

## 補遺

### 第一節 *Aovam3* 条件発現株の形質について

*Aovam3* の機能を調べるため、*Aovam3* 破壊株の作製を試みた。しかし NS4 または NSR13 株を親株とした約 600 株の形質転換体中に、目的の破壊株は見出されなかった。後述の条件発現株の形質を考慮すると、*Aovam3* が必須遺伝子であるとは考えにくい。クロマチン構造などに起因して、*Aovam3* 遺伝子座は組み換えが起こりにくいかもしれない。

そこで *PthiA* の支配下において *Aovam3* を条件発現する TPVII 株を作製した(Fig. S-4)。TPVII 株は抑制条件下(+thiamine)において気中菌糸を全く形成しないという形質を示すとともに(Fig. S-5)、浸透圧感受性を示した(Fig. S-6)。AoVam3p は液胞および late endosome/prevacuolar compartment の t-SNARE であると考えられるため、*Aovam3* の欠損により液胞形態に異常が出ることが予想された。しかし予想に反して、CFDA 染色(Fig. S-7)および CPY-EGFP、CMAC 染色(Fig. S-8)の結果、液胞形態は正常であった。またチューブ状液胞も観察された(data not shown)。さらに *Aovam3* 条件発現株が気中菌糸形成の欠損を示す寒天培地で生育させて実体顕微鏡による観察も行ったが、やはり液胞形態に変化は認められなかった。従って AoVam3p は液胞と late endosome/prevacuolar compartment 様構造に局在するにもかかわらず、そこで t-SNARE として働いているという確証は得られなかった。AoVam3p は液胞と late endosome/prevacuolar compartment の t-SNARE として働いているものの、AoVam3p の欠損時には他の t-SNARE が機能を一部代替できるのかもしれない。しかし *A. oryzae* において液胞膜に局在する syntaxin 様 t-SNARE は AoVam3p しか存在しない(倉都, 2006)ことから、*A. oryzae* における液胞形成機構は出芽酵母の知見からだけでは説明ができないようである。

*Aovam3* 条件発現株は気中菌糸形成に欠損を持つ。液胞は気中菌糸およびガラス表面菌糸において同様な形態をとることから、*Aovam3* 条件発現株がガラス表面菌糸を伸長できるか調べた。その結果、*Aovam3* は気中菌糸と同様ガラス表面菌糸もほとんど伸長できないことが分かった(Fig. S-9)。条件発現株の気中菌糸、ガラス表面菌糸の消失が液胞機能に関係したものは分からないが、気中菌糸とガラス表面菌糸は形成機構に共通の要素があることが示唆された。

## 第二節 液胞形態に関わる環境、分子的要因の探索

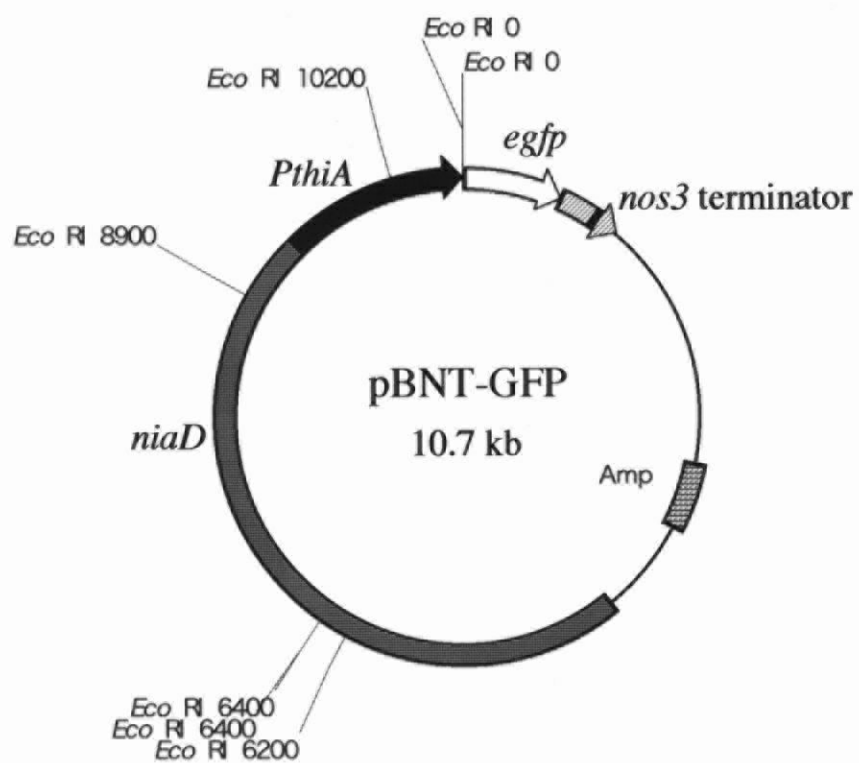
*A. oryzae* における液胞形態の詳細な解析から、Fig. 3-8 にみられるようなモデルが浮かび上がった。このモデルの解明には基部菌糸における細胞質成分の包括的な分解が起こっているか、またチューブ状液胞が実質的に栄養輸送に関わっているかを明らかにする必要がある。このうち後者の解析には、チューブ状液胞が消失する条件の発見と、それに伴う物質輸送、先端生長の変化を観察することが大事である。そこで *A. oryzae* においてチューブ状液胞を初めてする液胞形態に影響を与える環境的、分子的要因の探索を行った。

チューブ状液胞は気中菌糸およびガラス表面菌糸において発達している。また菌根菌 *Pisolithus tinctorius* においては GTP $\gamma$ S の存在下においてチューブ状液胞が増えることから、dynamin 様 GTPase がチューブ状液胞の形成に関与していることが示唆されている(Hyde et al., 2002)。これらを手がかりに探索を行った。

