。

### 第一節 *A. oryzae Aovam3* の機能解析

前述の様に出芽酵母において液胞形成の研究は極めて進んでいる。これらの研究で扱われる中心的なタンパク質はおそらく液胞膜の t-SNARE である Vam3p である(Wada et al., 1997)。Vam3p は液胞への小胞輸送および液胞の同形融合の両者に必須である(Wada et al., 1997; Srivastava and Jones, 1998)。さらに Vam3p は液胞膜にのみ存在することから、液胞膜のマーカーとして、また液胞膜の可視化にも用いられている(Kutsuna and Hasezawa, 2002; Uemura et al., 2002; Wang et al., 2002)。以上の理由から、*VAM3* の *A. oryzae* における相同遺伝子を最初の標的とし、このクローニングを行った。

当時はゲノム配列がまだ使えなかったため、*A. oryzae* の expression sequence tag (EST)データベースから *VAM3* 相同遺伝子の探索を行った。見いだされた EST の配列(以下 *Aovam3* と呼ぶ)をもとにプライマー VamC-N、VamC-C を設計し、*A. oryzae* RIB40 のゲノムをテンプレートとして PCR を行った。増幅産物をプローブとして *A. oryzae* ゲノムのファージライブラリーをスクリーニングし、ポジティブクローンを得た。得られたポジティブクローン上の *Aovam3* (DDBJ Accession No. AB232045)および *A. oryzae* RIB40 株の cDNA をもとにした PCR により得られた cDNA の配列をシーケンス解析によって決定した(Fig. S-3)。*Aovam3* は1つのイントロンを含み、271 アミノ酸からなるタンパク質をコードすると推定された。*AoVam3p* は出芽酵母 Vam3p と 25%の相同性を示したが、late endosome/prevacuolar compartment 上の t-SNARE Pep12p とは若干高い 27%の相同性を示した(Fig. 2-1)。

*AoVam3p* が一次配列上のみでなく機能的にも Vam3p の相同タンパク質であるか否かを明らかにするため、出芽酵母の *VAM3* 破壊株を用いた相補性試験を行った。*AoVam3p* は Pep12p とも高い相同性を示したことから、合わせ

て *PEP12* 破壊株の相補性試験も行った。

*Aovam3* cDNA の導入によって、出芽酵母 *VAM3* 破壊株のカルシウム感受性および液胞細分化の形質はいずれも相補された(Fig. 2-2a, b)。また *Aovam3* は *PEP12* 破壊株の温度感受性および CPY の missort の形質を相補した(Fig. 2-3a, b)。これらの結果から、AoVam3p は機能的にも Vam3p および Pep12p の相同タンパク質であることが示唆された。

## 第二節 EGFP と AoVam3p の融合タンパク質を用いた液胞膜の可視化

次いで AoVam3p の細胞内での局在を調べるために、AoVam3p のアミノ末端に EGFP を連結した融合タンパク質(EGFP-AoVam3p)を *amyB* プロモーター下で発現する(Fig. S-11)UEV 株を作製した。また *Aovam3* 条件発現株 TPVII118(補遺; Fig. S-4, 5)のバックグラウンドにおいて *Aovam3* プロモーターから EGFP-AoVam3p を発現する(Fig. S-11)TPVEV 株を作製した。サザン解析の結果、TPVEV1, 2, 3 株は 1 コピーの、TPVEV4 株は多コピーのプラスミド由来の融合遺伝子を持つことが確認された(Fig. S-10)。EGFP-AoVam3p は条件発現株の気中菌糸形成欠損を相補したことから(Fig. 2-4)、この融合タンパク質が機能的であることが確認された。また融合タンパク質を高発現する UEV 株を、炭素源をグルコースとする培地で培養しても顕著な生育の異常、遅延はみられなかった(data not shown)。さらにいずれの株においても EGFP 蛍光の局在が同様であった(Fig. 2-5)ことから、高発現による誤局在も起こっていないことが示唆された。

EGFP-AoVam3p はいずれの株においても、基部の菌糸において微分干渉像(DIC)で観察可能な発達した液胞の膜上に存在した(Fig. 2-5, 6)。また菌糸先端では小さい粒状の構造に局在がみられた。これらの構造もまた液胞であるか確認するために、EGFP-AoVam3p 発現株の 7-amino-4-chloromethylcoumarin (CMAC)および *N*-(3-triethylammoniumpropyl)-4-(*p*-diethylaminophenyl)-hexatrienyl) pyridinium dibromide (FM4-64)染色を行った。

CMAC は疎水性の低分子で、細胞膜を通過できる。細胞質に入った CMAC は glutathione *S*-transferase により glutathione 化されることがわかっている(Molecular Probes product information)。Glutathione 化された CMAC はおそらく液胞膜上の glutathione ポンプによって液胞内腔へと取り込まれる。FM4-64 は両親媒性の低分子で、膜構造に刺さり安定化する。出芽酵母においてはその後エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれ、エンドソームや液胞の膜を染色

する (Vida and Emr, 1995)。糸状菌においても FM4-64 を用いたエンドサイトーシス経路の染色がおこなわれているものの (Fischer-Parton et al., 2000; Read and Kalkman, 2003)、FM4-64 が細胞毒性を示し細胞内構造の異常をもたらすことも示唆されていた (Cole et al., 1998; Torralba and Heath, 2002)。そこでまず FM4-64 を用いた染色の条件検討を行った。

