

黄麴菌における細胞内mRNAの局在制御機構に関する研究

守田, 湧貴

<https://hdl.handle.net/2324/7182536>

出版情報 : Kyushu University, 2023, 博士 (農学), 課程博士
バージョン :
権利関係 :



黄麴菌における細胞内 mRNA の局在制御機構に関する研究

守田 湧貴

2024

目次

I. 緒言	4
II. 実験材料および方法	14
III. 結果および考察	39
第1章 黄麹菌における smFISH による mRNA 局在解析	
序	39
結果 1-1 EGFP 融合による細胞内局在解析株の作製	40
1-2 smFISH 法による <i>egfp</i> mRNA を介した標的 mRNA の可視化	43
1-3 smFISH 法による標的 mRNA の細胞内局在解析	45
考察	51
第2章 黄麹菌生細胞における mRNA ライブイメージング法の確立	
序	53
結果 2-1 <i>glaA</i> -MS2 株の作製	54
2-2 <i>glaA</i> -MS2 株の表現型解析	61
2-3 <i>glaA</i> -MS2 株における <i>glaA</i> mRNA の遺伝子発現解析	62
2-4 <i>glaA</i> -MS2 株におけるドット様蛍光の局在評価	63
2-5 <i>glaA</i> -MS2 株におけるドット様蛍光の転写応答評価	66
考察	67
第3章 <i>glaA</i> mRNA の局在制御機構に関する研究	
序	69
結果 3-1 <i>glaA</i> mRNA の菌糸局在解析	70
3-2 <i>glaA</i> mRNA の細胞内局在解析	73
3-3 細胞骨格重合阻害時における小胞体形態解析	76
3-4 <i>glaA</i> mRNA と微小管の共局在解析	79
3-5 <i>glaA</i> mRNA と初期エンドソームの共動態解析	81
考察	84

第4章	<i>glaA</i> mRNA の細胞内輸送機構に関する研究	
序		86
結果	4-1 <i>Aokin3/Aokin1</i> 欠失株の作製.....	87
	4-2 <i>Aokin3/Aokin1</i> 欠失株の表現型解析.....	89
	4-3 <i>Aokin3/Aokin1</i> 欠失株における初期エンドソームの動態解析.....	90
	4-4 <i>Aokin3/Aokin1</i> 欠失株における <i>glaA</i> mRNA の輸送動態解析.....	91
	4-5 <i>Aokin3/Aokin1</i> 欠失株における <i>glaA</i> mRNA と小胞体の共局在解析.....	94
	考察.....	96
第5章	ストレス条件下における <i>glaA</i> mRNA の細胞内局在化機構に関する研究	
序		98
結果	5-1 ストレス顆粒/P-body 共局在解析用株の作製.....	99
	5-2 高温ストレス条件下における細胞内局在解析.....	101
	5-3 持続的な高温ストレス条件下における細胞内局在解析.....	102
	5-4 ストレス顆粒の分散速度解析.....	105
	5-5 小胞体ストレス条件下における細胞内局在解析.....	106
	5-6 ストレス顆粒と P-body の細胞内局在解析.....	108
	考察.....	111
IV.	要約.....	113
V.	参考文献.....	115
VI.	謝辞.....	129

I. 緒言

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* は、古来、日本酒や味噌などの日本の伝統的な発酵醸造産業で利用される有用な微生物であり、2006 年に日本醸造学会において「国菌」として認定されている。近縁種 *A. flavus* のように Aflatoxin B1 や mycotoxin といった毒性化合物を産生しないことがゲノム解析および遺伝学的に証明されており (Tominaga et al., 2006)、アメリカ食品医薬品局 (Food and Drug Administration ; FDA) から Generally Recognized As Safe (GRAS) として高い安全性が認められている。また、アミラーゼ、グルコアミラーゼ、グルコシダーゼ、ペプチダーゼといった加水分解酵素やコウジ酸といった化合物など多様な有用物質を生産することで知られており、そうした有用物質生産の分子機構に関する研究が数多く進められている。特に、タンパク質分泌能力に優れることから、ヒトに有用な異種タンパク質 (e.g., 抗体医薬, ヒトリゾチーム) を生産させる宿主としての利用も進められている (Tsuchiya et al., 1992; 1994, Nakajima et al., 2006; Li et al., 2020; Huynh et al., 2020)。そうした経緯から産業利用の拡大を目指して、有用なタンパク質をより高分泌生産する黄麹菌株の分子育種に向けた細胞生物学的な研究が進められている。一方で、*A. oryzae* は多数の核を持つ細胞が細長く連なった特異な細胞形状であることから、タンパク質分泌機構も一層複雑であると考えられている。実際に、*A. oryzae* で異種タンパク質を発現させても内在性分泌型酵素のように多量に分泌されないため (Ohno et al. 2011)、その原因となる分子機構の全貌は未だ明らかにされていない。

messenger RNA (mRNA) 局在制御機構は遺伝子発現の時空間的な制御に必要であり、原核生物から真核生物に至るまで広く保存された生物学的プロセスである (Fig. 0-1) (Tutucci et al., 2018; Sattler et al., 2021; Müntjes et al., 2021; Cassella and Ephrussi, 2022; Hobson et al., 2022)。mRNA 局在制御機構はタンパク質の局所的または区画的な合成に重要であると考えられている (Das et al., 2021)。1983 年に非対称な mRNA 局在化が発見され (Jeffery et al., 1983)、その生理学的意義を解明すべく多くの研究が進められてきた。ショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* や出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae*, 神経細胞で特に研究が進められており、細胞極性の形成や細胞分化の制御といった非対称性に起因する生命現象に肝要であることが報告されている (Buxbaum et al., 2015)。D.

melanogaster, 線虫 *Caenorhabditis elegans*, 二形成酵母 *Ustilago maydis* などの多細胞生物では、mRNA 局在化機構の喪失により発生及び生育に著しい異常を引き起こすことが報告されている (Gavis and Lehmann, 1992; Becht et al., 2006; Nishimura et al., 2015)。このような背景から、mRNA 局在化の分子機構は生命活動の維持に必要な現象が重点的に解析されているが、如何に広く生命現象に寄与するのかは未だ不明な点が多い。

ある種の mRNA は細胞骨格上を移動する分子モーターを利用して非翻訳状態で輸送されるが、生物種ごとに mRNA 局在化機構の詳細が異なる (Costa et al., 2021; Christensen and Reck-Peterson, 2022)。 *S. cerevisiae* でよく研究された *ASH1* mRNA は、She2p-She3p 複合体を介して Myosin V である Myo4 に結合することで、出芽した娘細胞に輸送される (Long et al., 1997; Bertrand et al., 1998; Takizawa and Vale, 2000; Böhl et al., 2000; Long et al., 2000)。このような局在化を制御するトランス因子は、mRNA 配列内の *cis*-acting localization element (zip codes) に結合する。*ASH1* mRNA は 3'UTR 領域も含めて 4 か所の zip code (E1, E2A, E2B, E3) を持ち、輸送過程の翻訳抑制を介した正常な局在化に重要である (Chartrand et al., 1999; Chartrand et al., 2002; Chaudhuri et al., 2020)。

U. maydis は酵母型だけでなく菌糸型の細胞形態をとるため、糸状菌の mRNA 輸送モデルとしてよく研究されている。*U. maydis* の mRNA は微小管上で物質輸送を担う kinesin-3 を駆動源とする初期エンドソーム (early endosome : EE) に、Rrm4, Upa1, Upa2, Grp1, Pab1 などを含む複合体を介して結合し、細胞内で双方向に輸送される (Fig.0-2) (Niessing et al., 2018; Riquelme et al., 2018; Müntjes et al., 2021)。その際、mRNA はリボソームが複数結合したポリソームの状態に輸送される (Higuchi et al., 2014)。これらの因子は標的 mRNA 配列内の UAUG 配列および終始コドンに結合し、3'UTR 領域付近で複合体を形成する (Olgeiser et al., 2019)。すべてのトランス因子が見つかったわけではないが、Rrm4, Upa1, Upa2 を欠失させると mRNA 輸送能力が低下する (Jankowski et al., 2019)。一方で、*Aspergillus* 属糸状菌は Rrm4, Upa2 のホモログがなく (Fig. 0-3)、mRNA の局在化をリアルタイムに解析した報告もないことから、*U. maydis* と異なる mRNA 局在制御機構である可能性も考えられる。

神経細胞では、後期エンドソームやリソソームなどのオルガネラを利用して mRNA が輸送される (Cioni et al., 2019; Liao et al., 2019)。それだけでなく、mRNA が RNP を介

してキネシンもしくはダイニンに結合する輸送システムも存在する (Das et al., 2021, Costa et al., 2021)。最近では、five-subunit endosomal Rab5 and RNA/ribosome intermediary (FERRY) と呼ばれる高度な複合体が見つかり、mRNA が FERRY を介して EE 膜に結合し、ミトコンドリア関連因子をコードする mRNA を輸送することが報告されている (Schuhmacher et al., 2023; Quentin et al., 2023)。FERRY のホモログは真核微生物に保存されておらず、mRNA 局在化機構は種の進化や分化の過程で多様化したと考えられる。そのため、各生物種において mRNA 局在制御機構を明らかにすることが、その生理的意義を理解する上で重要になる。

mRNA は輸送過程において翻訳が抑制されており、様々な制御を受ける場合がある (Gu et al., 2004; Paquin et al., 2007; Buxbaum et al., 2014)。Ribonucleoprotein (RNP) 顆粒は mRNA の貯蔵、分解、翻訳抑制といった mRNA 制御に重要な役割を果たしており、よく研究された RNP 顆粒としてストレス顆粒と processing-body (P-body) が知られている (Fig. 0-4) (Protter and Parker, 2016; Youn et al., 2019; Riggs et al., 2020; Grousl et al., 2022)。これらは液-液層分離 (liquid-liquid phase separation : LLPS) で凝集した膜の無い動的なオルガネラであり、非翻訳 mRNA や RNA 結合タンパク質 (RNA binding protein : RBP) などが含まれる。*A. oryzae* でも P-body とストレス顆粒が存在する (Fig. 0-5) (Huang et al., 2013)。*A. oryzae* のストレス顆粒は他の生物種と異なり、菌糸の頂端に限定して形成されることが報告されている。

P-body は常に細胞内で形成されているが、ストレス条件下で数やサイズが増大する (Luo et al., 2018)。P-body 構成因子として脱アデニル化酵素 (e.g., Ccr4-Not, Lsm1-7 complex)、脱キャッピング関連酵素 (e.g., Dcp1, Dcp2, Edc3, Edc4, Dhh1)、5'-to-3' エキソリボヌクレアーゼ (e.g., Xrn1) などが知られるが、リボソームや翻訳開始因子を含まないことから mRNA 分解に寄与するとされている (Sheth and Parker, 2003)。一方で、P-body 内部の mRNA が再度細胞質に放出される場合やストレス時に翻訳開始可能なストレス顆粒と融合する場合は報告されており、翻訳開始に導く可能性を排除できない (Parker and Sheth, 2007)。平常時の P-body は役割に不明な点が多いが、mRNA の貯蔵を通じて時空間的に翻訳量を微調節する可能性も考えられる。

ストレス顆粒は様々な環境ストレスにより一過的に形成誘導されることが知られる。

ストレス顆粒構成因子として非翻訳 mRNA のほかに、40S リボソーム、翻訳開始因子 (e.g., eIF4GI, eIF4GII, eIF4E)、ポリ A 結合タンパク質 (e.g., Pab1/PABP)、ユビキチンプロテアーゼ補因子 (e.g., Bre5/Nxt3/G3BP1)、その他の RNA 結合タンパク質 (e.g., Pub1/TIA-1, Pbp1/Ataxin-2) が知られており、mRNA 分解だけでなく翻訳開始も可能であるとされている (Mateju et al., 2020; Hofmann et al., 2021; Grousl et al., 2022)。一方で、ストレスの種類でストレス顆粒構成因子が異なることが報告されており、*S. cerevisiae* のストレス顆粒はグルコース飢餓条件下で翻訳開始因子やリボソーム小サブユニットを含まない (Buchan et al., 2008)。ER ストレスやリソソーム損傷などの細胞内ストレスもストレス顆粒を形成誘導することが報告されているが、その応答機構はほとんど明らかとなっていない (Child et al., 2021; Hofmann et al., 2021; Jia et al., 2022)。カスパーゼ-3/-7 や TORC1 もストレス顆粒に局在することが報告されており、細胞内シグナルのカスケード制御に寄与する可能性もあることから、細胞内ストレス応答に対する役割についても調査する必要がある (Takahara and Maeda, 2012; Sandoval et al., 2021; Fujikawa et al., 2023)。

近年、RNP 顆粒は mRNA 輸送に関与することや小胞体と相互作用することが報告されている (Kato and Nakamura, 2012; Lee et al., 2020; Bose et al., 2022)。それだけでなく、*S. cerevisiae* で P-body からストレス顆粒に成熟することも報告されており、生物種ごとに形成機構と生理学的意義を解明する必要がある (Buchan et al., 2008)。

タンパク質分泌は成長、細胞恒常性維持、細胞分裂、外環境の適応、細胞間相互作用などに重要であり、多くの生物種に共通する基本的な生物学的プロセスの一つである (Viotti, 2016; Guo et al., 2017)。一般的な分泌型酵素は小胞体 (Endoplasmic reticulum : ER) で合成されゴルジ体で糖鎖修飾された後に分泌小胞により細胞外に放出される。タンパク質分泌経路において、分泌型酵素 mRNA が signal recognition particle (SRP) pathway に認識されることが重要となる (Reid and Nicchitta, 2015; Zhang et al., 2022)。多くの分泌型酵素は N 末端に ER 局在シグナルペプチドを持ち、この領域が SRP pathway の認識に重要となる。分泌型酵素 mRNA は細胞質で ER 局在シグナルペプチドが翻訳され、その領域に SRP が結合し翻訳が一時的に停止する。その後、ER 膜上の SRP 受容体に SRP が結合することで、分泌型酵素 mRNA が ER にリクルートする。ER 膜状に繫留された分泌型酵素 mRNA はポリソームを形成し翻訳され、SRP 受容体に隣接するトランスロ

コン複合体を介して ER 内腔に新生ペプチド鎖が転座する。ER 局在シグナルペプチドがない ER 局在性タンパク質もあり、SRP pathway 非依存的に ER へ局在化する分泌型酵素 mRNA も存在すると考えられる (Hermesh and Jansen, 2013; Hosomi et al., 2020)。

ER に局在する mRNA は ER と相互作用しながら輸送される場合がある。例えば、出芽酵母で娘細胞に局在化する *ASH1* mRNA は ER との相互作用しながら輸送されることが報告されている (Schmid et al., 2006)。その他の分泌酵素も ER と関連して輸送されることが報告されており (Aronov et al., 2007)、翻訳効率を最大化するために ER 膜近傍で輸送されると示唆されている (Niessing et al., 2018)。細長い菌糸細胞でタンパク質を分泌する場合、分泌部位近傍に分泌型酵素 mRNA を局在制御した方が、その分泌効率が高まると考えられる。しかし、それらに関する知見はほとんどない。したがって、分泌型酵素 mRNA の局在制御機構を明かにすることで、タンパク質分泌機構に関する新たな知見が得られると考えられる。

A. oryzae はアミラーゼをコードする mRNA を多量に転写するため、その転写システムや分泌経路について精力的に研究が進められてきた (Higuchi et al., 2009; Hayakawa et al., 2011; Nemoto et al., 2012; Togo et al., 2017; Tanaka and Gomi, 2021)。十分に研究されたアミラーゼとして、 α -アミラーゼ (AmyA, AmyB, AmyC)、グルコアミラーゼ (GlaA, GlaB) がある。これらアミラーゼはカーボンカタボライト抑制機構によりグルコース存在下で発現抑制され、マルトース存在下で高度に発現誘導されることが報告されている (Tada et al., 1991; Hata et al., 1992; Watanabe et al., 2011; Suzuki et al., 2015; Tanaka et al., 2018)。また、 α -アミラーゼ (AmyB) の局在解析により、菌糸頂端と隔壁が分泌部位として示唆されている (Kuratsu et al., 2007; Hayakawa et al., 2011)。分泌型酵素の細胞ニア局在が局所的であることから、分泌型酵素が mRNA レベルで分泌部位近傍で局在制御される可能性が考えられる。single molecule fluorescence in situ hybridization (smFISH) 法で *amyB* mRNA を可視化すると、菌糸先端付近でシグナルが確認されている (Fig. 0-6) (Higuchi and Takegawa, 2020)。*A. oryzae* は生きた細胞で mRNA が可視化されておらず、どのように mRNA が局在化するのか全く明らかにされていない。この分子機構を解明することで、タンパク質分泌機構に関する理解が深まり、より高分泌生産な黄麹菌株の分子育種への貢献に繋がると考えられる。

タンパク質の分泌輸送経路を解明することで、ボトルネックの一層の理解に繋がり、優良な黄麹菌株を分子育種する一助となる。事実、 α -アミラーゼを局在解析することで、菌糸細胞の分泌部位に関して理解が大きく前進した。一方で、そうした研究の多くがタンパク質レベルに留まり、mRNA レベルの局在制御機構に関する知見はほとんどない。タンパク質局在を決定し得る mRNA 局在制御機構の解明により、タンパク質分泌機構の一層の理解に繋がると考える。そもそも、*Aspergillus* 属糸状菌は mRNA 局在化機構がほとんど研究されておらず、mRNA 局在化に肝要な配列が全く明らかにされていない。近年、当研究室が *amyB* mRNA を可視化したことにより、mRNA 局在制御機構の重要性が注目されつつある (Higuchi and Takegawa, 2020)。

mRNA 局在制御機構の生理学的な意義を考える上で、全て mRNA が同じ局在でないことを証明する必要がある。そこで本研究では、産業利用される多種多様な菌類の中でも優れたタンパク質分泌生産能力を持つ *A. oryzae* で、タンパク質ごとに mRNA 局在が異なることを証明し、分泌型酵素 mRNA の局在制御機構を解明することを目的とした。本研究の遂行によって、糸状菌に特有の mRNA 局在制御機構を明らかにするとともに、タンパク質分泌機構に関する新しい知見をもたらすことが期待される。

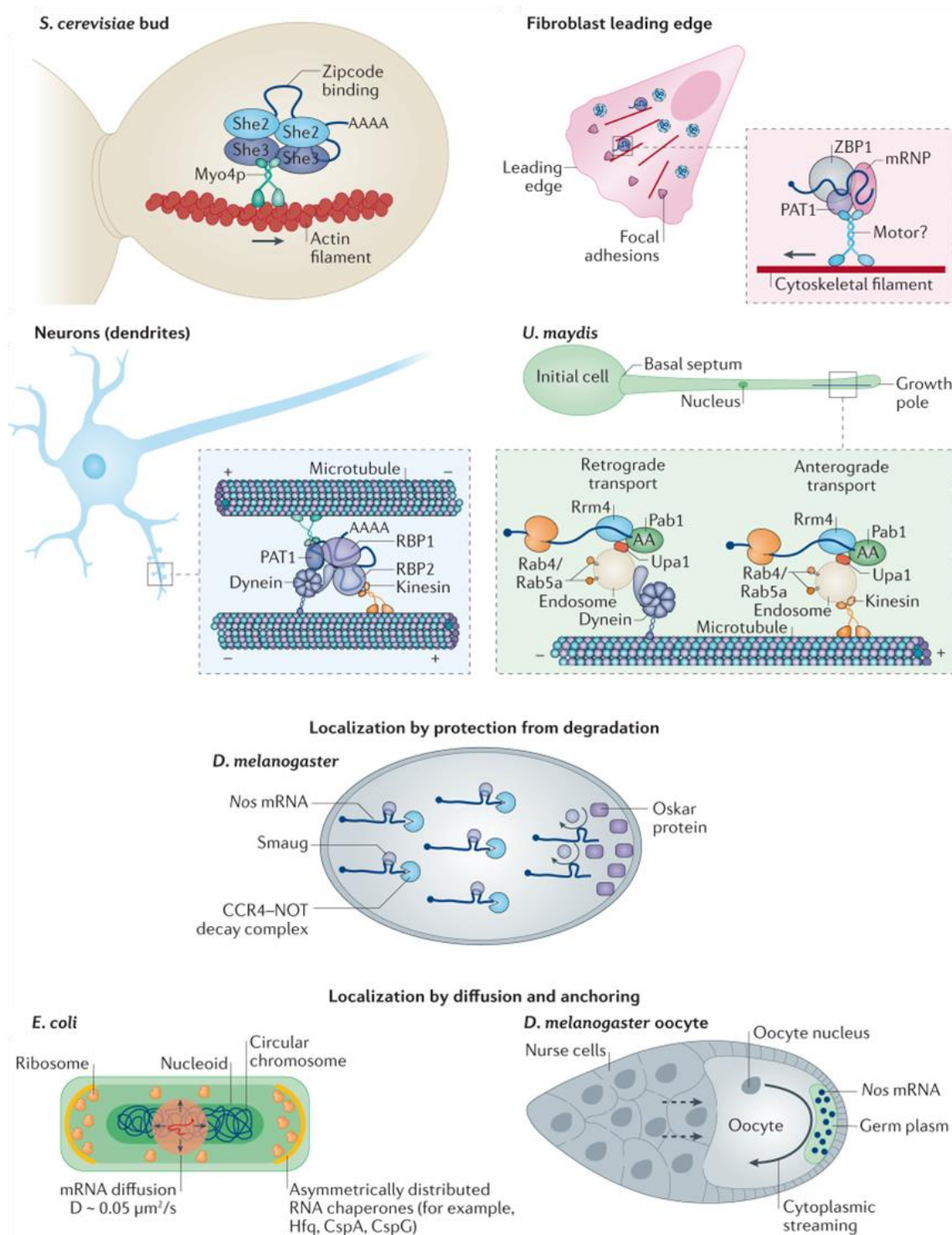


Fig. 0-1 生物種ごとに異なる mRNA 局在制御機構

(Das et al., 2021)

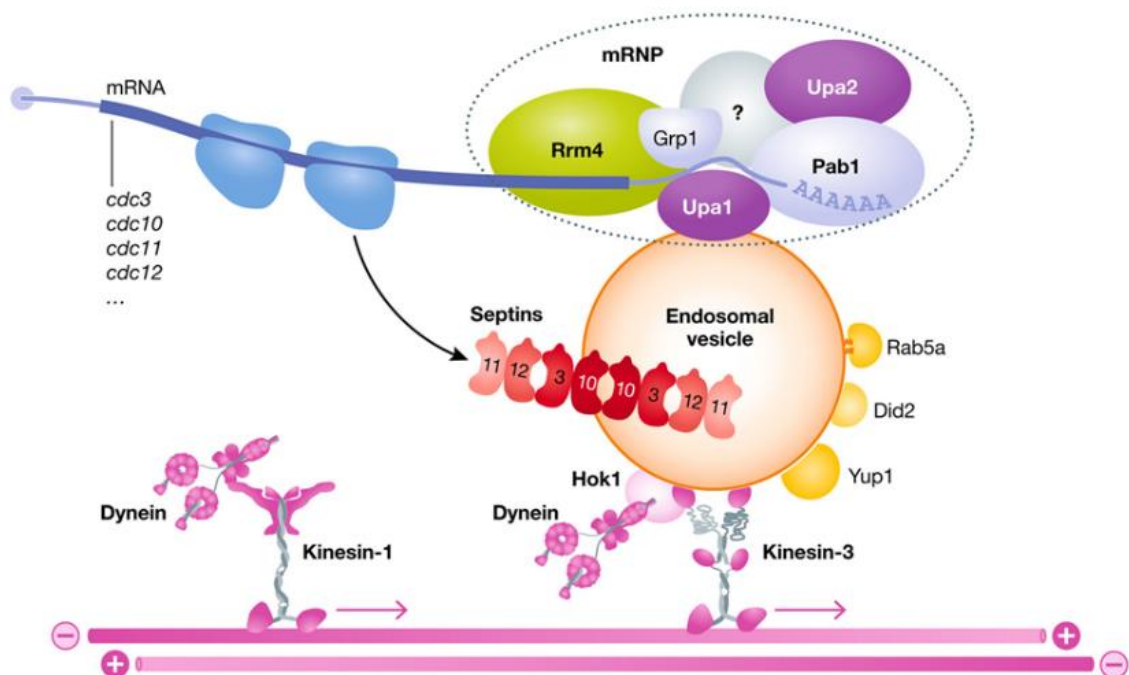


Fig. 0-2 *U. maydis* の mRNA 輸送機構で機能する RNP 複合体

(Müntjes et al., 2021)

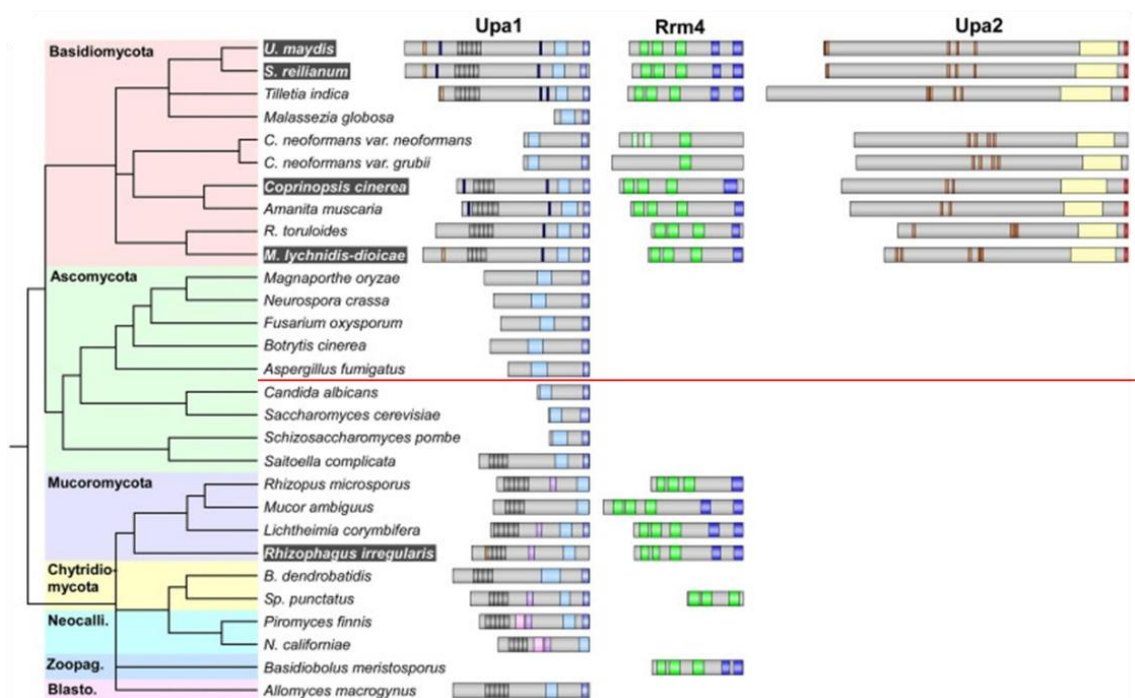


Fig. 0-3 *U. maydis* Rrm4 (UMAG_10836) のホモログ解析

(Müller et al., 2019)

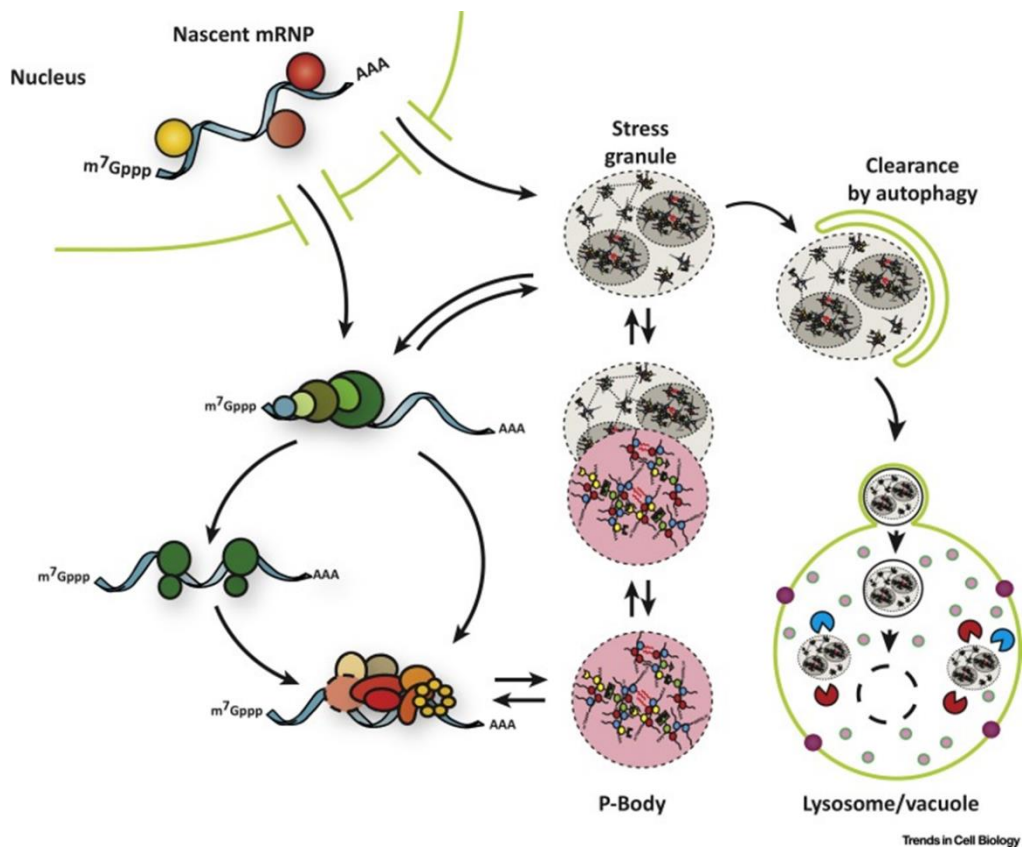


Fig. 0-4 P-body とストレス顆粒の形成制御機構

(Protter and Parker. 2016)

