

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

背景

第二章で記述した様に、*A. oryzae* の液胞膜動態の解析から、菌糸基部において細胞質成分とオルガネラの分解と、チューブ状液胞を介した分解産物の菌糸先端へのリサイクルが起こっている可能性が示唆された。本章では基部の菌糸において実際に包括的な細胞質成分の液胞への取り込みが起こっているか検証するため、様々なオルガネラの液胞への取り込みを検証した。

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

当研究室ではこれまで様々な EGFP との融合タンパク質をオルガネラのマーカーとして確立してきている(Maruyama et al., 2002; Mabashi et al., 2006; 倉都, 2006; 田浦, 2006)。しかし小胞輸送経路のオルガネラマーカー膜タンパク質はしばしば一部が液胞内腔へ移行してしまうため、液胞内への取り込みを評価するには不適である。そこで今回はペルオキシソームのマーカーである EGFP-PTS1 (Minami et al., unpublished results)、ミトコンドリアのマーカーである AoCit1-EGFP (Mabashi et al., 2006)、核のマーカーであるヒストン H2B-EGFP (Maruyama et al., 2001; Ishi et al., 2005)をそれぞれ発現する株を用いて観察を行った。培養は 0.15% L-methionine を含む CD 培地を用い、ガラスボトムディッシュで行った。先端生長を行っている菌糸と基部の菌糸を観察するため、24 hrs 培養後のカルチャーの菌糸先端と 48 hrs 培養後のカルチャーの液胞の発達した菌糸をそれぞれ観察した。

ペルオキシソームは出芽酵母(Hutchins et al., 1999)やメタノール資化性酵母(Monastryska et al., 2004; Farré and Subramani, 2004)においてよく研究されている、オートファジーによって液胞へ取り込まれるオルガネラの代表格である。24 hrs 培養後、EGFP-PTS1 により菌糸先端に粒状のペルオキシソームが観察された(Fig. 4-1a)。しかしこの時点で既に、液胞が発達している基部の菌糸においては液胞内腔に EGFP 蛍光が観察された(Fig. 4-1a)。これは 48 hrs 経過後により顕著になり、この時点で細胞質に粒状のペルオキシソームは少なく、EGFP 蛍光は主に微分干渉像で確認される液胞内腔に観察された。また 24 hrs 培養時、AoCit1-EGFP によって細胞質にチューブ状のミトコンドリアが観察される(Fig. 4-1b)。しかし 48 hrs 経過後、細胞質にチューブ状のミトコンドリアも存在した

ものの、一部の EGFP 蛍光は液胞内腔に観察された(Fig. 4-1b)。また 24 hrs 培養時、H2B-EGFP によって細胞質に多数の核が観察される(Fig. 4-1c)。これに対して 48 hrs 経過後は、細胞質にまだいくつかの核が残っているものの、一部の発達した液胞において弱い EGFP 蛍光が液胞内腔に観察された(Fig. 4-1c)。これらの結果から、48 hrs 培養後の基部の菌糸においては、ペルオキシソームやミトコンドリア、核といったオルガネラが液胞内へ取り込まれていることが明らかになった。

さらにこれらのオルガネラの液胞への取り込みがオートファジーによるものかどうか検証するために、当研究室の菊間によって作製された *Aoatg8* 破壊株(Kikuma et al., 2006)を用いて同様の実験を行った。*Aoatg8* は *A. oryzae* においてマクロオートファジーに必須であることがわかっている(Kikuma et al., 2006)。具体的には EGFP-PTS1、AoCit1-EGFP、H2B-EGFP 各融合タンパク質をコードするプラスミドを *Aoatg8* 破壊株に導入し、同様の観察を行った。

24 hrs 培養後、EGFP-PTS1 で可視化されたペルオキシソームは *Aoatg8* 破壊株においても細胞内に粒状の構造として存在した(Fig. 4-2a)。48 hrs 培養後、野生株と異なり、*Aoatg8* 破壊株において EGFP 蛍光は液胞内腔に観察されなかった(Fig. 4-2a)。また AoCit1-EGFP によって可視化されるミトコンドリアは 24 hrs 培養後、*Aoatg8* 破壊株においてもやはりチューブ状の構造として細胞質に観察された(Fig. 4-2b)。48 hrs 培養後の基部の菌糸においても、細胞質にはチューブ状のミトコンドリアが多く残っており、液胞内腔に EGFP 蛍光はみられなかった(Fig. 4-2b)。H2B-EGFP によって可視化された核も同様に、48 hrs 経過後も液胞内腔に EGFP 蛍光はみられなかった(Fig. 4-2c)。Fig. 4-2c において一部の核は液胞と重なっているが、微分干渉像で焦点をずらして確認したところ液胞と焦点面は一致しなかった。いずれにしても Fig. 4-1 でみられたような液胞内腔に拡散した EGFP 蛍光はみられなかったことから、これらの核は分解を受けておらず、従って液胞内には入っていないものと考えられる。

考察

これまでの研究により、糸状菌の基部菌糸においては細胞質成分とオルガネラの包括的な分解が起こっているという仮説が生じた。そこで本章では当研究室により蓄積されてきた各種マーカータンパク質発現株を活用し、この仮説の検証を行った。その結果基部の菌糸においては、ペルオキシソーム、ミ

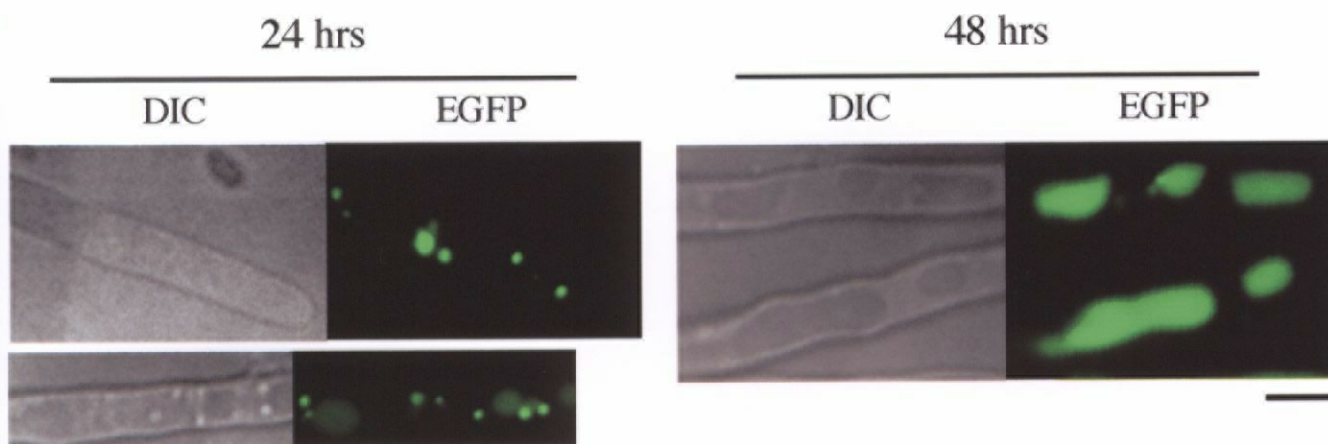
トコンドリア、核といったオルガネラが液胞に取り込まれていることが示された。この時マーカートンパク質に由来する EGFP は液胞内腔に拡散して見られたことから、取り込まれた成分は分解を受けていることが示唆された。さらに *Aoatg8* 破壊株を用いた解析から、これらのオルガネラの取り込みがオートファジーによるものであることが明らかになった。

出芽酵母やメタノール資化性酵母において、環境変化に対応してペルオキシソームがオートファジーにより液胞に取り込まれ、分解されることが知られている(Hutchius et al., 1999; Monastryska et al., 2004; Farré and Subramani, 2004)。これと一致して、今回の実験においてペルオキシソームはオートファジーによる液胞への取り込みが最も起こりやすく、24 hrs 培養後の比較的若い菌糸体においても取り込みはみられた。ミトコンドリアも出芽酵母においてオートファジーにより液胞に取り込まれることが知られている(Kissová et al., 2004)。核の一部もまた、出芽酵母において栄養飢餓条件下でマイクロオートファジーにより液胞に取り込まれる(Roberts et al., 2003)。しかしこの場合、取り込まれるのは核小体の一部や preribosome など核のごく一部である。単核の出芽酵母においては、核全体を取り込むことは自身の生命活動を完全に止めることになるので、むしろこれは当然であろう。これに対して *A. oryzae* では、EGFP と融合したヒストン H2B も液胞内へ取り込まれた。ヒストンは核酸の電荷を中和するためにも必要であると考えられているため、ヒストン H2B の液胞への取り込みは核酸の取り込みも伴っていると考えた方が自然である。自然界において糸状菌の生育を制限する栄養としてはまず窒素やリンがあげられるが、核酸はこの二つの元素を豊富に含むことから、液胞において核全体を分解しリサイクルすることは合理的である(Maheshwari, 2005)。*A. oryzae* を含む糸状菌の菌糸は多核であり、出芽酵母と異なって核の分解は生命活動の停止を意味しない。多核の菌糸を持つ意義は、先端生長時にはタンパク質合成を活性化することで他の生物よりも早く増殖し、基部の菌糸では核自身を窒素、リンの貯蔵庫として分解、再利用することにあるのかもしれない。