8  $\mu\text{M}$  の FM4-64 存在下において菌糸の伸長速度は  $1.01 \pm 0.16 \mu\text{m min}^{-1}$  ( $n=8$ ) で、FM4-64 非存在下での生育 ( $0.98 \pm 0.19 \mu\text{m min}^{-1}$ ,  $n=8$ ) と大きな違いはなかった。また EGFP-AoVam3p および微分干渉像によって観察される液胞構造も FM4-64 の存在によって影響を受けなかった (Fig. 2-5)。菌根菌 *P. tinctorius* において FM4-64 は死んだ菌糸の、CMAC によって染まらない液胞の膜のみを染色することが知られている (Cole et al., 1998)。そこで FM4-64 と CMAC による共染色を行った。その結果、FM4-64 は正常に生育しているとみられる細胞の、CMAC によって染色される液胞の膜を染色した (Fig. 2-6f)。以上の結果から、この条件下において FM4-64 の存在は細胞に悪影響を与えていないと判断した。

EGFP-AoVam3p の局在は FM4-64 による染色と極めて良い一致を示した (Fig. 2-5)。このことから EGFP-AoVam3p が液胞などのエンドサイトーシス経路のオルガネラに存在することが確かめられた。CMAC による染色も EGFP-AoVam3p 蛍光と良い一致を示した (Fig. 2-6)。基部の菌糸において EGFP-AoVam3p は、CMAC によって染色される液胞の膜に存在した。EGFP-AoVam3p によって可視化された菌糸先端の粒状構造も CMAC によって染色されたことから、これらが未発達の小な液胞であることが示唆された。しかし一部の EGFP-AoVam3p は基部の菌糸において、CMAC により染色されない構造体に局在した (Fig. 2-6c, e, f, 矢頭)。これらの構造体は FM4-64 によって染色されることから (Fig. 2-6f) エンドサイトーシス経路の構造体であるものの、CMAC によって染色されないことから液胞ではないと考えられる。この構造体は液胞の近くに存在し、液胞膜のタンパク質が蓄積している点が出芽酵母の肥大した late endosome/prevacuolar compartment である class E compartment と一致している (Raymond et al., 1992)。このことから、FM4-64 によって染色されるが CMAC によって染色されないこの構造が、*A. oryzae* の late endosome/prevacuolar compartment であると考えている。

第三節 AoVps23p と EGFP の融合タンパク質を用いた late endosome/prevacuolar

## compartment の可視化

出芽酵母において、Pep12p の高発現は *vam3* 破壊株の形質を相補し、Vam3p の高発現は *pep12* 破壊株の形質を相補する(Götter et al., 1997)。また、ALP 経路へのターゲティングに必要な di-leucine モチーフを変異させた Vam3p は、高発現しなくても *pep12* 破壊株の形質を相補できるようになる (Darsow et al., 1998)。これは、高発現または変異によってこれらの t-SNARE が互いの局在場所に部分的に局在し、機能を代替するためであると考えられている。従って、ある Vam3p/Pep12p 相同タンパク質が液胞と late endosome/prevacuolar compartment に同時に局在できるのであれば、そのタンパク質は Vam3p/Pep12p 両者の役割を併せ持つことができるであろう。このため AoVam3p の局在がみられた late endosome/prevacuolar compartment 様構造が実際に late endosome/prevacuolar compartment であることを示すことが重要である。しかしこれまで糸状菌において late endosome/prevacuolar compartment に関する報告は一つしかなく(Tatsumi et al., 2006)、有効なマーカータンパク質も存在しない。そこで出芽酵母において multivesicular body の形成に必要な ESCRT complex 構成因子の *A. oryzae* における相同タンパク質を用いて late endosome/prevacuolar compartment を可視化することを試みた。これまでに糸状菌における ESCRT complex 構成因子の相同タンパク質としては、当研究室の辰巳により Vps24p 相同タンパク質 AoVps24p が機能解析されているのみである(Tatsumi et al., 2006)。しかし AoVps24p と EGFP の融合タンパク質は大部分が細胞質に存在し、一部は膜構造に局在するものの観察はしづらいと判断した。実際に出芽酵母においても、Vps24p は細胞質に多く存在し、膜画分に存在するのは一部である(Babst et al., 2002)。そこで Vps24p 以外の候補を模索した。ESCRT1 complex の構成因子 Vps23p は比較的膜画分に多く存在し、EGFP との融合タンパク質も機能的である(Katzmann et al., 2001)。また Vps23p は late endosome/prevacuolar compartment の機能に必須であることから、Vps23p 相同タンパク質が局在する構造体は late endosome/prevacuolar compartment であると考えられる。以上の理由から Vps23p 相同タンパク質を用いることで late endosome/prevacuolar compartment の可視化を試みることにした。

*A. oryzae* ゲノムデータベースから *VPS23* と相同性を示す配列(Aovps23)を見だし、これをもとにプライマー(Aovps23-5', Aovps23-CDT)を設計した。また開始コドン上流 1 kb をプロモーターと定義し、これを増幅するプライマーも合わせて設計した。これらのプライマーを用いて *A. oryzae* RIB40 株 cDNA をテ

ンプレートとした PCR から *Aovps23* cDNA を、RIB40 株のゲノムをテンプレートとした PCR により *Aovps23* プロモーターをそれぞれクローニングした。この後 MultiSite Gateway cloning system を用い、*amyB* プロモーターまたは *Aovps23* プロモーター下流に *AoVps23p-EGFP* をコードし *niaD* マーカーを有するプラスミドを作製し、これを用いて *A. oryzae niaD300* 株を形質転換した。*Aovps23* プロモーターから融合タンパク質を発現する形質転換体においては、EGFP 蛍光は弱く観察に適さなかった。*amyB* プロモーターから融合タンパク質を発現する株においては、2%グルコースを炭素源とする培地で培養した場合菌糸の多分岐がみられた。そこで *amyB* プロモーターからの発現を弱めるため(田浦, 2005)、0.5%グルコースと 1.5%グリセロールを炭素源とする CD 培地で培養したものを主に観察に用いた。