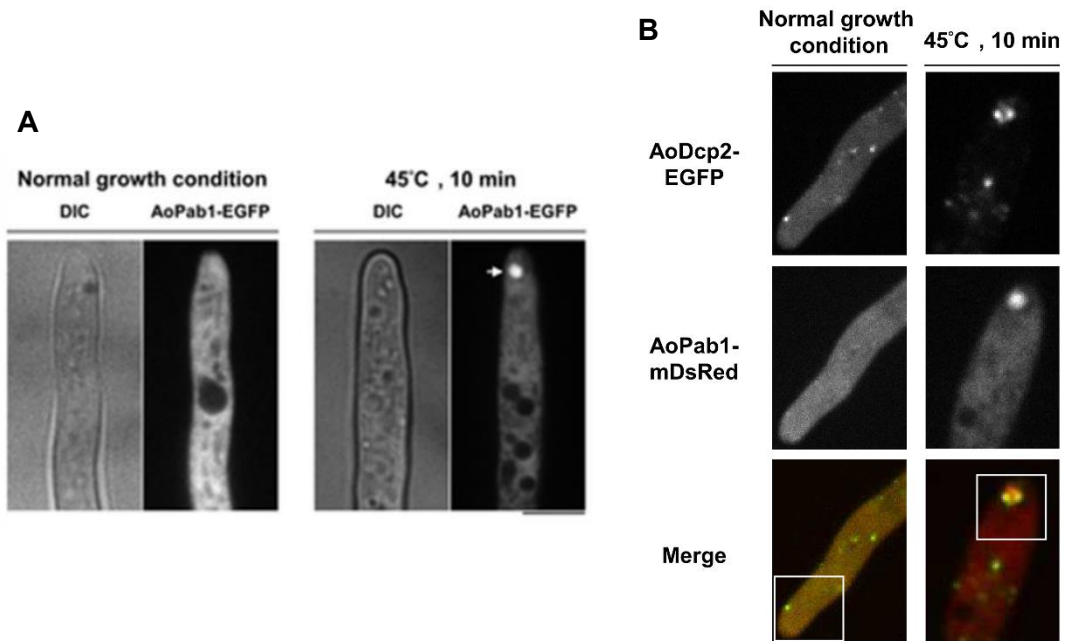
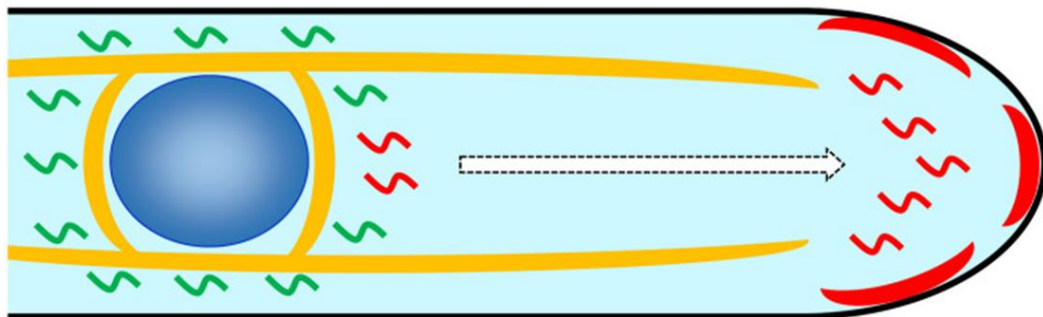
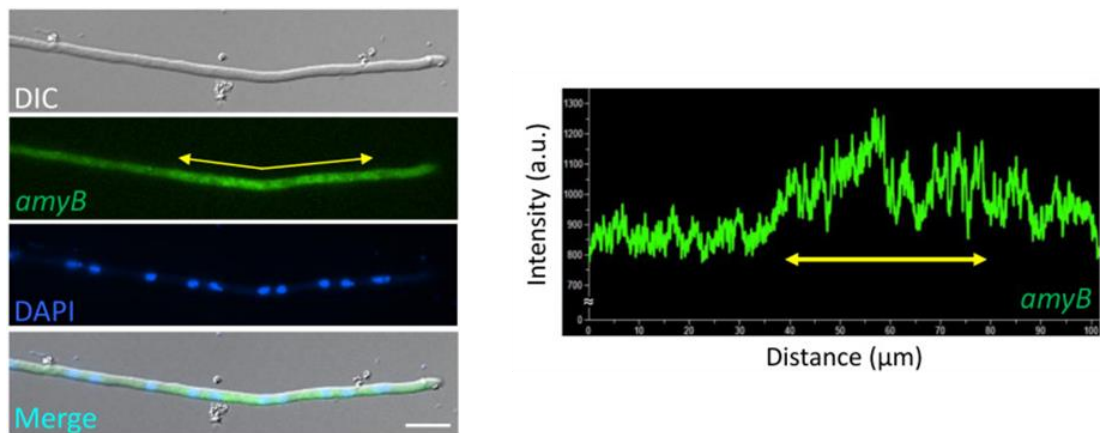


Fig. 0-4 *A. oryzae* における (A) ストレス顆粒と (B) P-body の細胞内局在

(Huang et al., 2013)



- Nucleus ~ *amyB* mRNA ⇒ α -amylase transport
- ~ *actA* mRNA) Actin cable or patch
-) ER ⇨ mRNA transport

Fig. 0-6 *A. oryzae* における α -アミラーゼ mRNA の細胞内局在
(Higuchi and Takegawa. 2020)

II. 実験材料および方法

大腸菌および黄麹菌株

プラスミドの構築と取得は大腸菌 DH5 α (F⁻, Φ 80d lacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(rK⁻ mK⁺), phoA, supE44, λ ⁻, thi-1, gyrA96, relA1)を使用した。使用した黄麹菌株は以下の通りである。

Strain	Genotype	Reference
<i>A. oryzae</i> RIB40	Wild-type(WT)	N/A
NSPID1	<i>niaD</i> ⁻ <i>sC</i> ⁻ <i>adeA</i> ⁻ Δ <i>argB::adeA</i> ⁻ Δ <i>ligD::argB</i> Δ <i>pyrG::adeA</i>	Maruyama and Kitamoto. 2008
NSIDS1	<i>niaD</i> ⁻ <i>sC</i> ⁻ <i>AosC</i> <i>adeA</i> ⁻ <i>adeA</i> Δ <i>argB</i> Δ <i>ligD::argB</i>	Togo <i>et al.</i> 2017
NSIDN1	<i>niaD</i> ⁻ <i>niaD</i> <i>sC</i> ⁻ <i>adeA</i> ⁻ Δ <i>argB::adeA</i> ⁻ Δ <i>ligD::argB</i> Δ <i>pyrG::adeA</i> <i>pyrG</i>	Togo <i>et al.</i> , 2017
NSIDSN1	<i>niaD</i> ⁻ <i>niaD</i> <i>sC</i> ⁻ <i>AosC</i> <i>adeA</i> ⁻ Δ <i>argB::adeA</i> ⁻ Δ <i>ligD::argB</i> Δ <i>pyrG::adeA</i> <i>pyrG</i>	Morita <i>et al.</i> , 2020
PaG	<i>niaD</i> ⁻ (<i>PamyB-egfp niaD</i>) <i>sC</i> ⁻ <i>AosC</i> <i>adeA</i> ⁻ <i>adeA</i> Δ <i>argB</i> Δ <i>ligD::argB</i>	This study
PaLaG	<i>niaD</i> ⁻ (<i>PamyB-Lifeact-egfp niaD</i>) <i>sC</i> ⁻ <i>AosC</i> <i>adeA</i> ⁻ <i>adeA</i> Δ <i>argB</i> Δ <i>ligD::argB</i>	This study
GSec22	<i>niaD</i> ⁻ (<i>PamyB-egfp-Aosec22 niaD</i>) <i>sC</i> ⁻ <i>AosC</i> <i>adeA</i> ⁻ <i>adeA</i> Δ <i>argB</i> Δ <i>ligD::argB</i>	Togo <i>et al.</i> , 2017
GSnc1	<i>niaD</i> ⁻ (<i>PamyB-egfp-Aosnc1 niaD</i>) <i>sC</i> ⁻ <i>AosC</i> <i>adeA</i> ⁻ <i>adeA</i> Δ <i>argB</i> Δ <i>ligD::argB</i>	Togo <i>et al.</i> , 2017
PaUapCG	<i>niaD</i> ⁻ (<i>PamyB-AouapC-egfp niaD</i>) <i>sC</i> ⁻ <i>AosC</i> <i>adeA</i> ⁻ <i>adeA</i> Δ <i>argB</i> Δ <i>ligD::argB</i>	This study
PaGVam3	<i>niaD</i> ⁻ (<i>PamyB-egfp-Aovam3 niaD</i>) <i>sC</i> ⁻ <i>AosC</i> <i>adeA</i> ⁻ <i>adeA</i> Δ <i>argB</i> Δ <i>ligD::argB</i>	This study
abE1	<i>niaD</i> ⁻ <i>sC</i> ⁻ <i>Aoabp1-egfp::AosC</i> <i>adeA</i> ⁻ <i>adeA</i> Δ <i>argB</i> Δ <i>ku70::argB</i>	This study
NSIDSER5	<i>niaD</i> ⁻ <i>PamyB-egfp-Aorab5 niaD</i> <i>sC</i> ⁻ <i>AosC</i> <i>adeA</i> ⁻ Δ <i>argB::adeA</i> ⁻ Δ <i>ligD::argB</i> Δ <i>pyrG::adeA</i> <i>pyrG</i>	This study

PpP1G	<i>niaD⁻ PpgkA-Aopab1-egfp::niaD sC⁻ adeA⁻ ΔargB::adeA⁻ ΔligD::argB ΔpyrG::adeA pyrG</i>	This study
PpP1GD2mCh	<i>niaD⁻ PpgkA-Aopab1-egfp::niaD sC⁻ PpgkA- Aodcp2-egfp::sC adeA⁻ ΔargB::adeA⁻ ΔligD::argB ΔpyrG::adeA pyrG</i>	This study
PpP1GD2mChAmTB	<i>niaD⁻ PpgkA-Aopab1-egfp::niaD sC⁻ PpgkA- Aodcp2-egfp::sC adeA⁻ ΔargB::adeA⁻ ΔligD::argB ΔpyrG::adeA pyrG PatuA-mtagbfp2-Aodcp2::ptrA</i>	This study
<i>glaA</i> -36×MBS	<i>niaD⁻ sC⁻ adeA⁻ ΔargB::adeA⁻ ΔligD::argB ΔpyrG::adeA</i>	This study
<i>glaA</i> -MS2-SΔP	<i>niaD⁻ PpgkA-nls-mcp-2×egfp::niaD sC⁻ adeA⁻ ΔargB::adeA⁻ ΔligD::argB ΔpyrG::adeA</i>	This study
<i>glaA</i> -MS2-PP	<i>niaD⁻ PpgkA-nls-mcp-2×egfp::niaD sC⁻ adeA⁻ ΔargB::adeA⁻ ΔligD::argB ΔpyrG::adeA pyrG</i>	This study
<i>glaA</i> -MS2	<i>niaD⁻ PpgkA-nls-mcp-2×egfp::niaD sC⁻ Aosc adeA⁻ ΔargB::adeA⁻ ΔligD::argB ΔpyrG::adeA pyrG</i>	This study
<i>glaA</i> -MS2-N	<i>niaD⁻ PpgkA-nls-mcp-2×egfp::niaD sC⁻ PAotps1- mcherry-nls::Aosc adeA⁻ ΔargB::adeA⁻ ΔligD::argB ΔpyrG::adeA pyrG</i>	This study
<i>glaA</i> -MS2-S61ΔP	<i>niaD⁻ PpgkA-nls-mcp-2×egfp::niaD sC⁻ PpgkA- Aosec61-mcherry::Aosc adeA⁻ ΔargB::adeA⁻ ΔligD::argB ΔpyrG::adeA</i>	This study
<i>glaA</i> -MS2-S61	<i>niaD⁻ PpgkA-nls-mcp-2×egfp::niaD sC⁻ PpgkA- Aosec61-mcherry::Aosc adeA⁻ ΔargB::adeA⁻ ΔligD::argB ΔpyrG::adeA pyrG</i>	This study
<i>glaA</i> -MS2-S61AtuA	<i>niaD⁻ PpgkA-nls-mcp-2×egfp::niaD sC⁻ PpgkA- Aosec61-mcherry::Aosc adeA⁻ ΔargB::adeA⁻ ΔligD::argB ΔpyrG::adeA PpgkA-mtagbfp2-atuA:: ptrA</i>	This study
<i>glaA</i> -MS2-R5	<i>niaD⁻ PpgkA-nls-mcp-2×egfp::niaD sC⁻ PpgkA- mcherry-Aorab5::Aosc adeA⁻ ΔargB::adeA⁻ ΔligD::argB ΔpyrG::adeA pyrG</i>	This study
<i>glaA</i> -MS2-AtuA	<i>niaD⁻ PpgkA-nls-mcp-2×egfp::niaD sC⁻ PpgkA- mcherry-atuA::Aosc adeA⁻ ΔargB::adeA⁻ ΔligD::argB ΔpyrG::adeA pyrG</i>	This study

<i>glaA</i> -MS2-B5	<i>niaD</i> ⁻ <i>PpgkA-nls-mcp-2×egfp::niaD</i> <i>sC</i> ⁻ <i>PpgkA-Aobre5-mcherry::AosC adeA</i> ⁻ Δ <i>argB::adeA</i> ⁻ Δ <i>ligD::argB</i> Δ <i>pyrG::adeA</i> <i>pyrG</i>	This study
<i>glaA</i> -MS2-E3	<i>niaD</i> ⁻ <i>PpgkA-nls-mcp-2×egfp::niaD</i> <i>sC</i> ⁻ <i>PpgkA-Aoedc3-mcherry::AosC adeA</i> ⁻ Δ <i>argB::adeA</i> ⁻ Δ <i>ligD::argB</i> Δ <i>pyrG::adeA</i> <i>pyrG</i>	This study
<i>glaA</i> -MS2-B5E3	<i>niaD</i> ⁻ <i>PpgkA-nls-mcp-2×egfp::niaD</i> <i>sC</i> ⁻ <i>PpgkA-Aoedc3-mcherry::AosC adeA</i> ⁻ Δ <i>argB::adeA</i> ⁻ Δ <i>ligD::argB</i> Δ <i>pyrG::adeA</i> <i>PpgkA-Aobre5-mtagbfp2::AoptrA</i>	This study
<i>glaA</i> -MS2-S61B5	<i>niaD</i> ⁻ <i>PpgkA-nls-mcp-2×egfp::niaD</i> <i>sC</i> ⁻ <i>PpgkA-Aosec61-mcherry::AosC adeA</i> ⁻ Δ <i>argB::adeA</i> ⁻ Δ <i>ligD::argB</i> Δ <i>pyrG::adeA</i> <i>PpgkA-Aobre5-mtagbfp2::AoptrA</i>	This study
<i>glaA</i> -MS2-S61E3	<i>niaD</i> ⁻ <i>PpgkA-nls-mcp-2×egfp::niaD</i> <i>sC</i> ⁻ <i>PpgkA-Aosec61-mcherry::AosC adeA</i> ⁻ Δ <i>argB::adeA</i> ⁻ Δ <i>ligD::argB</i> Δ <i>pyrG::adeA</i> <i>PpgkA-Aoedc3-mtagbfp2::AoptrA</i>	This study
<i>glaA</i> -MS2-P1	<i>niaD</i> ⁻ <i>PpgkA-nls-mcp-2×egfp::niaD</i> <i>sC</i> ⁻ <i>PpgkA-Aopab1-mcherry::AosC adeA</i> ⁻ Δ <i>argB::adeA</i> ⁻ Δ <i>ligD::argB</i> Δ <i>pyrG::adeA</i> <i>pyrG</i>	This study
<i>glaA</i> -MS2-D2	<i>niaD</i> ⁻ <i>PpgkA-nls-mcp-2×egfp::niaD</i> <i>sC</i> ⁻ <i>PpgkA-Aodcp2-mcherry::AosC adeA</i> ⁻ Δ <i>argB::adeA</i> ⁻ Δ <i>ligD::argB</i> Δ <i>pyrG::adeA</i> <i>pyrG</i>	This study
<i>glaA</i> -MS2-ΔH1	<i>niaD</i> ⁻ <i>PpgkA-nls-mcp-2×egfp::niaD</i> <i>sC</i> ⁻ <i>adeA</i> ⁻ Δ <i>argB::adeA</i> ⁻ Δ <i>ligD::argB</i> Δ <i>pyrG::adeA</i> Δ <i>Aohok1::pyrG</i>	This study
<i>glaA</i> -MS2-ΔH1N	<i>niaD</i> ⁻ <i>PpgkA-nls-mcp-2×egfp::niaD</i> <i>sC</i> ⁻ <i>adeA</i> ⁻ <i>PAotps1-mcherry-nls::AosC</i> Δ <i>argB::adeA</i> ⁻ Δ <i>ligD::argB</i> Δ <i>pyrG::adeA</i> Δ <i>Aohok1::pyrG</i>	This study
<i>glaA</i> -MS2-ΔH1S61	<i>niaD</i> ⁻ <i>PpgkA-nls-mcp-2×egfp::niaD</i> <i>sC</i> ⁻ <i>adeA</i> ⁻ <i>PpgkA-Aosec61-mcherry::AosC</i> Δ <i>argB::adeA</i> ⁻ Δ <i>ligD::argB</i> Δ <i>pyrG::adeA</i> Δ <i>Aohok1::pyrG</i>	This study
<i>glaA</i> -MS2-ΔK1	<i>niaD</i> ⁻ <i>PpgkA-nls-mcp-2×egfp::niaD</i> <i>sC</i> ⁻ <i>adeA</i> ⁻ Δ <i>argB::adeA</i> ⁻ Δ <i>ligD::argB</i> Δ <i>pyrG::adeA</i> Δ <i>Aokin1::pyrG</i>	This study

<i>glaA</i> -MS2-ΔK1N	<i>niaD</i> ⁻ <i>PpgkA-nls-mcp-2×egfp::niaD</i> <i>sC</i> ⁻ <i>PAotps1-mcherry-nls::AosC adeA</i> ⁻ Δ <i>argB::adeA</i> ⁻ Δ <i>ligD::argB</i> Δ <i>pyrG::adeA</i> Δ <i>Aokin1::pyrG</i>	This study
<i>glaA</i> -MS2-ΔK1S61	<i>niaD</i> ⁻ <i>PpgkA-nls-mcp-2×egfp::niaD</i> <i>sC</i> ⁻ <i>PpgkA-Aosec61-mcherry::AosC adeA</i> ⁻ Δ <i>argB::adeA</i> ⁻ Δ <i>ligD::argB</i> Δ <i>pyrG::adeA</i> Δ <i>Aokin1::pyrG</i>	This study
<i>glaA</i> -MS2-ΔK1R5	<i>niaD</i> ⁻ <i>PpgkA-nls-mcp-2×egfp::niaD</i> <i>sC</i> ⁻ <i>PpgkA-mcherry-Aorab5::AosC adeA</i> ⁻ Δ <i>argB::adeA</i> ⁻ Δ <i>ligD::argB</i> Δ <i>pyrG::adeA</i> Δ <i>Aokin1::pyrG</i>	This study
<i>glaA</i> -MS2-ΔK3	<i>niaD</i> ⁻ <i>PpgkA-nls-mcp-2×egfp::niaD</i> <i>sC</i> ⁻ <i>adeA</i> ⁻ Δ <i>argB::adeA</i> ⁻ Δ <i>ligD::argB</i> Δ <i>pyrG::adeA</i> Δ <i>Aokin3::pyrG</i>	This study
<i>glaA</i> -MS2-ΔK3N	<i>niaD</i> ⁻ <i>PpgkA-nls-mcp-2×egfp::niaD</i> <i>sC</i> ⁻ <i>PAotps1-mcherry-nls::AosC adeA</i> ⁻ Δ <i>argB::adeA</i> ⁻ Δ <i>ligD::argB</i> Δ <i>pyrG::adeA</i> Δ <i>Aokin3::pyrG</i>	This study
<i>glaA</i> -MS2-ΔK3S61	<i>niaD</i> ⁻ <i>PpgkA-nls-mcp-2×egfp::niaD</i> <i>sC</i> ⁻ <i>PpgkA-Aosec61-mcherry::AosC adeA</i> ⁻ Δ <i>argB::adeA</i> ⁻ Δ <i>ligD::argB</i> Δ <i>pyrG::adeA</i> Δ <i>Aokin3::pyrG</i>	This study
<i>glaA</i> -MS2-ΔK3R5	<i>niaD</i> ⁻ <i>PpgkA-nls-mcp-2×egfp::niaD</i> <i>sC</i> ⁻ <i>PpgkA-mcherry-Aorab5::AosC adeA</i> ⁻ Δ <i>argB::adeA</i> ⁻ Δ <i>ligD::argB</i> Δ <i>pyrG::adeA</i> Δ <i>Aokin3::pyrG</i>	This study
<i>glaA</i> -MS2-ΔΔK1K3	<i>niaD</i> ⁻ <i>PpgkA-nls-mcp-2×egfp::niaD</i> <i>sC</i> ⁻ <i>adeA</i> ⁻ Δ <i>argB::adeA</i> ⁻ Δ <i>ligD::argB</i> Δ <i>pyrG::adeA</i> Δ <i>Aokin1::ptrA</i> Δ <i>Aokin3::pyrG</i>	This study
<i>glaA</i> -MS2-ΔΔK1K3N	<i>niaD</i> ⁻ <i>PpgkA-nls-mcp-2×egfp::niaD</i> <i>sC</i> ⁻ <i>PAotps1-mcherry-nls::AosC adeA</i> ⁻ Δ <i>argB::adeA</i> ⁻ Δ <i>ligD::argB</i> Δ <i>pyrG::adeA</i> Δ <i>Aokin1::ptrA</i> Δ <i>Aokin3::pyrG</i>	This study
<i>glaA</i> -MS2-ΔΔK1K3S61	<i>niaD</i> ⁻ <i>PpgkA-nls-mcp-2×egfp::niaD</i> <i>sC</i> ⁻ <i>PpgkA-Aosec61-mcherry::AosC adeA</i> ⁻ Δ <i>argB::adeA</i> ⁻ Δ <i>ligD::argB</i> Δ <i>pyrG::adeA</i> Δ <i>Aokin1::AnptrA</i> Δ <i>Aokin3::pyrG</i>	This study

使用プラスミド

使用したプラスミドは以下の通りである。

Plasmid	Construction	Reference
pgPamyB-Smal-egfp-TamyB	<i>PamyB-Smal-egfp-TamyB-niaD-amp</i>	Togo <i>et al.</i> 2017
pgLifeactegnD	<i>PamyB-Lifeact-egfp-TamyB-niaD-amp</i>	Morita <i>et al.</i> , 2020
pgPaUAPCegnD	<i>PamyB-uspC-egfp-TamyB-niaD-amp</i>	Morita <i>et al.</i> , 2020
pgPaGAoSec22	<i>PamyB-egfp-Aosec22-TamyB-niaD-amp</i>	Togo <i>et al.</i> 2017
pgPaGAoSnc1	<i>PamyB-egfp-Aosnc1-TamyB-niaD-amp</i>	Togo <i>et al.</i> 2017
pgPaGAoVam3	<i>PamyB-egfp-Aoxam3-TamyB-niaD-amp</i>	Togo <i>et al.</i> 2017
pgNotI-AosC-NotI	NotI-AosC-NotI	This study
pgSmal-pyrG-ptrA	Smal-pyrG-ptrA	This study
pET264	pUC 24xMS2V6 <i>LoxP</i> KANr <i>LoxP</i>	Tutucci <i>et al.</i> , 2018
pANPXP-Cre	<i>lox-AnptrA-Cre-lox</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2017
36×MBS cassette	NotI-36× <i>mbs-lox-AnptrA-Cre-lox</i> -NotI	This study
<i>glaA</i> -36×MBS-AnptrA cassette	NotI- <i>glaA</i> ORF- <i>loxPtrA-Cre-lox-glaA</i> 3'UTR-NotI	This study
<i>glaA</i> -36×MBS cassette	NotI- <i>glaA</i> ORF- <i>loxPyrG-Cre-lox-glaA</i> 3'UTR-NotI	This study
pgPpSmalG	<i>PpgkA-Smal-egfp-TamyB-niaD</i>	This study
pgPpSmalMC	<i>PpgkA-Smal-mcherry-TamyB-AosC</i>	This study
pgPpMG	<i>PpgkA-mcp-egfp-TamyB-niaD</i>	This study
pgPpM2G	<i>PpgkA-mcp-2×egfp-TamyB-niaD</i>	This study
pgPcNM2G	<i>PAocyc1-nls-mcp-2×egfp-TamyB-niaD</i>	This study
pgPpNM2G	<i>PpgkA-nls-mcp-2×egfp-TamyB-niaD</i>	This study
pgPtmCN	<i>PAotps1-mcherry-nls-TamyB-AosC</i>	This study
pgPpS61mCN	<i>PpgkA-Aosec61-mcherry-TamyB-niaD</i>	This study

pgPpS61mCS	<i>PpgkA-Aosec61-mcherry-TamyB-AosC</i>	This study
pgPpmCR5	<i>PpgkA-mcherry-Aorab5-TamyB-AosC</i>	This study
pgPamCAtuA	<i>PpgkA-mcherry-atuA-TamyB-AosC</i>	This study
pgPamTBAtuA	<i>PpgkA-mtagbfp2-atuA-TamyB- AopyrG-AoptrA</i>	This study
pgPpB5mC	<i>PpgkA-Aobre5-mcherry-TamyB-AosC</i>	This study
pgPpB5mTB	<i>PpgkA-Aobre5-mtagbfp2-TamyB-AopyrG-AoptrA</i>	This study
pgPpE3mC	<i>PpgkA-Aoedc3-mcherry-TamyB-AosC</i>	This study
pgPpE3mTB	<i>PpgkA-Aoedc3-mtagbfp2-TamyB-AopyrG-AoptrA</i>	This study
pgPpP1G	<i>PpgkA-Aopab1-egfp-TamyB-niaD</i>	This study
pgPpP1mC	<i>PpgkA-Aopab1-mcherry-TamyB-AosC</i>	This study
pgPpD2mC	<i>PpgkA-Aodcp2-mcherry-TamyB-AosC</i>	This study
pgAbp1-EGFP	<i>Spel-5'abp1-TamyB-AosC-3'abp1-Spel</i>	This study
Δ Aohok1-pyrG cassette	<i>NotI-Aohok1 5'UTR-pyrG-TamyB-Aohok1 3'UTR- NotI</i>	This study
Δ Aokin1-pyrG cassette	<i>NotI-Aokin1 5'UTR-pyrG-TamyB- Aokin1 3'UTR-NotI</i>	This study
Δ Aokin1-ptrA cassette	<i>NotI-Aokin1 5'UTR-AnptrA-TamyB-Aokin1 3'UTR- NotI</i>	This study
Δ Aokin3-pyrG cassette	<i>NotI-Aokin3 5'UTR-pyrG-TamyB-Aokin3 3'UTR-NotI</i>	This study

使用プラスミドの作製手順

使用したプラスミドの作製手順は以下の通りである。

Plasmid	Method
pgNotI-AosC-NotI	当研究室の柿本により作製された。
pgSmaI-pyrG-ptrA	pyrG を YM271 と YM272、ptrA を KK218 と YM272、amp を KK324 と YM60 で増幅した各 DNA 断片をライゲーションした。
36×MBS cassette	pANPXP-Cre を YM119 と YM120 で増幅しライゲーションし、Cre/loxP cassette の上流に NotI サイトを挿入した。その後、36×MBS を YM121 と YM86、上記プラスミドを YM87 と YM122 で増幅した各 DNA 断片をライゲーションし、Cre/loxP cassette の上流に 36×MBS を導入した。36×MBS は 24×MBS を増幅したときに、偶然的に得られる約 2.4 kbp のバンドを精製し使用した (Fig. 2-1-5)。最後に上記プラスミドを YM123 と YM124 で増幅した DNA 断片をライゲーションし、Cre/loxP cassette の下流に NotI サイトを挿入する
<i>glaA</i> -36×MBS- <i>Anptra</i> cassette	<i>glaA</i> 遺伝子の 3'末端 ORF 939 bp を YM148 と YM149、36×MBS cassette を YM115 と YM122 で増幅した各 DNA 断片のライゲーションを行った。続いて、 <i>glaA</i> 遺伝子の 5'UTR 側 950 bp を YM150 と YM151、上記プラスミドを YM130 と YM116 で増幅した各 DNA 断片をライゲーションした。 <i>glaA</i> 遺伝子の相同組換え領域を増幅するために、 <i>A. oryzae</i> RIB40 のゲノム DNA を使用した。
<i>glaA</i> -36×MBS cassette	pyrG を YM249 と YM250、 <i>glaA</i> -36×MBS- <i>Anptra</i> cassette を MK15 と MK16 で増幅した各 DNA 断片をライゲーションした。
pgPpSmaIG	PpgkA を YM56 と YM63 で増幅し、pgPamyB-SmaI-egfp-TamyB (Morita et al., 2021) を YM80 と YM60 で増幅した DNA 断片をライゲーションし、egfp の上流に SmaI の制限酵素サイトを挿入した。
pgPpSmaImC	pgPpS61mC を YM210 と YM79 で増幅した DNA 断片をライゲーションし、mcherry の上流に SmaI の制限酵素サイトを挿入した。
pgPpMG	MCP を YM95 と YM186、egfp を YM28 と YM74、TamyB-niaD-amp-ori-PpgkA を KK230 と YM79 で増幅した各 DNA 断片をライゲーションした。
pgPpM2G	egfp を YM187 と YM188、pgPpMG を YM189 と YM190 で増幅した各 DNA 断片をライゲーションした。
pgPcNM2G	PAocyc1 を YM235 と YM260、pgPpM2G を YM259 と YM60 で増幅した各 DNA 断片をライゲーションした。
pgPpNM2G	PpgkA を YM56 と YM264、pgPcNM2G を YM263, YM60 で増幅した

