

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成 24 年度博士課程入学
氏 名 中村 英淳
指導教員名 有岡 学

論文題目

麹菌 *Aspergillus oryzae* における菌核形成に関与する因子の探索と機能解析

序論

麹菌 *Aspergillus oryzae* は、我が国の伝統的な醸造産業において日本酒・醤油・味噌などの製造に 1000 年以上にわたって利用されてきた糸状菌である。*A. oryzae* は有性世代が見つかっておらず、不完全菌として分類される。そのため交配を行うことができず、複数の株由来の優良な表現型を備えた株の育種を行うことが困難である。近年、*A. oryzae* において 2 つの接合型株（MAT1-1 型、MAT1-2 型）が存在することが明らかになったことから、ヘテロタリックな有性生殖を行う可能性が示された。

菌核は、子囊菌門および担子菌門に属する一部の糸状菌で観察される耐久性の休眠構造である。また、最近、有性世代が発見された *Aspergillus parasiticus* や *Aspergillus flavus* では、菌核内に子嚢果と呼ばれる有性生殖器官が形成されることが報告されている。*A. oryzae* では、野生株 RIB40 を含む一部の株は少ないながらも菌核を形成するが、大部分の株は菌核を形成しない。このことは、*A. oryzae* において有性世代が発見されていない理由の一つとして考えられる。

以前、*A. oryzae* において、basic helix-loop-helix 型の転写因子 SclR と EcdR が菌核形成をそれぞれ正と負に制御することが報告された。しかし、*A. oryzae* を含め他の糸状菌においても、菌核形成に関与する因子はいまだに多くが明らかになっていないと考えられる。菌

菌核形成の分子メカニズムの全貌が解明されれば、*A. oryzae* で菌核形成能が低下もしくは失っている原因を特定することができ、菌核形成の促進による有性生殖の誘導ができる可能性がある。

本研究では、*A. oryzae* の菌核形成能を向上させることを目的として、菌核形成に関与する因子の探索およびその分子機構の解明を行い、それらの知見を利用して菌核形成の誘導を試みた。

第一章 *A. oryzae* の分化における AoRim15 の機能解析

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のセリン/スレオニンプロテインキナーゼである Rim15p は栄養飢餓・熱・酸化などのストレス応答に関わる調節因子であり、有性生殖にも関与することが知られている。対して、糸状菌では分生子形成（無性生殖）、有性生殖、菌核形成などの分化が知られているが、これらにおける Rim15p に相同なタンパク質の役割はほとんどわかっていない。そこで、*A. oryzae* のゲノムデータベースから、*S. cerevisiae* の RIM15 に相同性を有する遺伝子 AO090012000420 を見だし、*Aorim15* と命名して機能解析を行った。*A. oryzae* RIB40 株に由来する NSPID1 株を用いて、*Aorim15* の破壊株と過剰発現株を作製した。分生子の熱や酸化ストレスに対する感受性試験を行ったところ、*Aorim15* 破壊株では感受性を示し、*Aorim15* 過剰発現株では耐性を示した。これにより、AoRim15 は *S. cerevisiae* の Rim15p と同様にストレス耐性に関与することが示された。また、寒天培地における生育を観察したところ、*Aorim15* 破壊株では分生子形成が 2.5% まで低下し、過剰発現株では 29% まで減少した。したがって、AoRim15 は基本的に分生子形成を正に制御しているが、発現量が高い場合は分生子形成が抑制されると考えられた。一方で、菌核形成は *Aorim15* の破壊により減少したが、過剰発現によって増加したことから、AoRim15 が菌核形成を正に制御していることが示された。これらの結果より、AoRim15 の機能が *A. oryzae* における分化誘導に重要な役割を持ち、発現量が高い場合には分生子形成を抑制し、菌核形成を促進させることが明らかにした。

第二章 *A. oryzae* の菌核形成に関与する転写因子の探索

糸状菌において、分生子形成や有性生殖のような分化に関与する転写因子は数多く報告されているが、菌核形成に関わる転写因子はあまり多くは知られていない。そこで、菌核形成に関与する因子の探索を目的として、野田産業科学研究所が所有する *A. oryzae* の転写因子遺伝子破壊株ライブラリーより、菌核形成能に影響が見られた株をスクリーニングした。菌核形成が誘導される麦芽エキスを寒天培地において、暗所条件で 10 日間 30°C にて培養した。転写因子遺伝子破壊株 352 株をスクリーニングした結果、菌核の数が減少した株が 64 株、反対に菌核の数が増加した株が 45 株見いだされた。さらに、これら 109 株で再度スクリーニングを行った結果、*sclR* 破壊株を含む 47 株において、コントロール株と比較して半分以下に菌核の数が減少していた。これらの転写因子をコードする遺伝子は、菌核形成

を正に制御する因子であると考えられた。また、反対に菌核の数が増加した株は *ecdR* 破壊株を含む 26 株見いだされ、これらがコードする転写因子は菌核形成を負に制御する因子であると示唆された。