*AoVps23p-EGFP* による蛍光は一部液胞内腔にもみられたものの、主に FM4-64 により染色される粒状構造に観察された(Fig. 2-7A 矢印)。これら粒状構造は液胞近傍に位置していたが、CMAC によっては染色されなかった(Fig. 2-7B 矢印)。これらのことから late endosome/prevacuolar compartment と考えられる *AoVps23p-EGFP* の局在する構造体は、EGFP-*AoVam3p* の局在した late endosome/prevacuolar compartment 様構造と同様の特徴を持っていることが分かった。

## 考察

糸状菌の液胞に関しては、特徴的な側面が見出されていたにも関わらず、実験手法の限界からその後の研究が滞っていた。筆者は、菌根菌と比較して分子レベルでの実験が適用しやすい *A. oryzae* を材料とした液胞研究のため、まず液胞膜観察系の構築を行った。そのための標的としては、液胞形成において中心的役割を持ち、液胞膜のマーカー、可視化に用いられている *Vam3p* 相同タンパク質を選んだ。*EGFP-AoVam3p* 融合タンパク質は一部が late endosome/prevacuolar compartment 様構造に局在したものの、主に液胞膜に存在した。さらに *Aovam3* 条件発現株の相補実験で明らかになった様に、*EGFP-AoVam3p* は機能的である。また、*EGFP-AoVam3p* は多少の高発現を行っても局在や菌糸体の形態に大きな影響を与えなかった。顕微鏡観察においては染色、融合タンパク質の発現によるアーティファクトに注意が必要だが、

EGFP-AoVam3p を用いた液胞観察はこのようなアーティファクトをあまり含まないことが示唆された。以上の結果から当初の目的通り、アーティファクトを含まず液胞膜を簡便に、高解像度で観察できる系が構築されたことが分かった。

AoVam3p は出芽酵母の液胞膜上の t-SNARE である Vam3p と相同性を示すものの、late endosome/prevacuolar compartment の t-SNARE である Pep12p とも同等の相同性を示した。A. oryzae ゲノムデータベースにおいて VAM3 または PEP12 と高い相同性を示す配列は Aovam3 のみである(倉都, 2006; Kobayashi et al., submitted)。これは他の糸状菌においても同様で、Vam3p または Pep12p の相同タンパク質は一つのみしか存在しない(Gupta and Heath, 2002)。この結果は AoVam3p が Vam3p および Pep12p 両者の機能を併せ持つことを示唆しているのかもしれない。Aovam3 が出芽酵母  $\Delta$ vam3 および  $\Delta$ pep12 株の形質を相補したことは、この仮説を支持している。また、出芽酵母において Vam3p の高発現は  $\Delta$ pep12 株の形質を相補し、Pep12p の高発現は  $\Delta$ vam3 株の形質を相補する(Götte et al., 1997)。これは通常 Vam3p は液胞に、Pep12p は late endosome/prevacuolar compartment に局在するが、高発現により一部のタンパク質が互いの局在場所へ移行し、機能を代替できるためと考えられている。つまりこの両者の機能の差異は局在場所にあり、SNARE motif の特異性に大きな違いはないということである。だとすると液胞、late endosome/prevacuolar compartment に同時に局在できるならば、Vam3p/Pep12p 相同タンパク質は両者の機能を併せ持つことができるはずである。これと一致して、EGFP-AoVam3p の一部は late endosome/prevacuolar compartment 様の粒状構造体に局在した。Aovam3 プロモーターから発現され、Aovam3 条件発現株の形質を相補する条件下でもこの局在は観察されたことから、この結果が遺伝子の高発現、または EGFP との融合によって生じたアーティファクトとは考えにくい。そこで late endosome/prevacuolar compartment の機能に必要な Vps23p の相同タンパク質 AoVps23p と EGFP の融合タンパク質の局在を解析したところ、同様の粒状構造体への局在がみられた。今後実際に AoVam3p と AoVps23p の共局在を示す必要があるものの、上述の結果はこの粒状構造体が late endosome/prevacuolar compartment であること、さらに AoVam3p が Vam3p および Pep12p 両者の相同タンパク質であることを示唆している。