	各 DNA 断片をライゲーションした。
pgPtmCN	<i>PAotps1</i> の 5'UTR 側 1009 bp を YM237 と YM314、 <i>mcherry</i> を YM216 と YM294、AoStuA 由来 NLS を YM144 と YM109、TamyB-sC-amp-ori を YM112 と YM60 で増幅した各 DNA 断片をライゲーションした。
pgPpS61mCN	<i>Aosec61</i> を YM214 と YM215、 <i>mcherry</i> を YM216 と YM211、TamyB-niaD-amp-ori-PpgkA を KK230 と YM79 で増幅した各 DNA 断片をライゲーションした。 <i>Aosec61</i> 遺伝子を増幅するために、 <i>A. oryzae</i> RIB40 のゲノム DNA を使用した。
pgPpS61mCS	pgPpS61mCN を KK324 と KK189、sC を SH23 と SH24 で増幅した各 DNA 断片をライゲーションした。
pgPpmCR5	<i>Aorab5</i> を YM217 と YM218、 <i>mcherry</i> を YM206 と YM207、pgPpS61mC から TamyB-sC-amp-ori-PpgkA を KK230 と YM79 で増幅した各 DNA 断片をライゲーションした。 <i>Aorab5</i> 遺伝子を増幅するために、 <i>A. oryzae</i> RIB40 のゲノム DNA を使用した。
pgPamCAtuA	当研究室の川富により作製された。
pgPamTBAtuA	当研究室の川富により作製された。
pgPpB5mC	<i>Aobre5</i> を YM322 と YM323、pgPpS61mC から <i>mcherry</i> -TamyB-sC-amp-ori-PpgkA を YM211 と YM79 で増幅した DNA 断片をライゲーションした。 <i>Aobre5</i> 遺伝子を増幅するために、 <i>A. oryzae</i> RIB40 のゲノム DNA を使用した。
pgPpB5mCPP	pgPpB5mC を YM292 と YM293 で増幅し、pgSmaI-pyrG-ptrA を SmaI で処理した DNA 断片とライゲーションした。
pgPpB5mTBPP	pgPpB5mCPP を YM323 と KK230、 <i>mtagbfp2</i> を YM305 と YM230 で増幅した DNA 断片をライゲーションした。 <i>mtagbfp2</i> 遺伝子は GeneArt で遺伝子合成を行い、 <i>A. oryzae</i> で使用頻度の高いコドンに最適化した。
pgPpE3mC	<i>Aoedc3</i> を YM324 と YM324、pgPpS61mC から <i>mcherry</i> -TamyB-sC-amp-ori-PpgkA を YM211 と YM79 で増幅した DNA 断片をライゲーションした。 <i>Aoedc3</i> 遺伝子を増幅するために、 <i>A. oryzae</i> RIB40 のゲノム DNA を使用した。
pgPpE3mCPP	pgPpE3mC を YM292 と YM293 で増幅し、pgSmaI-pyrG-ptrA を SmaI で処理した DNA 断片とライゲーションした。
pgPpE3mTBPP	pgPpE3mCPP を YM325 と KK230、 <i>mtagbfp2</i> を YM305 と YM230 で増幅した DNA 断片をライゲーションした。
pgPpP1G	<i>Aopab1</i> を YM65 と YM47 で増幅した DNA 断片と、pgPpSmaI-G を SmaI で消化した DNA 断片をライゲーションした。 <i>Aopab1</i> 遺伝子を

	増幅するために、 <i>A. oryzae</i> RIB40 のゲノム DNA を使用した。
pgPpP1mC	<i>Aopab1</i> を YM65 と YM212 で増幅し、pgPpSmal mC を SmaI で消化した DNA 断片をライゲーションした。
pgPpD2mC	<i>Aodcp2</i> を YM244 と YM245 で増幅し、pgPpSmal mC を SmaI で消化した DNA 断片をライゲーションした。 <i>Aodcp2</i> 遺伝子を増幅するために、 <i>A. oryzae</i> RIB40 のゲノム DNA を使用した。
pgAbp1-EGFP	樋口裕次郎博士論文 (2010) で作製された。
ΔAohok1-pyrG cassette	<i>Aohok1</i> 遺伝子の 5'UTR 側 936 bp を YM276 と YM277、 <i>Aohok1</i> 遺伝子の 3'UTR 側 956 bp を YM278 と YM279、 <i>pyrG</i> 選択マーカーを YM221 と YM222、 <i>amp</i> を YM130 と YM122 で増幅した各 DNA 断片をライゲーションした。 <i>Aohok1</i> 遺伝子の相同組換え領域を増幅するために、 <i>A. oryzae</i> RIB40 のゲノム DNA を使用した。
ΔAokin1-pyrG cassette	<i>Aokin1</i> 遺伝子の 5'UTR 側 936 bp を YM280 と YM281、 <i>Aokin1</i> 遺伝子の 3'UTR 側 956 bp を YM282 と YM283、 <i>pyrG</i> を YM221 と YM222、 <i>amp</i> を YM130 と YM122 で増幅した各 DNA 断片をライゲーションした。 <i>Aokin1</i> 遺伝子の相同組換え領域を増幅するために、 <i>A. oryzae</i> RIB40 のゲノム DNA を使用した。
ΔAokin1-ptrA cassette	<i>AnptrA</i> 選択マーカーを YM316 と YM317、Δ <i>Aokin1</i> cassette を YM318 と YM319 で増幅した DNA 断片をライゲーションした。
ΔAokin3-pyrG cassette	<i>Aokin3</i> 遺伝子の 5'UTR 側 936 bp を YM284 と YM285、 <i>Aokin3</i> 遺伝子の 3'UTR 側 956 bp を YM286 と YM286、 <i>pyrG</i> を YM221 と YM222、 <i>amp</i> を YM130 と YM122 で増幅した各 DNA 断片をライゲーションした。 <i>Aokin3</i> 遺伝子の相同組換え領域を増幅するために、 <i>A. oryzae</i> RIB40 のゲノム DNA を使用した。

使用プライマー

使用したプライマーは以下の通りである。

Primer	Sequence
YM119	GGTTAACGCGGCCGCGCAGGATTACGTTGAAGGGCTTAG
YM120	TAATCCTGCGGCCGCGTTAACCGCTCACAATTCCACAC
YM121	GGTTAACGCGGCCGCGCAGAGCCCCCTGGCAATCGC
YM86	GCTATACGAACGGTATCCGTGTGAGGGTCTCTGTCGC
YM87	TACCGTTCTGTATAGCATACATTATACGAAG
YM122	GCGGCCGCGTTAACCGCTCA
YM123	AACGGTAGCGGCCGCTATGGTGCACTCTCAGTACAATC
YM124	CACCATAGCGGCCGCTACCGTTCTGTATAATGTATGCTATACG
YM148	GGTTAACGCGGCCGCGCGGTCTGTGCTGAGAATCAAGCTG
YM149	TGCCAGGGGGCTCTGTCACCGCCAAACATCGCTCTG
YM115	CAGAGCCCCCTGGCAATCGC
YM150	ATTATACGAACGGTATCATCATGTCCCGATGAAGAGG
YM151	CACCATAGCGGCCGCGGAACAACGAGCTTCGGATG
YM130	GCGGCCGCTATGGTGCACTC
YM116	TACCGTTCTGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATC
YM249	GTATCCAAGACGCATGAGTGCGGCTGACAACTATG
YM250	TCTGACGCCTCATTCCCACGATTGAACATCCTCGTCC
MK15	GAATGAGGCGTCAGACGTGAC
MK14	ATGCGTCTTGGATACGCGAC
YM95	TTGTGTGATAGAACAATGCTCGCCGTCAAGATGGC
YM186	GCCCTTGCTCACCATGTTGAGGCAACGAGAATCGGCGTAGATGCCGCTG TTGGCGG
YM28	ATGGTGAGCAAGGGCGAGGA
YM74	GAATTATCAACTATGTTACTTGTACAGCTCGTCCATGC
KK230	CATAGTTGATAATTCACTGGCCGTCTG
YM79	TGTTCTATCACACAAGGTGGGGG
YM187	TACGCCGATTCTCGTATGGTGAGCAAGGGCGAGGA
YM188	CACCATGTTGAGGCACTTGTACAGCTCGTCCATGCCG
YM189	TGCCTCAACATGGTGAGCAAG

YM190	ACGAGAATCGGCGTAGATGC
YM235	GATAACAATTTACACTACTAGGGGGAATACAGACGG
YM260	TTACGCTTCTTTTTAGGCATTGTGAATGTGTGTAGTAAAGTCTAAAAGAC
YM259	TAAAAAGAAGCGTAAAGTGACCGGCATGCTCGCCGTCAAGATGGC
YM195	AAGAAGCGCAAGGTCAACCGGTATGGTGAGCAAGGGCGAGGA
YM196	GACCTTGCGCTTCTTCTTGGGGTAGATGCCGCTGTTGGCGG
YM261	AAGAAACGCAAGGTCTAACATAGTTGATAATTCAGTGGCCGTC
YM262	GACCTTGCGTTTCTTCTTTGGCTTGTACAGCTCGTCCATGC
YM60	TGTGAAATTGTTATCCGCTGGTATCAG
YM56	GATAACAATTTACATATTGACTACTATGGTAACCAACGCG
YM264	CTTCTTTTTAGGCATTGTTCTATCACACAAGGTGGGG
YM263	ATGCCTAAAAAGAAGCGTAAAGTGAC
YM214	TTGTGTGATAGAACAATGAGCGGACGTGAGTGAC
YM215	GCCCTTGCTGACCATGTTGCCAGGAACAAGGCCCTTG
YM216	ATGGTCAGCAAGGGCGAAGAG
YM211	GAATTATCAACTATGTTACTTGTACAGCTCATCCATGCC
KK324	TATGGTGCACTCTCAGTACAATCTGC
KK189	TATGCGGTGTGAAATACCGCACAG
SH23	ATTTACACCCGCATAGATTTAGTTCCGTTCTGTCAGG
SH24	TGAGAGTGCACCATACCAAGGAACAGGTCAGGATTAAAG
YM217	GATGAGCTGTACAAGATGTCTGAGTCAACTAGCACAAATAC
YM218	GAATTATCAACTATGTTAACAAGCACAAACCTTCTTTGGC
YM206	TTGTGTGATAGAACAATGGTCAGCAAGGGCGAAGA
YM207	CTTGTACAGCTCATCCATGCCG
YM322	TTGTGTGATAGAACAATGGCCGATACTCAAGCCCCC
YM323	GCCCTTGCTGACCATAGCAGCCTGAGCCTGGTTGC
YM324	TTGTGTGATAGAACAATGGATCGCGCCCGCAAGAAG
YM325	GCCCTTGCTGACCATAGCAGAGGATGGCTGGTAGCG
YM63	GCTCACCATCCCGGGTGTCTATCACACAAGGTGGGGGG
YM80	CCCGGGATGGTGAGCAAGGG
YM65	TGTGATAGAACACCCATGTCTGCCGACGCCTCTAC
YM47	CTTGCTCACCATCCCCGACTTGTCTCTTCGGTAGAGG
YM210	TTGTGTGATAGAACACCCGGGATGGTCAGCAAGGGCGAAGA

YM212	CTTGCTGACCATCCCCGACTTGTTCTCTTCGGTAGAGG
YM244	TGTGATAGAACACCCATGACAGAAACAAAGATGCATTTAGAAG
YM245	CTTGCTGACCATCCCCTTGTTCCCTTTGGCAACACC
YM237	GATAACAATTTACACGCCACCATGAGAGAAAAGG
YM314	GCCCTTGCTGACCATTTTTGGTGAAATCGGATTTGATGGTTG
YM294	ACGCTTTCCTGACCCCTTGACAGCTCATCCATGCCG
YM144	GGGTCAGGAAAGCGTATGCGGG
YM109	TTATCAACTATGTAAAGTCTTCCGGCGCTTGCTCT
YM112	TAACATAGTTGATAATTCAGTGGCCGTC
YM276	GGTTAACGCGGCCGCCATTCCTAGGGTGGACGGATC
YM277	TTGTCAGCCGCACTCGTTGGCCTAAGAGGCAGTTG
YM278	GATGTTCAATCGTGGTACCGAAGCATAATTTGCAGTATATCC
YM279	CACCATAGCGGCCGCGCCTATATGGATCCGGTGTCG
YM221	GAGTGCGGCTGACAACTATG
YM222	CCACGATTGAACATCCTCGTCC
YM280	GGTTAACGCGGCCGCCAAAAGGTGACAGCATACTGCC
YM281	TTGTCAGCCGCACTCGTTCACTCTGACCCAGAAACCC
YM282	GATGTTCAATCGTGGTCCACGATTTCTCTTTTGTGTTTATTTATC
YM283	CACCATAGCGGCCGCGAGGCCTTACTGAAGGTGCAG
YM316	TGGTCGCGTATCCAAGACGC
YM317	TCATTCACTTTGTTGCCTCGGTG
YM318	CAACAAAGTGAATGATCCACGATTTCTCTTTTGTGTTTATTTATC
YM319	TTGGATACGCGACCAGTTCACTCTGACCCAGAAACCC
YM284	GGTTAACGCGGCCGCGCAAGAGCATTTACATGGGC
YM285	TTGTCAGCCGCACTCTATGACCAATCCCCCATGCAC
YM286	GATGTTCAATCGTGGCTTCTGTCTGTCACATCAGCC
YM287	CACCATAGCGGCCGCTTCCGGCCATGACCAGTAC
YM271	GATAACAATTTACACCCGGGGAGTGCGGCTGACAACTATG
YM272	CGTAATCAATTGCCCCCACGATTGAACATCCTCGTCC
KK218	GGGCAATTGATTACGGGATCCC
YM273	TGAGAGTGCACCATAATGGGGTGACGATGAGCCGCTCTTG
YM305	ATGGTCAGCAAGGGCGAAGA

使用培地

使用した培地(100 mL)は以下の通りである。

● Lysogeny Broth (LB) medium

Compositions	Volume
LB broth (EMD Millipore Corporation)	2.5 g
Ampicillin sodium (ストック溶液濃度 : 100 ng/mL)	100 μ L
Agar	3 g

● Czapek-Dox (CD) medium

Compositions	Volume
NaNO ₃	0.3 g
KCl	0.2 g
KH ₂ PO ₄	0.1 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.05 g
0.2 % FeSO ₄ · 7H ₂ O	1 mL
Glucose	2 g

※ プレート用寒天培地は 2% Agar を添加した。

※ *pyrG* 欠失株は Uracil, Uridine を培地に添加した。Uridine は極微量を添加し、Uracil は 0.1%を添加した。

※ CDm 培地は 0.00015% Methionine solution を添加した。

● Minimal (M) medium

Compositions	Volume
NH ₄ Cl	0.2 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.1 g
KCl	0.05 g
NaCl	0.05 g
KH ₂ PO ₄	0.1 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.05 g
0.2 % FeSO ₄ · 7H ₂ O	1 mL
Glucose	2 g

※ プレート用寒天培地は 2% Agar を添加した。

※ MM 培地は 0.00015% Methionine solution を添加した。

● DPY medium

Compositions	Volume
Dextrin	2 g
Polypeptone	1 g
Yeast extract	0.5 g
KH ₂ PO ₄	0.5 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.05 g

※ プレート用寒天培地は 2% Agar を添加した。

プラスミド DNA の作製法

プラスミドの作製手順は以下の通りである。

1. コンピテントセルを -80°C フリーザーから取り出し、氷上で融解した。
2. PCR もしくは制限酵素処理によって目的 DNA 断片を得た。
3. In-Fusion® HD Cloning Kit (Takara) を使用し、DNA 断片のライゲーション反応 (37°C, 15 min) を行った。
4. コンピテントセル 100 µL に上記の反応産物を 5 µL 添加し、よく混合し氷上で静置 (30 min) した。
5. ヒートショック (42°C, 90 sec) を行い、その後氷上で 5 min 静置した。
6. LB 培地にコンピテントセル溶液を植菌し、37°C で 16 h 培養した。

※ DH5α 株のコンピテントセルは、Inoue 法に従って作製を行った (Inoue *et al.* 1990)。

※ プラスミド DNA 抽出は GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma) を使用し、添付された説明書に従って行った。

※ 制限酵素は Fast Digest (Thermo Fisher Scientific) を使用した。100 ng/µL プラスミド溶液 10 µL, green Buffer 2 µL, Enzyme 1 µL, DDW 7 µL で反応液を調製し、37°C, 1h で処理を行った。

※ DNA シーケンス解析は、Azenta に依頼した。

DNA 断片の調製法

Polymerase Chain Reaction (PCR) は、PCR Thermal Cycler PERSONAL (Takara), Thermal Cycler GeneAtlas 322/325 (Astec) 及び Arktik Thermal Cycler (Thermo Scientific) を使用した。使用した DNA ポリメラーゼは、下記の通りである。

Polymerase	Identifier
PrimeSTAR GXL	Takara
PrimeSTAR MAX	Takara
KOD FX	Toyobo
Go Taq	Promega

- ※ PCR は各 DNA ポリメラーゼに添付された説明書通りに行った。
- ※ colony PCR (cPCR) は 2 倍希釈した Go Taq 反応液 10 μ L を使用した。cPCR は極微量の大腸菌を Go Taq 反応液に懸濁し、それを鋳型とした。
- ※ Spore PCR は KOD FX を使用した。Spore PCR は KOD FX 反応液に分生子懸濁液を添加し、それを鋳型とした。分生子懸濁液はプレートから分生子を少量採取し、滅菌水 50 μ L に懸濁して作製を行った。

PCR 産物の精製法

Monofas DNA Purification Kit I (GL Science) を用いて精製を行った。電気泳動装置は Mupid-One (Mupid) を使用した。電気泳動用ゲルは TAE バッファーに 0.7% アガロース LE クラシックタイプ (Nacalai tesque) を添加し作製を行った。その際、エチジウムブロマイド溶液 (Nippon gene) を終濃度 0.5 mg/mL で添加した。DNA 検出装置として、デジプリント MiniCCD UV 用, DP-MiniCCD UV (Bio Tools) を使用した。

A. oryzae の形質転換法

プロトプラスト-PEG 法によって形質転換を行った。手順は以下の通りである。

1. 液体培地に適量の分生子を植菌し、30°C で 20 h 振盪培養した。
2. TF Solution I 10 mL を 0.45 μ m フィルターで滅菌し、50 mL チューブに入れた。
3. ミラクロスで集菌後に、滅菌水で洗菌を行った。
4. TF Solution I に菌体を入れ、軽く振りながら菌糸塊を解きほぐした。

5. L 字管に移し、プロトプラスト化 (30°C, 50 rpm, 3 h) を行った。
6. ミラクロスで濾過し、プロトプラストを含む濾液を回収した。
7. プロトプラスト溶液に TF Solution II を同量加え、よく混和した。
8. 2,000 rpm、8 min、4°Cで遠心を行った。
9. 上清を除き、TF Solution II 5 mL を再度加え、ペレットを懸濁した。
10. 2,000 rpm、8 min、4°Cで遠心を行った。
11. 上清を除き、形質転換用 DNA×200 mL の TF Solution II でペレットを懸濁し、15 mL チューブに 200 μ L ずつ分注した。
12. 形質転換用 DNA 溶液 10 μ L (DNA: 5~7 μ g) を加えて優しくタッピングして懸濁し、氷上で 30 min 静置した。
13. TF Solution III 1 mL を加え、優しくタッピングして懸濁した。その後、30°Cで 20 min 静置した。
14. TF Solution II 10 mL を加えて転倒混和した。
15. 2,000 rpm、8 min、4°Cで遠心を行った。
16. 200 mL 程残すように上清を捨て、選択培地に軽く塗布した。
17. 重層用軟寒天培地 4 mL を加え、素早く混合し重層した。
18. 30°Cで培養し、生えてきたコロニーを選択培地に 1~3 回植え継ぎ、形質転換体を取得した。

Solution	Contents
TF Solution I	0.01g Yatalase (Takara), 0.01g CELLULASE “onozuka” R-10 (Yakult), 0.6 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 50 mM Maleate buffer (pH 5.5)
TF Solution II	1.2 M sorbitol, 50 mM CaCl ₂ , 35 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5)
TF Solution III	60% polyethylene glycol 4000, 50 mM CaCl ₂ , 10 mM Tris-HCl (pH 7.5)

※ 重層用軟寒天培地：1.2 M sorbitol、0.6% Agar を含む各種選択培地

A. *oryzae* の Total RNA 抽出法

炭素源をマルトースに置換した CD (mal) 液体培地 100 mL に 1.0×10^5 個の分生子を植菌し、30°C, 24 h, 150 rpm で培養を行った。その後ミラクロスで集菌し、メタルコーンで菌体破碎を行った。RNA 抽出キット(QIAGEN) を使用し Total RNA 抽出を行った。

cDNA 合成法

cDNA 合成は抽出した Total RNA から SuperPrep Cell Lysis & RT Kit for qPCR (Toyobo) を使用して行った。cDNA 合成の PCR 条件は添付された説明書に従った。

PT-qPCR

Thunderbird SYBR qPCR Mix (Toyobo) を使用し、説明書通りに PT-qPCR を行った。PCR 装置は Thermal Cycler Dice Real Time System TP-800 instrument (Takara) を使用した。使用プライマーは以下の通りである。

Primer	Sequence
YHK190	CGGTTCTCTCGTGCCCTATT
YHK191	GATGTCTTTGCCCGATCGCC
YHK196	CGTCGAGTCCACTGGTGTCTT
YHK197	TTGTTGACACCCATAACGAACATGG

グルコアミラーゼ活性測定法

DPY 液体培地 20 mL に 1.0×10^7 個の分生子を植菌し、30°C, 3 days, 150 rpm で培養を行った。その後ミラクロスで集菌し、菌体は 60°C インキュベーターで乾燥させ、培養上清はグルコアミラーゼ活性測定に使用した。グルコアミラーゼ活性は、糖化力分別定量キット(Kikkoman) の説明書に従って測定を行った。

顕微鏡使用機器

- smFISH 法で使用した顕微鏡およびその搭載機器

Device	Details
倒立顕微鏡	ECLIPSE Ti2-A inverted microscope (Nikon)
対物レンズ	CFI Plan Apo Lambda 100 × objective lens (1.45 numerical aperture)
カメラ	DS-Qi2 digital camera
フィルター	LED-DA/FI/TX-A triple band filter (Semrock: Exciter, FF01-378/474/575; Emission, FF01-432/523/702; Dichroic mirror, FF409/493/596-Di02)
LED 光源	LED light source X-LED1

- MS2 system で使用した顕微鏡およびその搭載機器

Device	Details
倒立顕微鏡	THUNDER Imager Live Cell (Leica microsystems)
対物レンズ	HCX PLAPO 100×/1.40-0.70 OIL objective lens
カメラ	K8 Scientific CMOS camera
フィルター	DFT51010 filter (Leica : LED, DAPI_FITC_TXRED_Cy5-390/475/555/635; Excitation Range, DAPI_FITC_TXRED_Cy5-375-407/462-496/542-566/622-654; Emission Range, DAPI_FITC_TXRED_Cy5-420-450/506-532/578-610/666-724; Dichroic, DAPI_FITC_TXRED_Cy5-415/490/ 572/660) and a CYR71010 filter (Leica : LED, CFP_YFP_RFP_NIR-440/510/575/730; Excitation Range, CFP_YFP_RFP_NIR-422-450/495-517/566-590/710-750; Emission Range, CFP_YFP_RFP_NIR-462-484/527-551/ 602-680/770-850; Dichroic, CFP_YFP_RFP_NIR-459/523/598/763)
LED 光源	LED light source LED8 (Leica microsystems)

顕微鏡用試料の培養法

- smFISH 法

0.2 μm のフィルターを使用して滅菌した CD (mal) medium 200 μL をポリリジンコートしたガラスボトムディッシュ (matsunami) に添加し、*glaA*-36×MBS 株および *glaA*-MS2 株の分生子を 1.0×10^5 個/ 10 μl 植菌して 30°C で 24 h 培養した。

- MS2 system

0.2 μm のフィルターを使用して滅菌した CD medium および CD (mal) medium 200 μL をポリリジンコートしたガラスボトムディッシュに添加し、*glaA*-MS2 株および各共局在解析株の分生子を 8.0×10^4 個/ 8 μl 植菌して 30°C 20 h および 24 h 培養した。

イメージング解析法

局在解析画像は THUNDER imaging system による処理を次の設定で行った。Instant Computational Clearing (ICC) は封入剤を Water にし、Feature Scale を以下に設定した。局在画像解析およびタイムラプス解析は ImageJ Fiji を使用した (Schindelin et al., 2012)。

Objects	LED	Feature Scale
<i>glaA</i> mRNA	FITC	0.4 μm
AoSec61-mCherry	DAPI/TXRED/RFP	0.4 μm
mCherry-AoRab5	TXRED/RFP	0.4 μm
AoEdc3- mCherry/mTagBFP2	DAPI/TXRED/RFP	0.4 μm
AoDcp2-mCherry	RFP	0.4 μm
mCherry-NLS	TXRED/RFP	1.0 μm
AoBre5- mCherry/mTagBFP2	DAPI/TXRED/RFP	1.5 μm
AoPab1-mCherry	FITC	1.5 μm
mCherry/mTagBFP2-AtuA	DAPI/TXRED/RFP	0.4 μm

● 局在画像解析

glaA mRNA 数の測定は RS-FISH のプラグインを使用した (Ella Bahry et al. 2022)。 *glaA* mRNA 局在解析画像と核局在解析画像を 16 bit から 8 bit に変換してマージし、各菌糸部位をクロップした。その後、各画像を再度分割して核局在解析画像を 2 値化し、image calculator で *glaA* mRNA 局在解析画像から減算した。核蛍光を消失させた *glaA* mRNA 局在解析画像のバック蛍光を Math の subtract で完全に減算し Gaussian filter で処理した。次の設定で RS-FISH による計測を実行した。Radial Symmetry では、Mode=Interactive, ZYX=1.000, RANSAC に設定した。その際、Use anisotropy coefficient for Dog をチェックし、Spot intensity を Linear Interpolation に設定した。その後、Adjust difference-of-gaussian values を sigma=1.5, Threshold=0.00102 に設定して *glaA* mRNA 数の計測を実行した。

glaA mRNA と ER の相関係数は colocalization Finder のプラグインを使用して算出した。 *glaA* mRNA 局在解析画像と ER 局在解析画像を 16 bit から 8 bit に変換してマージし、各菌糸部位をクロップした。その後、各画像のバック蛍光を Math の subtract で減算し、image calculator で *glaA* mRNA 局在解析画像と ER 局在解析画像の共局在箇所を抽出し Gaussian filter で処理した。colocalization Finder を使用し、 *glaA* mRNA 局在解析画像と *glaA* mRNA & ER 局在解析画像の共局在蛍光をプロットし相関係数を算出した。

ER の面積比は ER 局在解析画像から核がない領域をクロップした。細胞膜の両サイドから約 0.7 μm 内側をクロップして細胞質 ER を抽出し、各画像のバック蛍光を Math の subtract で減算し Gaussian filter で処理した。全 ER と細胞質 ER を 2 値化し、Analyze

Particles で各画像の面積を算出して全 ER から細胞質 ER の面積比を算出した。

glaA mRNA と ER の Mander's test は *glaA* mRNA 局在解析画像と ER 局在解析画像を 16 bit から 8 bit に変換してマージし、各菌糸部位をクロップした。その後、各画像を再度分割して各画像のバック蛍光を Math の subtract で減算し Gaussian filter で処理した。*glaA* mRNA 局在解析画像と ER 局在解析画像を 2 値化し、image calculator で *glaA* mRNA 局在解析画像と ER 局在解析画像の共局在箇所を抽出した。Analyze Particles を使用して、*glaA* mRNA 局在解析画像、ER 局在解析画像、*glaA* mRNA & ER 局在解析画像の面積を算出して *glaA* mRNA & ER 局在解析画像に対する *glaA* mRNA 局在解析画像、ER 局在解析画像の面積比を算出した。

● タイムラプス解析

glaA mRNA のみは、EGFP (撮影条件 : FITC, 100%, 20 ms) で 20 秒間撮影を行った。*glaA* mRNA と ER は EGFP (FITC, 100%, 10 ms), mCherry (TXRED, 100%, 20 ms) で 30 秒間撮影を行った。同様の解析で、各キネシン欠失株は EGFP (FITC, 100%, 20 ms), mCherry (TXRED, 100%, 20 ms) で 20 秒間撮影を行った。*glaA* mRNA と EE は EGFP (FITC, 100%, 20 ms), mCherry (TXRED, 100%, 20 ms) で 20 秒間撮影を行った。EE のみの動態は mCherry (TXRED, 100%, 20 ms) で 20 秒間撮影を行った。