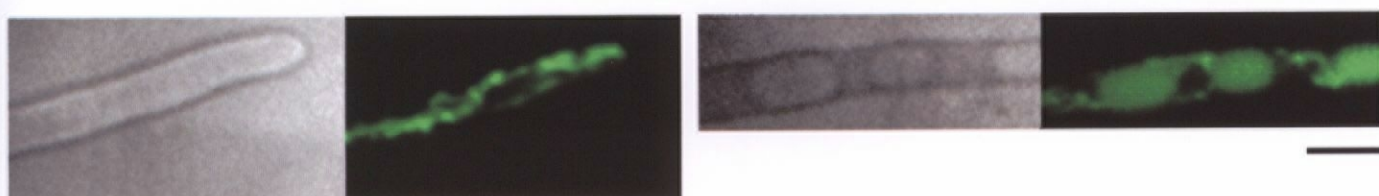
今回 *Aoatg8* 破壊株を用いた解析によりオルガネラの取り込みがオートファジーによるものであることが明らかになったが、現時点ではマイクロオートファジーとマクロオートファジーのいずれが寄与しているのかは定かでない。出芽酵母の Atg8p はマクロオートファジーに関与することが知られているが(Kirisako et al., 1999; Ichimura et al., 2000)、メタノール資化性酵母において Atg8p

相同タンパク質はマクロ、マイクロオートファジーの両者に関与する(Farré and Subramani, 2004)。 *A. oryzae* の AoAtg8p がマイクロオートファジーにも関与するかどうかは明らかになっていないが、状況証拠からオルガネラの取り込みは主にマイクロオートファジーにより行われていると考えている。今回の観察において細胞質中に拡散した EGFP 蛍光はみられなかったことから、各オルガネラは細胞質で分解されてから液胞に取り込まれるのではなく、完全な状態で液胞に取り込まれ、そこで分解されるものと考えられる。特に核のようにある程度の大きさを持つものを取り込むには、オートファゴソームで覆ってから液胞へ取り込むマクロオートファジーよりも、液胞膜の陥入とともに取り込めるマイクロオートファジーが適している。出芽酵母において核の一部が液胞内へ取り込まれる過程も、マイクロオートファジーによるものである。また基部の菌糸において液胞膜の内腔への取り込みが示唆されたことも、マイクロオートファジーによる取り込みを示唆している。今後の研究においてはオルガネラが完全な状態で取り込まれているか、またマイクロオートファジーによる取り込みなのかを明らかにするためにも、液胞への取り込みの段階を観察することが重要である。

a. EGFP-PTS1



b. AoCit1-EGFP



c. H2B-EGFP

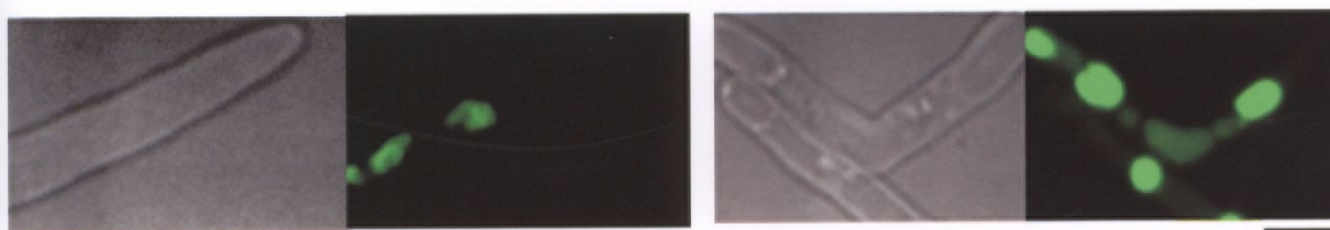
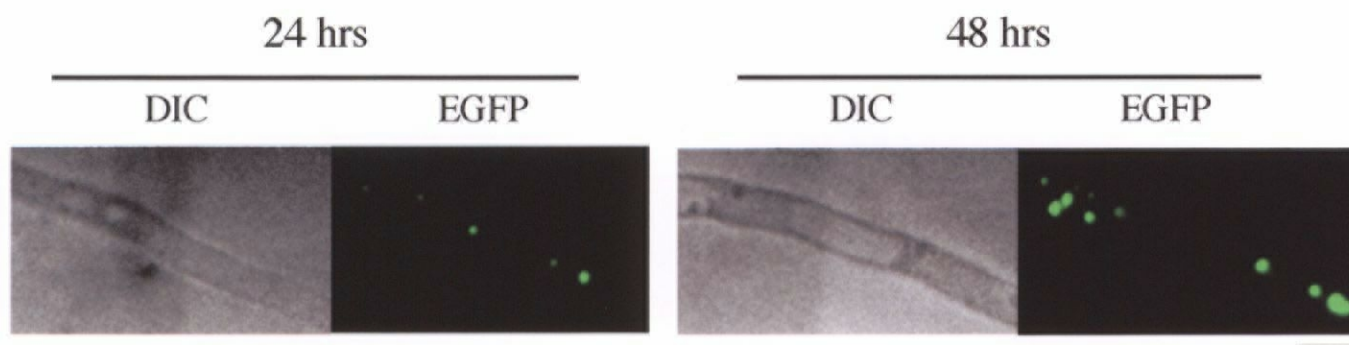


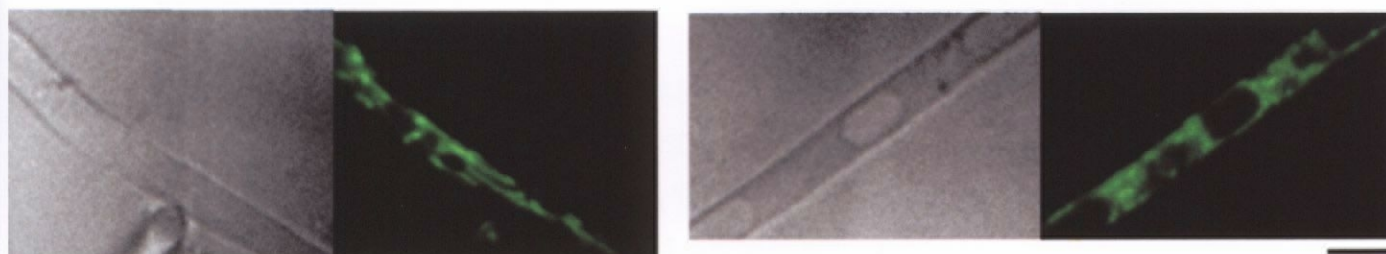
Fig. 4-1. Fluorescence micrographs of fusion proteins of various organelle markers with EGFP

A. oryzae strains expressing a peroxisomal marker EGFP-PTS1, a mitochondrial marker AoCit1-EGFP, and a nuclear marker histone H2B-EGFP were inoculated in CD supplemented with 0.15% L-methionine and grown for either 24 (left) or 48 hrs (right). Bars represent 5 μ m.

a. EGFP-PTS1



b. AoCit1-EGFP



c. H2B-EGFP

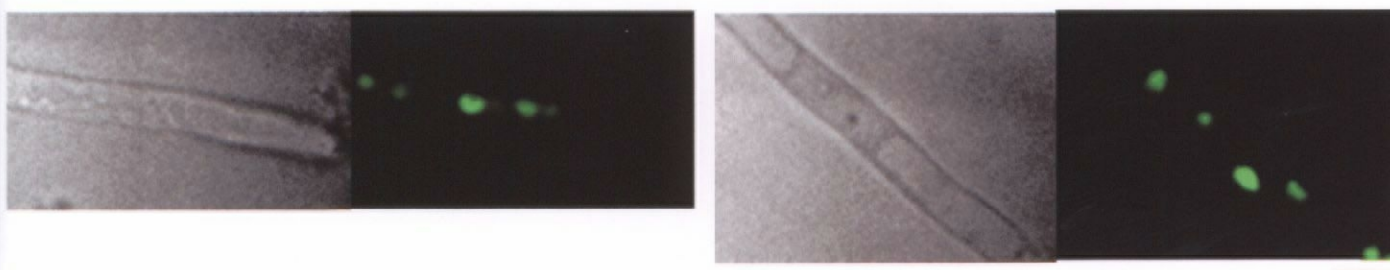


Fig. 4-2. Fluorescence micrographs of fusion proteins of various organelle markers with EGFP in Δ *Aoatg8* background

A. oryzae strains expressing a peroxisomal marker EGFP-PTS1, a mitochondrial marker AoCit1-EGFP, and a nuclear marker histone H2B-EGFP in Δ *Aoatg8* background were inoculated in CD supplemented with 0.15% L-methionine and grown for either 24 (left) or 48 hrs (right). Bars represent 5 μ m.