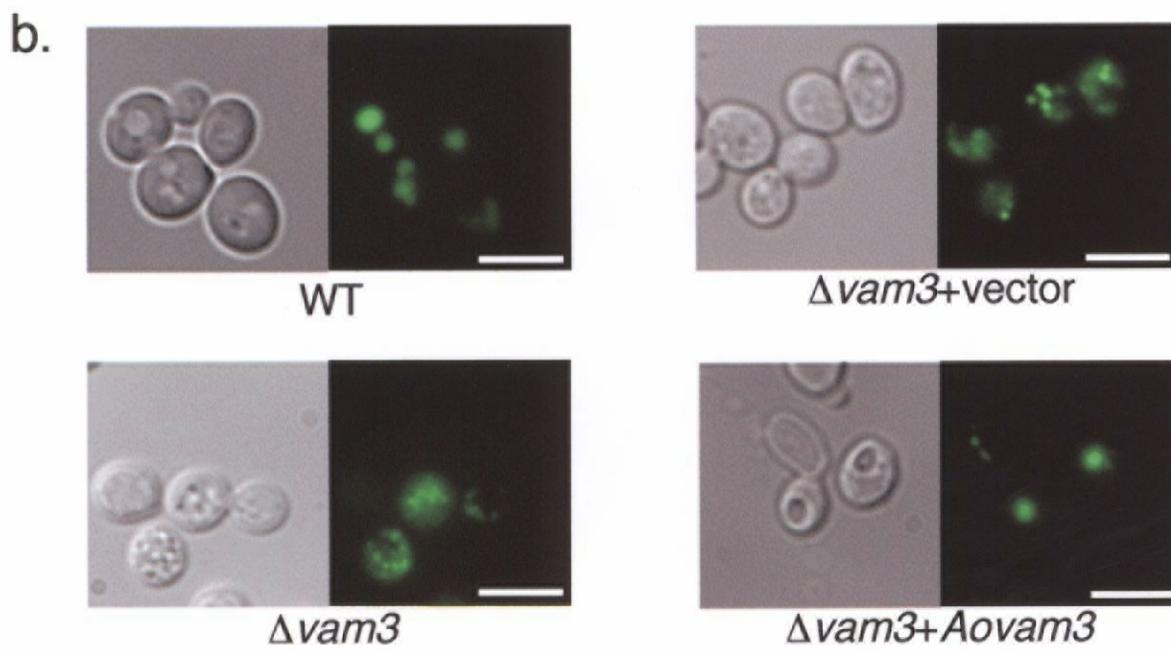
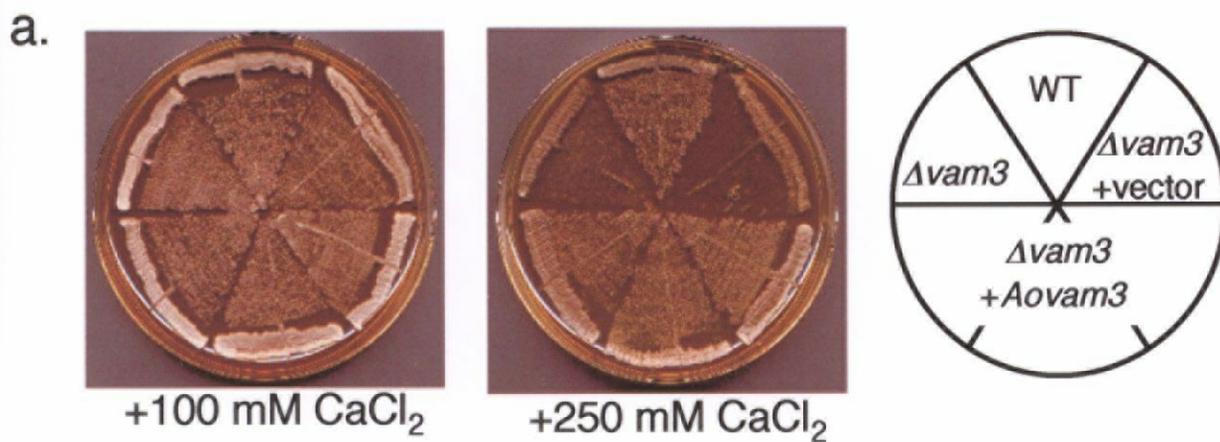
```

A.oryzae AoVam3p      MSFDRLSSLESQPTLLRRSDDPQYRDDPEFYQLTESLSNQLFSLTSNITRLSDQIALLGT
A.thaliana Vam3p     MSFQDLESGRGRSTRKFNGGRQ-----DSTQAVASGIFQINTGVSTFQRLVNTLGT
M.musculus syntaxin7 -----MSYTPGIIGDSA-----QLAQRISSNIQKITQCSVEIQRTLNLQGT
S.cerevisiae Pep12p  MSEDEFFGGDNEGVMNGSRFSD----SPEFQTLKEEVAELFEINGQISTLQQFTATLKS
S.cerevisiae Vam3p   MSFFDIEAQSSKGNQQEPQFSTN-----QTKELSNLIETFAEQSRVLEKECTKIGS
                        : : : : : : : :
A.oryzae AoVam3p      RRD-----TERVRERVHNLLEQTR-SGFKGVGEGIKKVQAWEDVN---PSQKWTQK
A.thaliana Vam3p     PKD-----TPELREKLHKTRLHIG-QLVKDTSAKLKEASETDHQSGVNPSSKKIADAK
M.musculus syntaxin7 PQD-----SPELRQLLQKQYTN-QLAKETDKYIKEFGSLPTTSEQRQRKIQKDR
S.cerevisiae Pep12p  FIDRGDVSAAKVVVERINKRSVAKIEEIG-GLIKKINTSVKKMDAIEEAS-LDKTQIIAREK
S.cerevisiae Vam3p   KRDSKELRYKIETELIPNCTSVRDKIESNILIHQNGKLSADFNKLTQYSLQSSYNQRK
      *           : :           . : :           : : :
A.oryzae AoVam3p      LSSEFKATLDEFQTVQRRALEKQRASAVAARTAVEEGEQPAVEGATQEQQ----QLLQEQ
A.thaliana Vam3p     LARDFQAVLKEFQKAQQTAAERETTYTPFVPQSALPSSYTAGEVDKVPQRAQLQESKRQ
M.musculus syntaxin7 LVAEFTTSLTNFQKAQRQAAREKEFVARVRASSRVSGGFPEDSSKEKNLVSWESQTQPQ
S.cerevisiae Pep12p  LVRDVSYSFQEFQGIQRQFTQVMQVNERAKESLEASEMANDAALLDEEQRQNSKSTRI
S.cerevisiae Vam3p   SLFPLKTPISPGETSKERKDIHPRTEAVRQDPESYISIKVNEQSPLLHNEGQHQLQLQEE
      . : : : : : : :
A.oryzae AoVam3p      P-----RLANQDEVDFQESLIIERAEIRNIEQSVGELNELFRDVAHIVHEGGQLD
A.thaliana Vam3p     E-----LVLLDNEIAFNEAVIEEREQGIQEIHQQIGEVNEIFKDLAVLVNDQGVMD
M.musculus syntaxin7 V-----QVQDEEITEDDLRLIHERESSIRQLEADIMDINEIFKDLGMMIHEGGMD
S.cerevisiae Pep12p  PGSQIVIERDPINNEEFAYQONLIEQRDQEISNTERGITELNEVFKDLGSVVOQGVLVD
S.cerevisiae Vam3p   QEQQ----QQGLSQEELDFQTIHQERSQIGRIHTAVQEVNAIFHOLGSLVKEGEOVT
                        : : : : : * . . : : * : * : : : * :
                        TMD
A.oryzae AoVam3p      IISENVENVTNDTRGANVELRSASRHQKNARNKACCLLVILAVILTIIVLAAITIG--
A.thaliana Vam3p     DIGTHIDNSRAATSQGKSQLVQAAKTQKSNSSLTCLLLVIFGIVLLIIVLAA---(27.9%)
M.musculus syntaxin7 SIEANVESAIEVHVQANQQLSRAADYQRKSRKTLLCIIIFILVVRIVIIICLIVWGLKG(27.3%)
S.cerevisiae Pep12p  NIEANTYTTSDNTQLASDELKAMRYQKRTSRWRVYLLIVLLVMLLFIFLIMKL---(27.1%)
S.cerevisiae Vam3p   TIDENISHLHDNMQNANKQLTRADQHQRDRNKCCGKVTLIIIIIVVCMVLLAVLS---(25.2%)
      * : :           . : * * * :           : : : : : :

