

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 黄 湘婷

生物は生存のために、ストレスなどの環境刺激を感知して迅速で適切な応答を行うことが不可欠である。このような適応応答は、従来、遺伝子発現制御を介した転写調節が主要であると考えられていた。しかし、近年 mRNA の翻訳調節といった転写後調節も、重要な役割を果たしていることが明らかになりつつある。mRNA のリモデリングはそのうちの一つであり、翻訳されている mRNA はポリソームを形成するが、非翻訳状態になった mRNA は多くのタンパク質とストレス顆粒や P-Body といった巨大複合体 mRNP (messenger ribonucleoproteins) を形成する。ストレス顆粒は真核生物で高度に保存され、酵母や動物において多くの研究報告があるが、これまで糸状菌では報告がほとんどなかった。本論文は、麹菌 *Aspergillus oryzae* においてストレス顆粒に関する解析を行ったものであり、4 章からなる。

第 1 章では、*A. oryzae* における mRNP の局在解析を行った。*A. oryzae* においてストレス顆粒を可視化するため、酵母ポリ A 結合タンパク質 Pab1 のホモログ AoPab1 と EGFP との融合タンパク質を、ストレス顆粒のマーカーとして発現させた。ストレス顆粒は、高温、低温、酸化ストレス、栄養源飢餓などの様々なストレスに応答して、菌糸先端に形成されることを見いだした。さらに、高温ストレスにおいては、ストレス顆粒は P-Body との共局在が観察された。ストレス顆粒の機能解析を行うため、ストレス顆粒の中心的な因子をコードする遺伝子 *Aopub1* の破壊株を作製し、小胞体ストレス、酸化ストレス、浸透圧ストレス条件での生育実験を行った。*Aopub1* 破壊株は野生株より生育遅延と分生子形成阻害が見られたが、ストレス条件下でより顕著な生育阻害が観察された。

第 2 章では、ストレス顆粒の新規構成タンパク質として SO を同定した。糸状菌は多数の菌糸細胞がつながった構造からなる。隣接する細胞は隔壁孔を通して細胞間連絡を行っており、SO はストレスに応答して隔壁孔に凝集することが知られている。SO の挙動を調べた結果、熱ストレスにおいて菌糸先端に形成されるストレス顆粒と共局在することを発見した。免疫沈降実験により、SO と AoPab1 との相互作用が確認された。また、SO を欠損した *A. oryzae* では、ストレス顆粒の形成部位が異常になることも見いだした。以上の実験により、SO をストレス顆粒の新規構成因子として同定した。

第 3 章では、持続的な熱ストレスによるストレス顆粒構成因子の分解とオートファジーの関与について解析した。*A. oryzae* において、ストレス顆粒が液胞と隣接して観察されたことから、オートファジーはストレス顆粒の分解に関与している可能性が考えられた。その

可能性を検証するため、オートファゴソームのマーカーである EGFP-AoAtg8 とストレス顆粒のマーカーである AoPab1-mDsRed の共発現株を作製し、局在解析を行った。その結果、熱ストレス条件下で共局在することが観察された。また、持続的な熱ストレスにより、ストレス顆粒構成タンパク質 AoPab1 の量は経時的に減少した。一方で、オートファジー欠損株 *Aoatg8* 破壊株では熱ストレスによる AoPab1 の量の減少が抑制された。これらの結果から、持続的な熱ストレスにおいて、ストレス顆粒は少なくとも部分的にオートファジーを介して分解されることが示唆された。

第4章では、熱ストレス条件下でのストレス顆粒構成因子 AoPab1 の翻訳後修飾について解析した。ポリ A 結合タンパク質 Pab1 は、mRNA の翻訳および安定性を調節する中心的な因子であり、ストレス顆粒の構成因子でもある。このような Pab1 の多機能性とストレスに対する迅速な応答を協調させるには複雑な制御が必要であり、翻訳後修飾が重要な役割を果たしていると予想した。AoPab1 の翻訳後修飾を解明するため、0、10、30 分間熱ストレス処理を行った細胞より抽出したタンパク質を二次元電気泳動で解析した。10 分間の熱ストレスでは AoPab1 がより酸性側にも検出されたが、30 分間では pH 3 から pH 10 まで広く分布するようになった。翻訳後修飾を同定するため、免疫沈降により得た AoPab1 についてトリプシン消化したのち、LC-MS/MS 解析を行った。その結果、メチル化、アセチル化、およびリン酸化された残基を同定するとともに、熱ストレスによって翻訳後修飾のパターンの変化が認められた。

以上、本研究は、*A. oryzae* のストレス応答時に形成されるストレス顆粒について詳細に解析したものであり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士(農学)の学位論文として価値あるものと認めた。