各タイムラプス撮影画像は上述の THUNDER imaging system による処理を行った。*glaA* mRNA 動態は TrackMate のプラグインを使用して解析を行った。Dog Detector を使用して、細胞内に非特異的な検出がない閾値で 0.3 μm の蛍光を検出した。その後、Lap Tracker をフレーム間の距離を 0.5 μm 、3 フレーム間のギャップ距離を 0.5 μm に設定して実行した。その際、MAX distance の閾値を 0.8 μm 以上に制限した。*glaA* mRNA と ER の共動態解析は、*glaA* mRNA 動態の解析と同様に行った。*glaA* mRNA 動態と EE 動態のカイモグラフは、kymograph Builder のプラグインを使用した。

統計解析法

すべての解析は再現性確認 (test=2) を行った。エラーバーは標準偏差を表しており、Tukey-Kramer 検定(<https://www.gen-info.osaka-u.ac.jp/MEPHAS/tukey.html>) もしくはエクセルのデータ解析で有意差検定を行った。

ストレス誘導解析法

● 転写阻害解析

転写阻害剤 Actinomycin D (ActD) を使用した。CD 液体培地で培養後、終濃度 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ で ActD を添加し、30°C, 1 h でインキュベートした。その後、終濃度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で ActD を添加した CD (mal) 液体培地で 30°C, 2 h の転写誘導を行った。ActD で抑制された転写を回復するために、CD (mal) 液体培地に置換し 30°C, 2 h で培養を行った。コントロールとして、DMSO を添加した条件で観察を行った。転写阻害確認は PaG を使用した。CD 液体培地で培養後、終濃度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で ActD を添加し、30°C, 1 h で反応させた。その後、終濃度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で ActD を添加した CD (mal) 液体培地で 30°C, 2.5 h 培養し、ImageJ Fiji の plot profile でラインスキャン解析を行った。

● 微小管重合阻害解析

微小管重合阻害剤 Nocodazole (Noc) を使用した。CD (mal) 液体培地で培養後、終濃度 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で Noc を添加し、30°C, 30 min で反応させた。コントロールとして、DMSO を添加した条件で観察を行った。微小管重合阻害確認は NSIDSER5 株を使用した。CD (mal) 液体培地で培養後、終濃度 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で Noc を添加し、30°C 30 min で反応させた。EE 動態は ImageJ Fiji の kymograph Builder を使用して解析を行った。

● アクチン重合阻害解析

アクチン重合阻害剤 Latrunculin B (LatB) を使用した。CD (mal) 液体培地で培養後、終濃度 100 μM で LatB を添加し、30°C, 30 min で反応させた。コントロールとして DMSO を添加した条件でも観察を行った。アクチン重合阻害確認は PaLaG 株を使用した。CD (mal) 液体培地で培養後、終濃度 100 μM で LatB を添加し、30°C 30 min で反応させた。そして、Lifeact-egfp の輝度を ImageJ Fiji の plot profile で解析を行った。

● ER ストレス解析

ER ストレスを誘導するために Dithiothreitol (DTT) を使用した。CD (mal) 液体培地で培養後、終濃度 10 mM で DTT を添加し、30°C, 1~2 h で反応させた。ER ストレスから回復するために、新鮮な CD (mal) 液体培地で 30°C, 2 h で培養を行った。コントロールとして DDW を添加した条件でも観察を行った。

A. *oryzae* の smFISH 法

smFISH 法の手順は以下の通りである。

1. グラスボトムディッシュにて、約 1.0×10^5 個の分生子を液体培地 200 μL に植菌して軽くピペッティングし、30°C, 20 h で静置培養を行った。
2. 7.3% となるように 37% formaldehyde を添加し、室温, 1 h で固定化処理を行った。
3. 氷冷 100 mM Glycine/PBS 100 μL で 1 度洗浄し、5 min で静置した。
4. 氷冷 Fixation Buffer (FB) 100 μL で 2 回洗浄を行った。
5. Zymolyase Buffer 100 μL を加え、30°C, 1.5 h で細胞壁消化処理を行った。
6. 氷冷 FB 100 μL で 2 回洗浄を行った。
7. TritonX-100 Buffer 100 μL 添加して、室温, 10 min で細胞透過処理を行った。
8. 氷冷 FB 100 μL で 3 回洗浄を行った。
9. Hybridization Buffer (Steraris) 100 μL を加え、30°C, 16 h で反応させた。
10. Buffer A (Steraris) 100 μL を加え、室温で 5 min 静置した。
11. Buffer A を 100 μL を加え、30°C で 30 min 静置した。
12. Buffer A+DAPI 100 μL を加え、30°C で 30 min 静置した。
13. Buffer B (Steraris) 100 μL を加え、室温で 3~5 min 静置した。
14. Vectashield Mounting Medium (VEC) 50 μL で菌体をカバーした。

Buffer	Contents
100 mM Glycine/PBS (pH 6.0)	0.8% NaCl, 0.2% KCl, 0.12% Na_2HPO_4 , 0.2% KH_2PO_4 , 100 mM Glycine
Fixation Buffer (pH 7.5)	1.2 M sorbitol, 0.1% K_2HPO_4
20T Zymolyase Buffer	100 μL Fixation Buffer, 0.5 mg/mL 20T Zymolyase
TritonX-100 Buffer	100 μL Fixation Buffer, 0.1% TritonX-100
Hybridization Buffer	100 μL Hybridization Buffer, 2 μL probe (DDW, Steraris)
Buffer A+DAPI	100 μL Buffer A, 0.05 ng/ μL DAPI (DMSO)

- ※ 100 mM Glycine はホルムアルデヒドのタンパク質固定作用を停止する効果に着目し、過剰架橋による自家蛍光を低減するために使用した。
- ※ probe 溶液の希釈率は説明書に従った。
- ※ Buffer A+DAPI は 1 mg/ml DAPI を希釈して作製した。
- ※ Triton-X 100 Buffer と Zymolyase Buffer は要時調製した。

- EGFP 融合タンパク質をコードする mRNA の局在解析用プローブ

設計内容 (color : green (FAM), probe number : 37 probes, oligo length : 18) で作製されたプローブを使用し smFISH を行った。

ggcatcaagggtgaacttcaagatccgccacaacatcgaggacggcagcgtgcagctcgcc
ccgta ttccacttgagttctag cggtagttgtagctctgc gtcgcacgtcagcggg
Probe # 26 Probe # 27 Probe # 28

gaccactaccagcagaacccccatcggcgacggccccgtgctgctgccgacaccac
ct gtgatggtcgtgttgg gtagccgctgcggggca gacgacgggctgtggtg
Probe # 29 Probe # 30 Probe # 31

tacctgagccaccagtcgcccttgagcaagaccccaacgagaaagcggatcacatggtc
tggactcgtgggtcaggc ggactcgtttctgggggt ctcttcgcgtagtgtac g
Probe # 32 Probe # 33 Probe # 34

ctgctggagttctgtaccgcccgccgggatactcaggatcggacgagctgtacaag
gacgacctcaagcactg ggagcccttagtgatgc gtacctgctgcacatgtt
robe # 35 Probe # 36 Probe # 37

● MS2 system 確認用プローブ

glaA mRNA

設計内容 (color : red (CAL Fluor Red 610), probe number : 48 probes, oligo length : 20) で作製されたプローブを使用し smFISH を行った。

atggtgtcttttctcttctgtctcgggcttagccctcggatcctcagttctcgggtc aaagaggagaacagaggccc gtagccttaggagtcagagc cag Probe # 1 Probe # 2 Pro	gctttgtagaaggtagcagcttcgcaagactgtcggttctctgtgccctattgtgac cgaaccatctt gaagcgtttctgacagcaa agcacggggataacactg 19 Probe # 20 Probe # 21
caacctgtccttagacaggcagctggtctagatacctggctgagcacagaagcaatttt gttgacaggaatctgt gtttaaaa be # 3 Probe #	tcgaagcgccccagtcgatgttatttaaatccttctggaccgggagttacatccag ag cggggttcaggctacaataa ctcaatgtagggtc Probe # 22 Probe # 23
tccgccaggcaatcttgaataatatcgccgagatggccagtcggcgaggcgcaagt aggcggtccgt aactattatagccgctct 4 Probe # 5	gccaatctcggtggcggtcgaggcaagacatcaacactgtctctgggtagtagccac cggttaa cgttctgttagttgtgacag ccatcatagggtg Probe # 24 Probe # 25
ccagggtggtgattgccagccctagcaaaagtgaccagattatttctatacctggacc gatcgttttctactgggtcta aaagatatggacctgg Probe # 6 Probe # 7	acgttcgatcctcaagcagctgtgatgatgtaccttccagccctgttcggcgagcc tgcaagct cactactacgatggaaggtc Probe # 26
cgtgactcgggtctcgtcatgaaacccctggctgatctgttcagaggcgagatgccgat gcac cagagcagttacttttgggac acggcta Probe # 8 Probe #	ttggccaaccataaggtagtaacggactcgttcgatcaatctatgccatcaactccgg ggttgggtattccatcattgc ttgatacggtagttgaggc Probe # 27 Probe # 28
cttctccctatcatcgaggagttcattagctccaggtcggatccaaggcatctcaaac gaagagggatagt ctctcaagtaatcgagggt gtttg 9 Probe # 10 Probe	cggtctgagaatcaagctgttctgttggccgtacccccgaagacagctattacaacggg ttagttcgacaacgacaacc gggcttctgtcgataatgtt c Probe # 29 Probe # 30 P
ccttctggtgtcttttccagtggggtctgggagagcctaagttcaatgtcgacgagaca ggaagaccacagaaa tacagctgtcttgt # 11 Probe # 12	aatccttgggttcttgaccacccctggccggcgagagcagttgtatgacggtgtgtaccag ttaggaaccaaggactggt cgtcaacatactgcgcaaca tc robe # 31 Probe # 32 Pr
gcatttacggcgcatggggtcgcccgagcgtgacggaccagcttgcgcgacccgt cgtaaa tggcga Probe	tgggataaaattggatcattggccatcacggagctttcttccattcttcaagctctt acctatttttaacctagt agtgccctgcaagaaacgggt cgagaa obe # 33 Probe # 34 Probe
atgatctcgtttgagaaatggctagttgaaatggtcatacaagcatagcgacggacctg tactagagcaaac ttaccgatcaacttttacca # 13 Probe # 14	tacagttctgccgcagaggacctacgcacgtccacgaggtgtataaggatattgtc atgtcaagacggcg tagcaggtgctgccacatat ataacag # 35 Probe # 36 Probe #
gtatggcctgttttaggaatgatctatctatgtggctcagttatggaccaatcggg ataccggacaacaatcctta gatacccgagtcataacct gttaggccc Probe # 15 Probe # 16 Probe # 1	tcagcgtcaaggcctatgcagacggatagctgcagatcgtcacaacctacgctgcatcc agtcggcagttcc tatgcagctctagcaggttt 37 Probe # 38
ttcgatctcggggaggaagtccaaggcacatattcttactgttcagtttctcatgc aagctagagac cttcaggttccgtgtagtaa gagtagcg 7 Probe # 18 Probe #	accggctccatggcgagcaatataccaagacggagggagtcagacctccgccgggat ggctcgttatatggttctgc Probe # 39
	cttacctggtctacgtcgtcacttctcagggccaacaaccgacgaacgggtcgttct cagcatcgacgtgaagagt Probe # 40

gcaccatggggcgagaccgctgccaccagcattccgtcagcttgctctacgacttcgcc agtcgaacgagatgctgaag Probe # 41	aatccttagcagcgccgaccgattgaacgaggacagctacactactgacaaccccttggtg atgtgatgactgttggggaa Probe # 45
tcgggcacctacagcagctggttatcacatcctggccgaccattagcggataccaggcc gtcgcaccaatagttagga Probe # 42	acgggaacaataaacttgctgctggacagtcgttcgagataagtttattcgcgttcag gacctgtcagcaagctcata aataagcgcaagtc Probe # 46 Probe # 47
gcgcagacagagccctgccaggtgccgacgactgtgtcggtgaccttcgsgtgaaagct cactttcga Probe # 4	aacggggcggttacgtgggagagtgaacccaacggaaatataccgttccttcgacttc ttgccc atggcaagggaagctgaacg Probe # 48
actacggcttacggtagcttatcaagatcgtcgggtcgatctctcagctcgggagctgg tgatgccagat ctcagatagttctagcagcc 3 Probe # 44	gggggtgaaaagtgtgtgcagagcgatgtttggcggtga c

MBS probe

設計内容 (color : green (FAM), probe number : 29 probes, oligo length : 20) で作製されたプローブを使用し smFISH を行った。36×MBS は 3 コピーの 12×MBS から成るので、最大で 87 個のプローブが結合すると考える。

cagagccccctggcaatcgccggggagagcagcagactaccgctcttactctcgttgcg gtcctgatggcgagaaagt gaggcgaacgc Probe # 1 Probe # 2	tgtgcagatggccccaagtttttgcctaaggaggaataccccattctctgtcaacaa acacgtc ccggcggttcaaaaaacgg acctccttatgggtaaga cagttgggt Probe # 21 Probe # 22 Probe # 2
cgggtatcgcaggagcaacgtcaccaggcgacacagaggaataccctgttggtcccc gcatatgc gtgtctccttatgggacac gggg Probe # 3 Prob	cccatgcaaaagtttactctgtctatggcagcactgtcgcagaggaataccctgcgagcc gggtacgttt aatgtgagacgataccgtc ttatgggacgtcgg 3 Probe # 24 Probe # 25
acgggtctacaagaacattccgtattgtctaccagtgctacatgtggaggactaccaca tgccacgatgtttct taaggcataacgagtggtc agtgtacacctctgatgg e # 4 Probe # 5 Probe # 6	aaaaacggccccgggtgcgtgtattgtcatctgccttgcgagcattcacaggagcaaatag tttt ggccacgcacataacgtag ggaacgctcgtaaagtgtcc c Probe # 26 Probe # 27 P
caagcgagtcaggaacccctcggggcatcgaccattatcccgaacaatgcacacgcagg ttcgtcagtcctttggaa cgtagcgtggttaataaggc ttagctgtgcgtcc Probe # 7 Probe # 8 Probe # 9	ccctgccttgcttacttcaatatgggtgctctgtcgtcgtcatcaggaccatttgcgc gggacggcaacgtaatga ttataccacgagacagca agtagtcctggttaaacgcg robe # 28 Probe # 29 Probe # 30
attaccgcgtgggacactctgttccccgtcaaaattggaccataccggagtcggcttacg taatg gcaccctgtgagacaaggg agttttaacctgggtatggc cagccgaatgc Probe # 10 Probe # 11 Probe # 12	aggactaccgcgcataatcatcagcactcgtgcggatacttctgggattcctattgtta ctgatggcgcttatatagt tcgtgagcacgcctatgaa ccctaaggataacaat Probe # 31 Probe # 32 Probe # 33
tcatgcaggattaccgcatgcatggtgcagaatatcggcatgtctactcgtacagtcaaa agtacgtc aatggcgtagctaccagct agccgtacagatgagcatg agttt Probe # 13 Probe # 14 Probe	cgcgagctcaggaataccgagctctggcgacagagacccctcacacggga gcg gagtcccttatggctcgaga gctgtctctgggagtggtc Probe # 34 Probe # 35
tctactcgtgtggtcaggactaccgaccacttctattctattcatcttttcggttgca agatgagcacacca cctgatggctggtgaagat agaaaagccaacacgt # 15 Probe # 16 Probe # 17	
ggatattctgccgatgtacgagaagacgattacgcttctcgactaccttcatcatactgg cca gacggctacatgctcttct taatgcgaagagctgatgg gtagtatgtacc Probe # 18 Probe # 19 Probe # 20	

III. 結果および考察

第 1 章 黄麹菌における smFISH による mRNA 局在解析

序

糸状菌は子囊菌門に属する *Aspergillus* 属もしくは *Penicillium* 属が代表的であるが、担子菌門に属する *U. maydis* で mRNA 局在制御機構に関する研究が最も進められている (Müntjes et al., 2021)。しかし、*U. maydis* は一核菌糸で解析が行われるため、多核多細胞菌糸である *Aspergillus* 属糸状菌と細胞内構造が異なることを考慮する必要がある (Steinberg and Perez-Martin, 2008; Egan et al., 2012)。特に、*A. oryzae* はより多核であり、無性胞子な分生子内に複数の核 (2~7 個) を含む (Maruyama et al., 2001)。したがって、*U. maydis* の知見が *A. oryzae* に通用しない可能性がある。実際、*Aspergillus* 属糸状菌は *U. maydis* の mRNA 輸送に関与する Rrm4 や Upa2 を持たない (Müller et al., 2019)。mRNA 局在化機構は細胞形状や外環境などの要因により多様化している可能性が考えられる。しかし、*Aspergillus* 属糸状菌は mRNA 局在化機構がほとんど明らかにされていない。

mRNA 局在制御機構は局所タンパク質合成に寄与している。それにより、タンパク質はその機能性に最適な時間と場所で発現が可能となる。*A. oryzae* において、分泌型酵素は菌糸の頂端と隔壁に局在することから (Hayakawa et al., 2011)、mRNA レベルで分泌部位に局在制御される可能性が考えられる。実際、smFISH 法で *amyB* mRNA を可視化すると、菌糸先端付近でより強いシグナルが確認される (Higuchi and Takegawa, 2020)。一方で、*amyB* mRNA は菌糸基部側でもシグナルが検出されることから非局在性である可能性も考えられる。しかし、*Aspergillus* 属糸状菌は非局在性の mRNA が同定されておらず、タンパク質ごとの mRNA 局在が明らかにされていない。

本章では、*A. oryzae* の多核多細胞菌糸でタンパク質ごとに mRNA 局在が制御されることを明らかにすることを目的とし、細胞内局在が異なる 6 種類 (アクチンケーブル、細胞質、小胞体、液胞、細胞膜、分泌小胞) のタンパク質をコードする mRNA を対象に、smFISH 法による mRNA 局在の解析を行った。

1-1. EGFP 融合による細胞内局在解析株の作製

mRNA 局在制御機構は mRNA 配列の *cis*-acting localization element と呼ばれる領域と、そこに結合する RNA 結合タンパク質 (RNA-binding protein : RBP) により制御される (Chaudhuri et al., 2020)。ribonucleoprotein (RNP) 複合体は複数の RBP で構成されており、mRNA 局在制御機構に肝要であることが知られている。動物細胞は mRNA の *cis*-acting localization element が 3'非翻訳領域 (untranslated region : UTR) に集中している。一方で、*S. cerevisiae* は mRNA の *cis*-acting localization element (Zip code) が 3'UTR だけでなく、コーディング領域 (CDS) にも多く存在している (Niedner et al., 2014)。例えば、*ASH1* mRNA は Zip code (E1, E2A, E2B, E3) の E1, E2A, E2B が CDS に存在し、E3 が 3'UTR に存在する。*ASH1* mRNA は Zip code を個々に欠失しても局在が崩壊しないことが確認されている (Chartrand et al., 2002)。例えば、*ASH1* mRNA は E3 のみを欠失しても非局在率が 6%程度であることが報告されている (Chartrand et al., 2002)。*U. maydis* においても、mRNA の *cis*-acting localization element が CDS と 3'UTR に存在するとされている (Müntjes et al., 2021)。したがって、*A. oryzae* も mRNA の *cis*-acting localization element が CDS に存在する可能性が考えられる。

smFISH 法は mRNA を可視化するために、古くから多様な生物種で利用されている。標的 mRNA 配列に相補的な蛍光標識 DNA プローブを設計し、それを標的 mRNA 配列に結合させる (Chen et al., 2018)。smFISH 法は 40 種類以上の蛍光標識 DNA プローブにより標的 mRNA を 1 分子レベルで可視化する (Fig.1-1-1)。その過程で、標的 mRNA の二次構造を壊す必要があり、ホルムアルデヒドなどによる標的細胞の化学固定を行う。真核微生物は細胞壁により蛍光シグナルが拡散されるため、細胞壁溶解酵素 Zymolyase で細胞壁を一部溶解した細胞を用いて smFISH 法を行う (Rahman and Zenklusen, 2013)。多くの糸状菌は細胞壁を構成する糖鎖成分が *S. cerevisiae* よりも多いため、Zymolyase を使用しても十分な蛍光シグナルが得られない可能性がある (Gow et al., 2017)。アカパンカビ *Neurospora crassa* は Zymolyase の使用により十分な蛍光シグナルが得られるが、*Aspergillus* 属糸状菌の細胞壁成分である galactosaminogalactan, α -1,3-glucan、 β -1,6-glucan が存在しない (Verdín et al., 2019; Bartholomai et al., 2021)。したがって、*Aspergillus* 属糸状菌は smFISH 法で mRNA を 1 分子可視化できない可能性があるが、蛍光シグナルを菌糸部位ごとに比較することで局在解析が可能である (Higuchi and Takegawa, 2020)。

細胞内局在が異なるタンパク質をコードする mRNA 局在の調査を行うことにより、タンパク質ごとに mRNA が局在制御されることを明らかにできると考えた。そこで、標的タンパク質に EGFP を融合発現し、*egfp* mRNA を標的とする DNA プローブ (*egfp* probe) を用いて smFISH 法を行うことで、同一細胞内でタンパク質と mRNA の共局在解析を試みた (Fig. 1-1-2)。EGFP (細胞質)、Lifeact-EGFP (アクチンケープル局在性異種タンパク質)、EGFP-AoSec22 (小胞体膜 SNARE タンパク質)、EGFP-AoVam3 (液胞膜 SNARE タンパク質)、AoUapC-EGFP (細胞膜プリントランスポーター)、EGFP-AoSnc1 (分泌小胞膜 SNARE タンパク質) を標的とした (Fig. 1-1-3)。 *A. oryzae* で一般的な *amyB* プロモーター (*PamyB*) と *amyB* ターミネーター (*TamyB*) で設計されたプラスミドを使用し、同一の転写条件で標的 mRNA の局在解析を行った (Fig. 1-1-4)。

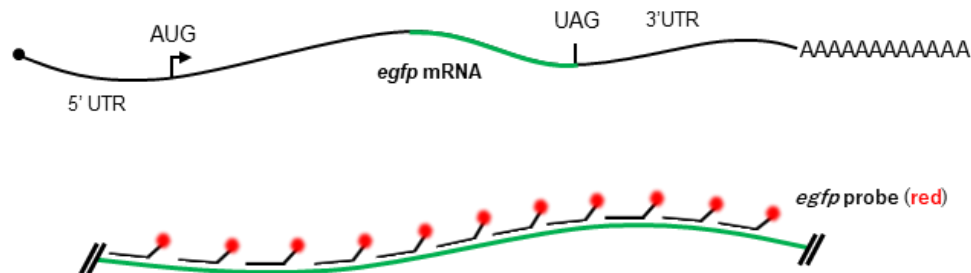


Fig. 1-1-1 smFISH 法による *egfp* probe を用いた標的 mRNA の可視化方法

本研究は標的タンパク質と EGFP を融合発現し、*egfp* mRNA に相補的な 37 種類の DNA プローブを結合させた。

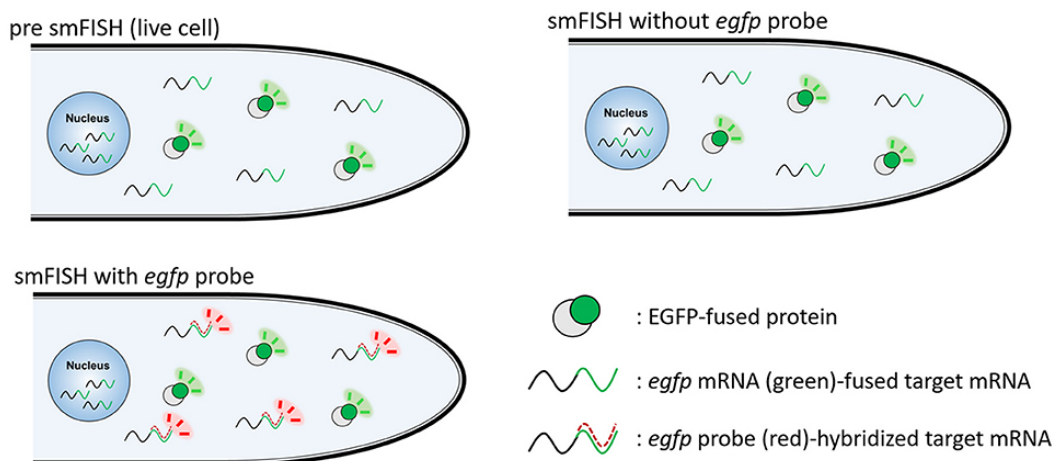


Fig. 1-1-2 smFISH 法による標的タンパク質と標的 mRNA の可視化方法

pre smFISH でタンパク質の局在を確認した。smFISH without *egfp* probe で mRNA 蛍光が検出されないことを確認した。smFISH with *egfp* probe で mRNA 局在とタンパク質局在を比較し評価した (Morita et al., 2021)。

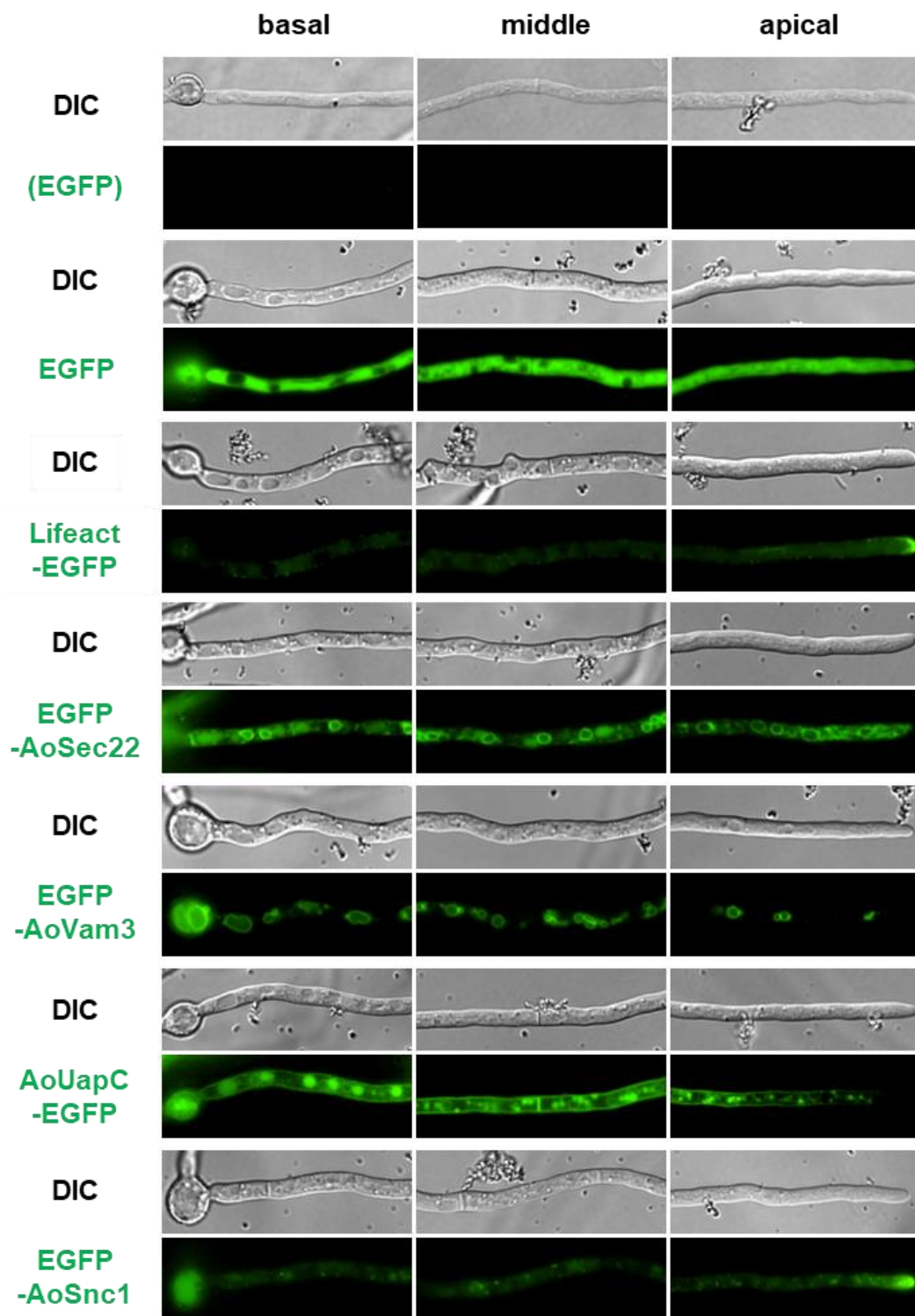


Fig. 1-1-4 EGFP 融合標的タンパク質の細胞内局在解析

上から順に、*A. oryzae* RIB40 株 (WT)、PaG 株 (細胞質)、PaLaG 株 (アクチンケーブル)、GSec22 株 (小胞体)、PaGVam3 株 (液胞)、PaUapCG 株 (細胞膜)、GSnc1 株 (分泌小胞) の局在解析画像を示す。