総合討論

本研究は、主に形態的側面から解析されてきた糸状菌の液胞を分子レベルから理解することを目的とし、その初めとして *PthiA* を用いた遺伝子の条件発現と EGFP-AoVam3p を用いた液胞膜の可視化という二つの実験系の確立を行った。

当初期待した様に、*PthiA* を用いることで生理的に大きな影響を与えることなく遺伝子の厳密な発現制御が可能となった。また基底レベルの発現が検出限界以下にまで低下することから、*PthiA* は *A. oryzae* において必須遺伝子の解析を行う際に、条件発現株作製のための唯一の選択肢となっている。また、融合タンパク質などの発現においても重要なツールである。さらに糸状菌のモデルである *A. nidulans* においても同様の制御を受け、適用可能であることが示唆された。このことから *PthiA* の開発が *A. oryzae* のみならず、糸状菌一般における分子生物学の進展に貢献できたのではないかと考えている。実際これまでに *A. nidulans* を扱う研究者からプラスミドや株の提供を要望されたことから、今後 *PthiA* を用いて糸状菌全般における遺伝子の機能解析が進むことを期待したい。

また EGFP-AoVam3p を用いた液胞膜観察系においても、*PthiA* を用いて作製した *Aovam3* 条件発現株を用いることによって、アーティファクトを含まない実験系であることが強く示唆されている。EGFP-AoVam3p は一部 late endosome/prevacuolar compartment 様構造にも局在したものの大半は液胞膜上に局在しており、従来の液胞内腔を可視化する系と比べて高解像度かつ簡便な液胞動態の観察が可能となった。一方で、糸状菌においては細胞染色の方法も、必ずしも確立していなかった。例えば FM4-64 に関してはアーティファクトを生じるという議論があり、CMAC は染色効率が悪かった。本研究では FM4-64 および CMAC による染色の検討を行い、効率的かつ細胞に悪影響を及ぼさない染色法を確立したことから、例えば AoVam3p の局在場所のような細部の議論が可能となった。これは画期的な成果ではないが、特に当研究室における *A. oryzae* の液胞研究においては極めて重要な貢献であったと考えている。このように EGFP-AoVam3p による液胞膜動態観察系と液胞染色系を確立したことが、チューブ状液胞形成時の液胞膜動態や基部菌糸における液胞膜の内在化、気中菌糸やガラス表面菌糸における液胞形態、Vam3p 相同タンパク質の液胞と late endosome/prevacuolar compartment 様構造への局在といった新規現象の発見につ

ながったと考えている。

液胞形態の詳細な解析から、Fig. 3-8 に示した様に菌糸体の部位により液胞が異なる役割を持つ可能性が示唆された。これは、基部の菌糸では細胞質成分のオートファジーによる分解とそれに伴う液胞の発達、液胞膜の内在化が起こり、分解産物がチューブ状液胞を介して菌糸の生長先端へと運ばれ、リサイクルされるというモデルである。このモデルの検証には、基部菌糸における細胞質成分の包括的な分解が起こっているか、またチューブ状液胞が実際に栄養輸送に関与し、特に栄養と接していない菌糸において先端生長を支えているかを明らかにする必要がある。後者の検証のためには、チューブ状液胞の消失が物質の動きと先端生長へ及ぼす影響を評価することが直接的である。ガラス表面や気中菌糸においてチューブ状液胞の頻度が増加したことを手がかりとして、チューブ状液胞の形成に関与する因子の探索を行ったが、炭素源、窒素源の枯渇(data not shown)や浸透圧(Fig. S-12)はチューブ状液胞の頻度に影響しなかった。また、チューブ状液胞の形成には dynamin 様 GTPase の関与が示唆されているが(Hyde et al., 2002)、*A. nidulans* において液胞形成に関与する dynamin である VpsAp の *A. oryzae* における高発現や、*Aovam3* の発現抑制もチューブ状液胞の頻度に影響しなかった(data not shown)。従ってチューブ状液胞の形成に関与する因子の探索と、それを利用したチューブ状液胞の生理的な役割の検証が今後の大きな課題である。対して当研究室で作製されてきた各種オルガネラのマーカタンパク質を用いることで、基部菌糸においてペルオキシソーム、ミトコンドリア、核の液胞への取り込みと分解が起こっていることが示唆された。これは当初予想した様に、菌糸密度が高くなって栄養を取得しにくくなった基部の菌糸が生命活動を最小限にとどめることで、個としての生存力を高めているのかもしれない。またこの過程で見出された核の取り込みは、特に興味深い現象である。出芽酵母においては核の一部の取り込みが知られているにすぎない(Roberts et al., 2003)。またゾウリムシにおいては、接合後の細胞において核が acid phosphatase 陽性かつ酸性の小胞状構造に囲まれ、それに伴って核の消失が起きることが知られている(Lu and Wolfe, 2001)が、実際に核が lysosome に取り込まれ分解されているのかどうかははっきりしていない。H2B-EGFP の液胞への取り込みに伴う核の挙動を解析することは、多核細胞の意義と液胞の役割に関する今後の理解のために重要であるとともに、生物全般でみても新規の知見をもたらす可能性を秘めている。

この研究を始めた5年前は、糸状菌の基礎研究において *A. oryzae* は極めて非正統派であり、*A. oryzae* を用いて基礎研究を行う意義があるのかという批判も受けていた。しかし特徴的な液胞形態など糸状菌全般でみても新規な知見と、気中菌糸における液胞構造など *A. oryzae* を用いたからこそ明らかになった知見を示すことで、本研究を通して液胞研究におけるモデルとしての *A. oryzae* を提示できたのではないかと思う。また、本研究では液胞形態の詳細な解析から見出された菌糸体部位による液胞機能の多様性という仮説を導き、当研究室で利用可能な実験材料を駆使することでその検証を進めることができた。これは逆遺伝学的アプローチで個々の遺伝子機能の断片的情報を得ることが主流だった *A. oryzae* の基礎研究において、現象から入るというアプローチが可能となったことを意味しているのかもしれない。

本研究において様々な実験系を確立し、それによって新規の知見を見出してきた。しかし菌糸部位による液胞機能の違いや基部菌糸における核の取り込みといった本当に興味深い仮説は、ようやく検証が進みつつあるという段階である。自分でここまで進めてきた研究であるので、自分の力である程度の決着がつくところまで突き詰めてみたいと考えている。

実験材料と方法

使用菌株

大腸菌組換えプラスミドの取得には *E. coli* DH5 α (*supE44*, Δ *lacU169* (Φ 80 *lacZ* Δ *M15*), *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*) を用いた。

出芽酵母の相補性試験においては BY4741 および BY4741 を親株とする Δ *vam3* 株 Y02362 (BY4741; *MAT a*; *his3 D1*; *leu2 D0*; *met15 D0*; *ura3 D0*; *YOR106w::kanMX4*)、 Δ *pep12* 株 Y01812 (BY4741; *MAT a*; *his3 D1*; *leu2 D0*; *met15 D0*; *ura3 D0*; *YOR036w::kanMX4*) (Brachmann et al., 1998) を用いた。

A. nidulans における *PthiA* の挙動解析には A89 株(*biA1*, *argB2*)および A89 株を *PthiA-egfp* と *argB* マーカーを含む plasmid pBATG により形質転換した ATG3, 4 株(*biA1*, *argB2*, (*PthiA-egfp*, *argB*))を用いた。

A. oryzae 使用菌株は Table 1 にまとめた。

使用培地

A. nidulans の培養には下記の培地を使用した。

MMglc+biotin (1 L あたり); 6.0 g NaNO₃, 0.52 g KCl, 1.52 g KH₂PO₄, 0.52 g MgSO₄·7H₂O, 20 g glucose, 1.0 ml Trace elements solution, 0.02 mg biotin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)

ただし Trace elements solution (1 L あたり); 22 g ZnSO₄·7H₂O, 11 g H₃BO₃, 5 g MnCl₂·4H₂O, 5 g FeSO₄·7H₂O, 1.6 g CoCl₂, 1.6 g CuSO₄·5H₂O, 1.1 g (NH₄)₂MoO₄·H₂O, 50 g EDTA

YG 培地; 0.5% Yeast extract, 1% glucose

A. oryzae の培養には下記の培地を使用した。

M 培地; 0.2% NH₄Cl, 0.1% (NH₄)₂SO₄, 0.05% KCl, 0.05% NaCl, 0.1% KH₂PO₄, 0.05% MgSO₄·7H₂O, 0.002% FeSO₄·7H₂O, 2% glucose, pH 5.5

CD 培地; 0.3% NaNO₃, 0.2% KCl, 0.1% KH₂PO₄, 0.05% MgSO₄·7H₂O, 0.002% FeSO₄·7H₂O, 2% glucose, pH 5.5

必要に応じて 0.15% L-Methionine を添加した。

DPY 培地; 2% dextrin, 1% polypeptone, 0.5% yeast extract, 0.5% KH₂PO₄, 0.05% MgSO₄·7H₂O

また、培地にチアミンを添加する場合は、Thiamine hydrochloride (Sigma) を特に記載がない場合 10 μ M の濃度でオートクレーブ後の培地に加えた。

S. cerevisiae の培養には下記の培地を使用した。

YPD 培地: 1% Yeast Extract, 2% Bacto peptone, 2% glucose

YPGal 培地: 1% Yeast Extract, 2% Bacto peptone, 2% galactose

SD 培地: 0.67% Yeast nitrogen base without amino acids, 2% glucose

E. coli の培養には下記の培地を使用した。

LB 培地: 1% Bacto Tryptone, 0.5% Yeast extract, 0.5% NaCl

遺伝子操作一般

Sambrook らの方法(Sambrook et al., 1989)に従った。試薬やキット類は説明書の指示に従って行った。

大腸菌のプラスミド回収はアルカリ-SDS 法により行った。

Polymerase Chain Reaction (PCR)は *Ex Taq* (TaKaRa Co., Kyoto, Japan)または *pyrobest* (TaKaRa)を polymerase として用い、下記のサイクルによって行った。

1. ゲノム DNA の乖離 (94°C, 5 min.)
2. DNA の乖離 (94°C, 30 sec.)
3. アニーリング (温度はプライマーによる, 30 sec.)
4. 伸長反応 (72°C, 時間は伸長する長さによる)
5. 冷却 (4°C, ∞)