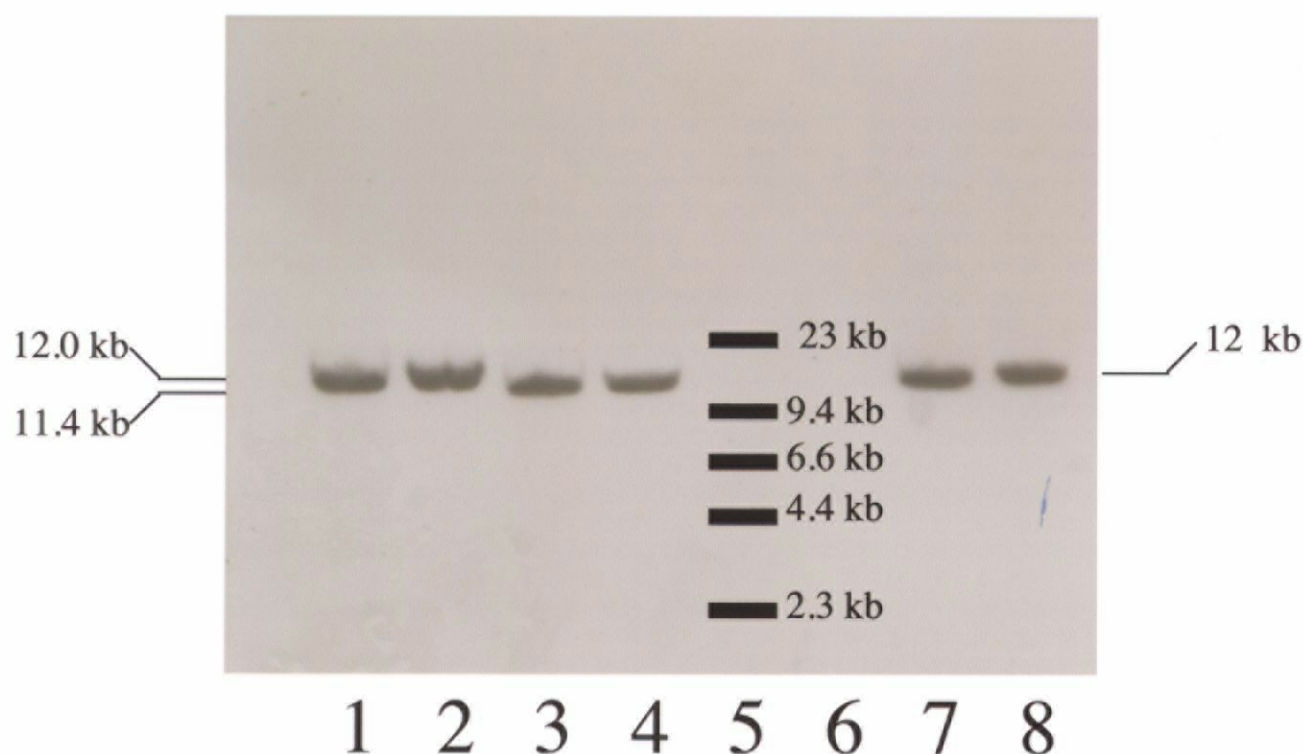
気中菌糸やガラス表面菌糸は栄養と直接接していないため、栄養枯渇の条件にあると考えられる。それゆえ主要な栄養である窒素、炭素源を枯渇させた液体培地中での液胞形態を観察したが、通常の状態と比較して大きな差異はみられなかった(data not shown)。また気中菌糸およびガラス表面菌糸は周囲に水分がなく、浸透圧が高い状態にあると考えられる。そこで 40%マルトースを含む培地における液胞形態を観察したところ、液胞はガラス表面菌糸でみられた様に小さく粒状になったものの、チューブ状液胞の頻度は変わらなかった(Fig. S-12)。従ってガラス表面菌糸の液胞形態は一部浸透圧によって制御されているものの、チューブ状液胞の形成はまた異なる機構によって制御されている可能性が示唆された。

また *A. nidulans* において液胞形成に関わる dynamin 様 GTPase VpsAp または AoVam3p を高発現しても、チューブ状液胞の頻度に大きな変化はなかった(data not shown)。この過程で、カルチャー中の気泡の近くに高い頻度でチューブ状液胞がみられるように感じられたが、チューブ状液胞の頻度はカルチャーごとに頻度が大きく変わるため、有意な差はえられていない。チューブ状液胞を含む液胞形態は菌糸の部位によって異なる。このためカルチャーごとに異なる菌糸の密度、生育フェイズ、空気と接している部位の割合などにより、液胞形態の頻度は容易に変化してしまうと思われる。従ってどのような液胞形態が

存在するかの観察は比較的容易でも、個々の液胞形態の頻度を計測するのは遥かに難易度が高い様に感じられた。今後液胞形態を劇的に変化させる要因の発見か、液胞形態の頻度を安定させられる培養方法の確立なくしては、液胞形態に影響を与える因子の理解は困難であると考えられる。



**Fig. S-1. The plasmid for the expression of *egfp* reporter under the control of *PthiA***



Lane 1: *Sal* I-digested NaE1 genomic DNA  
 Lane 2: *Sal* I-digested NaE2 genomic DNA  
 Lane 3: *Xba* I-digested NaE1 genomic DNA  
 Lane 4: *Xba* I-digested NaE2 genomic DNA  
 Lane 5:  $\lambda$  *Hind* III  
 Lane 6: 100 bp ladder  
 Lane 7: *Sal* I-digested TPG1 genomic DNA  
 Lane 8: *Sal* I-digested TPG4 genomic DNA

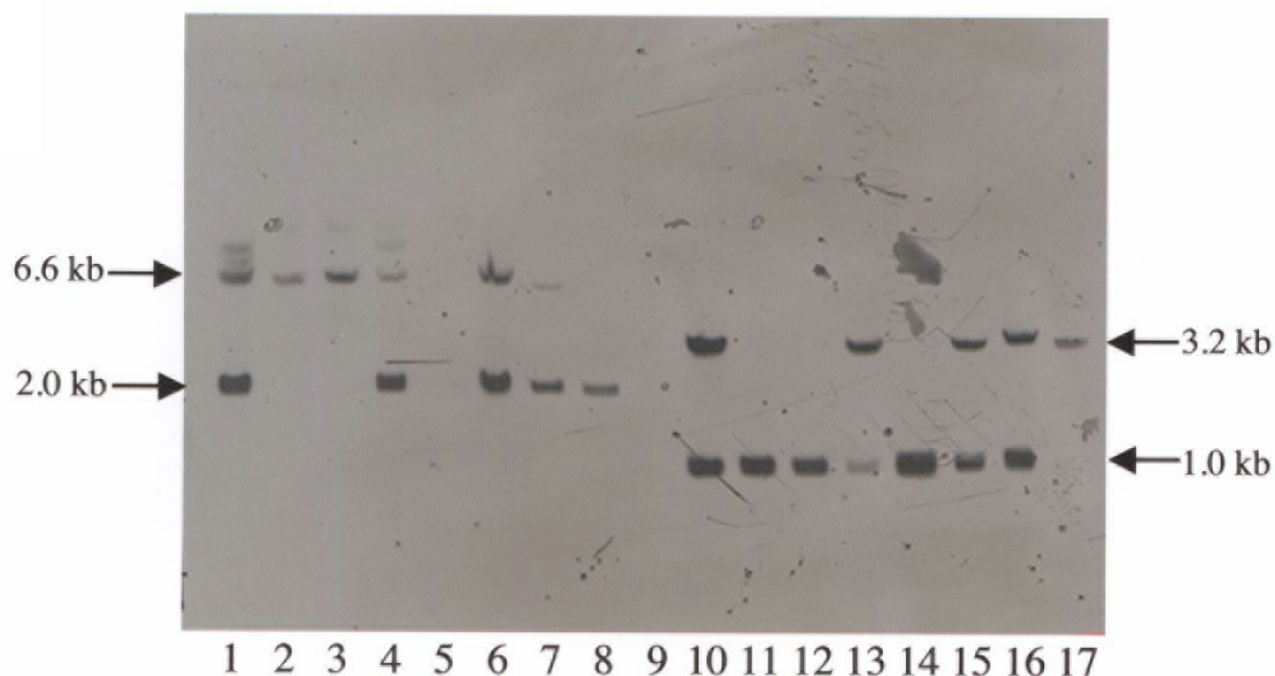
**Fig. S-2. Southern analysis of NaE and TPG transformants**

Genomic DNA of NaE strains was digested with either *Sal* I or *Xba* I. Genomic DNA of TPG strains was digested with *Sal* I. A 0.8 kb *egfp* fragment was used as a probe. If several copies of the plasmid were inserted into the *niaD* locus of the genome, an extra 10.7 kb and 10.1 kb signals should appear in NaE and TPG, respectively.