以上の結果より、*A. oryzae* における菌核形成に関与する転写因子を見いだすことに成功した。

第三章 菌核形成に関与する因子の機能解析

第二章で見いだした菌核形成に関与する転写因子について、再現性の確認とさらなる機能解析を行った。

まず、菌核形成が最も増加した株で破壊されていた遺伝子 AO090003000678 について、機能解析を行った。同遺伝子は、*S. cerevisiae* の細胞質分裂に関与する *ACE2*、*Aspergillus fumigatus* の分生子形成を正に制御する *ace2* と相同性を有していたことから、*Aoace2* と命名した。遺伝子破壊による表現型の再現性を検討するために、NSPID1 株を用いて *Aoace2* の破壊株を作製した。*A. oryzae* の *Aoace2* 破壊株では分生子形成能が低下し、*A. fumigatus* の *ace2* 破壊株と同様の結果であった。一方、*Aoace2* 破壊株では菌核形成が顕著に増加し、この表現型は *Aoace2* を自身のプロモーターにより発現することで相補された。このことから、*AoAce2* が菌核形成を制御する転写因子であることが示された。また、*amyB* プロモーターを用いて *Aoace2* を過剰発現したところ、生育が低下するとともに、溶菌している菌糸が観察された。*AoAce2* は菌核形成を負に制御しているが、発現量が高い場合は生育の低下を招くことを明らかにした。

さらに、第二章のスクリーニングにおいて、Zn(II)2Cys6 型転写因子をコードする機能未知遺伝子 AO090010000784 の破壊株では菌核を全く形成しないことを見いだした。酒類総合研究所で公開されている *A. oryzae* 比較ゲノムデータベースにおいて、菌核を全く形成しない日本酒製造用の RIB128 株では、同遺伝子の下流側に変異が多数見られた。よって、この変異が RIB128 株において、菌核形成が見られない原因である可能性が考えられた。NSPID1 株において AO090010000784 遺伝子を破壊し、表現型の再現性を検討した。その結果、同遺伝子の破壊株では、菌核が形成されなかった。したがって、AO090010000784 は菌核形成を正に制御していることが示唆された。

第四章 *A. oryzae* の実用株における菌核形成の誘導

A. oryzae の実用株では、菌核形成が全く認められない株が大部分である。そこで、菌核形成を制御する因子の過剰発現あるいは破壊により、菌核形成の誘導を試みた。菌核を形成しない株のモデルとして、RIB128 株を使用した。菌核形成を正に制御する *scIR* および *Aorim15* の過剰発現株をそれぞれ作製したが、菌核形成の促進は見られなかった。現在、AO090010000784 を RIB128 株において過剰発現させることで菌核形成が促進されるかどうかを検討している。

次に、菌核形成を負に制御する *ecdR* または *Aoace2* を破壊して、菌核形成の誘導を試みた。*A. oryzae* の実用株では遺伝子破壊が技術的に困難であるため、非相同組換えに関与する *ligD* 遺伝子の機能欠損が必要であると考えた。そこで、ゲノム編集技術の一つである CRISPR/Cas9 システムを用いて、いずれも菌核を全く形成しない RIB128 株、醤油製造用の RIB915 株、吟醸酒製造用 RIBOIS01 株の *ligD* 遺伝子に変異を導入した。さらに、それらの株の *pyrG* 遺伝子を破壊し、ウリジン/ウラシル要求性株を取得した。*pyrG* を選択マーカーとして *ecdR* の破壊を行った結果、RIB128 株と RIB915 株では気中菌糸が絡まった菌核形成の初期段階とみられる構造が観察されるようになった。一方で、*Aoace2* 破壊においては菌核形成の誘導は観察されなかった。以上より、RIB128 株と RIB915 株において、*ecdR* 遺伝子の破壊によって菌核様構造の形成を誘導することに成功した。

総括と展望

A. oryzae で有性生殖を誘導するためには菌核形成を促進することが重要だが、菌核形成の分子機構に関する知見は乏しかった。本研究では、転写因子遺伝子破壊株ライブラリーからスクリーニングすることにより、菌核形成に関与する転写因子を数多く見いだすことに成功した。

一方で、*A. oryzae* の実用株ではこれまで遺伝子破壊が困難であったことから、遺伝子操作による育種開発の障害となっていた。しかしながら、本研究でゲノム編集等を利用することで、*A. oryzae* の実用株において効率的な遺伝子操作が可能となった。そのうえで、これまで全く菌核形成が認められなかった実用株において、初めて菌核様構造が観察されるようになった。

本研究により、数多くの転写因子が菌核形成に関与することが明らかになり、実用株における効率的な遺伝子操作技術を開発して菌核形成が誘導できる可能性を示した。今後、菌核形成の分子機構のさらなる解明、ならびに実用株で菌核形成ができない原因を明らかにすることで、*A. oryzae* における有性生殖の誘導による産業的な交配育種の開発に貢献することが期待される。

Nakamura, H., Kikuma, T., Jin, F. J., Maruyama, J., and Kitamoto, K (2015) AoRim15 is involved in conidial stress tolerance, conidiation and sclerotia formation in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *J. Biosci. Bioen.*, 印刷中

Katayama, T., Tanaka, Y., Okabe, T., Nakamura, H., Fujii, W., Kitamoto, K., and Maruyama, J (2015) Development of a genome editing technique using the CRISPR/Cas9 system in the industrial filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Biotechnol. Lett.*, 印刷中