上記 2. ~ 4. を 30 サイクル繰り返した。ただしプラスミドをテンプレートとする時は 1. のサイクルは省略した。また伸長時間は、ポリメラーゼの伸長速度が 1 kb/min. であるとして計算した。使用した primer とアニーリング温度は Table 2 にまとめた。

pyrobest を用いて増幅した産物は、必要に応じて T4 polynucleotide kinase (TaKaRa)により末端をリン酸化した。制限酵素処理を行った DNA 末端の脱リン酸化には Phosphatase, Alkaline (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany)を用いた。Ligation 操作は DNA 断片を GENE CLEAN II Kit (Funakoshi Co., Tokyo, Japan)により精製後、DNA ligation kit ver. 2.0 (TaKaRa)を用いて行った。DNA 断

片の末端平滑化には DNA blunting kit (TaKaRa)を用いた。

サザン解析は ECL direct nucleic acid labeling and detection system (Amersham Japan, Tokyo, Japan) を用いて行った。ノザン解析は AlkPhos direct labeling and detection system (Amersham) によって行った。

DNA 塩基配列の決定には DSQ-1000L (Shimadzu co., Kyoto, Japan) または ABI Prism™ 310NT genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いた。

使用プラスミド

1. pBNT-GFP (TPG 株の作製用)

RIB40 株のゲノム DNA をテンプレートとし、*thiA* pro.5'-*Sma*I, *thiA*pro.3'-*Xho*I をプライマーとして *pyrobest* を用いた PCR を行い、得られた約 1.3 kb の *PthiA* を含む断片の末端をリン酸化後、pBluescript II SK+ (Stratagene, La Jolla, CA, USA) の *EcoR* V 部位へ挿入、pBTHIII を得た。pBTHIII を *Sma* I で切断して得られた約 1.3 kb の断片を *amyB* ターミネーターを含む pBAT の *Sma* I 部位へ挿入、pBTPAT を得た。pUNA を *Hind* III で切断して得られた *niaD* 遺伝子を含む約 5.1 kb の断片を pBTPAT の *Hind* III 断片へ挿入し、pBNT を得た。pBEGFP-F を *EcoR* I で切断して得られた *egfp* を含む約 1.0 kb の断片を blunting 処理後、pBNT の *Sma* I 部位へ挿入、pBNT-GFP を得た。

2. pBATG (*A. nidulans* への *PthiA-egfp* 導入用)

pYARG (松田、修士論文) を *Bam*H I 処理し、得られた *argB* を含む 3.2 kb の断片を平滑末端化後、pBNT-GFP を *Hind* III 処理後に平滑末端化して得た *PthiA-egfp*, *amyB* terminator を含む約 4.5 kb の断片と ligation することで得た。

3. pYESVAM (*S. cerevisiae* における *Aovam3* cDNA 発現用)

A. oryzae cDNA をテンプレートとし、*vamC-N*, *vamC-C* プライマーを用いた PCR を行い、増幅された *Aovam3* cDNA を pT7 blue vector (EMD Science, San Diego, CA, USA) へ TA クローニングすることでプラスミド pTVAM を得た。pTVAM を *Bam*H I, *Sph* I で切断して得られた *Aovam3* cDNA を含む約 0.8 kb の断片を、*Gall* promoter を含む pYES2 の *Bam*H I, *Sph* I 部位へ挿入、pYESVAM を得た。

4. pUEGFP-VAM (*amyB* プロモーターからの *egfp-Aovam3* 融合遺伝子の発現用)

RIB40 cDNA をテンプレートとして *vam3BsrN*, *vam3BsrC* プライマーを用い PCR を行い、増幅された *Aovam3* cDNA を pT7 blue vector へ TA クローニングしてプラスミド pTVBSR を得た。pTVBSR を *BsrG* I で切断して得られた *Aovam3* cDNA を含む約 0.8 kb の断片を、*egfp* を含む pBEGFP-F の *BsrG* I 部位へ挿入し、pBEGFP-VAM を得た。pBEGFP-VAM を *Sma* I, *EcoR* V で切断して得られる *egfp-Aovam3* 融合遺伝子を含む約 1.8 kb の断片を *amyB promoter*, *amyB terminator*, *niaD* を含む pUNA の *Sma* I 部位に挿入し、pUEGFP-VAM を得た。

5. pUTPVsC (*Aovam3* 条件発現株作製用)

RIB40 株のゲノムをテンプレートとして P1,P2 プライマーを用いて PCR を行い、*Aovam3* を含む約 0.8 kb の増幅産物を pT7 blue vector へ TA クローニングして pTVAMS を得た。pTVAMS を *Sal* I で切断して得られた *Aovam3* を含む約 0.8 kb の断片を pBluescript II SK+ の *Sal* I 部位へと挿入、pBVOS を得た。ファージクローン由来の *Aovam3* 周辺約 4.5 kb の *Sal* I 断片を含む pBVAMS を *Sac* I で切断し、得られた *Aovam3* 3'隣接領域を含む約 1.5 kb の断片を pBVOS の *Sac* I 処理した後のベクターへ挿入、pBVOD を得た。前述の pBTHIII を *Xho* I で切断して得られた *PthiA* を含む約 1.3 kb の断片を pBVOD の *Xho* I 部位へと挿入、pBTHVOD を得た。pBVAMS を *Sma* I, *Xba* I で切断して得られた *Aovam3* 5'隣接領域を含む約 2.0 kb の断片を *A. nidulans sC* を含む pUSC の *Sma* I, *Xba* I 切断部位に挿入、pUSCSX を得た。pBTHVOD を *Sma* I で切断して得られた *PthiA*, *Aovam3*, *Aovam3* 3'隣接領域を含む約 3.8 kb の断片を pUSCSX の *EcoR* V 部位へ挿入、pUTPVsC を得た。

6. pBNVPEV (*Aovam3* promoter 下での EGFP-AoVam3p の発現用)

RIB40 株のゲノムをテンプレートとし、*vamCpro*. 5'-*EcoRV*, *vamCpro*. 3'-*EcoRV* をプライマーとして *pyrobest* による PCR を行い、得られた *Aovam3* promoter を含む約 1.3 kb の断片の末端をリン酸化後、pBluescript II SK+ の *EcoR* V 部位へと挿入、pBVPE を得た。pBVPE を *EcoR* V で切断して得られた *Aovam3* promoter を含む約 1.3 kb の断片を *egfp-Aovam3* を含む前述の pBEGFP-VAM の *EcoR* V 部位へ挿入、pBVPEV を得た。pUNA を *Hind* III で切断して得られた *niaD* を含む約 5.2 kb の断片を blunting 後、pBVPEV の *Sma* I 部位へ挿入、pBNVPEV

を得た。

7. pgNAVEN

RIB40 cDNA をテンプレートとし、Aovps23-5', Aovps23-CDT をプライマーとして *pyrobest* で PCR を行い、増幅された終止コドンを含まない Aovps23 を持つ約 1.8 kb の断片を pgEHH (Mabashi et al., 2006) を *Sma* I 処理することで得られた約 2.5 kb の断片へ導入し、pgEAV23 を得た。その後 pg5'aE, pgEAV23, pg3'E, DV1 を用いた LR 反応(Mabashi et al., 2006)を行い、*amyB* promoter 下に Aovps23-*egfp* 融合遺伝子を持ち、*amyB* terminator と *niaD* マーカーを有するプラスミド pgNAVEN を得た。

顕微鏡観察

18×18 mm のカバーガラス(Matsunami Glass Ind., Osaka, Japan)上の 100 μ l の CD, M または CD+0.15% L-methionine 培地に菌糸体または約 10^3 個の分生子を植菌後、20 hrs 程度 30°C で培養した後観察した。共焦点顕微鏡を用いた観察を行う場合はガラスボトムディッシュ(Asahi Techno Glass, Chiba, Japan)で同様の培養を行った。気中菌糸およびガラス表面菌糸の観察には、22 mm×22 mm のカバーガラス(Asahi Techno Glass)上においた約 1 cm×1 cm×10 mm (縦×横×高さ)の 2% agar を含む CD 培地の側面に分生子を植菌後、22 mm×22 mm カバーガラスを培地上にのせた。これを湿らせたキムワイプを含むシャーレに入れ、30°C で 2-3 日培養した後、横方向に伸長した菌糸を倒立型顕微鏡で観察した。

観察には Olympus System Microscope Model BX52 (Olympus, Tokyo Japan)および IX71 倒立型顕微鏡(Olympus)を用いた。対物レンズは UplanApo 100× または 40× objective lens (1.35 numerical aperture, Olympus)を用いた。EGFP 蛍光または CFDA 蛍光観察時には GFP filter (495/20 nm excitation, 510 nm dichroic, 530/35 nm emission) (Chroma Technologies, Brattleboro, VM, USA) または U-MWIB filter cube (460–490 nm excitation, 505 nm dichroic, >515 nm emission, Olympus)を使用した。DsRed または FM4-64 蛍光観察時には DsRed filter (570/20 nm excitation, 590 nm dichroic, 630/60 nm emission, Chroma Technologies)を用いた。CMAC 蛍光の観察には BH-DMU ultraviolet excitation cube (330–385 nm excitation, 400 nm dichroic, >420 nm emission, Olympus)を用いた。顕微鏡写真の解析には MetaMorph software (Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA, USA) または IPlab software

(Scanalytics, Fairfax, VA, USA)を使用した。共焦点顕微鏡のレーザー発生器としては、Sapphire™ 488-20, 20 mW diode laser (Coherent, Santa Clara, CA, USA)を用いた。また共焦点顕微鏡には CSU21 confocal scanning system (Yokogawa Electronics, Tokyo, Japan), AP imager camera (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan), image intensifier unit (Hamamatsu Photonics)をあわせて用いた。