-664 gaattccacatgctccaatgggaaaccaagccataaaaactggcggaaggtgacattgtt  
 -604 aaccaccaattcgttcaaatgcagcatttccaagaatccgtcatttgaagtaaaaaaggg  
 -564 ttcttgctacttacaggacgacttatccccaatcaagaatgcgactaggtagcagacaag  
 -484 cagcgctaatagcagaagcatgaacgaagcgctcggtgcagcgctgaagtcaggatgcgcg  
 -424 atatggggcgggcgatagcagccataatgctagtccaatgggggactccaagatctct  
 -364 taggtagagaaggaatgaaaattcacagcatgatcagaactgctgcgcagtactattctt  
 -304 atatgocagaactaggaatcaagaggcaattogacgtatgagctgaacgggcaactgaa  
 -244 attccgagcagcgacggcagcatgcgaogataaaaatgaagctttttgggaaaagcatcaa  
 -184 aacacactagccacaacccggttggtcaggtgatggaccactagccacgcaccatattat  
 -124 tgcagcctgcaaataccggcgagaaacccaggtgacggcccgcgatccgcagggttgacgt  
 -64 ttcacccggcgccctcttcccaacactgttccattcatcgtcacgctgcgtgcacatcgcc  
 -4 caccATGTCTTTTCGACCGTCTTAGTCTCTAGAATCACAGCCTACTACCCTGCGTCGCTC  
     M S F D R L S S L E S Q P T T L R R S  
 56 CGACGATCCACAGTATCGAGATGATCCCGAGTTTACCAACTCACTGAGAGTCTTTTCGAA  
     D D P Q Y R D D P E F Y Q L T E S L S N  
 116 TCAGCTGTTTCAGCCTAACGTCGAACATCACCCGGCTATCGGACCAGATCGCGCTTCTAGG  
     Q L F S L T S N I T R L S D Q I A L L G  
 176 GACAAGGCGAGACACGGAACGAGTCCGTGAACGAGTTCACAATCTTTTAGAGCAGACTCG  
     T R R D T E R V R E R V H N L L E Q T R  
 236 TTCGGGGTTCAAGGGAGTAGGCGAAGGTATCAAGAAGGTGCAAGCATGGGAGGATGTTAA  
     S G F K G V G E G I K K V Q A W E D V N  
 296 TgtatgcgaataaagccaaactctatgtaacgcgctactgacattcattcgatagCCTTC  
     -----P S  
 356 TCAAAAATGGACACAGCAAAAGCTATCTTCAGAATTCAAGGCTACTCTGGATGAGTTCCA  
     Q K W T Q Q K L S S E F K A T L D E F Q  
 416 AACTGTCCAACGCCGGGCTTTGGAGAAGCAGCGCGCATCTGCTGTTGCTGCCCCGACCGC  
     T V Q R R A L E K Q R A S A V A A R T A  
 476 CGTGGAGAAGGTGAACAACAGCGGTTGAGGGAGCTACGCAAGAACAGCAACAGCTACT  
     V E E G E Q P A V E G A T Q E Q Q Q L L  
 536 TCAGGAACAGCCTCGACTTGCGAACCAGGATGAGGTGGACTTCCAAGAGTCTCTAATAAT  
     Q E Q P R L A N Q D E V D F Q E S L I I  
 596 TGAGCGCGAAGCAGAAAATTCGCAATATTGAGCAAAGCGTTGGCGAACTCAATGAGTTGTT  
     E R E A E I R N I E Q S V G E L N E L F  
 656 CCGCGATGTCGCCACATCGTTTCAGGAGCAAGGAGGCCAGCTCGATATAATCAGCGAGAA  
     R D V A H I V H E Q G G Q L D I I S E N  
 716 CGTTGAAAATGTTACCAACGACACCCGAGGAGCTAATGTTGAGCTCCGCGAGTGCCAGCAG  
     V E N V T N D T R G A N V E L R S A S R  
 776 ACATCAAAAAGAACGCCCGGAACAAGGCTTGCTGTCTGCTTGTCATCCTTGCCGTCATCCT  
     H Q K N A R N K A C C L L V I L A V I L  
 836 AACTATCATTTGTGCTGGCGGCTACTATTGGATAAgtoggttcagttacgccttaattcttt  
     T I I V L A A T I G \*  
 896 ccacctatcattcctagtctacttgattgttcattatggcggtcttctgttcattgatato  
 956 ctcttgatgcagttctatgtattgttatgaactatctattctctctcatgaotcattt  
 1016 tatgaccagcaggcgcatgcgaagtgagggaagtgtatcttcatttcgtccttctatcct  
 1076 tatttgttccttcttctaga  
 1136

**Fig. S-3. Nucleotide and deduced amino acid sequences of *A. oryzae* Aovam3 gene**  
 The blue box represents the polyA-attached site of cDNA sequence.





- Lane 1: *Pst* I digested TPVII25 genomic DNA  
 2: *Pst* I digested TPVII28 genomic DNA  
 3: *Pst* I digested TPVII48 genomic DNA  
 4: *Pst* I digested TPVII59 genomic DNA  
 5: *Pst* I digested TPVII118 genomic DNA  
 6: *Pst* I digested TPVII168 genomic DNA  
 7: *Pst* I digested TPVII185 genomic DNA  
 8: *Pst* I digested RIB40 genomic DNA  
 9: Marker  
 10: *Eco* RV and *Sal* I digested TPVII25 genomic DNA  
 11: *Eco* RV and *Sal* I digested TPVII28 genomic DNA  
 12: *Eco* RV and *Sal* I digested TPVII48 genomic DNA  
 13: *Eco* RV and *Sal* I digested TPVII59 genomic DNA  
 14: *Eco* RV and *Sal* I digested TPVII118 genomic DNA  
 15: *Eco* RV and *Sal* I digested TPVII168 genomic DNA  
 16: *Eco* RV and *Sal* I digested TPVII185 genomic DNA  
 17: *Eco* RV and *Sal* I digested RIB40 genomic DNA

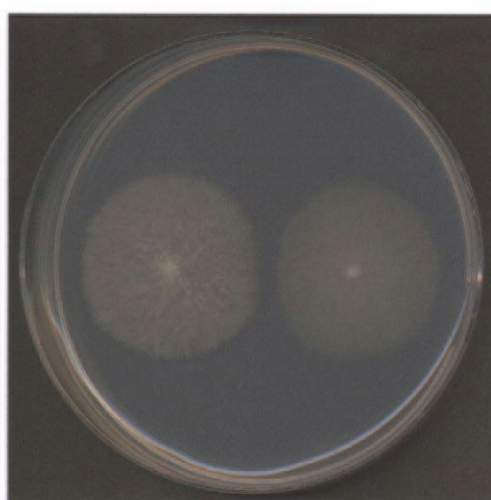
**Fig. S-4. Southern blotting of TPVII strains**

Genomic DNA of TPVII strains and RIB40 was digested with either *Pst* I (lanes 1~8) or *Eco* RV and *Sal* I (lanes 10~17). PCR-amplified 0.8 kb *Aovam3* fragment was used as a probe. The wild type *Aovam3* locus yields 2.0 kb and 3.2 kb signals by *Pst* I or *Eco* RV and *Sal* I digestion, respectively, while the substituted *Aovam3* locus yields 6.6 kb and 1.0 kb signals.