```

**Fig. 2-1. Alignment of the deduced amino acid sequence of *A. oryzae* AoVam3p with various homologous proteins**

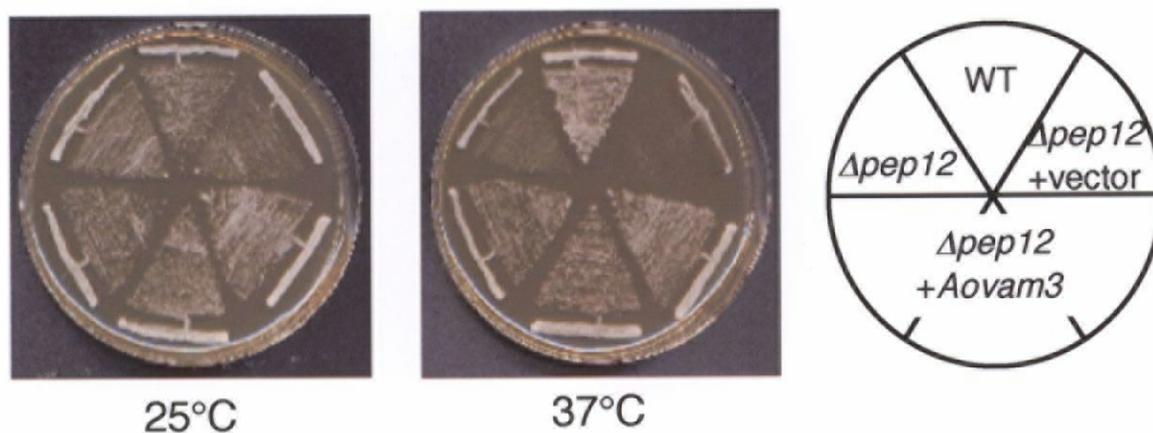
Conserved transmembrane domain (TMD) and a glutamine residue are boxed. SNARE motifs of Vam3p and Pep12p are underlined in red. Di-leucine motif of Vam3p is underlined in green.



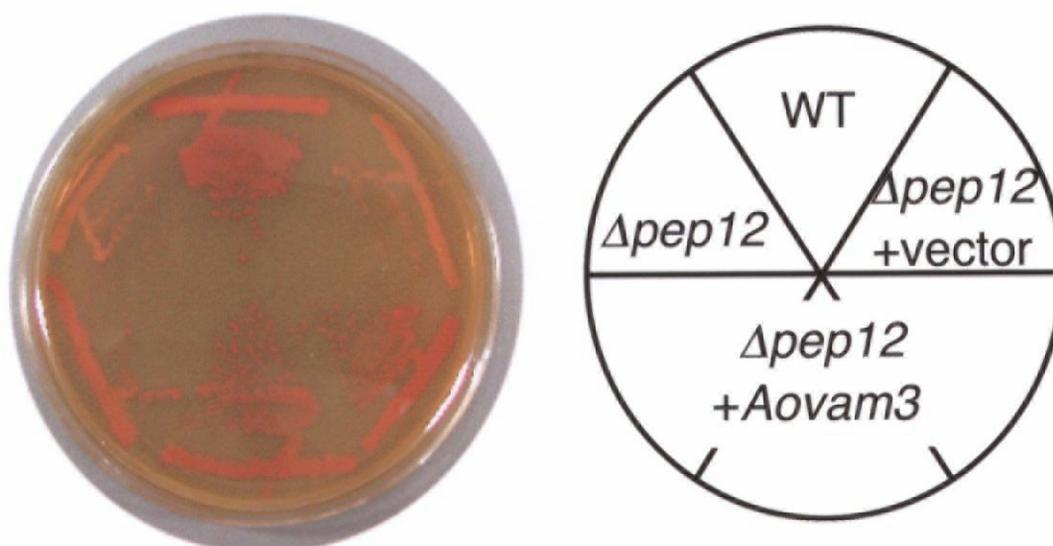
**Fig. 2-2. Complementation of *S. cerevisiae*  $\Delta vam3$  phenotypes by the expression of *Aovam3* cDNA.**