実体顕微鏡は Multi viewer system VB-S20 (Keyence, Osaka, Japan)を用いた。

CFDA (または Oregon Green 488)染色

培養後の 100 μ l カバーガラスカルチャーの培地を 50 mM Citrate-Na buffer (pH 3.0)と 10 μ M CFDA(Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA)または 20 μ g/ml Oregon Green 488 (Molecular Probes Inc.)を含む培地で置換後、30 min.室温でインキュベート。新しい培地で2回洗った後さらに 10 min.ほど室温で放置した後観察した。

CMAC 染色

培養後の 100 μ l カバーガラスカルチャーの培地を 10 μ M CMAC (Molecular Probes)を含む培地で置換後、30°C で 30 min.インキュベート。新しい培地で2回洗った後すみやかに観察した。

FM4-64 染色

培養後の 100 μ l カバーガラスカルチャーの培地を 8 μ M FM4-64 (Molecular Probes)を含む培地で置換後、30°C で 15 min.インキュベート。新しい培地で2回洗った後 30°C でさらに 5-15 min.培養後観察した。

CMAC と FM4-64 による共染色

カバーガラスカルチャーの培地を、10 μ M CMAC および 8 μ M FM4-64 を含む培地で置換、30°C で 15 min.培養。さらに培地を 10 μ M CMAC のみを含む培地で置換後、30°C で 15 min.培養。新しい培地で二回洗った後、顕微鏡観察に供した。

菌糸伸長速度の計測

ガラスボトムディッシュで培養したカルチャーを 8 μ M FM4-64 存在下 30°C で 15 min. 培養後、サーモプレート(Tokai Hit Co., Shizuoka, Japan) で 30°C に保温しつつ倒立型顕微鏡により観察した。対照として FM4-64 を添加していないカルチャーも同様に観察した。伸長方向 30 μ m ほどの間に他の菌糸がない菌糸先端を選び、0 min. および 10 min. における顕微鏡写真を撮影した。二つの写真を重ね合わせた後、それぞれの写真における菌糸先端間の距離を直線で近似し、スケールバーとの比較からその値を求めた。10 min. の間に直線的な伸長をしなかったものおよび上下方向へ伸びることで焦点からずれたものについては、データから除外した。

***S. cerevisiae* 形質転換**

リチウム法により行った。

***A. oryzae* 形質転換**

1. 100 ml の DPY に菌糸体を植菌し、30°C で 18 hrs 程度培養。
2. ミラクロス(EMD Science, San Diego, CA, USA)を用いて菌体を回収、滅菌水で洗浄。
3. 10 ml の Sol I (1% Yatalase (Takara), 0.6 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 50 mM maleate buffer (pH 5.5)) の入った L 字管に菌体を入れ、50 rpm, 30°C で 3 時間振とう。
4. プロトプラストをミラクロスで回収。
5. 等量の Sol II (1.2 M Sorbitol, 50 mM CaCl_2 , 35 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl (pH 7.5)) と混合し、遠心(2,000 rpm, 4°C, 8 min.)。
6. 5 ml Sol II で 2 回洗い。
7. プロトプラストを約 5×10^7 個/ml となるように Sol II に懸濁
8. 200 μ l のプロトプラスト懸濁液に DNA を 10 μ g/10 μ l 程度加え、30 分氷上に放置。
9. 250 μ l, 250 μ l, 850 μ l と段階的に Sol III (60% PEG4000, 50 mM CaCl_2 , 10 mM Tris-Cl (pH 7.5)) を加え混合、20 分室温で放置。
10. 5 ml の Sol II と混合した後遠心(2,000 rpm, 4°C, 8 min)、沈澱を 500 μ l の Sol II に懸濁。
11. 48°C で保温しておいた上層培地 (1.2 M Sorbitol, 0.8% agar 入りの選択培地) を 5 ml 加え、下層培地 (1.2 M Sorbitol, 1.5 % agar 入りの選択培地) に重層。

12. 形質転換体は4-5日後くらいに植え継ぐ。その後3-5回選択培地に植え継ぐことでホモカリオン体を取得。

A. nidulans 形質転換

1. 100 ml の YG に菌糸体を植菌し、30°C で 18 hrs 程度培養。
2. ミラクロスを用いて菌体を回収、滅菌水で洗浄。
3. 10 ml の酵素液 (5 mg/ml Yatalase (Takara), 0.3 mg/ml Lysing enzyme (Sigma), 0.8 M NaCl, 10 mM Na Phosphate buffer (pH 6.0)) の入った L 字管に菌体を入れ、50 rpm, 30°C で 3 時間振とう。
4. プロトプラストをミラクロスで回収。
5. 等量の STC buffer (1.0 M Sorbitol, 50 mM CaCl₂, 10 mM Tris-Cl (pH 7.5)) と混合し、遠心(2,000 rpm, 4°C, 8 min.)。
6. 5 ml STC buffer で 2 回洗い。
7. プロトプラストを約 5×10^7 個/ml となるように STC buffer に懸濁
7. 200 μ l のプロトプラスト懸濁液に DNA を 10 μ g/10 μ l 程度と 50 μ l PEG 溶液 (25% PEG 6000, 50 mM CaCl₂, 10 mM Tris-Cl (pH 7.5))を加え、20 分氷上に放置。
8. 2 ml PEG 溶液を加え混合、5 分室温で放置。
9. 遠心(2,000 rpm, 4°C, 8 min)し、沈澱を 500 μ l の STC buffer に懸濁。
10. 48°C で保温しておいた上層培地 (1.2 M Sorbitol, 0.8% agar 入りの選択培地) を 5 ml 加え、下層培地 (1.2 M Sorbitol, 1.5 % agar 入りの選択培地) に重層。
11. 形質転換体は4-5日後くらいに植え継ぐ。その後2-3回選択培地に植え継ぐことで形質を安定化。

マイクロプレートリーダーによる菌糸体蛍光の測定

96 穴マイクロプレート(Asahi Techno glass)の 1 ウェルあたり 200 μ l の M 培地を入れ、約 10^6 個の分生子を植菌した。このマイクロプレートを 30°C で振とう培養し、2 時間ごとに Tecan Spectrofluorometer FP-6500 (JASCO Co., Tokyo, Japan)を用い、励起波長 488 nm、吸収波長 510 nm の条件で EGFP 蛍光を測定した。

A. oryzae RNA 回収法

1. 100 ml 培地に *A. oryzae* の分生子を 10^5 - 10^6 程度植菌し、30°C で培養。

2. 菌糸体をブフナー漏斗で集菌。液体窒素で凍結させ、乳鉢、乳棒またはマルチビーズショッカー(2,500 rpm, 30 sec)を用いて破碎。
3. 0.04 g の菌体を 1 ml Isogen (Nippon Gene, Toyama, Japan)に懸濁。5 min.室温で放置。
4. 0.2 ml のクロロホルムを加え、vortex した後遠心(15,000 rpm, 4°C, 15 min.)。
5. 上層に 500 µl 2-プロパノールを加え、攪拌後 10 min.室温で放置。その後遠心(15,000 rpm, 4°C, 10 min.)。
6. 沈殿を 70% エタノールで洗い、遠心(15,000 rpm, 4°C, 5 min.)。
7. 沈殿を 40 µl の ddW に溶解。
8. 回収した RNA は吸光度測定 and/or 泳動により、分解の有無を確認。
9. 必要に応じて OligotexTM-dT30 <super> mRNA Purification Kit (TaKaRa)を用いて mRNA の精製を行った。

定量的 RT-PCR

100 ng の mRNA を Expand Reverse Transcriptase (Roche)を用いて逆転写し、cDNA を取得。得られた cDNA 溶液 2 µl を鋳型とし、LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche) および Light Cycler Quick System 330 (Roche)を用いて PCR を行った。PCR のサイクルは 95 °C 60 sec で酵素の活性化と cDNA の乖離を行った後、95 °C 15 sec, 52 °C 5 sec, 72 °C 50 sec, 84 °C での蛍光測定からなるサイクルを 45 回行った。得られたデータは、同時に定量した γ -actin をコードする遺伝子の発現量に対して標準化した。

A. *oryzae* 染色体 DNA 抽出法 (large scale)

1. 100 ml DPY に菌糸体または分生子を植菌後、30°C で 24 hrs 程度培養
2. 菌体をブフナー漏斗で集菌。液体窒素で凍結させ、乳鉢、乳棒で破碎。
3. 菌体を 10 ml の Sol I (50 mM EDTA (pH 8.0) , 0.5% SDS, 0.1mg/ml proteinase K) に懸濁後、50°C、60 rpm で 3 時間振とう。
4. 10 ml の PCI (50% phenol, 48% chloroform, 2% isoamylalcohol)を加え、vortex をかけた後遠心(3,500 rpm, 4°C, 15 min.)。
5. 上層に等量の 2-プロパノールを加え、攪拌、遠心(3,500 rpm, 4°C, 10 min.)。
6. 沈殿を 4 ml 程度の TE に溶解後、10 mg/ml ribonuclease A (Sigma)溶液を 10 µl 添加し、30°C で 30 min.インキュベート。

7. 4 ml PCI を加え、vortex をかけた後遠心(3,500 rpm, 4°C, 10 min.)。
8. 上層に 4 ml の CI (96% chloroform, 4% isoamylalcohol)を加え、vortex をかけた後遠心(3,500 rpm, 4°C, 5 min.)。
9. 上層に 10 ml 100% エタノールを加え、攪拌後遠心(3,500 rpm, 4°C, 10 min.)。
10. 沈殿を 70% エタノール洗った後、遠心(3,500 rpm, 4°C, 5 min.)。
11. 沈殿に 1 ml ddw を加え、しばらく放置して溶解させる。