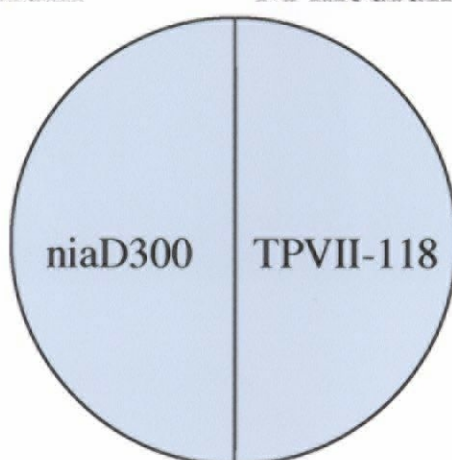
**a.**



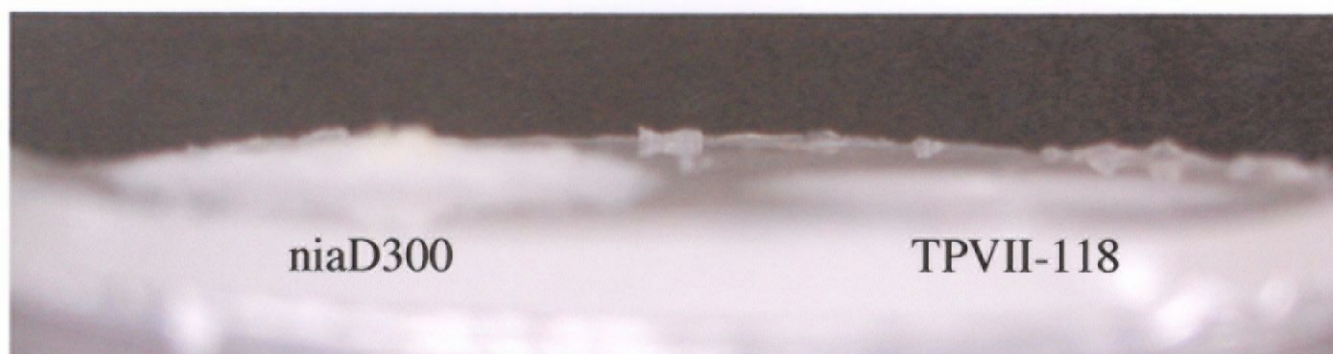
M medium



M medium + 10  $\mu$ M thiamine



**b.**

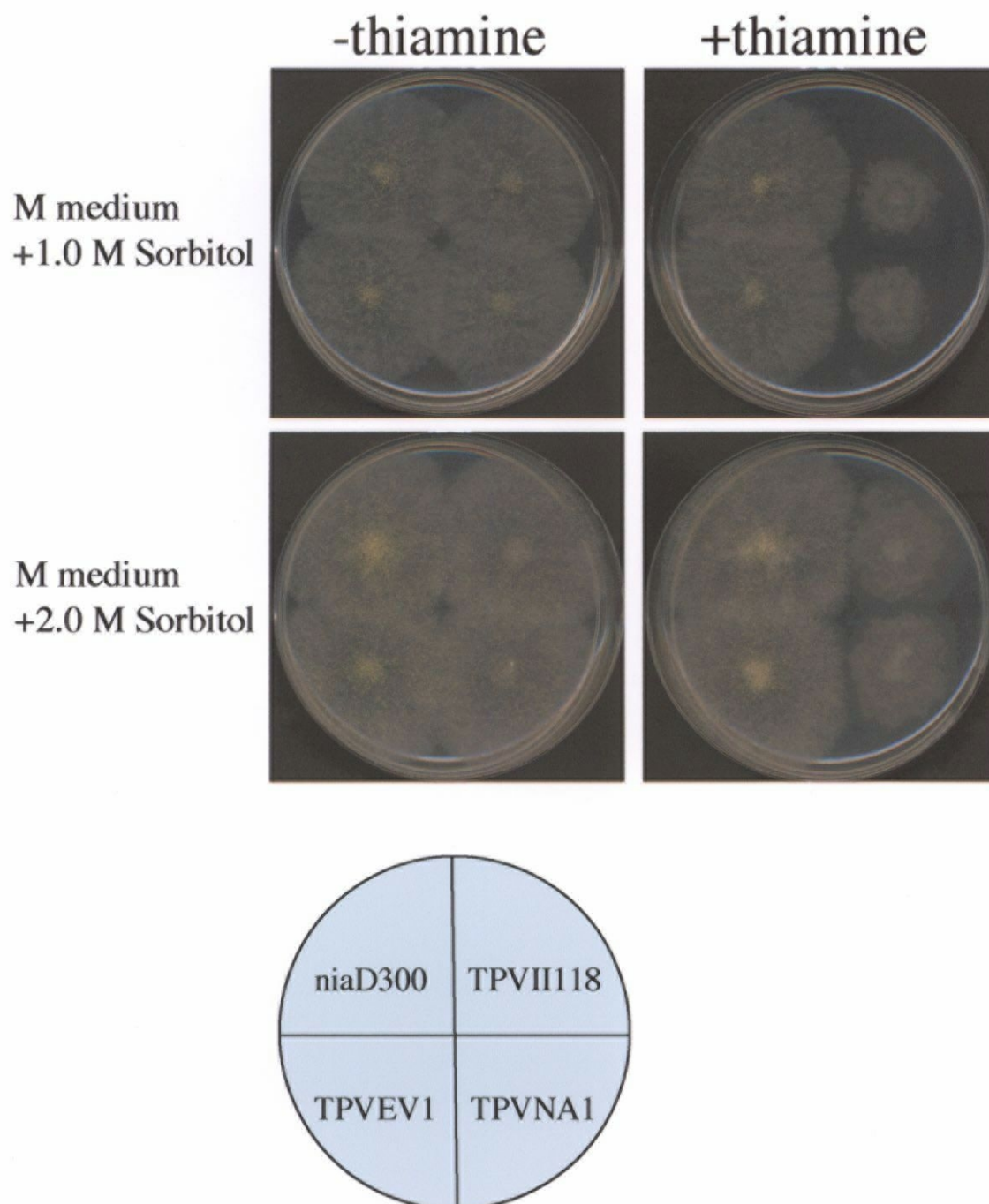


M medium + 10  $\mu$ M thiamine

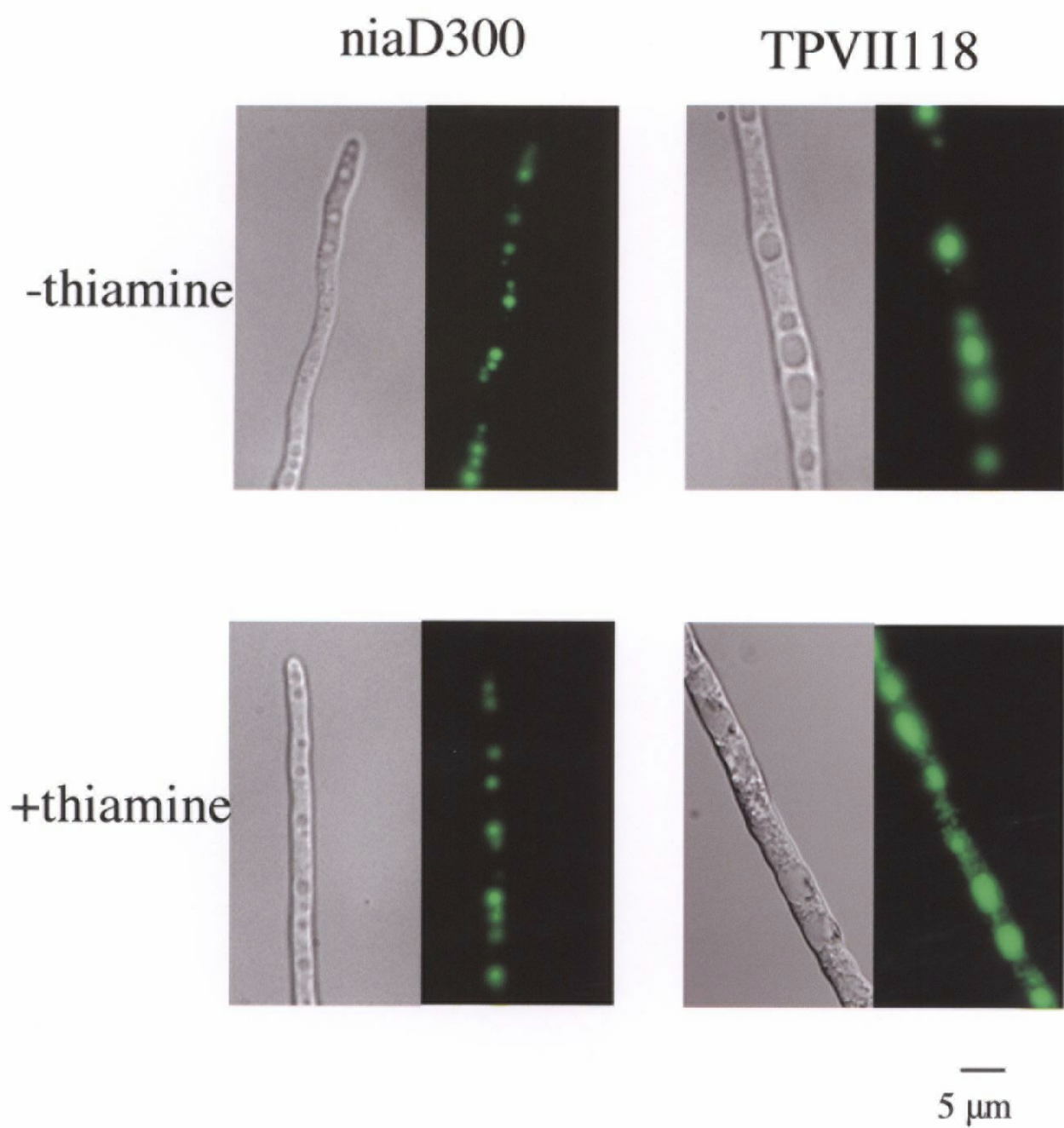
**Fig. S-5. Phenotype of *Aovam3* conditional expression strain**