(a) The indicated yeast strains were streaked on the YPGal plate containing either 100 mM or 250 mM CaCl<sub>2</sub> and grown for 3 days. (b) Vacuoles of the indicated strains were stained with 10  $\mu$ M CFDA. Large developed vacuoles were observed in wild type strain and  $\Delta vam3$  strain that expressed *Aovam3* cDNA, while  $\Delta vam3$  strain and that only possessed the empty vector showed vacuolar fragmentation. Bars represent 10  $\mu$ m.

a.



b.



**Fig. 2-3. Complementation of *S. cerevisiae*  $\Delta pep12$  phenotypes by the expression of *Aovam3* cDNA.**

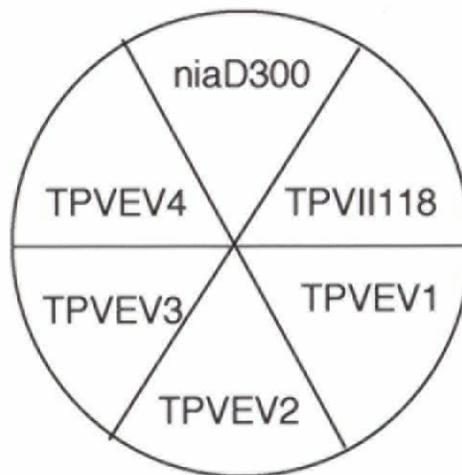
(a) The indicated yeast strains were streaked on the YPGal plate and incubated at either 25°C or 37°C for 3 days. (b) The indicated yeast strains were streaked on the YPGal plate and incubated at 30°C for 2 days. CPY activity were assessed by the color of the colonies after the APE assay (see Materials and Methods); red represents the presence of CPY activity while yellow indicates the lack of the activity.