A. oryzae からの染色体 DNA の取得 (PCR 用)

1. 10 ml DPY に菌糸体を植菌、30°C で 24 hrs 程度培養
2. 菌糸体をミラクロスを用いて集菌。スパーテルで軽く押すことで、菌糸体から余分な水をのぞく。
3. 0.1 g の菌体を、マルチビーズショッカー用 2 ml チューブに移した後液体窒素で凍結。
4. マルチビーズショッカー (Yasui Kikai, Osaka, Japan) を用い、メタルコーンで 2,500 rpm, 30 sec.-1 min.菌体を破碎。
5. 400 µl の Sol I (50 mM EDTA (pH 8.0) , 0.5% SDS, 0.1mg/ml proteinase K (Roche)) を加え、50°Cで 30 分インキュベート
6. 400 µl の PCI を加え、vortex。遠心(15,000 rpm, 4°C, 5 min.)。
7. 上層に 1 ml 100%エタノールを加え、攪拌後遠心(15,000 rpm, 4°C, 10 min.)。
8. 沈殿を 100 µl ddw に溶解し、このうち 0.5 µl を 20 µl スケールの PCR 反応のテンプレートとして使用。

Table 1. Genotypes of strains used for this study

Name	Parental strain	Genotype	Source or plasmid
RIB40		wild type	
niaD300	RIB40	<i>niaD</i>	
NS4	niaD300	<i>niaD</i> , <i>sC</i>	
NSR13	NS4	<i>niaD</i> , <i>sC</i> , <i>adeA</i>	Jin et al., 2005
TPG1, 4	niaD300	<i>niaD</i> ::(<i>niaD</i> , <i>PthiA-egfp</i>)	pBNT-GFP
TPVII118	NS4	<i>niaD</i> , <i>sC</i> , Δ <i>Aovam3</i> ::(<i>PthiA-Aovam3</i> , <i>sC</i>)	pUTPVsC
UEV1	niaD300	<i>niaD</i> ::(<i>PamyB-egfp-Aovam3</i> , <i>niaD</i>)	pUEGFP-VAM
TPVEV1	TPVII118	<i>niaD</i> ::(<i>PAovam3-egfp-Aovam3</i> , <i>niaD</i>), <i>sC</i> , Δ <i>Aovam3</i> ::(<i>PthiA-Aovam3</i> , <i>sC</i>)	pBNPVEV
TPVEV4	TPVII118	<i>niaD</i> ::(<i>PAovam3-egfp-Aovam3</i> , <i>niaD</i>), <i>sC</i> , Δ <i>Aovam3</i> ::(<i>PthiA-Aovam3</i> , <i>sC</i>)	pBNPVEV
NAVEN	niaD300	<i>niaD</i> , (<i>PamyB-Aovps23-egfp</i> , <i>niaD</i>)	pgNAVEN
NAGCp	niaD300	<i>niaD</i> , (<i>PamyB-egfp-pts1</i> , <i>niaD</i>)	Minami et al., unpublished
ACEN	niaD300	<i>niaD</i> , (<i>PamyB-AoCit1-egfp</i> , <i>niaD</i>)	Mabashi et al., 2006
NHG10	niaD300	<i>niaD</i> ::(<i>Ph2b-h2b-egfp</i> , <i>niaD</i>)	Maruyama et al., 2001
Δ Aoatg8-1-1	NSR13	<i>niaD</i> , <i>sC</i> , <i>adeA</i> , Δ <i>Aoatg8</i> :: <i>adeA</i>	Kikuma et al., 2006
DA8EP	Δ Aoatg8-1-1	<i>niaD</i> , (<i>PamyB-egfp-pts1</i> , <i>niaD</i>), <i>sC</i> , <i>adeA</i> , Δ <i>Aoatg8</i> :: <i>adeA</i>	pUNAGCp (Minami et al., unpublished)
DA8AE	Δ Aoatg8-1-1	<i>niaD</i> , (<i>PamyB-AoCit1-egfp</i> , <i>niaD</i>), <i>sC</i> , <i>adeA</i> , Δ <i>Aoatg8</i> :: <i>adeA</i>	pgACEN (Mabashi et al., 2006)
DA8HE	Δ Aoatg8-1-1	<i>niaD</i> , (<i>Ph2b-h2b-egfp</i> , <i>niaD</i>), <i>sC</i> , <i>adeA</i> , Δ <i>Aoatg8</i> :: <i>adeA</i>	pNH2BG (Maryuama et al., 2001)

TPVII118 is an *Aovam3* conditional expression mutant in which the entire *Aovam3* coding sequence is replaced by *A. nidulans sC* and *A. oryzae thiA* promoter followed by *Aovam3* cDNA.

Table 2. Primers used for this study

Name	Target	Sequence	Annealing temperature
thiA-pro. 5'-SmaI	<i>PthiA</i>	5'- <u>CCC GGG</u> TTC GGT AAA TAC ACT ATC ACA-3'	48°C
thiA-pro. 3'-XhoI	<i>PthiA</i>	5'- <u>CTC GAG</u> GTT TCA AGT TGC AAT GAC TAT-3'	48°C
PthiA N-5'	<i>PthiA</i>	5'-AACCAACCGACAATTCATTGC-3'	52°C
PthiA S-3'	<i>PthiA</i>	5'-AAATACACTCCTCGATTAGCC-3'	52°C
egfp-M3'	<i>egfp</i>	5'-TGTAGTTGTACTCCAGCTTGT-3'	52°C
EGFP 5'-EcoRI	<i>egfp</i>	5'-ATC <u>GAAATTC</u> GATCCCATGGTGAG-3'	52°C
EGFP 3'-EcoRI	<i>egfp</i>	5'-TC <u>GAAATTC</u> GTACAGCTCGTCCAT-3'	52°C
actin-5'	<i>actin</i>	5'-GTTGCTGCTCTCGTCATTGAC-3'	52°C
actin-3'	<i>actin</i>	5'-GTAATCGGTCAAATCACGGCC-3'	52°C
vamC-N	<i>Aovam3</i>	5'-CAT GTA TTT CGA CCG TCT TAG-3'	54°C
vamC-C	<i>Aovam3</i>	5'-TTA TCC AAT AGT AGC CGC CAG-3'	54°C
P1	<i>Aovam3</i>	5'-GGT CGA CAT GTC TTT CGA CCG TCT T-3'	54°C
P2	<i>Aovam3</i>	5'-GGT CGA CTC ATG AGA GAG AAT AGA TAG T-3'	54°C
vam3 Bsr N	<i>Aovam3</i>	5'-CTG TAC ATG TAT TTC GAC CGT CTT AGT-3'	54°C
vam3 Bsr C	<i>Aovam3</i>	5'-TGT ACA T TA TCC AAT AGT AGC CGC CAG-3'	54°C
vamCpro. 5'-EcoRV	<i>Aovam3</i> promoter	5'-GAT ATC GTC CTG GAG GAG CCG CGG CAG-3'	54°C
vamCpro. 3'-EcoRV	<i>Aovam3</i> promoter	5'-GAT ATC GGT GGG CGA TGC GAC GCA GCG-3'	54°C
Aovps23-5'	<i>Aovps23</i>	5'-ATG GCG ACG GTG CCG CA-3'	58°C
Aovps23-CDT	<i>Aovps23</i>	5'-GAT TTG ATG TTC CTC AAG ACC CAT G-3'	58°C

Red letters indicate initiation or termination codons.

Underlines represent incorporated restriction sites.

参考文献

- Adams, T. H., Wieser, J. K., Yu, J. H., 1998. Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 35-54.
- Ashford, A. E., 1998. Dynamic pleiomorphic vacuole systems: Are they endosomes and transport compartments in fungal hyphae? *Adv. Bot. Res.* **28**, 119-159.
- Babst, M., Wendland, B., Estepa, E. J., Emr, S. D., 1998. The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal endosome function. *EMBO J.* **17**, 2982-93.
- Babst, M., Katzmann, D. J., Snyder, W. B., Wendland, B., Emr, S. D., 2002a. Endosome-associated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body. *Dev Cell* **3**, 283-9.
- Babst, M., Katzmann, D. J., Estepa-Sabal, E. J., Meerloo, T., Emr, S. D., 2002b. Escrt-III: an endosome-associated heterooligomeric protein complex required for MVB sorting. *Dev Cell* **3**, 271-82.
- Bankaitis, V. A., Johnson, L. M., Emr, S. D., 1986. Isolation of yeast mutants defective in protein targeting to the vacuole. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **83**, 9075-9.
- Becherer, K. A., Rieder, S. E., Emr, S. D., Jones, E. W., 1996. Novel syntaxin homologue, Pep12p, required for the sorting of luminal hydrolases to the lysosome-like vacuole in yeast. *Mol. Biol. Cell* **7**, 579-94.
- Bowers, K., Stevens, T. H., 2005. Protein transport from the late Golgi to the vacuole in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* **1744**, 438-54.
- Brachmann, C. B., Davies, A., Cost, G. J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P., Boeke, J. D., 1998. Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications.

Yeast **14**, 115-32

Cole, L., Orlovich, D. A., Ashford, A. E., 1998. Structure, function, and motility of vacuoles in filamentous fungi. *Fungal Genet. Biol.* **24**, 86–100.

Cole, L., Hyde, G. J., Ashford A. E., 1997. Uptake and compartmentalisation of fluorescent probes by *Pisolithus tinctorius* hyphae: evidence for an anion transport mechanism at the tonoplast but not for fluid-phase endocytosis. *Protoplasma* **199**, 18–29.