*niaD300* and *Aovam3* conditional expression strain, TPVII-118, were grown on M medium or M medium containing 10  $\mu$ M thiamine for 4 days at 30°C. **a.** upper view **b.** side view

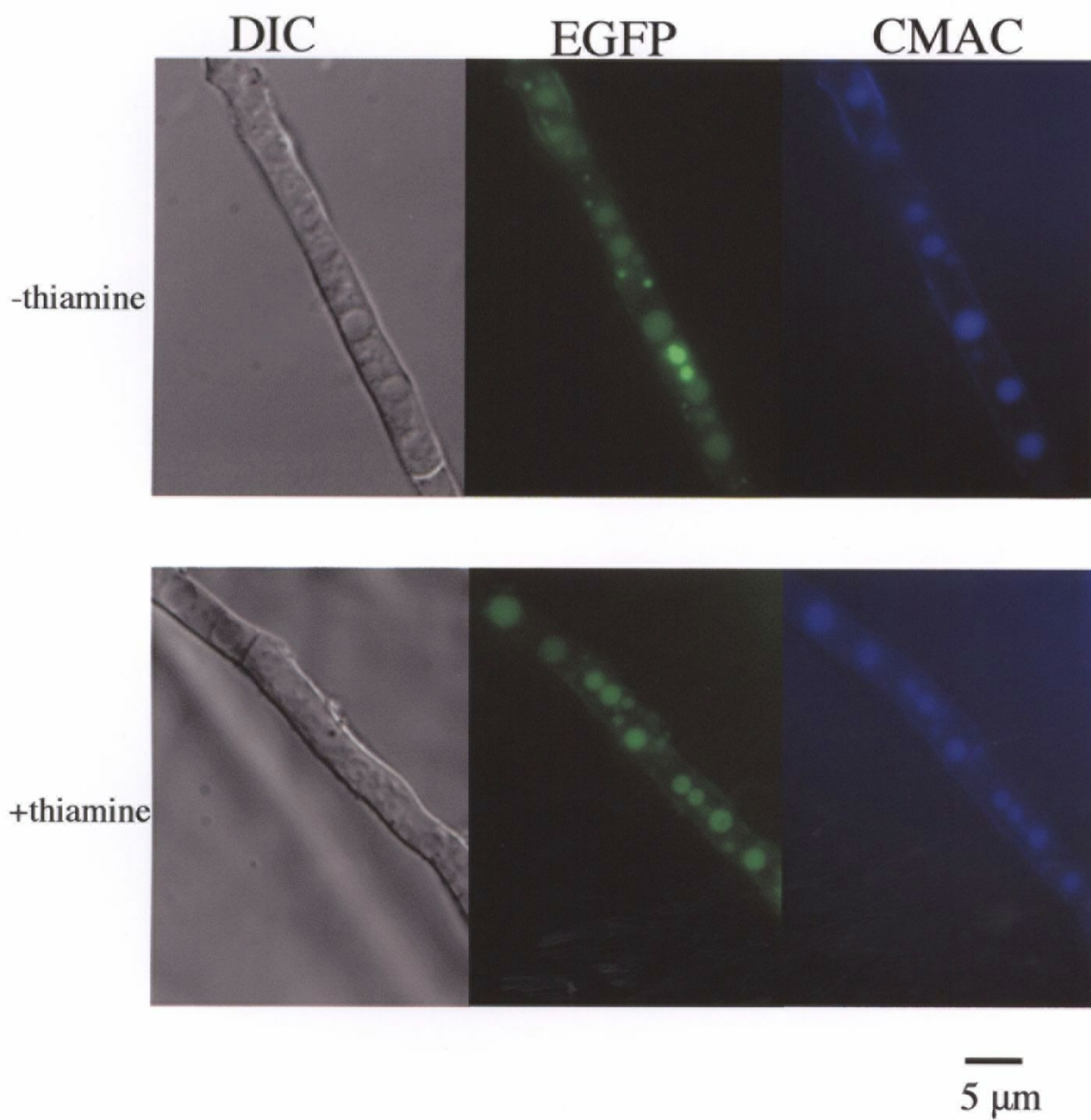




**Fig. S-6. Phenotype of TPVII and TPVEV in media containing sorbitol**

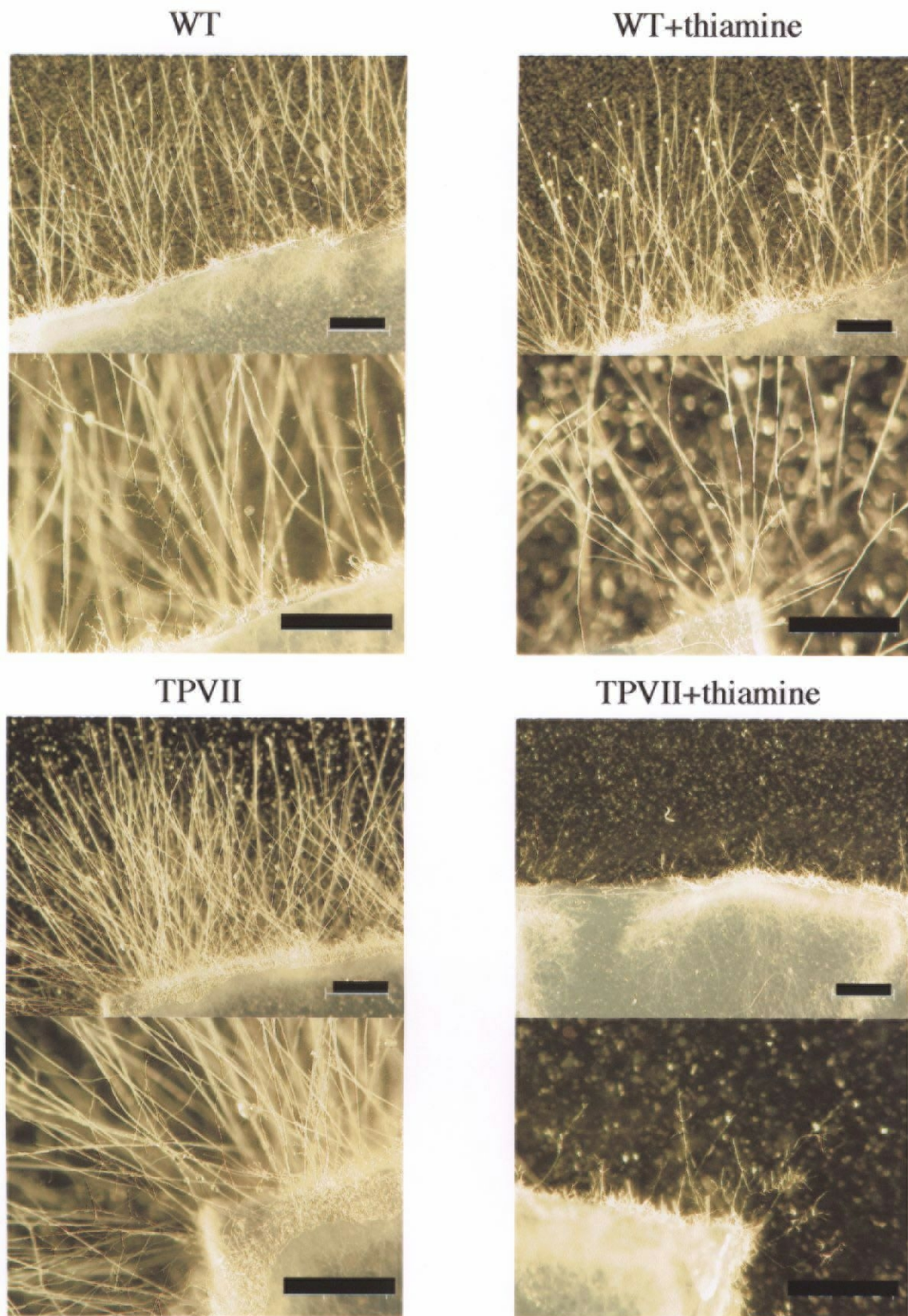


**Fig. S-7. CFDA staining of vacuoles**  
 left panels : niaD300  
 right panels : TPVII118



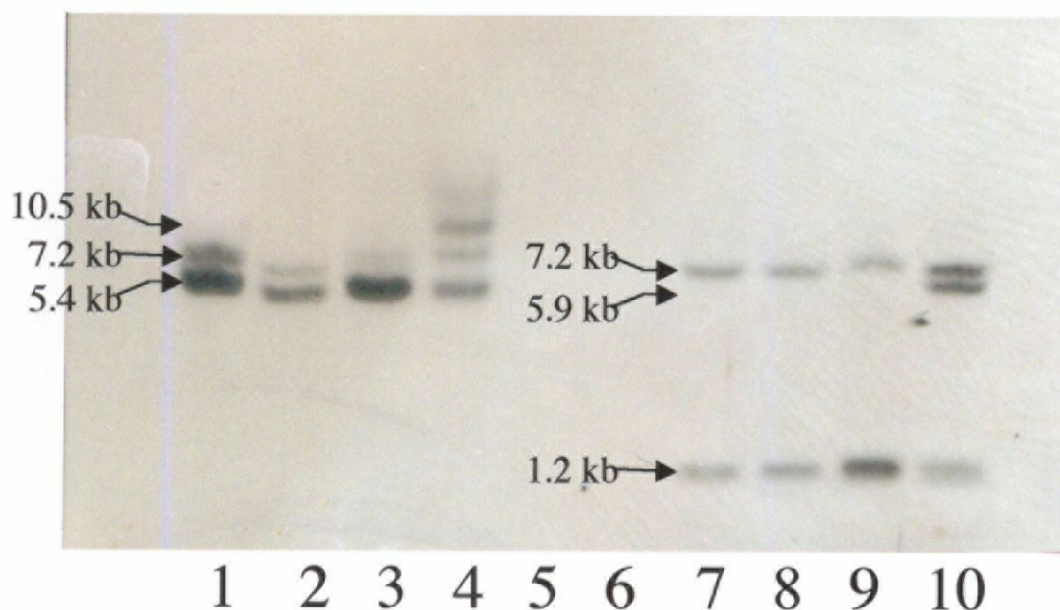
**Fig. S-8. Localization of CPY-EGFP fusion protein in vacuoles in TPVII118**





**Fig. S-9. Aerial hyphae and glass-surface hyphae in TPVII**

Mycelia were grown in either M medium or M medium containing 10  $\mu$ M thiamine (+thiamine). Lower panels represent magnified images. Bars represent 1 mm.