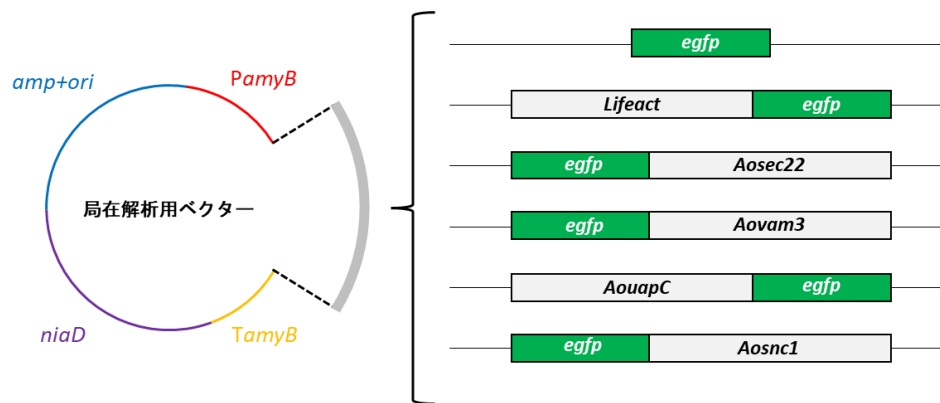


Fig. 1-1-4 EGFP 融合標的タンパク質発現用プラスミド

上から、細胞質、アクチンケーブル、小胞体、液胞、細胞膜、分泌小胞膜を可視化したプラスミドを示す。

1-2. smFISH 法による *egfp* mRNA を介した標的 mRNA の可視化

PaG 株を用いて *egfp* probe による *egfp* mRNA の局在解析を行った。*egfp* probe 添加時に *egfp* mRNA が検出できることを確認した (Fig. 1-2-1)。一方で、*egfp* probe 非添加時は *egfp* mRNA が検出されないことを確認した (Fig.1-2-2)。さらに、野生株 RIB40 (WT) で *egfp* probe 添加時に *egfp* mRNA が検出されないことを確認した (Fig. 1-2-3)。したがって、*egfp* probe を *egfp* mRNA と特異的に結合し、標的タンパク質とその mRNA を同時に局在解析できることが示された。*egfp* mRNA の蛍光輝度は菌糸基部側で低くなっているものの、菌糸全域で局在が確認された (Fig. 1-2-4)。

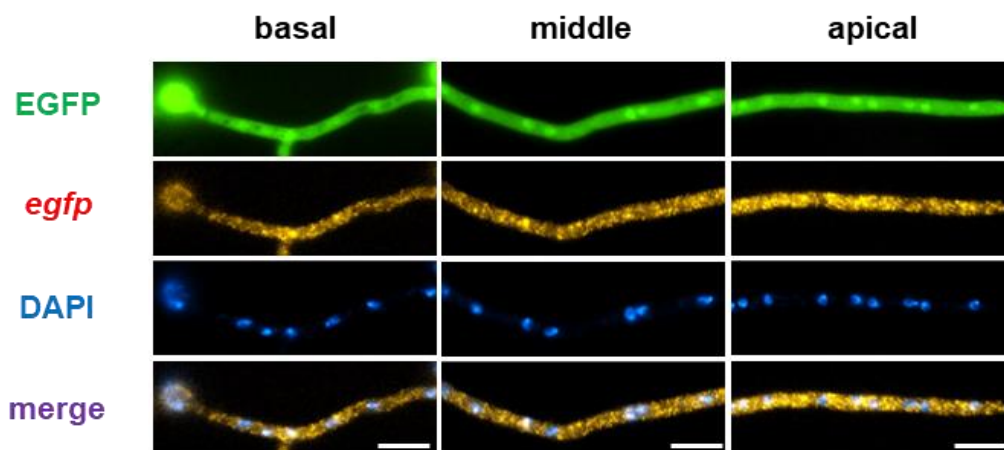


Fig. 1-2-1 *egfp* probe 添加時の *egfp* mRNA の細胞内局在解析

CD 培地に植菌し 30°C、24 時間で培養した菌体で smFISH 法を行った。*egfp* probe 添加時の観察を行った。スケールバーは 10 μ m を示す。

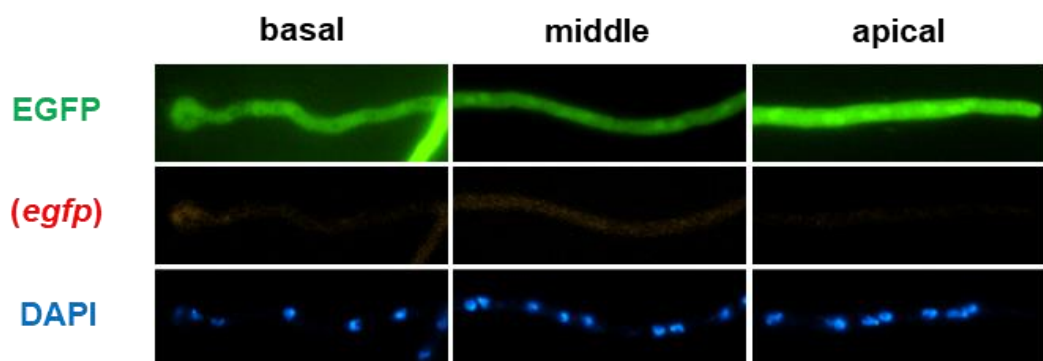


Fig. 1-2-2 *egfp* probe 非添加時の *egfp* mRNA の細胞内局在解析
CD 培地に植菌し 30°C、24 時間で培養した菌体で smFISH 法を行った。

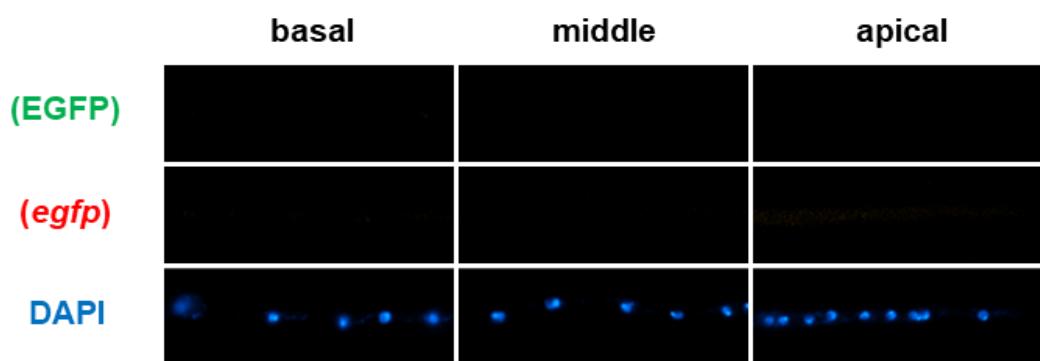


Fig. 1-2-3 RIB40 における *egfp* probe 添加時の *egfp* mRNA の細胞内局在解析
CD 培地に植菌し 30°C、24 時間で培養した菌体で smFISH 法を行った。

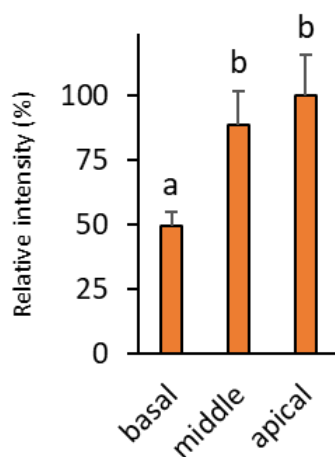


Fig. 1-2-4 *egfp* mRNA 蛍光の蛍光輝度の定量

Fig.1-2-1 の *egfp* mRNA 蛍光について、その蛍光輝度の定量解析を行った (n=10)。 *egfp* mRNA 蛍光輝度は菌系の中間部と先端部で有意に高いことが分かった。エラーバーは SE を示す。スケールバーは 10 μ m を示す。

1-3. smFISH 法による標的 mRNA の細胞内局在解析

PaLaG 株で解析を行った結果、*Lifeact-egfp* mRNA は Lifeact-EGFP の局在と一致して、菌糸頂端で局在が確認された (Fig. 1-3-1, Fig. 1-3-2)。 *Lifeact-egfp* mRNA は菌糸全域で弱い蛍光が検出されたが、先端領域で有意に高い輝度が検出された (Fig. 1-3-3)。菌糸頂端から核まで約 10 μm の距離があることから、生体分子モーターにより輸送された後に翻訳される可能性が示唆された。

GSec22 株で解析を行った結果、*egfp-Aosec22* mRNA は先端領域で優先的な局在が確認された (Fig. 1-3-4, Fig. 1-3-5)。菌糸全域で比較的高い輝度が検出されたが、先端領域で有意に高い輝度が検出された (Fig. 1-3-6)。小胞体は菌糸全域にわたって形成されるため、細胞質 ER と一致するように mRNA が局在制御される可能性が示唆された。菌糸頂端が分泌部位であることから、先端領域の小胞輸送が盛んであると考えられ、それにより AoSec22 がより多く合成されている可能性も考えられる。

GSnc1 株で解析を行った結果、菌糸頂端に局在する EGFP-AoSnc1 と異なり、*egfp-Aosnc1* mRNA は菌糸全域で局在が確認された (Fig. 1-3-7, Fig. 1-3-8, Fig. 1-3-9)。出芽酵母の *SNC1* mRNA も非局在性であると示唆されていることから、EGFP-AoSnc1 はタンパク質に翻訳された後に輸送される可能性が示唆された (Aronov et al., 2007)。

PaGVam3 株で解析を行った結果、菌糸基部側に局在する EGFP-AoVam3 と異なり、*egfp-Aovam3* mRNA は先端領域で優先的な局在が確認された (Fig. 1-3-10, Fig. 1-3-11, Fig. 1-3-12)。先端領域で液胞前駆体のようなドット様局在が観察されるため、EGFP-AoVam3 は先端領域で翻訳されて液胞前駆体に局在し、液胞成熟に伴って基部側に局在する可能性が示唆された (Cui et al., 2019)。

PaUapCG 株で解析を行った結果、*AouapC-egfp* mRNA は先端領域で優先的な局在が確認された (Fig. 1-3-13, Fig. 1-3-14)。基部側にあまり存在せず、先端領域で有意に高い輝度が検出された (Fig. 1-3-15)。細胞膜タンパク質は分泌経路により細胞膜へ局在化するため、菌糸先端付近でより多く翻訳されることで、細胞膜へ局在化を空間的に効率化している可能性が示唆された (Dimou et al., 2020)。

以上の結果をまとめると、mRNA 局在はコードされるタンパク質ごとに mRNA 局在が異なることが明らかとなった。さらに、タンパク質をコードする配列により mRNA の局在と安定性が制御されることが示唆された。

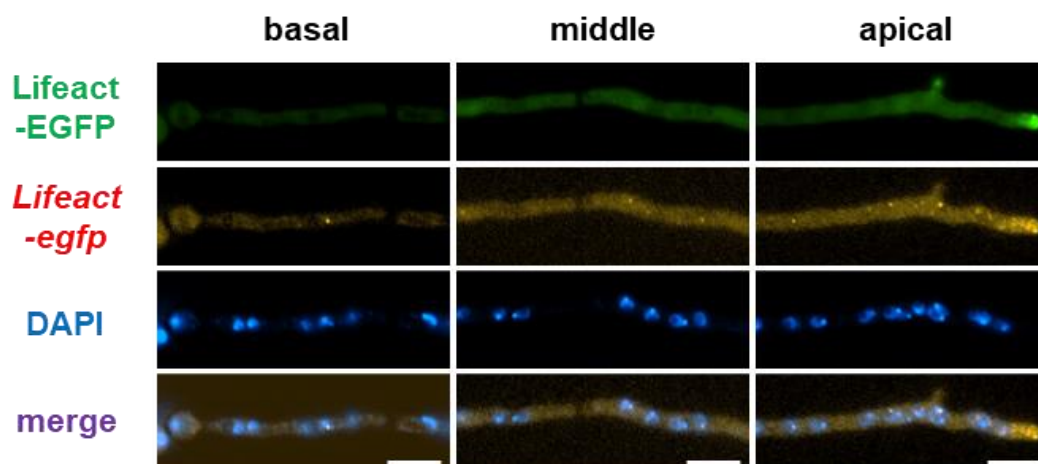


Fig. 1-3-1 *egfp* probe 添加時の *Lifeact-egfp* mRNA の細胞内局在解析

CD 培地に植菌し、30℃で 24 時間培養した菌体で smFISH 法を行った。

スケールバーは 10 μ m を示す。

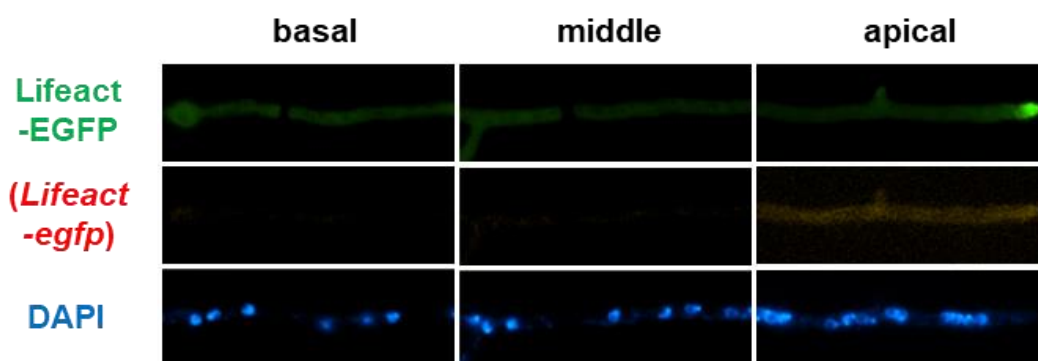


Fig. 1-3-2 *egfp* probe 非添加時の *Lifeact-egfp* mRNA の細胞内局在解析

CD 培地に植菌し、30℃で 24 時間培養した菌体で smFISH 法を行った。

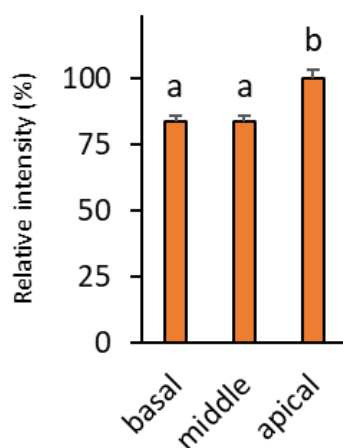


Fig. 1-3-3 *Lifeact-egfp* mRNA の蛍光輝度の定量

Lifeact-egfp mRNA の蛍光輝度の定量解析を行った(n=10)。エラーバー

は SE を示す。スケールバーは 10 μ m を示す。

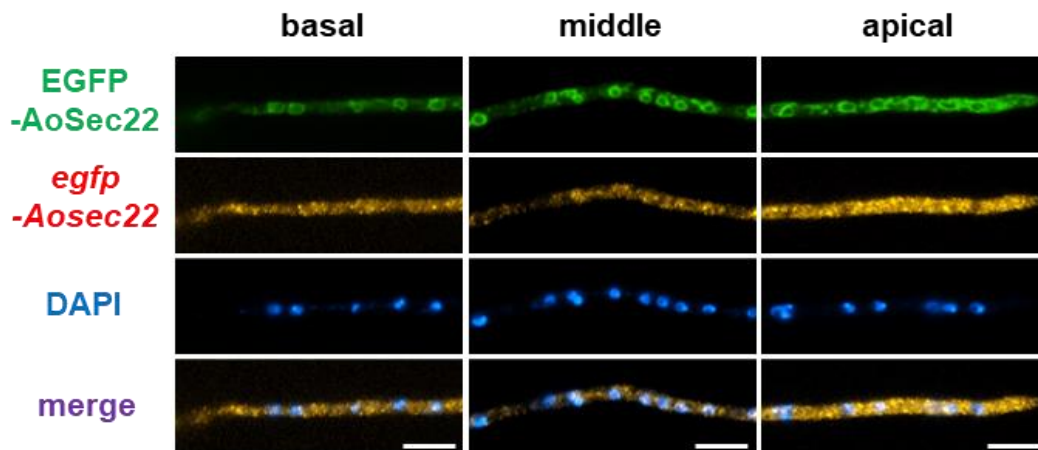


Fig. 1-3-4 *egfp* probe 添加時の *egfp*-*Aosec22* mRNA の細胞内局在解析

CD 培地に植菌し、30℃で 24 時間培養した菌体で smFISH 法を行った。

スケールバーは 10 μ m を示す。

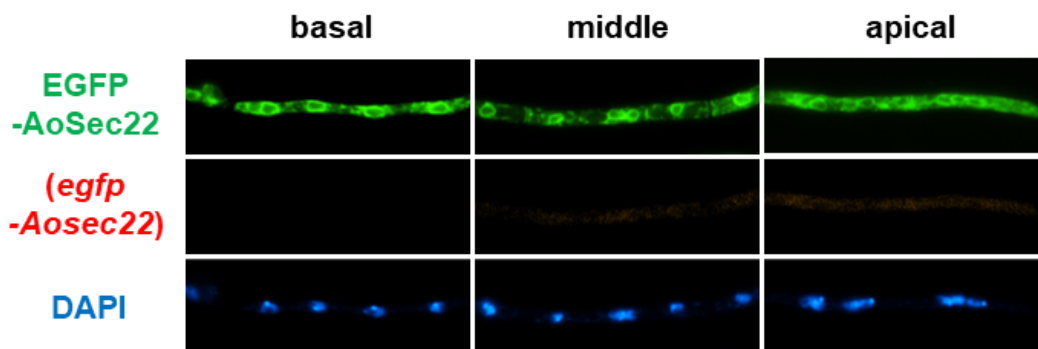


Fig. 1-3-5 *egfp* probe 非添加時の *egfp*-*Aosec22* mRNA の細胞内局在解析

CD 培地に植菌し、30℃で 24 時間培養した菌体で smFISH 法を行った。

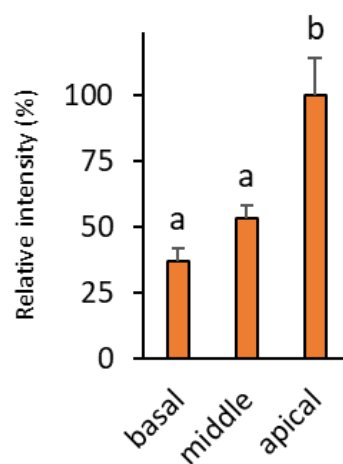


Fig. 1-3-6 *egfp*-*Aosec22* mRNA の蛍光輝度の定量

egfp-*Aosec22* mRNA の蛍光輝度の定量解析を行った(n=10)。エラーバ

ーは SE を示す。スケールバーは 10 μ m を示す。

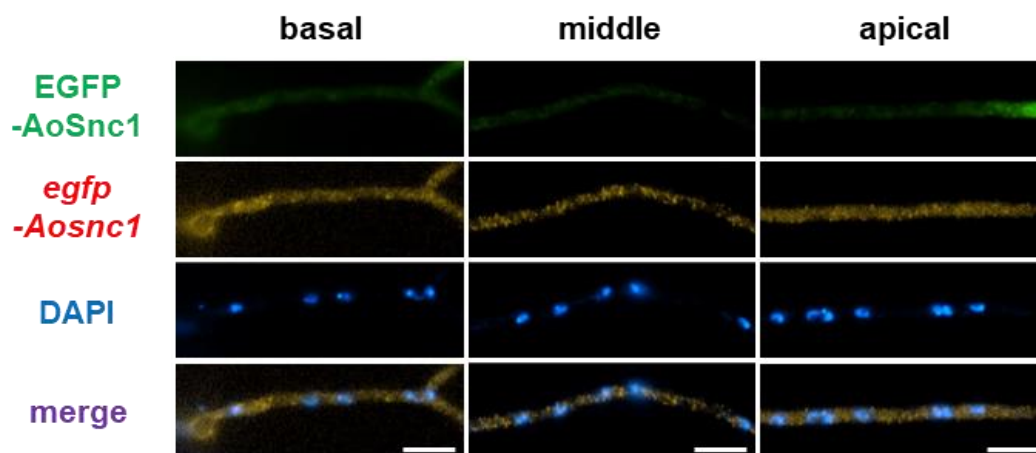


Fig. 1-3-7 *egfp* probe 添加時の *egfp*-*Aosnc1* mRNA の細胞内局在解析

CD 培地に植菌し、30℃で 24 時間培養した菌体で smFISH 法を行った。

スケールバーは 10 μ m を示す。

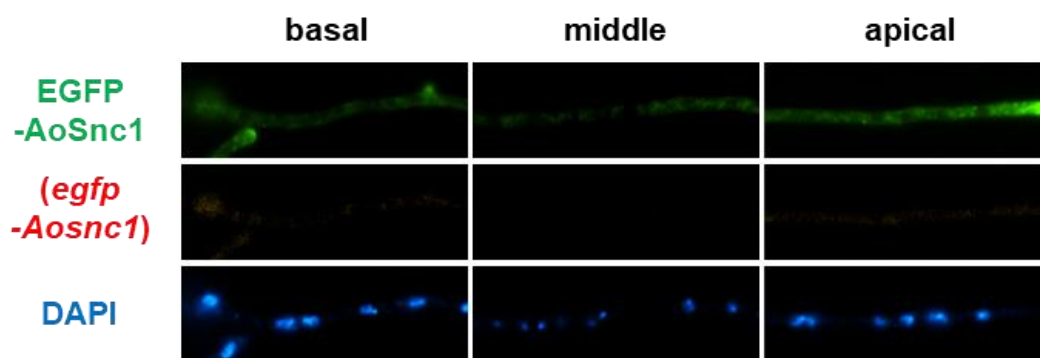


Fig. 1-3-8 *egfp* probe 非添加時の *egfp*-*Aosnc1* mRNA の細胞内局在解析

CD 培地に植菌し、30℃で 24 時間培養した菌体で smFISH 法を行った。

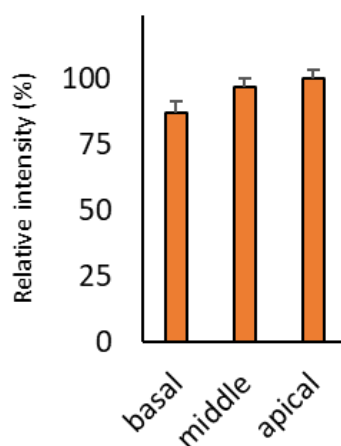


Fig. 1-3-9 *egfp*-*Aosnc1* mRNA の蛍光輝度の定量

egfp-*Aosnc1* mRNA の蛍光輝度の定量解析を行った(n=10)。エラーバー

は SE を示す。スケールバーは 10 μ m を示す。

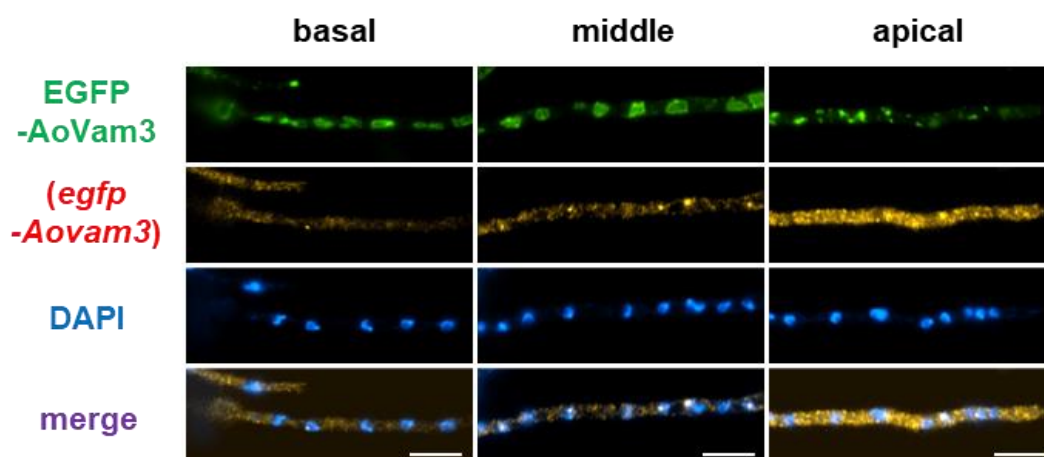


Fig. 1-3-10 *egfp* probe 添加時における *egfp-Aovam3* mRNA の細胞内局在解析

CD 培地に植菌し、30℃で 24 時間培養した菌体で smFISH 法を行った。

スケールバーは 10 μ m を示す。

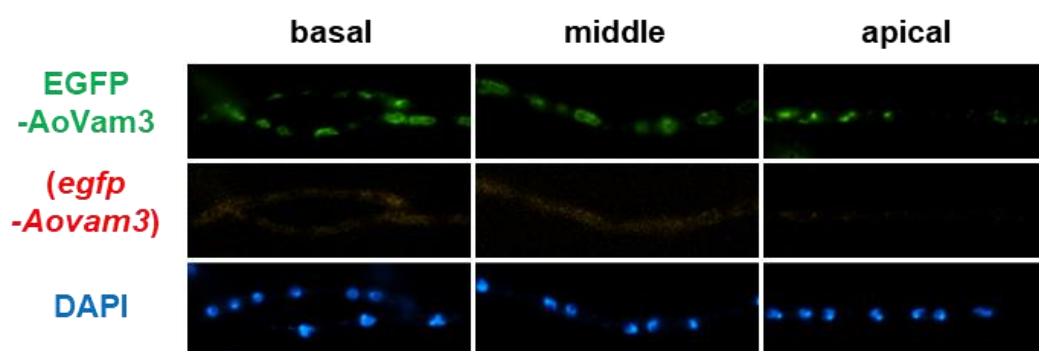


Fig. 1-3-11 *egfp* probe 非添加時における *egfp-Aovam3* mRNA の細胞内局在解析

CD 培地に植菌し、30℃で 24 時間培養した菌体で smFISH 法を行った。

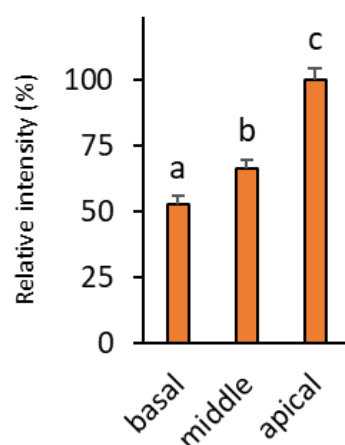


Fig. 1-3-12 *egfp-Aovam3* mRNA の蛍光輝度の定量

egfp-Aosnc1 mRNA の蛍光輝度の定量解析を行った(n=10)。エラーバーは SE を示す。スケールバーは 10 μ m を示す。

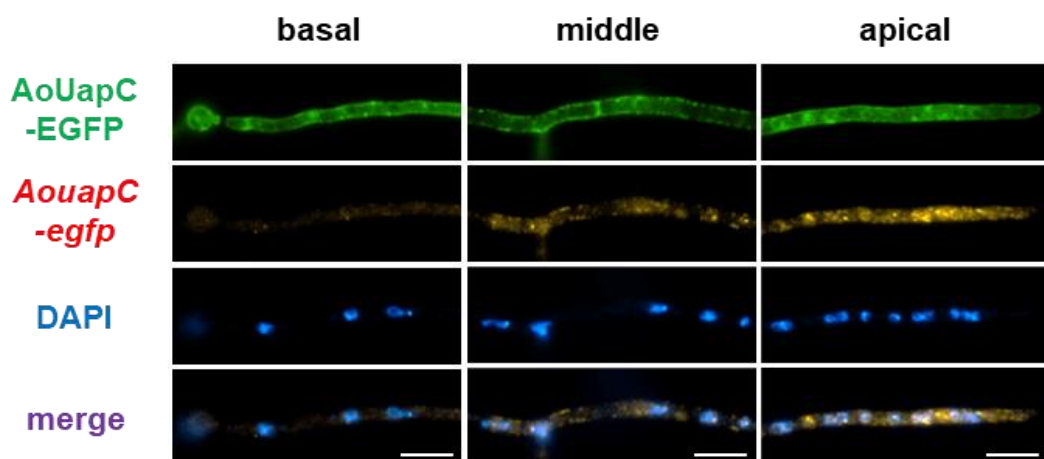


Fig. 1-3-13 *egfp* probe 添加時における *AouapC-egfp* mRNA の細胞内局在解析

CD 培地に植菌し、30℃で 24 時間培養した菌体で smFISH 法を行った。

スケールバーは 10 μ m を示す。

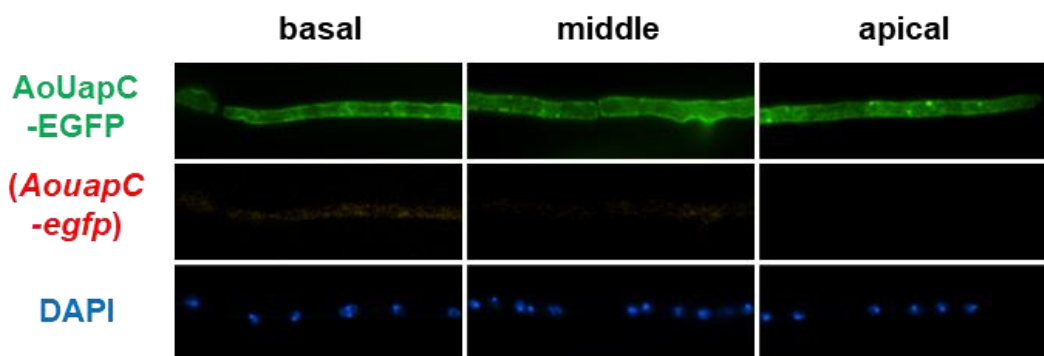


Fig. 1-3-14 *egfp* probe 非添加時における *AouapC-egfp* mRNA の細胞内局在解析

CD 培地に植菌し、30℃で 24 時間培養した菌体で smFISH 法を行った。

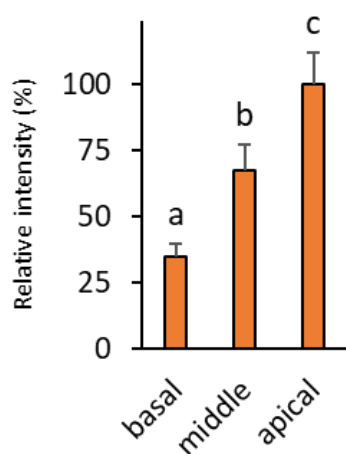


Fig. 1-3-15 *AouapC-egfp* mRNA の蛍光輝度の定量

egfp-Aosnc1 mRNA の蛍光輝度の定量解析を行った(n=10)。エラーバーは SE を示す。スケールバーは 10 μ m を示す。

考察

本章では、細胞の化学固定、細胞壁消化および透過処理を行った後も EGFP 融合タンパク質の局在が維持されたことから、*egfp probe* で標的タンパク質とその mRNA を同時に可視化する smFISH 法を考案した。そして、*A. oryzae* の菌糸において mRNA がコードされるタンパク質によって多様な局在パターンを示すことを明らかにした。さらに今回の解析では、同一のプロモーターを用いることで、各標的タンパク質の発現条件を等しくしたことから、mRNA の局在化と安定性がタンパク質をコードする配列により制御されることが示唆された。今回の smFISH 法について、膜タンパク質を固定する方が、タンパク質局在を維持できることが示唆された。この点に関連し、AmyB は菌糸先端と隔壁に局在するが、ER・小胞内腔で遊離状態であることから化学固定できないことを確認している。AmyB 局在が細胞質蛍光の増大により可視化できないため、エクトピックな発現で細胞質蛍光が強い場合もタンパク質局在を可視化できないことが予想される。