Darrah, P. R., Tlalka, M., Ashford, A., Watkinson, S. C., Fricker, M. D., 2006. The vacuole system is a significant intracellular pathway for longitudinal solute transport in basidiomycete fungi. *Eukaryot. Cell* **5**, 1111-25.

Darsow, T., Rieder, S. E., Emr, S. D., 1997. A multispecificity syntaxin homologue, Vam3p, essential for autophagic and biosynthetic protein transport to the vacuole. *J. Cell Biol.* **138**, 517-29.

Darsow, T., Burd, C. G., Emr, S. D., 1998. Acidic di-leucine motif essential for AP-3-dependent sorting and restriction of the functional specificity of the vam3p vacuolar t-SNARE. *J. Cell Biol.* **142**, 913-922.

de Jong, J. C., McCormack, B. J., Smirnov, N., Talbot, N. J., 1997. Glycerol generates turgor in rice blast. *Nature* **389**, 244-245

Dolan, L., Davies, J., 2004. Cell expansion in roots. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**:33–39.

Farré, J. C., Subramani, S., 2004. Peroxisome turnover by micropexophagy: an autophagy-related process. *Trends Cell Biol.* **14**, 515-23.

Felenbok, B., Flipphi, M., and Nikolaev, I., 2001. Ethanol catabolism in *Aspergillus nidulans*: a model system for studying gene regulation. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **69**, 149-204.

Fischer-Parton, S., Parton, R. M., Hickey, P. C., Dijksterhuis, J., Atkinson, H. A., Read, N. D., 2000. Confocal microscopy of FM4-64 as a tool for analysing endocytosis and vesicle trafficking in living fungal hyphae. *J. Microsc.* **198**, 246-59.

Galagan, J. E., Calvo, S. E., Cuomo, C., Ma, L. J., Wortman, J. R., Batzoglou, S., Lee, S. I., Basturkmen, M., Spevak, C. C., Clutterbuck, J., Kapitonov, V., Jurka, J., Scazzocchio, C., Farman, M., Butler, J., Purcell, S., Harris, S., Braus, G. H., Draht, O., Busch, S., D'Enfert, C., Bouchier, C., Goldman, G. H., Bell-Pedersen, D., Griffiths-Jones, S., Doonan, J. H., Yu, J., Vienken, K., Pain, A., Freitag, M., Selker, E. U., Archer, D. B., Penalva, M. A., Oakley, B. R., Momany, M., Tanaka, T., Kumagai, T., Asai, K., Machida, M., Nierman, W. C., Denning, D. W., Caddick, M., Hynes, M., Paoletti, M., Fischer, R., Miller, B., Dyer, P., Sachs, M. S., Osmani, S. A., Birren, B. W., 2005. Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature* **438**, 1105-15.

Götte, M., Gallwitz, D., 1997. High expression of the yeast syntaxin-related Vam3 protein suppresses the protein transport defects of a *pep12* null mutant. *FEBS Lett.* **411**, 48-52.

Gouka, R. J., Punt, P. J., van den Hondel, C. A., 1997. Efficient production of secreted proteins by *Aspergillus*: progress, limitations and prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **47**, 1-11.

Gupta, G. D., Heath, I. B., 2002. Predicting the distribution, conservation, and functions of SNAREs and related proteins in fungi. *Fungal Genet. Biol.* **36**, 1-21.

Hicks, G. R., Rojo, E., Hong, S., Carter, D. G., Raikhel, N. V., 2004. Geminating pollen has tubular vacuoles, displays highly dynamic vacuole biogenesis, and requires VACUOLESS1 for proper function. *Plant Physiol.* **134**, 1227-39.

Hyde, G. J., Davies, D., Cole, L., Ashford, A. E., 2002. Regulators of GTP-binding proteins cause morphological changes in the vacuole system of the filamentous fungus,

Pisolithus tinctorius. *Cell Motil. Cytoskeleton* **51**, 133-46.

Hutchins, M. U., Veenhuis, M., Klionsky, D. J., 1999. Peroxisome degradation in *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on machinery of macroautophagy and the Cvt pathway. *J. Cell Sci.* **112**, 4079-87.

Ichimura, Y., Kirisako, T., Takao, T., Satomi, Y., Shimonishi, Y., Ishihara, N., Mizushima, N., Tanida, I., Kominami, E., Ohsumi, M., Noda, T., Ohsumi, Y., 2000. A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature* **408**, 488-92.

Ishi, K., Maruyama, J., Juvvadi, P. R., Nakajima, H., Kitamoto, K., 2005. Visualizing nuclear migration during conidiophore development in *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus oryzae*: multinucleation of conidia occurs through direct migration of plural nuclei from phialides and confers greater viability and early germination in *Aspergillus oryzae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **69**, 747-54.

Jin, F. J., Maruyama, J., Juvvadi, P. R., Arioka, M., Kitamoto, K., 2004. Adenine auxotrophic mutants of *Aspergillus oryzae*: development of a novel transformation system with triple auxotrophic hosts. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**, 656-62.

Katzmann, D. J., Babst, M., Emr, S. D., 2001. Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell* **106**, 145-55.

Kikuma, T., Ohneda, M., Arioka, M., Kitamoto, K., 2006. Functional analysis of the ATG8 homologue *Aoatg8* and role of autophagy in differentiation and germination in *Aspergillus oryzae*. *Eukaryot. Cell* **5**, 1328-36.

Kirisako, T., Ichimura, Y., Okada, H., Kabeya, Y., Mizushima, N., Yoshimori, T., Ohsumi, M., Takao, T., Noda, T., Ohsumi, Y., 1999. The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *J. Cell Biol.* **151**, 263-76.

Kissov, I., Deffieu, M., Manon, S., Camougrand, N., 2004. Uth1p is involved in the autophagic degradation of mitochondria. *J. Biol. Chem.* **279**, 39068-74.

Klionsky, D. J., Herman, P. K., Emr, S. D., 1990. The fungal vacuole: Composition, function, and biogenesis. *Microbiol. Rev.* **54** (3), 266-292.

Klionsky, D. J., Ohsumi, Y., 1999. Vacuolar import of proteins and organelles from the cytoplasm. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **15**, 1-32.

Kubodera, T., Yamashita, N., and Nishimura, A., 2000. Pyrithiamine resistance gene (*ptrA*) of *Aspergillus oryzae*: cloning, characterization and application as a dominant selectable marker for transformation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**, 1416-1421.

Kubodera, T., Watanabe, M., Yoshiuchi, K., Yamashita, N., Nishimura, A., Nakai, S., Gomi, K., and Hanamoto, H., 2003. Thiamine-regulated gene expression of *Aspergillus oryzae thiA* requires splicing of the intron containing a riboswitch-like domain in the 5'-UTR. *FEBS Lett.* **555**, 516-520.

Kutsuna, N., Hasezawa, S., 2002. Dynamic organization of vacuolar and microtubule structures during cell cycle progression in synchronized tobacco BY-2 cells. *Plant Cell Physiol.* **43**, 965-73.

Lu, E., Wolfe, J., 2001. Lysosomal enzymes in the macronucleus of *Tetrahymena* during its apoptosis-like degradation. *Cell Death Differ.* **8**, 289-97.

Mabashi, Y., Kikuma, T., Maruyama, J., Arioka, M., Kitamoto, K., 2006. Development of a versatile expression plasmid construction system for *Aspergillus oryzae* and its application to visualization of mitochondria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **70**, 1882-9.

Machida, M., Asai, K., Sano, M., Tanaka, T., Kumagai, T., Terai, G., Kusumoto, K., Arima, T., Akita, O., Kashiwagi, Y., Abe, K., Gomi, K., Horiuchi, H., Kitamoto, K., Kobayashi, T., Takeuchi, M., Denning, D. W., Galagan, J. E., Nierman, W. C., Yu, J.,

Archer, D. B., Bennett, J. W., Bhatnagar, D., Cleveland, T. E., Fedorova, N. D., Gotoh, O., Horikawa, H., Hosoyama, A., Ichinomiya, M., Igarashi, R., Iwashita, K., Juvvadi, P. R., Kato, M., Kato, Y., Kin, T., Kokubun, A., Maeda, H., Maeyama, N., Maruyama, J., Nagasaki, H., Nakajima, T., Oda, K., Okada, K., Paulsen, I., Sakamoto, K., Sawano, T., Takahashi, M., Takase, K., Terabayashi, Y., Wortman, J. R., Yamada, O., Yamagata, Y., Anazawa, H., Hata, Y., Koide, Y., Komori, T., Koyama, Y., Minetoki, T., Suharnan, S., Tanaka, A., Isono, K., Kuhara, S., Ogasawara, N., Kikuchi, H., 2005. Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature* **438**, 1157-61.

Maheshwari, R., 2005. Nuclear behavior in fungal hyphae. *FEMS Microbiol. Lett.* **249**, 7-14.

Maruyama, J., Nakajima, H., Kitamoto, K., 2001. Visualization of nuclei in *Aspergillus oryzae* with EGFP and analysis of the number of nuclei in each conidium by FACS. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65**, 1504-10.

Masai, K., Maruyama, J., Sakamoto, K., Nakajima, H., Akita, O., Kitamoto, K., 2006. Square-plate culture method allows detection of differential gene expression and screening of novel, region-specific genes in *Aspergillus oryzae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **71**, 881-91.

Maundrell, K., 1993. Thiamine-repressible expression vectors pREP and pRIP for fission yeast. *Gene* **123**, 127-30.

Miranda-Ríos, J., Navarro, M., Soberón, M., 2001. A conserved RNA structure (*thi* box) is involved in regulation of thiamin biosynthetic gene expression in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 9736-41.