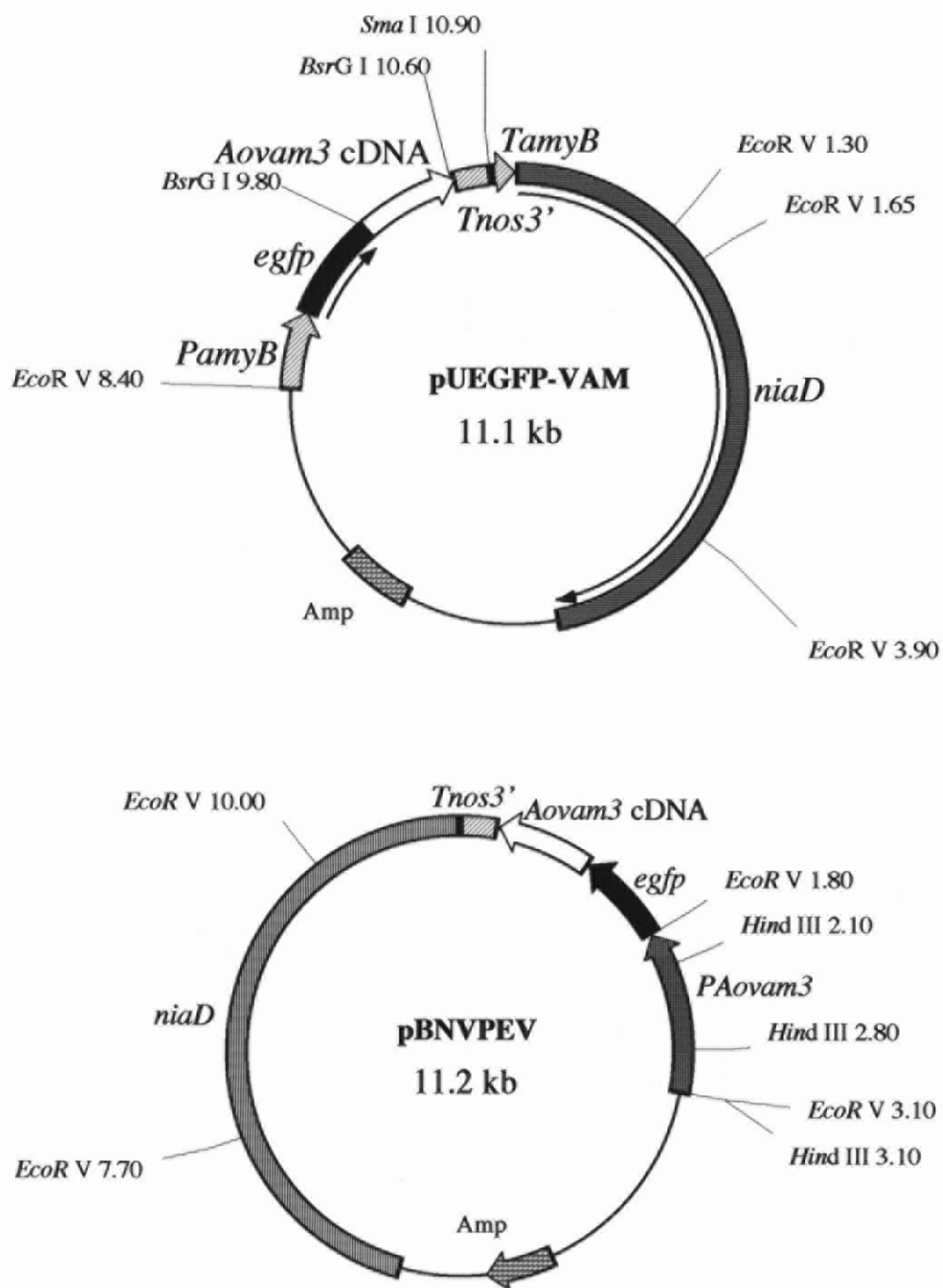


lane 1 : *Hind* III-digested TPVEV1 genomic DNA  
lane 2 : *Hind* III-digested TPVEV2 genomic DNA  
lane 3 : *Hind* III-digested TPVEV3 genomic DNA  
lane 4 : *Hind* III-digested TPVEV4 genomic DNA  
lane 5 :  $\lambda$  *Hind* III  
lane 6 : 100 bp DNA ladder  
lane 7 : *Xba* I-digested TPVEV1 genomic DNA  
lane 8 : *Xba* I-digested TPVEV2 genomic DNA  
lane 9 : *Xba* I-digested TPVEV3 genomic DNA  
lane 10: *Xba* I-digested TPVEV4 genomic DNA

**Fig. S-10. Southern analysis of TPVEV strains**

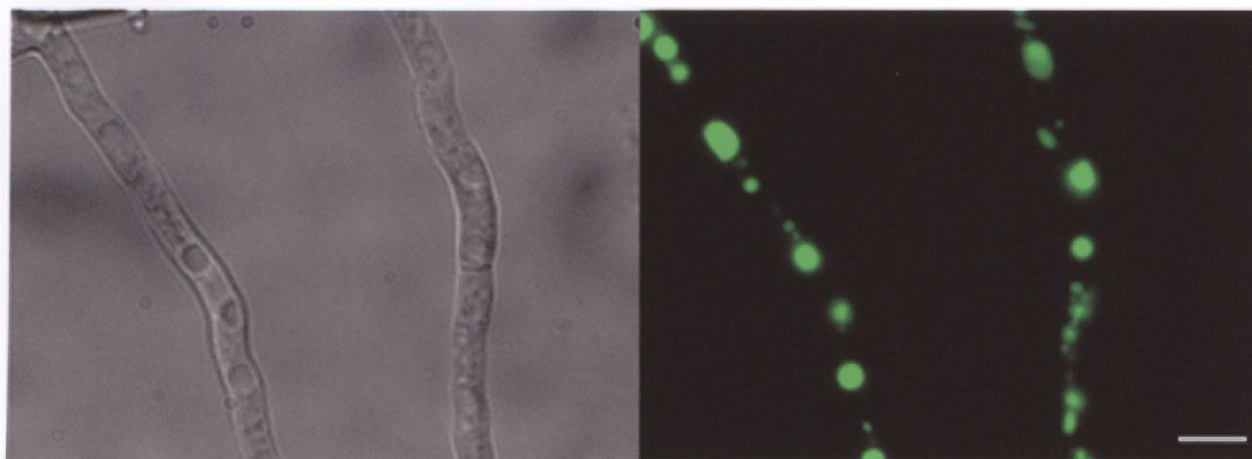
Genomic DNA of TPVEV strains was digested with either *Hind* III or *Xba* I. PCR-amplified 0.8 kb *Aovam3* fragment was used as a probe. 5.4 kb and 7.2 kb fragments with *Hind* III digestion and 1.2 kb and 7.2 kb fragments with *Xba* I digestion imply homologous integration of the plasmid at the *niaD* locus. Extra 10.5 kb and 5.9 kb fragments with *Hind* III or *Xba* I digestion, respectively, of TPVEV4 genomic DNA imply the integration of (an) additional copy(ies) of the plasmid at the *niaD* locus.



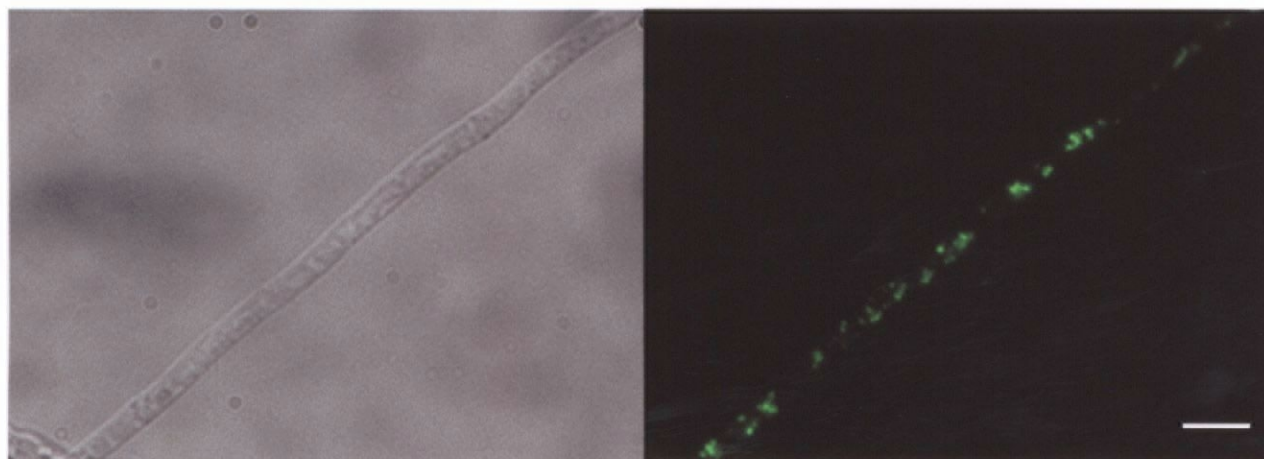