Lifeact-egfp mRNA がタンパク質局在で観察されたことから、菌糸先端部に輸送された後に翻訳されることが示唆された。当研究室では、アクチンをコードする *actA* mRNA が菌糸先端領域に局在することを明らかにしていることから、アクチンケーブル関連因子に共通する mRNA 局在パターンであることが示唆された (Higuchi and Takegawa, 2020)。アクチンは隔壁形成箇所で「アクチンリング」を形成するが、菌糸中間部でアクチンリング形成を示唆する *Lifeact-egfp* mRNA 蛍光が観察できなかった (Mamun et al., 2020)。アクチンリングは菌糸細胞内で隔壁形成中にのみ形成されと考えられ、今回の方法では局在の瞬間を観察できなかったと考えられる。

egfp-Aosec22 mRNA は先端領域に多く局在していたが、基部や中間部にも蛍光が確認されたことから、菌糸全体で翻訳される可能性が示唆された。AoSec22 は ER とゴルジ体間の小胞輸送に機能する SNARE であり、小胞体とゴルジ体が菌糸全体に配置される点からも整合性が取れる結果であると考えられる (Kuratsu et al., 2007)。ER も菌糸先端領域 (< 50 μm) がより複雑な網状構造で伸長形成が活発であると予測されることから、そうした領域で ER 局在性タンパク質がより多く翻訳・合成されるかもしれない。

egfp-Aosnc1 mRNA はほぼ均一に菌糸領域に局在していたが、*S. cerevisiae* で *SNC1* mRNA は母細胞に保持され極性を示さないことから、Snc1 はタンパク質に翻訳された後に局在化することが示唆される (Aronov et al., 2007)。EGFP-AoSnc1 は細胞内で双方

向に長距離輸送されることから、微小管依存的な初期エンドソーム動態と類似すると予想されるが、分泌小胞を輸送する生体分子モーターは糸状菌において同定されていない (Kuratsu et al., 2007; Higuchi, 2021)。AoSnc1 は菌糸頂端付近でエンドサイトーシスによりリサイクリングされるため、菌糸全体で新規合成される必要があると示唆された。

egfp-Aovam3 mRNA は主に先端領域に局在していたが、糸状菌の菌糸は基部領域に高度に液胞が形成される。植物細胞の液胞は後期エンドソームと断片化した液胞前駆体が融合し形成される。糸状菌も菌糸内の液胞形態が類似することから、先端領域の小さく未熟な液胞構造体が互いに融合し、基底領域の大きな液胞に成熟する可能性が考えられた (Cui et al., 2019)。液胞形成の分子過程をさらに明らかにするためには、これらの過程に関与する他の mRNA やタンパク質について解析が必要である。

AouapC-egfp mRNA が先端領域に局在することを明らかにし、分泌に関連した細胞膜輸送に関連性が示唆された。一方で、*A. nidulans* では、AoUapC のホモログ因子である UAPA がゴルジ体を経由せず小胞体から細胞膜に分泌されることが発見されている (Dimou et al., 2020)。一方で、菌糸頂端からゴルジ体を経由して細胞膜に分泌される場合もあることから、主要な分泌部位が菌糸頂端であることを考慮すると、菌糸先端近傍において AoUapC の翻訳が活発であると示唆される。*AouapC-egfp* mRNA の細胞内局在に連携して、AoUapC が先端領域で翻訳され細胞膜に局在すると考えられる。

第2章 黄麹菌生細胞における mRNA ライブイメージング法の確立

序

smFISH 法は mRNA 配列にアンチセンスな DNA プローブを使用するため、古くから多種多様な生物種で利用されてきた。一方で、smFISH 法は標的細胞を化学固定するため、mRNA の局在化プロセスを解析することが困難である。しかし、多くの mRNA はタンパク質ごとに最適な細胞区画へ輸送される。例えば、出芽酵母の性分化関連因子 *ASH1* や細胞周期関連因子 *EAR1* をコードする mRNA は娘細胞へ輸送される (Schmid et al., 2006; Samardak and Moriel-Carretero et al., 2021)。多核多細胞生物は細胞内で mRNA の転写位置も制御しており、広い細胞空間であっても効率的に mRNA を局在化できる (Gavis and Lehmann, 1992; Nishimura et al., 2015)。

生きた細胞で mRNA を可視化する手法が開発されたことで、mRNA 局在制御機構は飛躍的に理解が深まっている。例えば、MS2 system や t-Deg 法、CRISPR-sunspot 法などが挙げられる (Sun et al., 2020; Williams et al., 2022; Livingston et al., 2023)。t-Deg 法や CRISPR-sunspot 法は哺乳細胞でしか使用例がないため、真核微生物で機能しない可能性が考えられる。一方で、MS2 system は出芽酵母で開発された手法であり、現在も様々な生物種で利用されている (Bertrand et al., 1998)。したがって、MS2 system は汎用性に優れると考えられ、*A. oryzae* でも確立できる可能性が高い。

本章では、*A. oryzae* の生きた細胞で分泌酵素 mRNA を可視化するために、MS2 system の確立を行った。*A. oryzae* が高分泌する加水分解酵素グルコアミラーゼ (GlaA) をコードする mRNA を標的として、*glaA* mRNA に MS2 system を適用した *glaA*-MS2 株の作製を行った。MS2 system の適用による影響を確認するために、生育や遺伝子発現に関する解析を行った。また、MS2 system による *glaA* mRNA を示すドット様蛍光が *glaA* mRNA 由来であるか確認を行った。

2-1. *gla4*-MS2 株の作製

MS2 system は 1998 年に Robert H. Singer らにより開発された手法であり、生きた細胞で mRNA を一分子レベルで可視化できる (Bertrand et al., 1998)。彼らは出芽酵母で MS2 system を確立し、mRNA 局在制御機構に関する研究を精力的に進めている。MS2 system はバクテリオファージ MS2 に由来する特定の mRNA 配列 (MS2-binding site : MBS) と MBS と特異的に結合する RBP (MS2 coat protein : MCP) を利用する (Bertrand et al., 1998)。具体的には、標的遺伝子の終始コドン直後に 24×MBS を挿入した細胞で、2 分子の蛍光タンパク質 (EGFP) を融合した MCP (MCP-2×EGFP) を発現させる。MBS に結合していない MCP-2×EGFP は細胞質でバックグラウンド蛍光となるため、核局在シグナル (nuclear localization signal : NLS) により核内へ局在化させる (Fig. 2-1-1)。MS2 system 適用株で標的遺伝子から標的 mRNA が転写された際に、標的 mRNA は 24×MBS を介して MCP-2×EGFP が多数結合し、核外排出され細胞質で 1 分子可視化される (Fig. 2-1-2)。MCP-2×EGFP は最大 24 個が 24×MBS に結合できるが、その 60%程度しか結合しないことが報告されている (Fusco et al., 2003)。mRNA 蛍光の輝度が十分でない場合、MBS のコピー数を増やすことで改善することが報告されている (Pichon et al., 2020)。

MS2 system は 24×MBS (約 1.6 kbp) を標的 mRNA の下流に挿入するため、本来の mRNA 局在が反映されない可能性が懸念される (Li et al., 2022)。そこで、2018 年に MCP と MBS の結合親和性が低下した新型 MBS 配列 (MBSV6) が開発され、MS2 system を適用した mRNA が凝集体を形成しにくくなり、mRNA の局在化に与える影響が大きく改善した (Tutucci et al., 2018)。MS2 system を適用した mRNA が分解されやすいことも懸念されるが、その改善案が 2022 年に報告されている (Li et al., 2022)。こうした改良の積み重ねにより、生体内 mRNA の可視化における技術的な限界が克服されつつある。MS2 system は適用例が最も多く、他の手法と比較しても mRNA を安定的に可視化できるため、*A. oryzae* で確立する手法として適当であると考えた。

MS2 system の確立に際し、*A. oryzae* が高分泌する加水分解酵素のグルコアミラーゼ (GlaA) の mRNA を標的とした。*A. oryzae* はアミラーゼとして α -アミラーゼ (AmyA, AmyB, AmyC) とグルコアミラーゼ (GlaA, GlaB) を高分泌する。 α -アミラーゼ (AmyB) は最も研究されたアミラーゼであるが、*amyA/B/C* が上流約 1 kbp と下流約 1 kbp を含めてすべて同一塩基配列であり、相同組換えによるそれらの遺伝子座への MBS の挿入が

困難であると考えられた (Nemoto et al., 2012)。また、*glaB* は固体培地 (e.g. 米) に限定して転写が誘導されるが、固体培地が強い自家蛍光を発するため局在解析が困難であると考えられた (Mitsue et al., 1979; Hata et al., 1997)。一方で、*GlaA* の遺伝子はシングルコピーであり、*AmyB* と同じ転写制御機構により液体培地で転写誘導されることから、分泌型酵素 mRNA のモデルとして理想的であると考えた (Saha et al., 1979)。また、グルコアミラーゼはデンプンを構成する糖鎖を非還元末端から分解し、出芽酵母が資化するグルコースを生成するため、発酵醸造産業で重要な酵素として認知されている。

glaA 遺伝子の下流に MBS を挿入するために *Cre/loxP* system を利用した。*Cre/loxP* system はバクテリオファージ P1 に由来する部位特異的組換え反応であり、チロシンリコンビナーゼファミリーに属する *Cre* (causes recombination) が 34 塩基から成る *loxP* (locus of crossing over in Bacteriophage P1) 配列を認識して組換え反応を触媒することを応用し、遺伝子組換え後に使用したマーカー遺伝子を脱離する技術である (Kühn and Torres, 2002) (Fig. 2-1-3)。変異型 *loxP* 配列である *lox66* 配列と *lox71* 配列を使用することで、組換え反応後に *Cre* に認識されない新規な *lox72* 配列を生じさせ、*Cre/loxP* system の反復使用を可能にしている。もし *loxP* 配列をそのまま使用した場合には、*Cre/loxP* system の複数使用により染色体内で *loxP* 配列が蓄積し、*Cre* 発現時に意図しない相同組換えが起こる危険性が増大する。*A. oryzae* の *Cre/loxP* system はキシロース誘導性プロモーター (*P_{xyIP}*) により、キシロース存在下で条件的に *Cre* の発現を誘導できるようにしており、任意で組換え反応を起こすことができる (Zhang et al., 2017)。*Cre/loxP* system により遺伝子サイズが大きいマーカー遺伝子 (約 4 kbp) を脱離することで、MBS 挿入による 3'UTR に対する影響を最小限にできると考えた。MS2 system により mRNA の局在解析を行うためには、十分な輝度の mRNA 蛍光を得る必要がある。その点に関して、24×MBS を使用して *amyC* mRNA を可視化した際に、*amyC* mRNA を示す蛍光の輝度が十分でなく、視認できるもののイメージングツール (imageJ Fiji) による検出が困難だった (data not shown)。そこで、36×MBS を使用することで mRNA 蛍光の S/N 比を向上させ、*glaA* mRNA を imageJ Fiji にて解析できるように改良した。

A. oryzae の *Cre/loxP* system に用いられた pANPXP-*Cre* を東北大学の五味勝也教授から分譲して頂き、*glaA* 遺伝子の下流に MBS (MBSV6) を挿入するための DNA カセット (*glaA*-36×MBS cassette) の作製を行った (Fig. 2-1-4)。pANPXP-*Cre* はマーカー遺伝子

ptrA が *thiA* のプロモーター変異体であることから、*thiA* にターゲティングされ形質転換効率が低下する可能性が懸念された (Kubodera et al., 2000)。そこで、マーカー遺伝子をオロチジン-5'-リン酸デカルボキシラーゼ遺伝子 *pyrG* に変更した。*glaA*-36×MBS cassette を NotI 処理した DNA 断片を NSPID1 株に形質転換した後に、キシロース培地で培養し *pyrG* マーカー遺伝子を脱離することで、*glaA* 遺伝子の下流に 36×MBS を導入した *glaA*-36×MBS 株の作製を行った (Fig. 2-1-6)。

glaA-36×MBS 株で MCP-2×EGFP を発現させた *glaA*-MS2 株の作製を行った。MCP-2×EGFP は NLS を融合して核内に局在化させるが、その核局在化強度が mRNA 局在に影響を与える可能性が示唆された。そこで、NLS の融合部位が異なる MCP-2×EGFP 発現用ベクター (pgPcNM2G、pgPcMN2G、pgPcNM2GN) を作製し、mRNA 局在に影響が少ない条件を検討した。その際、MCP-2×EGFP は出芽酵母の MS2 system で使用された構成的プロモーターであるシトクローム C 遺伝子のプロモーター (*PAocyc1* in *A. oryzae*) と、*A. oryzae* で一般的な構成的プロモーターであるホスホグリセレートキナーゼ遺伝子のプロモーター (*PpgkA*) を使用した。MCP の塩基配列は GeneArt で遺伝子合成を行い、*A. oryzae* で使用頻度の高いコドンに最適化したものを使用した (Fig. 2-1-7)。*niaD* をマーカー遺伝子として、*glaA*-36×MBS 株に pgPcNM2G、pgPcMN2G、pgPcNM2GN を形質転換し、*glaA* mRNA を安定的に可視化できる株を選定した (Fig. 2-1-8)。NLS-MCP-2×EGFP を発現した株は、*glaA* mRNA と思われるドット様蛍光が観察された (Fig. 2-1-9)。一方で、MCP-NLS-2×EGFP-NLS と MCP-2×EGFP-NLS を発現した株はドット様蛍光をほとんど観察できなかった (Fig. 2-1-9)。NLS-MCP-2×EGFP はダイマーMCP と MBS に結合した際に NLS が立体構造的にマスクされ、核輸送タンパク質であるインポート α とインポート β の結合から免れたのではないかと考えられた。以上の結果から、MS2 system により *glaA* mRNA を安定的に可視化できる MCP-2×EGFP として、NLS-MCP-2×EGFP が最良であることが示された。糸状菌の汎用性を優先して *PpgkA* を採用し、*niaD* をマーカー遺伝子として *glaA*-36×MBS 株に pgPpNM2G の形質転換を行い、*glaA*-MS2-SΔP 株の作製を行った。*niaD* をマーカー遺伝子として *glaA*-MS2-SΔP 株に pgSmaI-*pyrG*-*ptrA* の形質転換を行い、*glaA*-MS2-PP 株の作製を行った。硫酸還元酵素遺伝子 *sC* をマーカー遺伝子として *glaA*-MS2-PP 株に pgNotI-AosC-NotI の形質転換を行い、*glaA*-MS2 株の作製を行った。

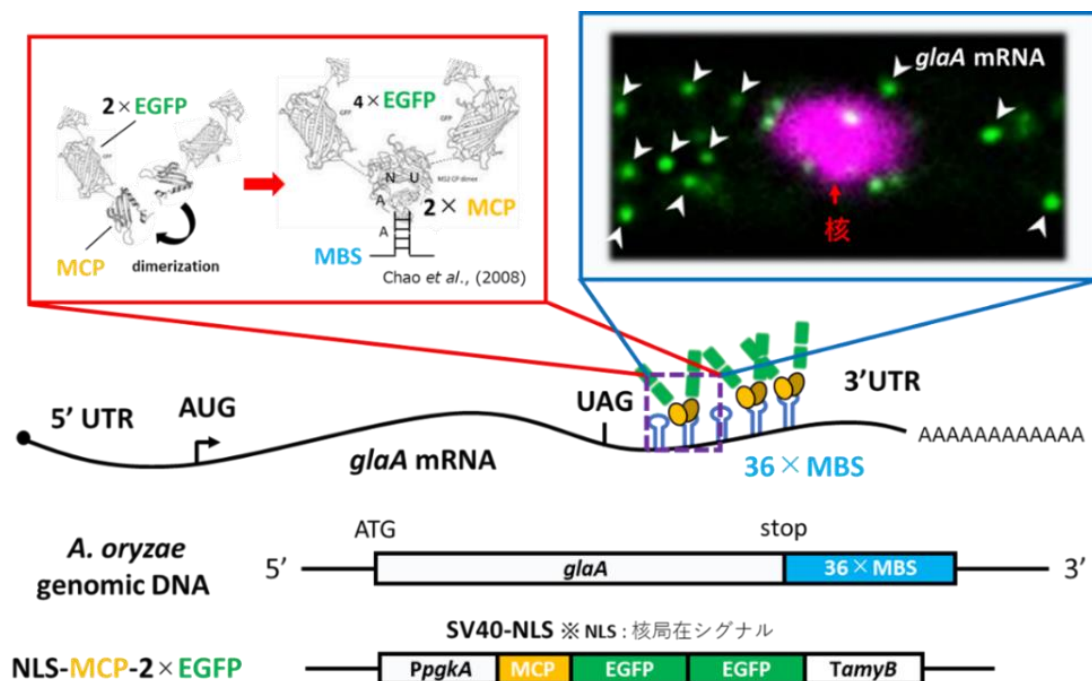


Fig. 2-1-1 MS2 system の mRNA 可視化メカニズム

赤枠内は MCP と MBS の結合様式を示す。青枠内は実際に可視化した *glaA* mRNA のドット様蛍光を示す。36×MBS と MCP-2×EGFP の結合により標的 mRNA が 1 分子可視化される。

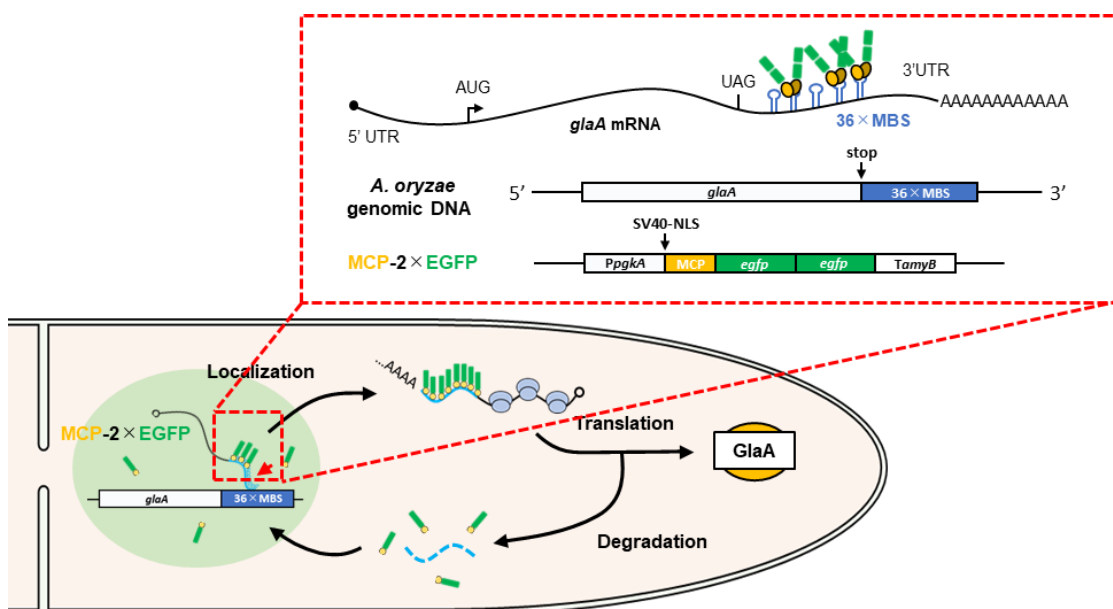


Fig. 2-1-2 MS2 system による mRNA 可視化プロセス

核内で標的 mRNA に MCP-2×EGFP が結合し、細胞質で 1 分子可視化される。翻訳後、標的 mRNA が分解されると同時に MCP-2×EGFP が乖離し、再び核内に局在し mRNA の可視化に利用される。

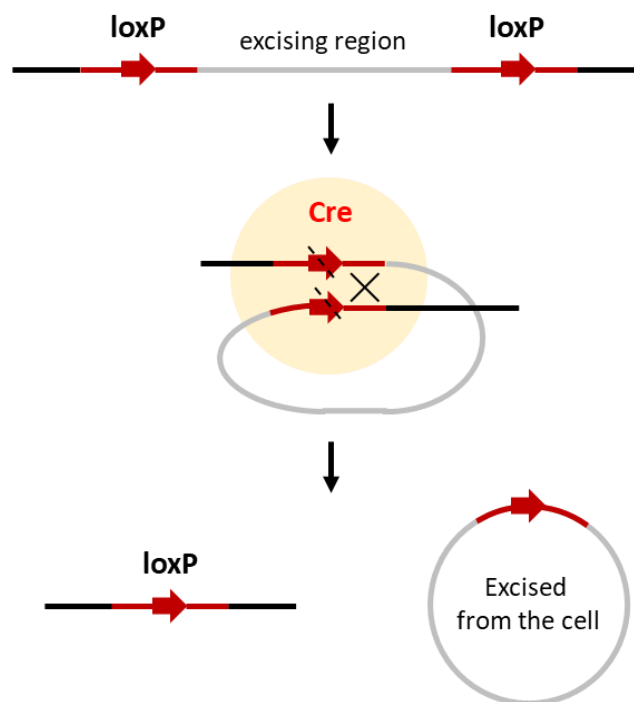


Fig. 2-1-3 Cre/loxP system の概要

loxP 配列に Cre が結合し組み換え反応を起こす。2 つの loxP 配列が同じ向きの場合、loxP 配列で挟まれた配列 (灰色) が脱離する。

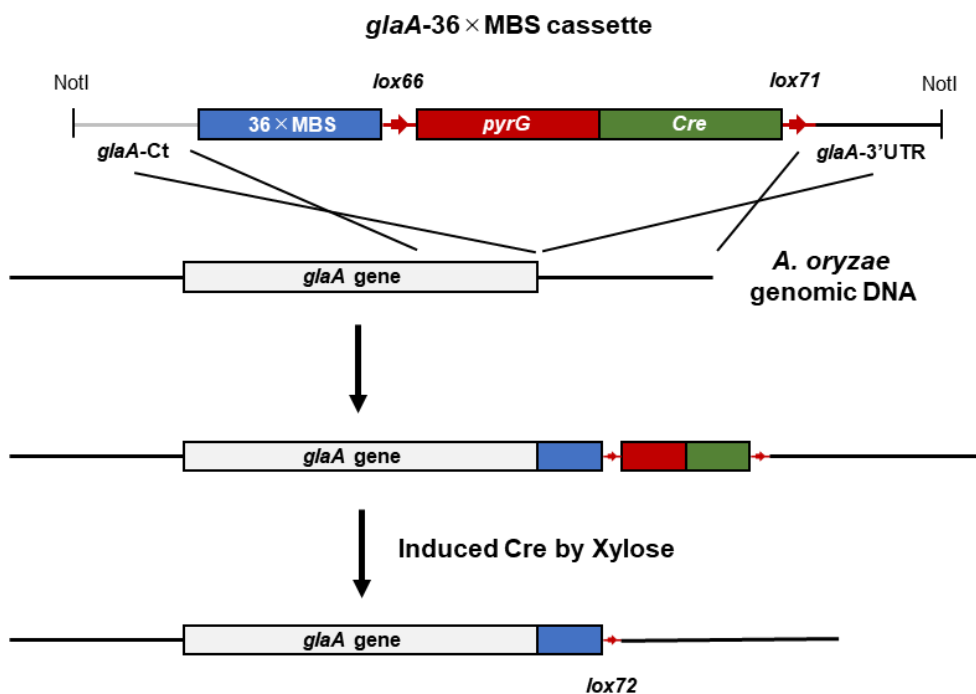
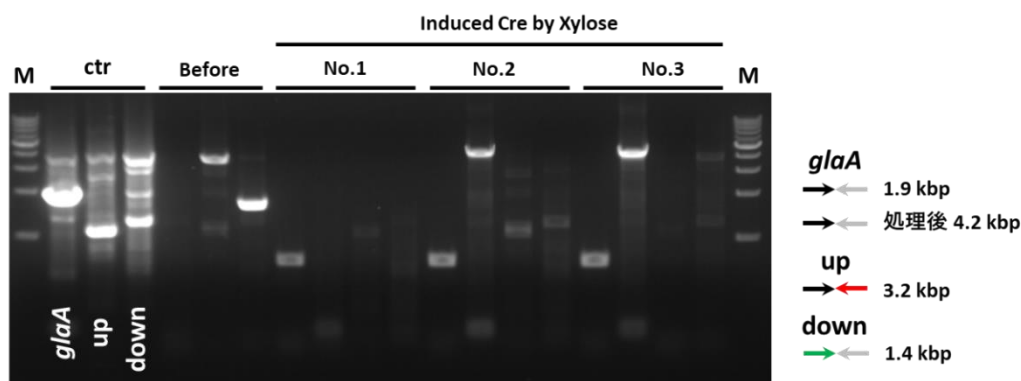


Fig. 2-1-4 glaA 遺伝子下流への 36xMBS の挿入方法

glaA 遺伝子下流に Cre/loxP system を適用した 36xMBS を挿入する。その後、キシロース培地にて *pyrG* マーカー遺伝子を脱離する。

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
MBSV6	CAGAGCCCC	TGGCAATCG	GGGAGACGC	AGGACTACG	CGTCTTCACT	CTCGCTTGG	CGGTATACG	AGGGAGCAAC	GTCACCCAGG	GCGACACAGA
										
	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
MBSV6	GGATAACCT	GTGTGGCCC	ACGGTGCTAC	AAAGAACATT	CCGTATTGCT	CACCACTGTC	ACATGTGGAG	GACTACCCCA	CAAGCGAGTC	AGGAAACCTT
										
	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
MBSV6	CGGGGCATCG	CACCATTATC	CCGAACAATC	GACACGCAGG	ATTACCGCGT	GGGACACTCT	GTTCGCCGTC	AAAATTGGAC	CATACCGGAG	TGGGCTTACG
										
	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
MBSV6	TCATGCAGGA	TTACCGCATG	CATGGTGCG	AATATCGGCA	TGTCTACTCG	TACAGTCAAA	TCTACTCGTG	TGGTCAGGAC	TACCGACCAC	TTCTATTCTA
										
	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
MBSV6	TTATCTTTTT	CGGTTGTGCA	GGTATTCTGC	CGATGTACGA	GAAGACGATT	ACGCTTCTCG	ACTACCTTCA	TCATACATGG	TGTGCAGATG	GCCGCCAAGT
										
	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
MBSV6	TTTTTGCCAA	TGGAGGAATA	CCCCATTCTC	TGTCAACCAA	CCCATGCAAA	GTTTACACTC	TGCTATGGCA	GCACTGTGCG	AGAGGAATAC	CCTGCGAGCC
										
	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700
MBSV6	AAAACGGCCC	CCGGTGCGTG	TATTGCATCT	GCCTTGCGAG	CATTACACAGG	GACGAATACG	CCCTGCCGTT	GCATTACTTC	AATATGGGTG	CTCTGTGCTC
										
	710	720	730	740	750	760	770	780	790	800
MBSV6	GTATCAGGA	CCATTGCGC	AGGACTACG	CGCATATATC	ATCAGCACTC	GTGCGGATAC	TTCTGGGATT	CCTATTGTTA	CGCGAGCTCA	GGAATACCGA
										
	810	820								
MBSV6	GCTCTGGCGA	CAGAGACCC	CACACGGA							

36×MBS 配列は 3 つの 12×MBS 配列から成る (Tutucci et al., 2018)。



ctr はコントロール株、before は脱離前の株を示す。キシロース培地にて培養後、No.2 株と No.3 株でマーカー遺伝子が脱離した。脱離株の左端のレーンは SporePCR のポジティブコントロールを示す。

Alignment: AoMCP in *Aspergillus oryzae*

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
AoMCP  ATGCTCGCCG TCAAGATGGC CTCGAATTC ACCCAGTTCG TCCTCGTCGA TAACGGCGGC ACCGGTGAIG TCACCGTCGC TCATCCCAAC TTGCGCAACG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
AoMCP  GTATCGCCGA GTGGATCTCC TCCAACTCTC GCTCCAGGC CTACAAAGTC ACCTGTTCCG TCCGCCAGTC CTCGCTCAG AACCGCAAGT ACACCATCAA

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
AoMCP  GGTGAGGTC CCTAAAGGCG CTTGGCGCTC CTACCTCAAC ATGGAATCA CTATCCCTAT CTTGCGCACC AACTCCGATT GCGAGCTGAT CGTCAAGGCC