Monastryska, I., Sjollem, K., van der Klei, I. J., Kiel, J. A., Veenhuis, M., 2004. Microautophagy and macropexophagy may occur simultaneously in *Hansenula polymorpha*. *FEBS Lett.* **568**, 135-8.

Ohneda, M., Arioka, M., Nakajima, H., Kitamoto, K., 2002. Visualization of vacuoles

in *Aspergillus oryzae* by expression of CPY-EGFP. *Fungal Genet. Biol.* **37**, 29–38.

Ohsumi, K., Arioka, M., Nakajima, H., Kitamoto, K., 2002. Cloning and characterization of a gene (*avaA*) from *Aspergillus nidulans* encoding a small GTPase involved in vacuolar biogenesis. *Gene* **291**, 77–84.

Oka, M., Maruyama, J., Arioka, M., Nakajima, H., Kitamoto, K., 2004. Molecular cloning and functional characterization of *avaB*, a gene encoding Vam6p/Vps39p-like protein in *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiol. Lett.* **232**, 113–121.

Piper, R. C., Bryant, N. J., Stevens, T. H., 1997. The membrane protein alkaline phosphatase is delivered to the vacuole by a route that is distinct from the VPS-dependent pathway. *J. Cell Biol.* **138**, 531–45.

Prescianotto-Baschong, C., Riezman, H., 2002. Ordering of compartments in the yeast endocytic pathway. *Traffic* **3**, 37–49.

Punt, P. J., Strauss, J., Smit, R., Kinghorn, J. R., van den Hondel, C. A., and Scazzocchio, C., 1995. The intergenic region between the divergently transcribed *niiA* and *niaD* genes of *Aspergillus nidulans* contains multiple NirA binding sites which act bidirectionally. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 5688–5699.

Punt, P. J., van Biezen, N., Conesa, A., Albers, A., Mangnus, J., van den Hondel, C. A., 2002. Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production. *Trends Biotechnol.* **20**, 200–6.

Raymond, C. K., Howald-Stevenson, I., Vater, C. A., Stevens, T. H., 1992. Morphological classification of the yeast vacuolar protein sorting mutants: evidence for a prevacuolar compartment in class E *vps* mutants. *Mol. Biol. Cell* **3**, 1389–1402.

Read, N. D., Kalkman, E. R., 2003. Does endocytosis occur in fungal hyphae? *Fungal Genet. Biol.* **39**, 199–203.

Roberts, P., Moshitch-Moshkovitz, S., Kvam, E., O'Toole, E., Winey, M., Goldfarb, D. S., 2003. Piecemeal microautophagy of nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **14**, 129-41.

Robinson, J. S., Klionsky, D. J., Banta, L. M., Emr, S. D., 1988. Protein sorting in *Saccharomyces cerevisiae*: isolation of mutants defective in the delivery and processing of multiple vacuolar hydrolases. *Mol. Cell Biol.* **8**, 4936-48.

Rothman, J. E., Warren, G., 1994. Implications of the SNARE hypothesis for intracellular membrane topology and dynamics. *Curr. Biol.* **4**, 220-33.

Rothman, J. H., Stevens, T. H., 1986. Protein sorting in yeast: mutants defective in vacuole biogenesis mislocalize vacuolar proteins into the late secretory pathway. *Cell* **47**, 1041-51.

Rothman, J. H., Howald, I., Stevens, T. H., 1989. Characterization of genes required for protein sorting and vacuolar function in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **8**, 2057-65.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., 1989. Molecular cloning, second edition. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*

Schadeck, R. J., B. Leite, D. F. Buchi., 1998. Lipid mobilization and acid phosphatase activity in lytic compartments during conidium dormancy and appressorium formation of *Colletotrichum graminicola*. *Cell Struct. Funct.* **23**, 333-340.

Schadeck, R. J., Randi, M. A., Buchi, D. F., Leite, B., 2003. Vacuolar system of ungerminated *Colletotrichum graminicola* conidia: convergence of autophagic and endocytic pathways. *FEMS Microbiol. Lett.* **218**, 277-283.

Shepherd, V. A., Orlovich, D. A., Ashford, A. E., 1993. A dynamic continuum of pleiomorphic tubules and vacuoles in growing hyphae of a fungus. *J. Cell Sci.* **104**, 495-507.

Shepherd, V. A., Orlovich, D. A., Ashford, A. E., 1993. Cell-to-cell transport via motile tubules in growing hyphae of a fungus. *J. Cell Sci.* 105, 1173-8.

Shoji, J. Y., Arioka, M., Kitamoto, K., 2006a. Vacuolar membrane dynamics in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Eukaryot. Cell* 5, 411-21.

Shoji, J. Y., Arioka, M., Kitamoto, K., 2006b. Possible involvement of pleiomorphic vacuolar networks in nutrient recycling in filamentous fungi. *Autophagy* 2, 226-7.

Shoji, J. Y., Maruyama, J., Arioka, M., Kitamoto, K., 2005. Development of *Aspergillus oryzae thiA* promoter as a tool for molecular biological studies. *FEMS Microbiol. Lett.* 244, 41-6.

Som, T., and Kolaparthi, V. S., 1994. Developmental decisions in *Aspergillus nidulans* are modulated by Ras activity. *Mol. Cell. Biol.* 14, 5333-5348.

Srivastava, A., Jones, E. W., 1998. Pth1/Vam3p is the syntaxin homolog at the vacuolar membrane of *Saccharomyces cerevisiae* required for the delivery of vacuolar hydrolases. *Genetics* 1998 148, 85-98.

Sudarsan, N., Barrick, J. E., Breaker, R. R., 2003. Metabolite-binding RNA domains are present in the genes of eukaryotes. *RNA* 9, 644-7.

Tada, S., Gomi, K., Kitamoto, K., Takahashi, K., Tamura, G., and Hara, S., 1991. Construction of a fusion gene comprising the Taka-amylase A promoter and the *Escherichia coli* beta-glucuronidase gene and analysis of its expression in *Aspergillus oryzae*. *Mol. Gen. Genet.* 229, 301-306.

Talbot, N. J., 1997. Growing into the air. *Curr. Biol.* 7, 78-81.

Tarutani, Y., Ohsumi, K., Arioka, M., Nakajima, H., Kitamoto, K., 2001. Cloning and characterization of *Aspergillus nidulans vpsA* gene which is involved in vacuolar

biogenesis. *Gene* **268**, 23–30.

Tatsumi, A., Kikuma, T., Arioka, M., Kitamoto, K., 2006. *Aovps24*, a homologue of *VPS24*, is required for vacuolar formation which could maintain proper growth and development in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **347**, 970-8.

Torralba, S., Heath, I. B., 2002. Analysis of three separate probes suggests the absence of endocytosis in *Neurospora crassa* hyphae. *Fungal Genet. Biol.* **37**, 221–232.

Uemura, T., Yoshimura, S. H., Takeyasu, K., Sato, M. H., 2002. Vacuolar membrane dynamics revealed by GFP-AtVam3 fusion protein. *Genes Cells* **7**, 743-53.

Uetake, Y., Kojima, T., Ezawa, T., Saito, M., 2002. Extensive tubular vacuole system in an arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*. *New Phytol.* **154**, 761–768.

van den Hombergh, J. P., van de Vondervoort, P. J., Fraissinet-Tachet, L., Visser, J., 1997. *Aspergillus* as a host for heterologous protein production: the problem of proteases. *Trends Biotechnol.* **15**, 256-63.

Veneault-Fourrey, C., Barooah, M., Egan, M., Wakley, G., Talbot, N. J., 2006. Autophagic fungal cell death is necessary for infection by the rice blast fungus. *Science* **312**, 580-3.

Vida, T. A., Emr, S. D., 1995. A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast. *J. Cell Biol.* **128**, 779-92.

Wada, Y., Ohsumi, Y., Anraku, Y., 1992. Genes for directing vacuolar morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. I. Isolation and characterization of two classes of *vam* mutants. *J. Biol. Chem.* **267**, 18665-70.

Wada, Y., Nakamura, N., Ohsumi, Y., Hirata, A., 1997. Vam3p, a new member of syntaxin related protein, is required for vacuolar assembly in the yeast *Saccharomyces*

cerevisiae. *J. Cell Sci.* **110**, 1299-306.

Wang, L., Seeley, E. S., Wickner, W., Merz, A. J., 2002. Vacuole fusion at a ring of vertex docking sites leaves membrane fragments within the organelle. *Cell* **108**, 357-69.

Weber, R. W., Wakley, G. E., Thines, E., Talbot, N. J., 2001. The vacuole as central element of the lytic system and sink for lipid droplets in maturing appressoria of *Magnaporthe grisea*. *Protoplasma* **216**, 101-12.

Weisman, L. S., 2003. Yeast vacuole inheritance and dynamics. *Annu. Rev. Genet.* **37**, 435-60.

Winkler, W., Nahvi, A., Breaker, R. R., 2002. Thiamine derivatives bind messenger RNAs directly to regulate bacterial gene expression. *Nature* **419**, 952-6.

Witteveen, C. F., Visser, J., 1995. Polyol pools in *Aspergillus niger*. *FEMS Microbiol. Lett.* **134**, 57-62.

浅野 静, 修士論文, 2004

飯島 隆, 修士論文, 2002

倉都 将宏, 修士論文, 2006

田浦 綾子, 修士論文, 2006

辰巳 晶紀, 修士論文, 2007

樋口 裕次郎, 修士論文, 2007

The Difco Manual

Molecular Probes product information