**Fig. S-11. Plasmids used for the expression of EGFP-AoVam3p fusion protein**

### RIB40 in CD



### RIB40 in CD+40% Maltose



**Fig. S-12. Oregon-Green-488-staining of vacuoles**

Mycelia were grown in either CD or CD+40% Maltose, and stained by Oregon Green 488. Large developed vacuoles were rather rare in the mycelium grown in CD+40% Maltose. Bars represent 5  $\mu\text{m}$ .

## 要旨

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。これらの研究における重要なタンパク質の一つが、液胞膜上の SNARE (soluble *N*-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor) タンパク質 Vam3p である。Vam3p は液胞への小胞輸送及び液胞同士の同型融合を仲介することで、液胞形成において中心的役割を果たす。また Vam3p および他の生物におけるその相同タンパク質は恒常的に液胞膜に存在することから、液胞のマーカータンパク質として、また液胞膜を可視化するために用いられている。

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が恒常的に存在することである。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。また菌根菌以外の糸状菌においても同様のチューブ状液胞が存在することが分かっているが、その生理的意義に関しても未解明のままである。つまり糸状菌の液胞に関しては興味深い現象が見いだされているにも関わらず、主に分子レベルでの解析の遅れから、液胞機能の大部分は未解明のままであった。

このような理由から、糸状菌における液胞機能の解明には、まず実験手法の充実を図ることが先決であると考えられた。そこで糸状菌 *Aspergillus oryzae* における VAM3 相同遺伝子 *Aovam3* を単離し、EGFP (enhanced green fluorescent protein) と AoVam3p の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。