M medium

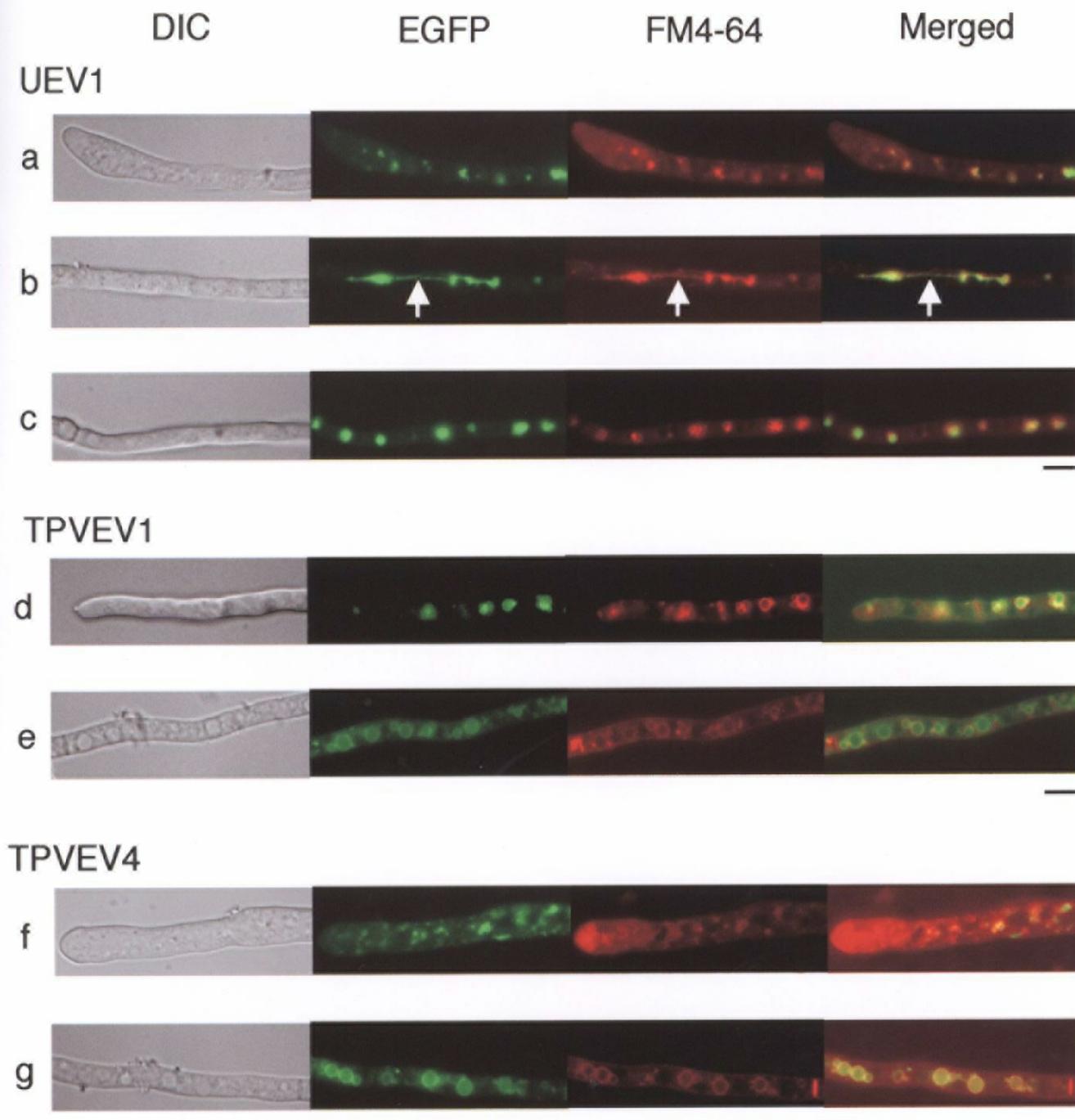


M medium + 10  $\mu$ M thiamine



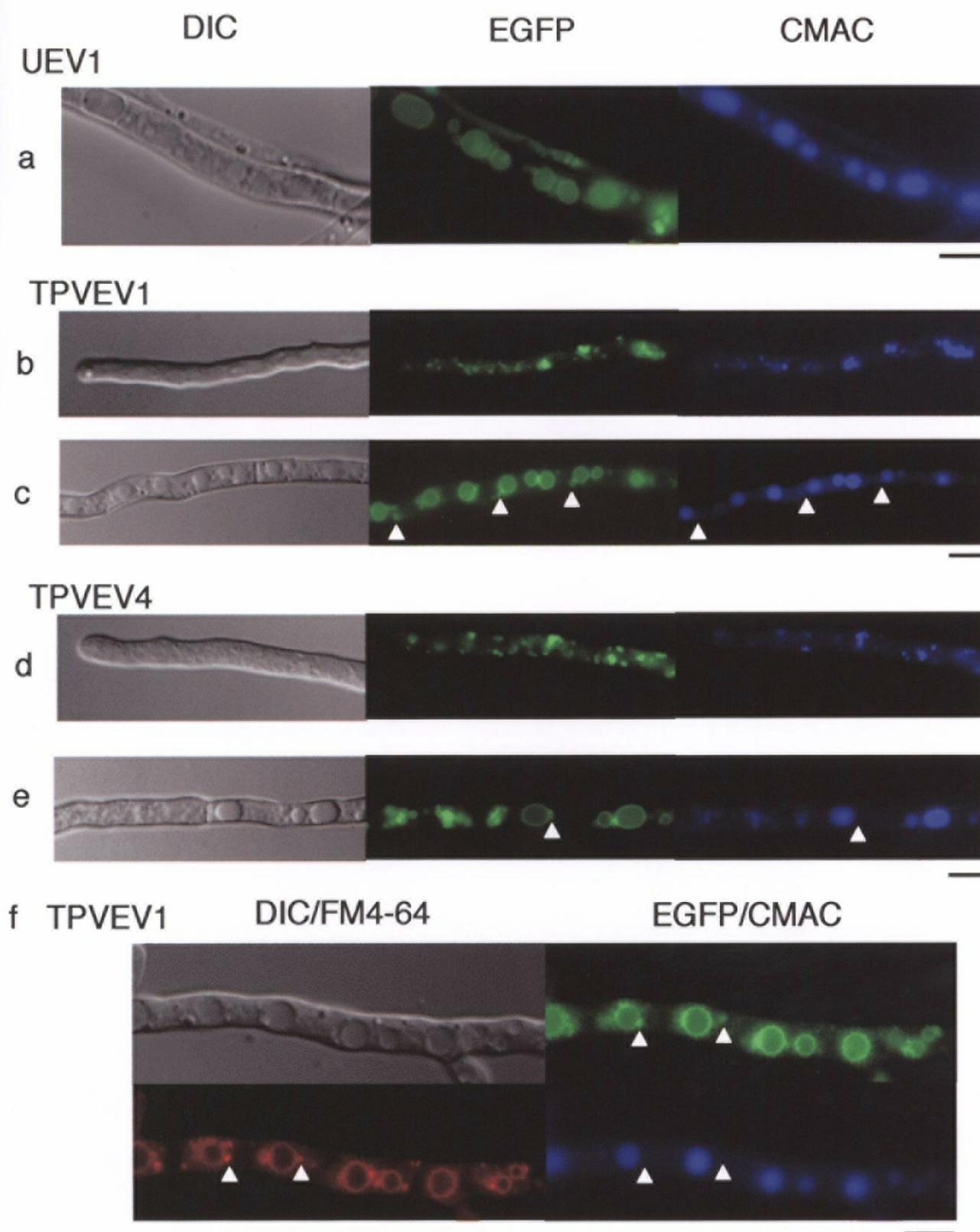
**Fig. 2-4. Complementation of phenotypes in an *Aovam3* conditional expression mutant by the expression of EGFP-*AoVam3p*.**

Approximately  $10^2$  conidia of either TPVII118, an *Aovam3* conditional expression mutant that expresses *Aovam3* under the control of thiamine-regulatable *thiA* promoter, and TPVEV strains that express EGFP-*AoVam3p* under *Aovam3* promoter on a TPVII118 background, were inoculated and grown for 4 days in M medium (*thiA* promoter induced, left) or M medium containing 10  $\mu$ M thiamine (*thiA* promoter repressed, right).