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     310     320     330     340     350     360
AoMCP  ATGCAAGGCC TGCTCAAGGA TGGCAACCT ATTCTTCG CTATCGCCGC CAACAGCGGC ATCTAC

```

Fig. 2-1-7 AoMCP 遺伝子の塩基配列

A. oryzae で使用頻度の高いコドンに最適化し遺伝子合成を行った。

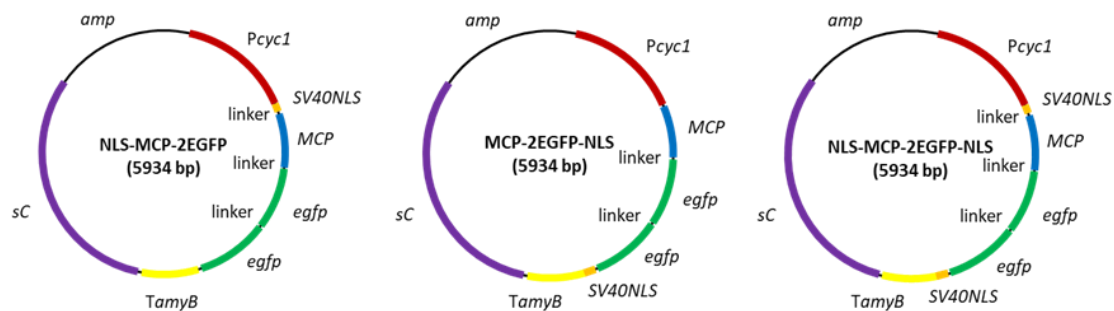


Fig. 2-1-8 各 MCP-2×EGFP 発現用プラスミド

左端から NLS-MCP-2×EGFP, MCP-2×EGFP-NLS, NLS-MCP-2×EGFP-NLS を示す。

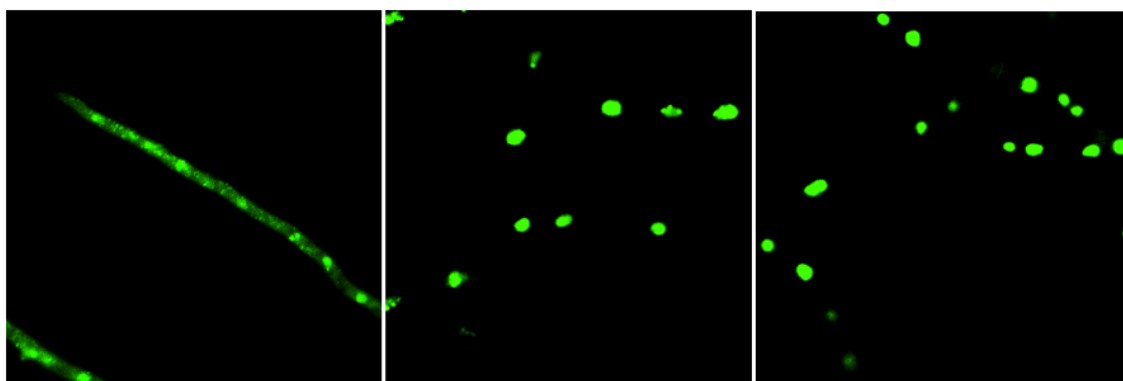


Fig. 2-1-9 各 MCP-2×EGFP 発現時における *glaA* mRNA の細胞内局在解析

CDm (maltose) 培地で 30°C, 24 時間培養し局在解析を行った。左端から NLS-MCP-2×EGFP, MCP-2×EGFP-NLS, NLS-MCP-2×EGFP-NLS の局在解析画像を示す。MCP-2×EGFP-NLS と NLS-MCP-2×EGFP-NLS は MCP-2×EGFP が核に強くトラップされ、強い核蛍光が見られた。

2-2. *glaA*-MS2 株の表現型解析

MS2 system の導入により標的 mRNA の細胞内レベルが低下するため (Li et al., 2022)、*glaA*-MS2 株の生育速度とコロニー形態に与える影響について表現型解析を行った。*amyB* 欠失株は多糖存在化で生育が若干抑制される (Nemoto et al., 2012)。炭素源をグルコース、マルトース、馬鈴薯デンプンにした CD 培地で解析を行った。また、富栄養条件下の DPY 培地でも表現型解析を行った。*glaA*-MS2 株は栄養条件や炭素源に関わらずコロニー形態に異常が確認されなかった (Fig. 2-2-1A)。また、生育速度も顕著な異常が確認されなかった (Fig. 2-2-1B)。

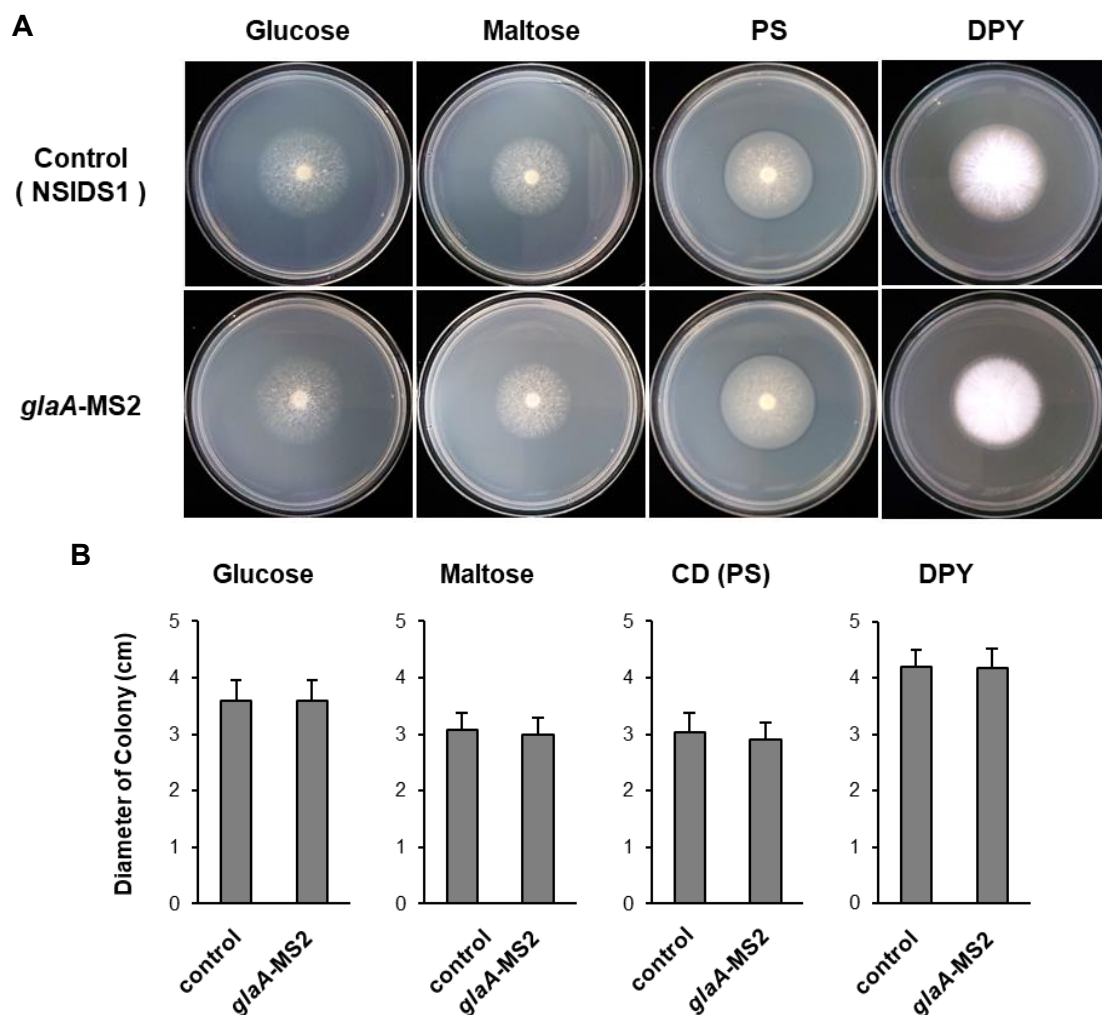


Fig. 2-2-1 *glaA*-MS2 株の表現型解析

炭素源の異なる CD 培地にて 30°C、3 日間で培養し表現型解析を行った。コントロール株として NSIDS1 株を使用した。A：左からグルコース、マルトース、馬鈴薯デンプン、DPY を炭素源とする培地での生育を示す。B：コロニーの直径を測定した (n=3)。エラーバーは SD を示す。

2-3. *glaA*-MS2 株における *glaA* mRNA の遺伝子発現解析

glaA-MS2 株における *glaA* mRNA の遺伝子発現量とグルコアミラーゼ活性について解析を行った。まず、*glaA*-MS2 株の *glaA* mRNA の遺伝子発現量解析を行った。CD (mal) 培地で培養した菌体から全 RNA を抽出して cDNA を合成し、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼをコードする mRNA (*gpdA* mRNA) を YHK196 と YHK196、*glaA* mRNA を YHK190 と YHK191 で RT-qPCR を行った。*gpdA* mRNA は内在性コントロールとした。その結果、*glaA*-MS2 株は *glaA* mRNA の遺伝子発現量がコントロール株の約 37%に低下することが確認された (Fig. 2-3-1A)。以上の結果から、MS2 system を *glaA* mRNA に適用することで、転写量や安定性が低下することが示された。

次に、*glaA*-MS2 株のグルコアミラーゼ活性の測定を行った。最少培地である CD 培地ではタンパク質合成量が少なく、検出が困難であるため、富栄養培地である DPY 培地で解析を行った。*glaA*-MS2 株を培養した DPY 培地の培養上清を使用し、糖化力分別定量キットによるグルコアミラーゼ活性の測定を行った。その結果、*glaA*-MS2 株は *glaA* mRNA の遺伝子発現量の減少率に比例するように、グルコアミラーゼ活性もコントロール株の約 37%に低下した (Fig. 2-3-2B, Fig. 2-3-2C)。以上の結果から、MS2 system を *glaA* mRNA に適用することで、グルコアミラーゼ活性が低下することが示された。

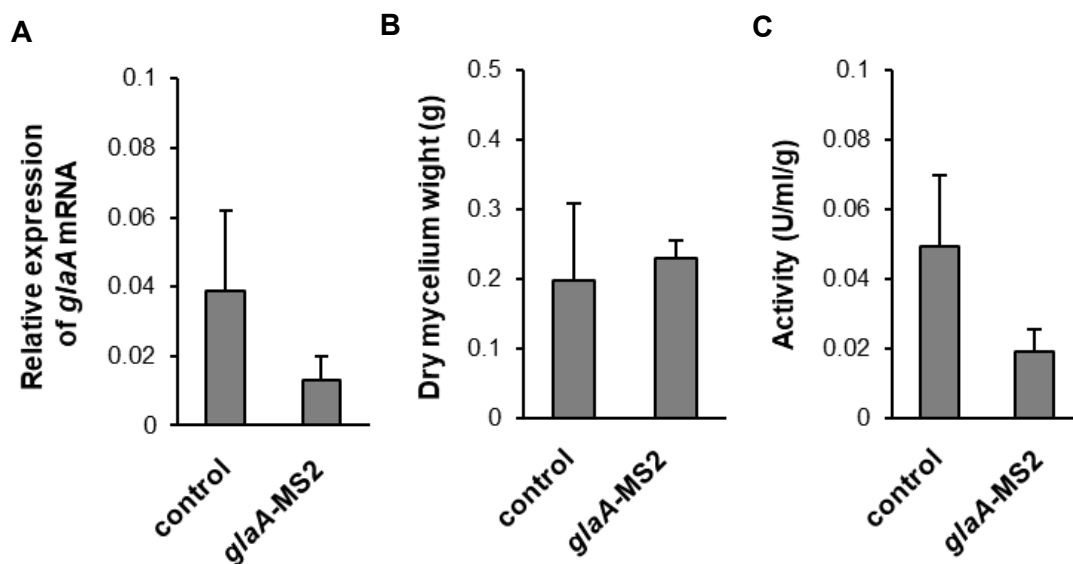


Fig. 2-3-1 *glaA* mRNA の遺伝子発現量解析とグルコアミラーゼ活性測定

A : *glaA* mRNA の遺伝子発現量の定量グラフを示す (n=3)。B : DPY 培地にて 30°C、3 日間で培養し解析を行った、グルコアミラーゼ活性測定の定量グラフを示す (n=3)。エラーバーは SD を示す。

2-4. *glaA*-MS2 株におけるドット様蛍光の局在評価

MS2 system によるドット様蛍光が mRNA 由来であるか確認を行うために、転写阻害剤 Actinomycin D (ActD) 添加時にドット様蛍光の形成が阻害されるか確認を行った。まず、PaG 株を用いて ActD による転写阻害が *A. oryzae* で可能であるか確認を行った。*amyB* プロモーター (*PamyB*) はグリセロール存在下で遺伝子の転写を抑制し、マルトース存在下で高度に転写を誘導する。そこで、CD (glycerol) 培地に DMSO または ActD を添加して前培養を行った後に、DMSO または ActD を添加した CD (maltose) 培地で転写誘導を行った。次章で示す *glaA* mRNA の転写誘導解析を行った際に、*glaA* mRNA 蛍光が十分に誘導されるまでに約 2 時間を要した。この結果を踏まえ、mRNA が翻訳されタンパク質として機能するのに、より長い時間を必要とすることが予想された。したがって、EGFP 蛍光で転写の有無を比較するために CD (maltose) 培地にシフトし、転写誘導後から約 2.5 時間後に解析を行った。その結果、ActD 添加時に EGFP 蛍光がほとんど検出されず、*A. oryzae* で ActD による転写阻害が可能であることを示した (Fig. 2-4-1)。

次に、*glaA*-MS2 株で ActD 添加時にドット様蛍光が阻害されるか確認を行った。CD (glucose) 培地に DMSO または ActD を添加して前培養を行った後に、DMSO または ActD を添加した CD (maltose) 培地で転写誘導を行った。*glaA* mRNA はグルコース存在下で転写を抑制できるため、CD (glucose) 培地に DMSO/ActD を添加して前培養を行った。MS2 system によるドット様蛍光の数を測定するために、核局在を解析可能な *glaA*-MS2 株の作製を行った。ドット様蛍光から核蛍光を減算することで、細胞質で局在化する *glaA* mRNA 蛍光を対象に測定を行った。*PpgkA* で AoStuA 由来 NLS に赤色蛍光タンパク質 mCherry を融合し発現させたところ、ドット様蛍光が核に凝集したことから過剰発現であると判断した。そこで、出芽酵母でトレハロース 6 リン酸合成酵素のホモログ因子 *Aotps1* (AO090003000417) から新規な低発現プロモーター (*PAotps1*) を見出した。*sC* をマーカー遺伝子として、*glaA*-MS2-PP 株に pgPtmCN の形質転換を行い、核局在を解析可能な *glaA*-MS2-N 株の作製を行った。*glaA*-MS2-N 株でドット様蛍光を観察し、異常な凝集体が形成されないことを確認した。*glaA*-MS2-N 株を用いて解析を行った結果、DMSO 添加時に安定して観察されたドット様蛍光が、ActD 添加時により阻害されることを確認した (Fig. 2-4-2A)。さらに、DMSO または ActD を添加しない CD (maltose) 培地で再び転写誘導を行うと、ドット様蛍光が回復することを確認した (Fig. 2-4-2B)。以

上の結果から、MS2 system によるドット様蛍光が mRNA 由来であることを示した。

MS2 system によるドット様蛍光が *glaA* mRNA 由来であるか確認を行うために、まず smFISH 法で *glaA* probe と *mbaA* probe により *glaA* と MBS mRNA の共局在解析を行った。その結果、*glaA* mRNA と MBS mRNA が共局在を示し、転写後に *glaA* mRNA に MBS が係留されていることを示した (Fig. 2-4-3A)。次に、MS2 system で可視化したドット様蛍光と smFISH で *glaA* probe により可視化した *glaA* mRNA 蛍光の共局在解析を行い、MS2 system によるドット様蛍光が *glaA* mRNA 由来であることが示された (Fig. 2-4-3B)。

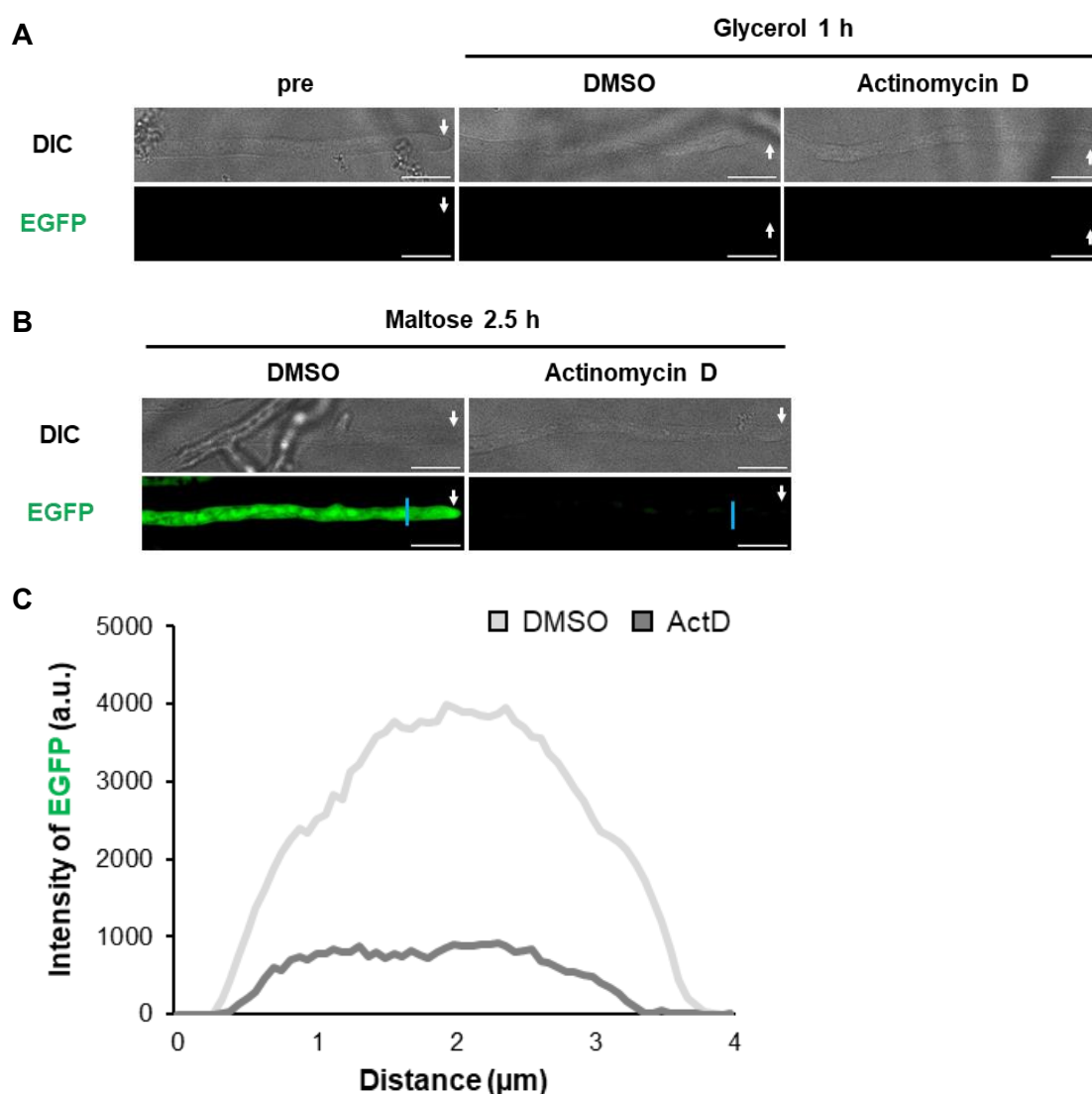


Fig. 2-4-1 ActD による転写阻害確認

PaG 株を CD 培地にて 30°C、20 時間で培養し解析を行った。白矢印は菌糸先端を示す。A：プレ培養時の局在解析画像。B：EGFP 発現誘導時の局在解析画像。C：ラインスキャンによる B の青線の輝度グラフ。

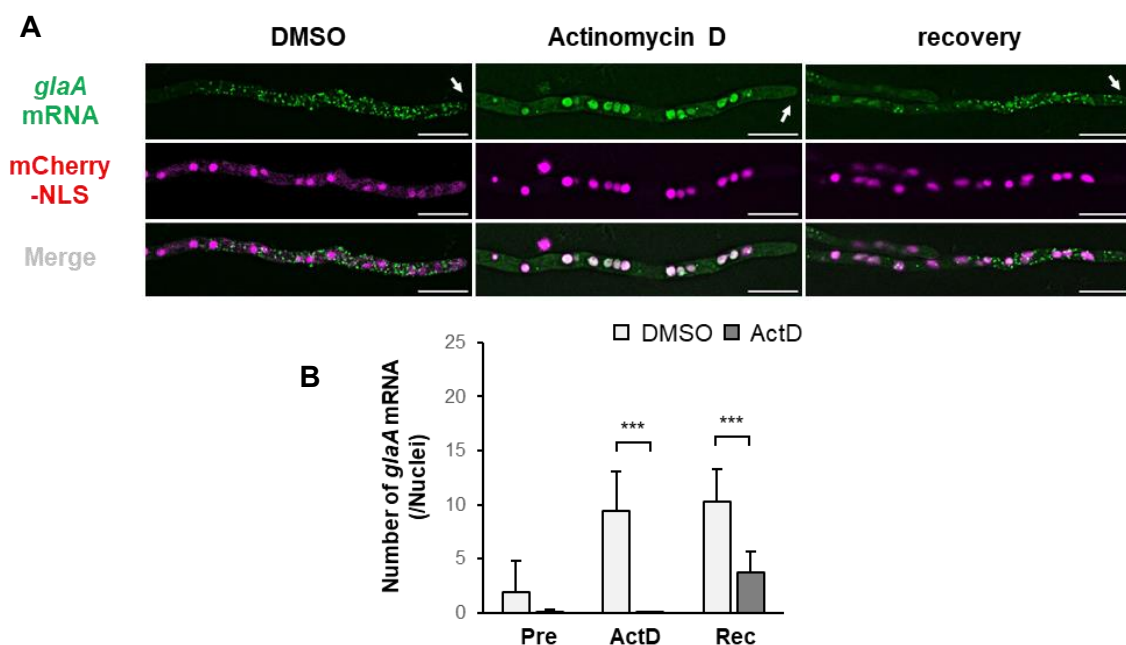


Fig. 2-4-2 ActD 添加時における *glaA* mRNA の転写阻害解析

glaA-MS2-N 株を CD (maltose) 培地で 30°C、24 時間培養した。白矢印は菌糸先端を示す。A: *glaA* mRNA 転写誘導時の局在解析画像を示す。スケールバーは 10 μ m を示す。B: *glaA* mRNA 数の定量化グラフを示す (n=10)。エラーバーは SD を示す。有意差は***: p<0.001 を示す。

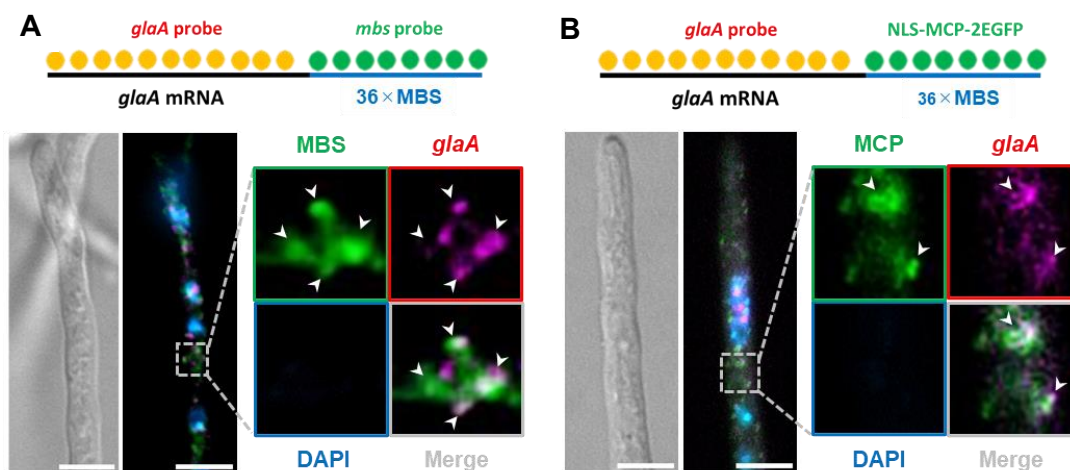


Fig. 2-4-3 smFISH 法による *glaA* mRNA の局在解析

WT と *glaA*-MS2-SΔP 株を CDm (maltose) 培地で 30°C、22 時間培養した。白矢印は共局在箇所を示す。A: WT を用いて *mbs* probe と *glaA* probe による共局在解析画像を示す。A: *glaA*-MS2-SΔP 株を用いて *glaA* probe と MS2 system によるドット様蛍光の共局在解析画像を示す。DAPI は核染色に使用した。スケールバーは 5 μ m を示す。

2-5. *glaA*-MS2 株におけるドット様蛍光の転写応答評価

カーボンカタボライト抑制機構による転写制御を、MS2 system によるドット様蛍光が反映するか確認を行った。*glaA*-MS2-N 株を CD (glucose) 培地と CD (maltose) 培地で培養し、菌糸先端部における *glaA* mRNA 数の測定を行った。その結果、CD (glucose) 培地で *glaA* mRNA 蛍光がほとんど観察されなかったが、CD (maltose) 培地で *glaA* mRNA 蛍光が有意に多く観察された (Fig. 2-5-1, Fig. 2-5-2)。したがって、MS2 system による *glaA* mRNA 蛍光が本来の転写制御システムを反映することを示した。

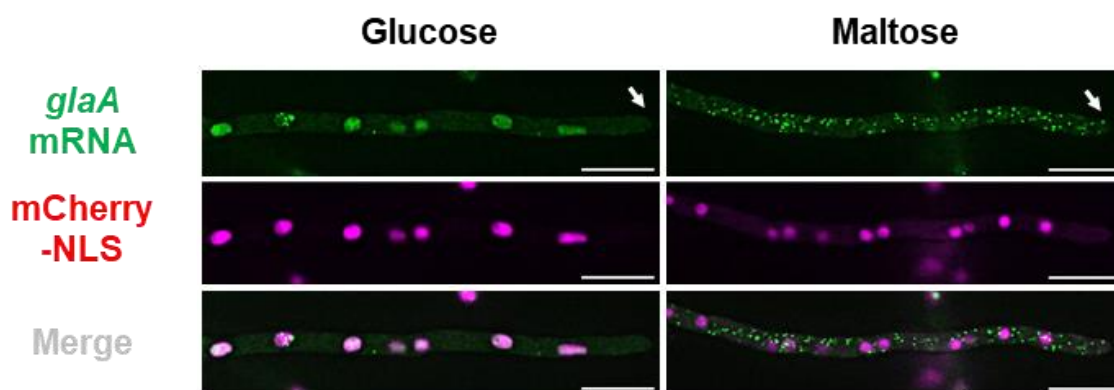


Fig. 2-5-1 各炭素源における *glaA* mRNA の局在解析画像

glaA-MS2-N 株を CD (maltose) 培地にて 30°C、24 時間で培養し解析を行った。白矢印は菌糸先端を示す。A: 各炭素源における *glaA* mRNA の局在解析画像。スケールバーは 10 μ m を示す。

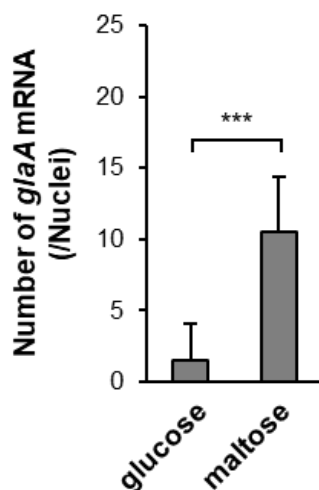


Fig. 2-5-2 各炭素源における *glaA* mRNA 数の測定

glaA-MS2-N 株を用いた *glaA* mRNA 数の定量化グラフ (n=10)。エラーバーは SD を示す。有意差は***: $p < 0.001$ を示す

考察

A. oryzae がタンパク質分泌能力に優れることから、その分泌量を時空間的に制御するために、mRNA レベルで局在制御される可能性を示唆した。そこで本章から、より高生産な黄麹菌株の分子育種に貢献すべく、*A. oryzae* が高分泌するグルコアミラーゼ (GlaA) を標的として、分泌酵素 mRNA の局在制御機構の解明を目的とした。本章では、smFISH 法で mRNA 局在制御機構を十分に解明できないことが示唆されたことから、生体内 mRNA を可視化する MS2 system の確立を試みた。そして、*A. oryzae* における MS2 system の適用に成功し、菌糸細胞内で *glaA* mRNA の安定的な可視化に成功した。

MS2 system の確立に際し、初めは *A. oryzae* で最も十分に研究された α -アミラーゼ (AmyB) を標的として、MS2 system による *amyB* mRNA の可視化を試みた。しかし、*amyA/B/C* がコピー配列であることから、*amyB* ではなく *amyC* に 24×MBS が導入されてしまった (data not shown)。*amyA/B/C* の中で、*amyB* は転写制御機構に関する知見が豊富であり、 α -アミラーゼとしての役割が大きいことが示唆されている。したがって、分泌酵素 mRNA モデルとして *amyB* mRNA が最も適するが、24×MBS の挿入が困難であったことから、*glaA* mRNA を標的とすることで解決を図った。この点に関連して、*amyA/B/C* の各遺伝子欠失株を作製した際に、*amyB* 欠失株の作製が最も困難であったことが報告されている (Nemoto et al., 2012)。また、GlaA は AmyB と同様に十分に研究されており、産業的にも重要であることから、分泌酵素 mRNA モデルに適すると考えた。

amyC mRNA を可視化する段階で、MS2 system の確立に必要な 2 つの重要な情報が得られた。1 つ目は、十分な輝度の *amyC* mRNA 蛍光が得られなかったことである。出芽酵母では、24×MBS により明瞭に標的 mRNA を可視化できていたが、今回の実験系では十分でないことが示唆された。そこで、36×MBS を使用して *glaA* mRNA を可視化することで、標的 mRNA を明瞭に可視化することに成功した。この方法で他の mRNA を可視化する場合、36×MBS に結合する EGFP が増加することを考慮し、標的 mRNA が凝集しない範囲で MCP-2×EGFP の発現量を調整するか、単量体で機能する蛍光分子 (e.g., mCherry) に変更する必要があると考える。EGFP は微弱なダイマー形成能を持つため、36×MBS に EGFP が結合しすぎると凝集体を形成する危険性がある。実際、48×MBS で *glaA* mRNA を可視化すると、凝集体が形成された (data not shown)。