### 1. *A. oryzae thiA* プロモーターによる発現の解析<sup>1)</sup>

*A. oryzae* において遺伝子の条件的発現による解析はこれまでなされていなかった。これに対し *A. nidulans* では、アルコールデヒドロゲナーゼをコードする *alcA* のプロモーターを用いた条件発現株作製が行われている。しかし *alcA* プロモーターのように、糸状菌にとって重要な栄養である炭素源を置換して制御しなくてはならないプロモーターは、本来遺伝子の条件制御において望ましくない。そこで炭素源に依存しないプロモーターの候補として、*A. oryzae* に

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 *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。実際当研究室において、複数の遺伝子の条件発現株が *PthiA* を用いて作製され、成功を収めている。

## 2. EGFP-AoVam3p 融合タンパク質の局在解析

*A. oryzae* において発現させた EGFP と AoVam3p の融合タンパク質(EGFP-AoVam3p)は主に液胞膜上に存在した。しかし液胞内腔を染色する CMAC を用いて EGFP-AoVam3p 発現株を染色すると、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、エンドサイトーシス経路を染色する FM4-64 によって染色された。これらの特徴は出芽酵母の class E vps 変異体における肥大した後期エンドソームと一致していることから、この構造体が糸状菌の後期エンドソーム構造であることが考えられる。従って EGFP-AoVam3p は液胞に加え、後期エンドソーム構造にも局在することが示唆された<sup>2)</sup>。出芽酵母においてはゴルジ体から液胞膜への小胞輸送において後期エンドソーム上の Pep12p 及び液胞膜上の Vam3p という二つの t-SNARE が必要である。*A. oryzae* を含む糸状菌においては Pep12p をコードする遺伝子が存在しないことから、AoVam3p が後期エンドソーム、液胞の両方に局在することによって Pep12p、Vam3p 両者の機能を果たしているのかもしれない。しかし *A. oryzae* においてこれまで後期エンドソームは厳密に定義されておらず、有効なマーカータンパク質も存在しない。そこで AoVam3p が実際に後期エンドソームにも局在するか調べるため、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。AoVps23p と EGFP の融合タンパク質は EGFP-AoVam3p 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。現在 EGFP-AoVam3p が同じ構造体に局在するか解明を行っている。

## 3. EGFP-AoVam3p を用いた *A. oryzae* 液胞形態の解析<sup>2)</sup>

共焦点レーザー顕微鏡を用いた観察を行うことにより、EGFP-AoVam3p が液胞の膜上に局在することがはっきりと観察できる。しかし 2 日乃至 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。これらの菌糸において、液胞は細胞の大半を占める程に発達していた。このことから、菌糸基部においては細胞質成分がオートファジーにより液胞内腔へ取り込まれ、それに伴って液胞膜も内腔へと取り込まれていることが示唆された。

さらに EGFP-AoVam3p による液胞観察系を利用し、様々な発達段階にある菌糸の液胞を観察した。分生子において液胞は小さな粒状構造として存在していたが、分生子の膨潤、発芽に伴って次第に大きく発達し、直径 5  $\mu\text{m}$  近くにまで達した。これは分生子発芽において、液胞が細胞の肥大化に必要な膨圧を提供するなど何らかの役割を担っている可能性を示唆している。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。

以上の結果を合わせて、糸状菌の液胞が菌糸の部位に応じて特化した役割を持っている可能性が考えられる。基底部の生長を停止した領域において、液胞は細胞質成分をオートファジーによって取り込み、分解する。分解産物である低分子化合物はチューブ状の液胞によって、菌糸の生長先端、特に栄養と直接接していない菌糸へと輸送される、というモデルを提案した。<sup>3)</sup>

#### 4. 菌糸基底部における細胞質成分、オルガネラの分解

上述のモデルの妥当性を検討するため、基部菌糸における細胞質成分の分解についてより詳細な解析を行った。当研究室で作製された、ヒストン H2B、ペルオキシソーム局在シグナル、クエン酸還元酵素にそれぞれ EGFP を融合して発現することで核、ペルオキシソーム、ミトコンドリアを可視化した株を用い、顕微鏡観察を行った。1 日培養の時点で EGFP 蛍光はそれぞれ核、ペルオキシソーム、ミトコンドリアに対応する丸い球状構造、粒状構造、チューブ状構造に局在していた。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。さらに EGFP は液胞内腔に拡散して観察されたことから、取り込まれたオルガネラが分解を受けていることも示唆された。

#### まとめ

糸状菌の液胞研究はこれまで、染色試薬などで液胞内腔を可視化し顕微鏡を用いた観



察を行うという方法で進展してきた。しかし EGFP-AoVam3p を用いた液胞観察系を確立させたことにより液胞膜の簡便で高解像度の観察が可能となり、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もたらされた。また従来の方法では観察できなかった気中菌糸などを観察できるようになったことから、糸状菌の液胞がこれまで考えられてき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、今後の研究の道筋を示したという点で大きな意義を持っていると考えている。また様々なオルガネラを可視化した株の利用など現在 *A. oryzae* において適用可能な系を駆使することで、糸状菌の液胞機能に関して提示したモデルの検証を十分行えることが分かった。本研究を草分けとして、今後液胞研究のモデル糸状菌としての *A. oryzae* が確立されることを期待したい。

#### 参考文献

- 1) Shoji, J. Y., et al., 2005. Development of *Aspergillus oryzae thiA* promoter as a tool for molecular biological studies. FEMS Microbiol. Lett., **244**(1):41-6
- 2) Shoji, J. Y., et al., 2006. Vacuolar membrane dynamics in the filamentous fungus, *Aspergillus oryzae*. Eukaryot. Cell, **5**(2):411-421
- 3) Shoji, J. Y., et al., 2006. Possible involvement of pleiomorphic vacuolar networks in nutrient recycling in filamentous fungi. Autophagy, **2**(3):226-227

## 発表論文一覧

Higuchi, Y., Nakahama, T., Shoji, J. Y., Arioka, M., Kitamoto, K., 2006. Visualization of the endocytic pathway in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae* using an EGFP-fused plasma membrane protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **340**, 784-91.

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.

正路 淳也, 樋口 裕次郎, 丸山 潤一, 2006. 麹菌を用いた糸状菌細胞生物学の進展 生物工学会誌, 84 巻, 9 号, 364-6.

## 謝辞

本研究を行うにあたってお世話になりました当研究室教授北本勝ひこ先生に感謝します。研究面のみならず、我々が実験に専念できるよう生活面にも気を配って下さったことで、研究に前向きに取り組み続けることができました。また我々の持つ疑問や要望を、常に真剣に受け止めて下さったことによりわけ感謝しています。

実験を進める上で数々の御助言を賜りました当研究室助教授有岡学先生に感謝します。有岡先生の御指摘には常に後々まで考えさせられ、その後の研究方向を考える上で大きな刺激となりました。また、つたない英語を学術論文の域にまで高める過程で、多大な御助力をいただいたことに感謝しています。

*A. nidulans* を用いた実験において御助言を賜りました細胞遺伝学研究室堀内裕之先生に感謝します。実験操作に限らず、学会などにおいて様々なお話をさせていただいたことは、楽しい思い出であるとともに研究者としての自分の将来を考える上での助けとなりました。

*S. cerevisiae* 破壊株を快く供与して下さった東京大学大学院新領域創生科学研究科教授大矢禎一先生に感謝します。

研究面において御助言とアイデアを与えてくださった当研究室の菊間隆志様、正井久美子様に感謝します。今でも時として一緒に時間を過ごし、研究や社会や私生活の話をしてくれるかつての同期達、特に浅野静様、池野雄高様、岩崎琢磨様に感謝します。研究室において多くの時間を共有し、楽しい時間を過ごすとともに多くのことを学ばせてくれた当研究室OBの倉都将宏様、田浦綾子様に感謝します。

そして、大学院生活を通じて常に心にかけてくれて、経済的および精神的に支えてくれた家族に感謝しています。