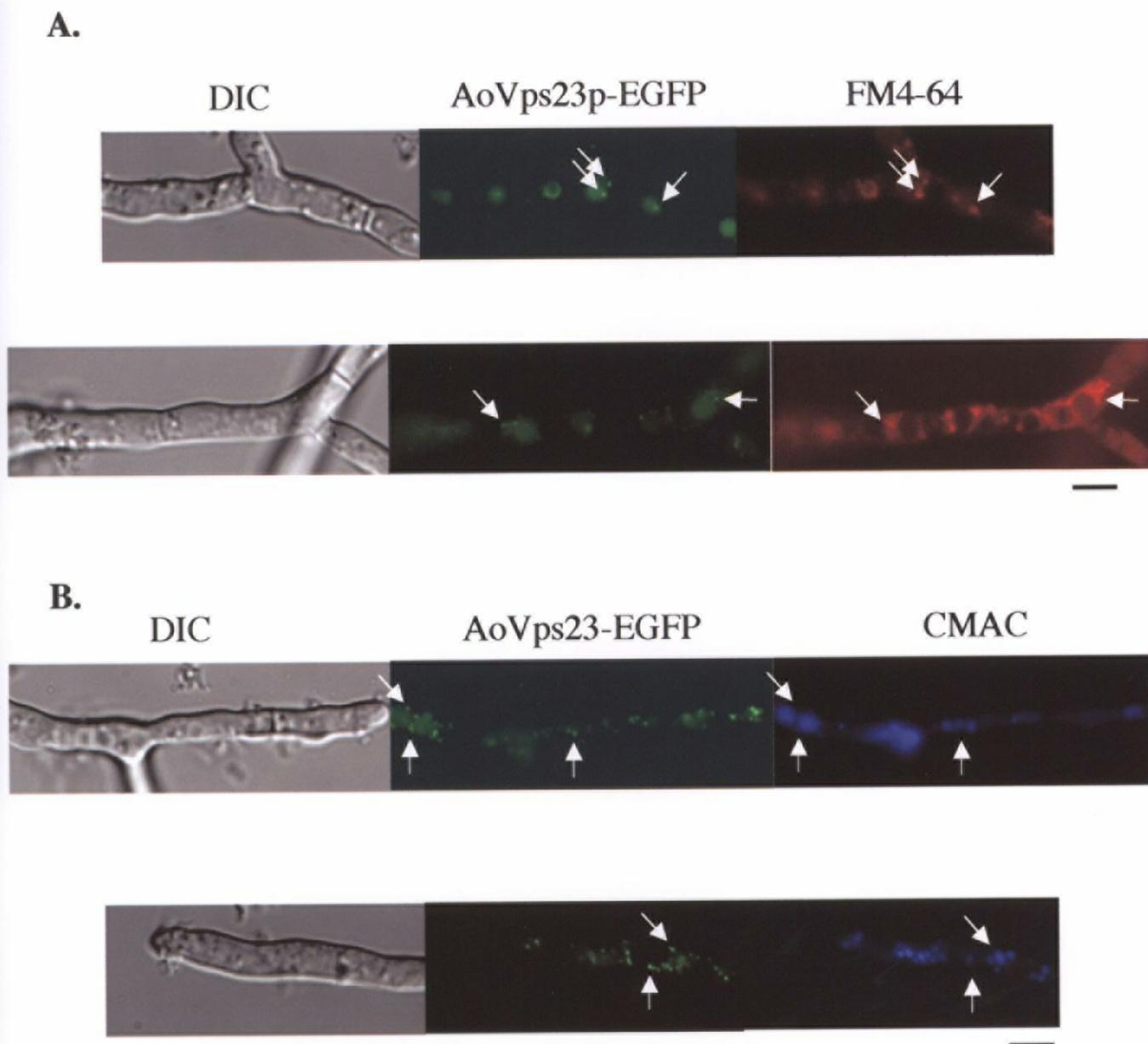
**Fig. 2-5. Localization of EGFP-AoVam3p and FM4-64 staining in UEV1, TPVEV1, and TPVEV4.**

Cover glass cultures of UEV1, TPVEV1, and TPVEV4 grown for 20 hours at 30°C were stained with 8  $\mu$ M FM4-64. DIC images, EGFP fluorescence, FM4-64, and merged images are shown (left to right). (a–c) Apical region, subapical region, and basal region, respectively, in UEV1. A tubular vacuole is indicated by arrows in b. (d, e) Apical region and subapical region, respectively, in TPVEV1. (f, g) Apical region and subapical region in TPVEV4. Bars represent 5  $\mu$ m.



**Fig. 2-6. Localization of EGFP-AoVam3p and CMAC staining of UEV1, TPVEV1, and TPVEV4.**

Cover glass cultures of UEV1, TPVEV1, and TPVEV4 grown for 20 hours were stained with CMAC. DIC images, EGFP fluorescence, and CMAC staining are shown (left to right). (a) Basal region in UEV1. (b, c) Apical and basal regions, respectively, in TPVEV1. (d, e) Apical and basal regions, respectively, in TPVEV4. (f) Dual staining of TPVEV1 with FM4-64 and CMAC. Images of DIC, FM4-64, EGFP, and CMAC fluorescence are shown. Arrowheads indicate putative late endosomes/prevacuolar compartments visualized by EGFP-AoVam3p that are not stained with CMAC. Bars represent 5 μm.



**Fig. 2-7. Subcellular localization of AoVps23p-EGFP**

**A.** FM4-64 staining of an AoVps23p-EGFP-expressing strain. **B.** CMAC staining of an AoVps23p-EGFP-expressing strain. Arrows indicate a few examples of the putative late endosomes/prevacuolar compartments that were stained by FM4-64, but not by CMAC. Bars represent 5  $\mu$ m.