2 つ目は、細胞質で *amyC* mRNA をほとんど観察できなかったことである。*amyC* 遺

伝子も多糖存在下で高度に転写が誘導されることから、MCP-2×EGFP の構成に問題があることが示唆された。そこで、MCP-2×EGFP が核のみに観察されたことから、核局在化強度に着目し、MCP-2×EGFP の発現量および NLS の種類と融合箇所の検討を行った。MCP-2×EGFP の発現量に関して、*PpgkA* よりも発現量が低い *PAotps1* を見出したが、MCP-2×EGFP の輝度が低下するだけで *glaA* mRNA を示すドット蛍光は得られなかった。したがって、MCP-2×EGFP の結合量が核局在化強度に関与しないことが示唆された。次に NLS の種類に関して、*amyC* mRNA で使用した糸状菌で一般的な発育阻害関連転写因子 AoStuA がコードする NLS から、出芽酵母や哺乳細胞で一般的に利用される SV40 ウイルスに由来する NLS (SV40NLS) に変更した。NLS は短いスペーサー配列で NLS が分断される双節型と分断がない単節型がある。真核生物の NLS は多くが双節型であることから、異種で単節型の SV40NLS にして核局在化強度の低化を図った。さらに、NLS の位置と数を考慮することで NLS-MCP-2×EGFP が有用であることを見出した。ただ、SV40NLS を MCP-2×EGFP の C 末端に融合しても核局在化強度が低下しなかったことから、NLS の種類ではなく、立体構造的な NLS のマスキングが重要であることが示唆された。NLS-MCP-2×EGFP は *glaA* mRNA 非誘導時に細胞質の蛍光輝度が MCP-2×EGFP-NLS と差がなかったことから、NLS-MCP-2×EGFP がダイマー化し MBS に結合したときに NLS がマスクされると考えられた。別の考察として、出芽酵母と同様に MCP と 2×EGFP の間に NLS を融合しても、MCP-2×EGFP が核に局在化しなかったことから、生物種ごとにインポーチン α/β による NLS 認識に相違があるのかもしれない。

以上の条件検討を踏まえ、MS2 system による *glaA* mRNA の可視化に成功した。また、*glaA*-MS2 株を用いた解析から、MS2 system による生育への影響が少なく、*glaA* mRNA の細胞内局在と転写応答システムを反映することを示した。しかし、*glaA* mRNA の遺伝子発現量とグルコアミラーゼ活性の低下が確認された。この点に関しては一般的に、技術的な限界と認識されているデメリットであり、多くの研究で標的 mRNA の細胞内局在に影響がない範囲で MS2 system が使用されている (Li et al., 2022; Tutucci et al., 2022; Hu et al., 2023; Livingston et al., 2023)。本章の解析により、MS2 system による *glaA* mRNA への影響について、その細胞内局在だけでなく転写応答システムに影響を与えないことを示した。以上から、MS2 system を利用して分泌酵素 mRNA の局在制御機構のさらなる解析を進めた。

第3章 *glaA* mRNA の局在制御機構に関する研究

序

糸状菌は「菌糸」と呼ばれる細長い細胞を生長させることで、視認可能なコロニーを形成する。*Aspergillus* 属糸状菌の多核多細胞菌糸は先端領域に近づくほど核が多い傾向にあり、多数の分岐をした複雑で広い細胞空間を持つ。さらに、その菌糸は菌糸先端に向けた高度な細胞極性を形成しており、それにより多くの細胞内プロセスを制御する。タンパク質分泌機構において、*Aspergillus* 属糸状菌は菌糸頂端と隔壁が分泌部位として示唆されている (Hayakawa et al., 2011)。特定の細胞区画に局在するタンパク質は mRNA レベルで局在制御される場合が多く、それにより細胞の分化や極性形成が制御される。したがって、*A. oryzae* の分泌型酵素は菌糸細胞内において mRNA レベルで分泌部位の近くに局在制御される可能性が考えられる。

多くの分泌型酵素は N 末端に小胞体局在シグナルを持ち、SRP 経路により ER に局在化することが知られている。出芽酵母では、ER 局在性 mRNA は ER 膜上で輸送され、その過程で She2-She3 複合体を介して ER 構造と結合することが報告されている (Schmid et al., 2006; Farajzadeh et al., 2023; Hwang et al., 2022)。そうした輸送機構により、ER 局在性 mRNA は細胞内で翻訳効率が最大化すると示唆されている。しかし、糸状菌の ER 局在性 mRNA は細胞内輸送機構が全く明らかにされていない。

本章では、MS2 system による *glaA* mRNA の局在解析を行い、*A. oryzae* の菌糸細胞内における *glaA* mRNA の菌糸局在と細胞内局在を明らかにすることを目的とした。菌糸局在は細長い菌糸における局在箇所を調査した。細胞内局在は菌糸局在の細胞における局在箇所を調査した。細胞内局在の調査として、GlaA は N 末端側に小胞体局在シグナルがあることから、*glaA* mRNA と ER の共局在解析を行った。それにより、ER 近傍で *glaA* mRNA の生体分子モーター様動態が観察されたため、*U. maydis* の mRNA 局在制御機構と同様であるか初期エンドソームとの関連性についても解析を行った。

3-1. *glaA* mRNA の菌糸局在解析

菌糸は非常に長く生長することから、分生子を含む約 50 μm を基部領域、隔壁を含む約 50 μm を隔壁領域、最先端から約 50 μm を先端領域として解析を行った (Fig. 3-1-1)。*glaA* mRNA はマルトース存在下で高度に転写誘導されることから、CD (maltose) 培地で *glaA* mRNA の局在解析を行った。*glaA* mRNA は主に先端領域や隔壁領域に局在する様子が観察された (Fig. 3-1-2)。先端領域の *glaA* mRNA は複数の核を含む広範囲に局在していた。一方で、隔壁領域の *glaA* mRNA は隔壁に隣接する核の近くに局在していた。各菌糸領域で *glaA* mRNA 数の測定を行ったところ、*glaA* mRNA は先端領域で有意に多いことが明らかとなった (Fig. 3-1-3A, Fig. 3-1-3B)。この点に関して、smFISH 法により *glaA* mRNA を局在解析すると、先端領域で強い蛍光シグナルが観察された (Fig. 3-1-4)。一方で、隔壁領域は基部領域と *glaA* mRNA 数に有意差が得られなかった。そこで、隔壁を含む領域と含まない領域で *glaA* mRNA 数の測定を行ったところ、隔壁を含む領域で *glaA* mRNA 数が有意に多いことが明らかとなった (Fig. 3-1-3C)。以上の結果から、*glaA* mRNA は分泌部位である菌糸頂端と隔壁の近くに局在制御されることを示した。

どのように *glaA* mRNA が分泌部位の近くへ局在化するのか経時的な観察を行った。*glaA* mRNA のカーボンカタボライト抑制機構を利用し、CD (glucose) 培地で培養後に CD (maltose) 培地にシフトし、*glaA* mRNA の転写誘導後から 0 分、30 分、60 分で顕微鏡観察を行った。その結果、*glaA* mRNA は菌糸全域で増加するのではなく、先端領域や隔壁領域の近くで部位特異的に増加する様子が観察された (Fig. 3-1-5A)。そこで、転写誘導後から 0 分、30 分、60 分、90 分で *glaA* mRNA 数の測定を行ったところ、*glaA* mRNA は 30 分後から 60 分後にかけて増加し、先端領域で最も増加率が高いことが明らかとなった (Fig. 3-1-5B)。この結果に関して、*glaA* 遺伝子の転写誘導後から 40 分後に CreA がほぼ完全に分解されることが報告されている (Tanaka et al., 2018)。さらに、CreA の分解に同調する様に *glaA* mRNA の細胞内レベルも転写誘導から 45 分後に増加することが報告されている (Suzuki et al., 2015)。これらの報告を踏まえ、*glaA* mRNA の転写箇所を真に反映していると考えられた。もし全ての核で *glaA* mRNA を転写するならば、*glaA* mRNA は転写誘導後に一時的に菌糸全域で局在するはずである。しかし、*glaA* mRNA は菌糸全域に局在することが全くなかった。したがって、分泌部位近傍の核で部位特異的に転写が誘導されることが示唆された。

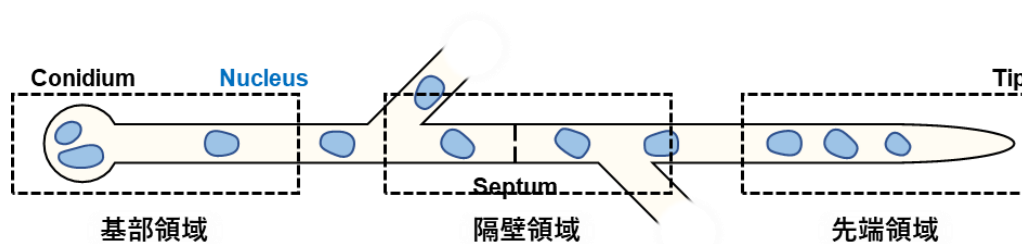


Fig. 3-1-1 *glaA* mRNA の局在解析における菌糸区分

分生子を含む約 50 μm の菌糸を基部領域、隔壁を含む約 50 μm の菌糸を隔壁領域、菌糸頂端から約 50 μm の菌糸を先端領域とした。標本のランダムな抽出を行うため、基部領域に隔壁を含む場合もある。

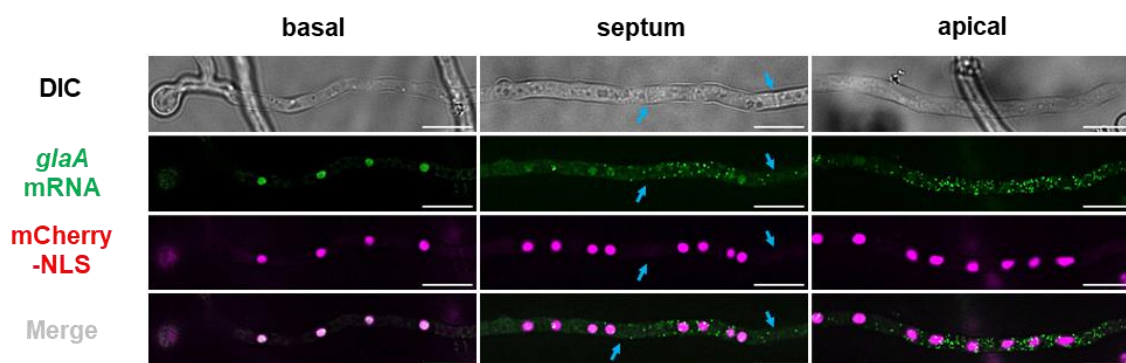


Fig. 3-1-2 *glaA* mRNA の菌糸局在解析

glaA-MS2-N 株を CD (maltose) 培地で 30°C, 24 時間培養した。菌糸の先端領域、隔壁領域、基部領域を apical、septum、basal で示す。青矢印は隔壁を示す。スケールバーは 10 μm を示す。

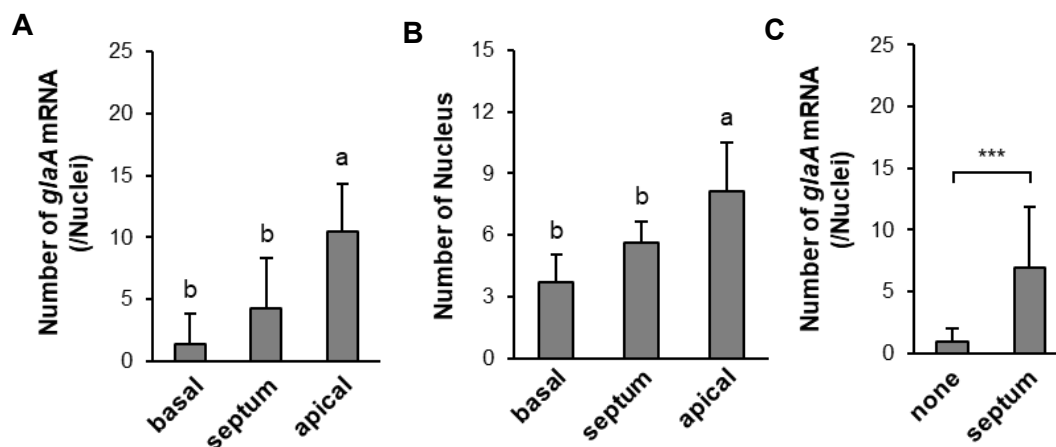


Fig. 3-1-3 菌糸部位ごとの *glaA* mRNA 数の定量

glaA-MS2-N 株を用いて解析を行った。A: 各領域の *glaA* mRNA 数を示す (n=10)。B: 各領域の核の数を示す (n=10)。C: 隔壁がある領域とない領域の *glaA* mRNA 数を示す (n=10)。エラーバーは SD を示す。有意差は a,b: $p < 0.05$ 、***: $p < 0.001$ を示す。

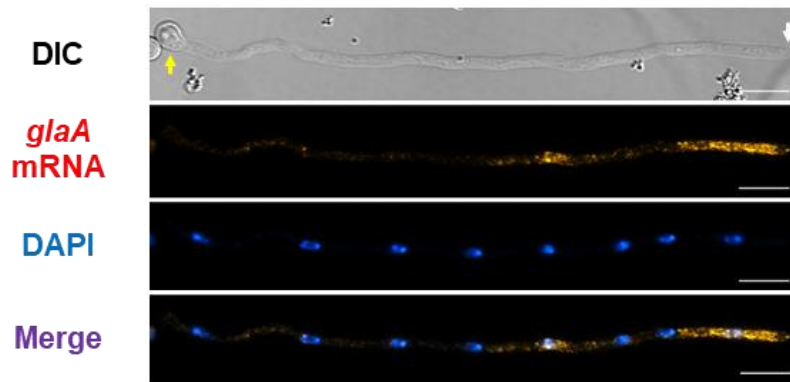


Fig. 3-1-4 smFISH 法による *glaA* mRNA の局在解析

NSIDN1 株を CD (maltose) 培地にて 30℃, 24 h で培養し局在解析を行った。smFISH 法により *glaA* probe で *glaA* mRNA を標識した。スケールバーは 10 μ m を示す。黄矢印は分生子、白矢印は先端を示す。

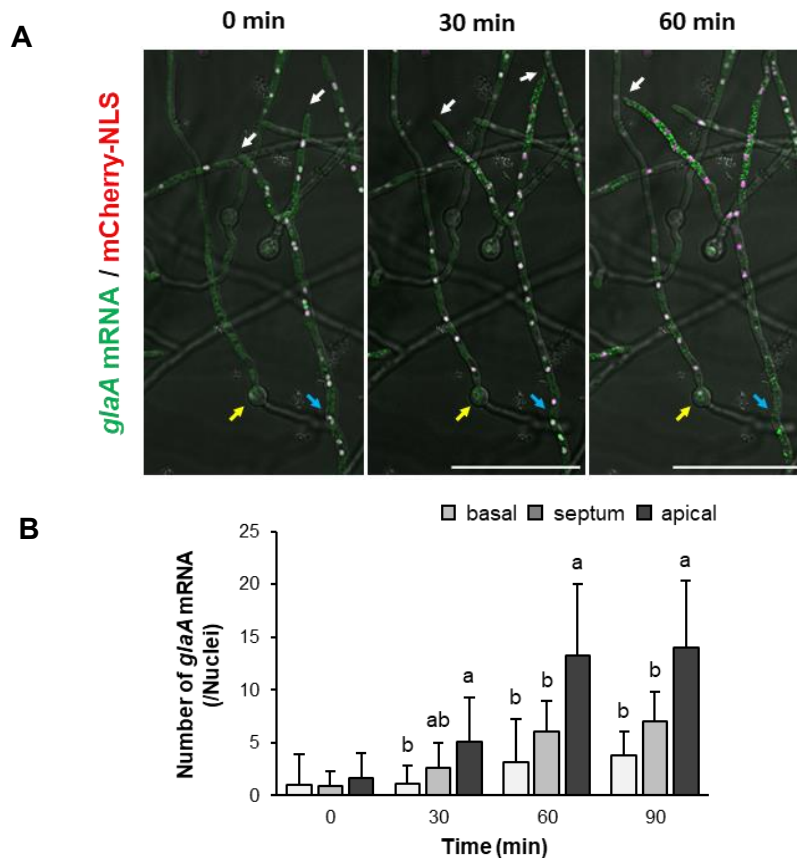


Fig. 3-1-5 転写誘導解析による *glaA* mRNA の局在解析と *glaA* mRNA 数の定量

glaA-MS2-N 株を CD (glucose) 培地で 30℃, 24 時間培養した。A: 転写誘導後から経時観察した *glaA* mRNA の局在解析画像を示す。白矢印は菌糸先端、黄矢印は分生子、青矢印は隔壁を示す。スケールバーは 50 μ m を示す。B: 転写誘導後から経時的に *glaA* mRNA 数を測定した定量グラフを示す。エラーバーは SD を示す。有意差は a,b : $p < 0.05$ を示す。

3-2. *glaA* mRNA の細胞内局在解析

GlaA は N 末端領域に小胞体局在シグナルがあるため、*glaA* mRNA と ER の関連性について解析を行った。そこで、トランスロコン複合体関連因子 Sec61 のホモログ因子に mCherry を融合し ER の可視化を行った (Fig. 3-2-1, Fig. 3-2-2)。sC をマーカー遺伝子として *glaA*-MS2-PP 株に pgPpS61mCS を形質転換し、*glaA* mRNA と ER を可視化する *glaA*-MS2-S61 株の作製を行った。*glaA* mRNA と ER の共局在解析を行ったところ、*glaA* mRNA はその多くが ER と共局在を示した (Fig. 3-2-3A)。そこで、imageJ Fiji の colocalization Finder によって *glaA* mRNA と ER の共局在率の評価を行った。その結果、ピアソン相関係数が $R=0.7$ 以上の高い相関が得られた (Fig. 3-2-3B)。

glaA mRNA が ER と共局在したことから、*glaA* mRNA が ER に局在化するプロセスについて解析を行った。*glaA* mRNA の輸送動態をトラッキング解析し、それにより得られた *glaA* mRNA の輸送軌跡と ER 構造の共局在解析を行った。*glaA* mRNA の輸送軌跡は ER が形成された箇所により多く共局在を示した (Fig. 3-2-4)。そこで、*glaA* mRNA の輸送動態を詳細に観察したところ、*glaA* mRNA はその多くが ER 近傍で静止動態かブラウン様動態を示した (Fig. 3-2-5A)。さらに、一部の *glaA* mRNA は 5% 以下の低い割合であるものの直線的な生体分子モーター様動態を示した (Fig. 3-2-5)。以上の結果から、*glaA* mRNA は細胞内の ER 近傍で輸送されることにより、効率的に ER へ局在化して翻訳される可能性が示唆された。

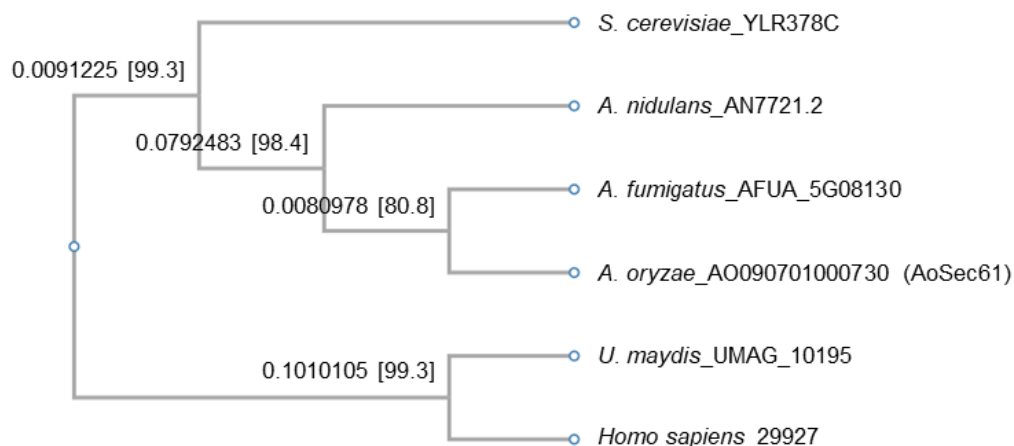


Fig. 3-2-1 AoSec61 の遺伝子系統樹

Genome Net (<https://www.genome.jp/tools/blast/>) の BRST 検索による結果を示す (AoSec61 in *A. oryzae*)。

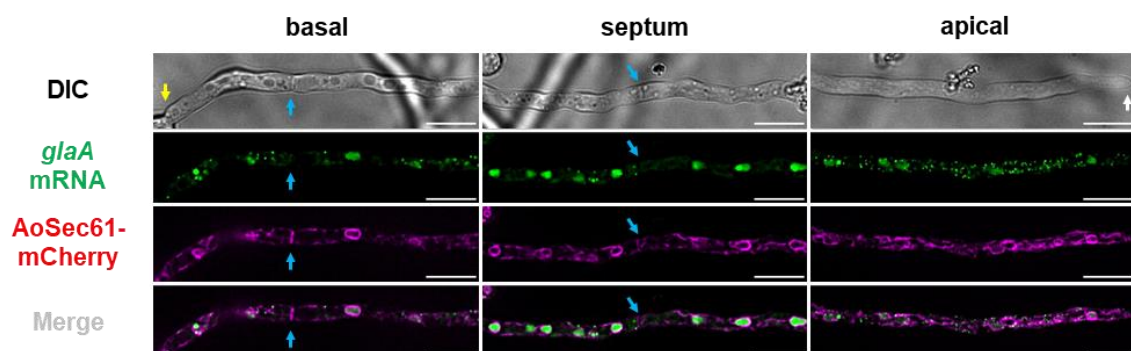


Fig. 3-2-2 *glaA* mRNA と ER の共局在解析

glaA-MS2-S61 株を CD (maltose) 培地で 30°C, 24 時間培養した。青矢印は隔壁、黄矢印は分生子、白矢印は菌糸先端を示す。スケールバーは 10 μ m を示す。

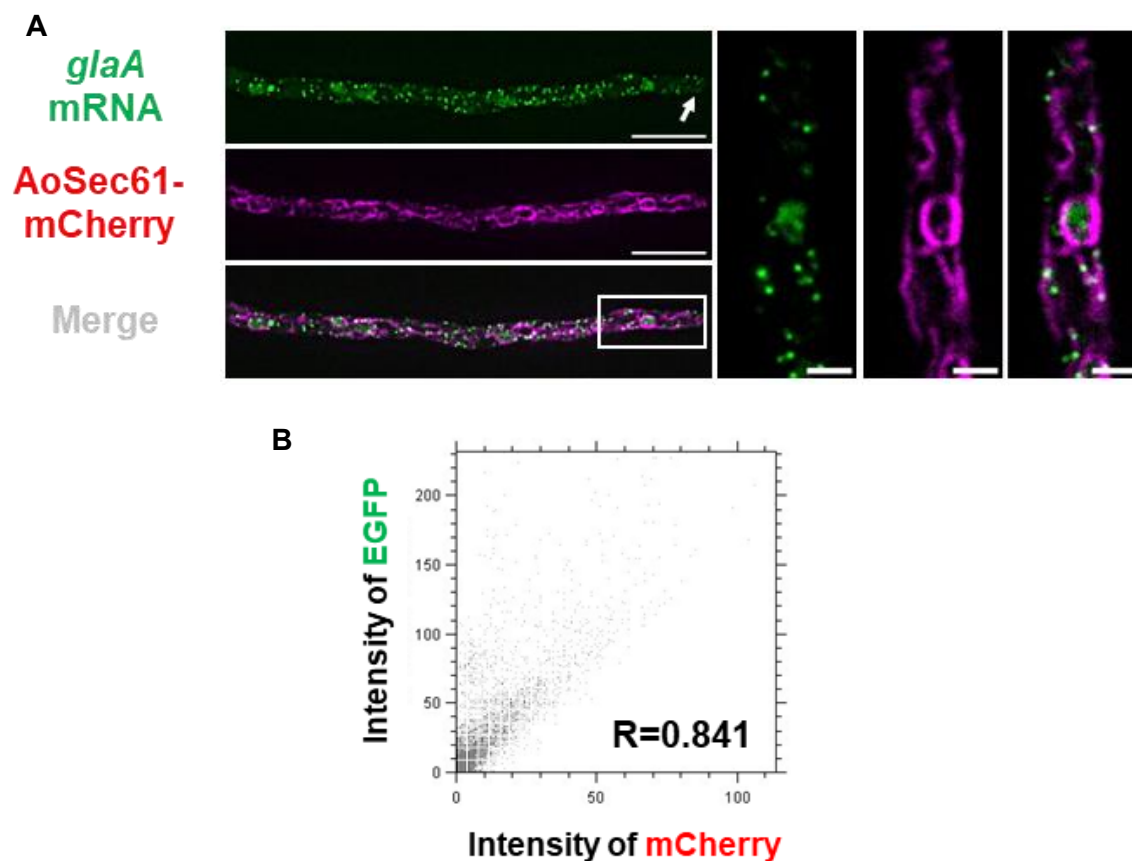


Fig. 3-2-3 *glaA* mRNA と ER の共局在率評価

glaA-MS2-S61 株を CD (maltose) 培地で 30°C, 24 時間培養した。A : *glaA* mRNA と ER の共局在画像を示す。白枠は拡大した箇所を示す。B : A の共局在グラフとピアソン値を示す。共局在グラフは対角線上にドットが集中するほど、共局在していることを示す。白矢印は菌糸先端を示す。スケールバーは 10 μ m を示す (拡大画像内は 2 μ m)。

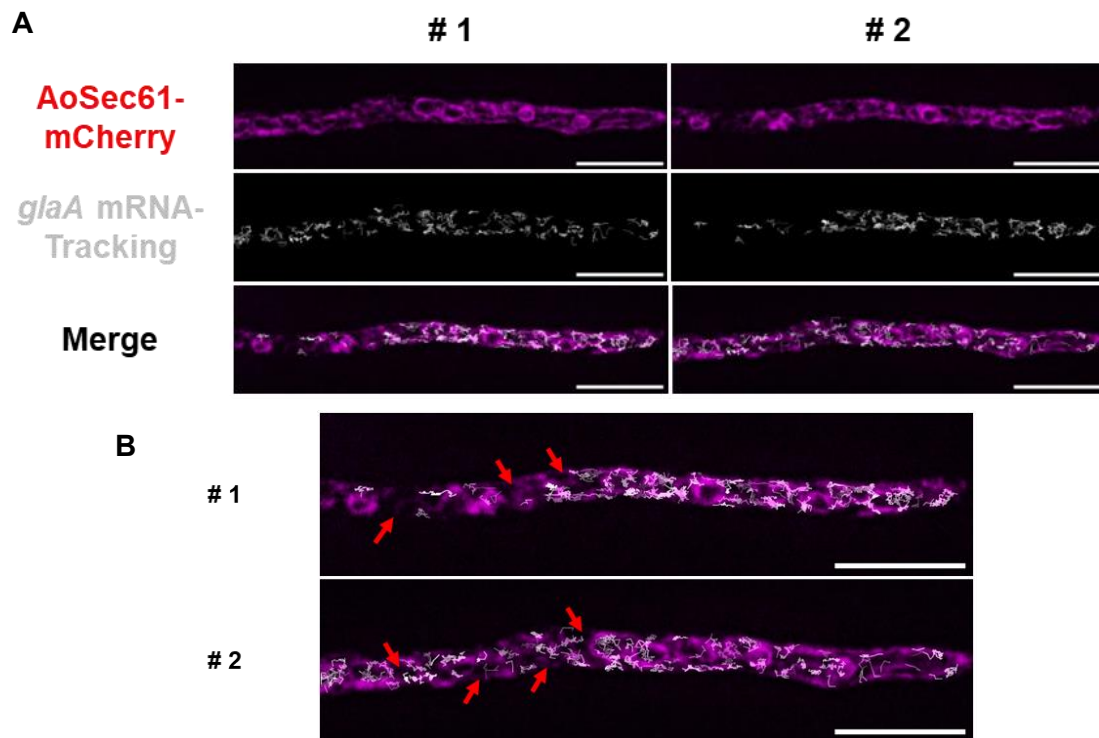


Fig. 3-2-4 *glaA* mRNA の輸送動態と ER の共局在解析

glaA-MS2-S61 株を CD (maltose) 培地で 30°C, 24 時間培養した。A : *glaA* mRNA 動態の軌跡と ER の共局在画像で独立した 2 細胞を示す。B : A の共局在画像を拡大した画像を示す。赤矢印は ER 構造がない領域を示す。スケールバーは 10 μ m を示す。

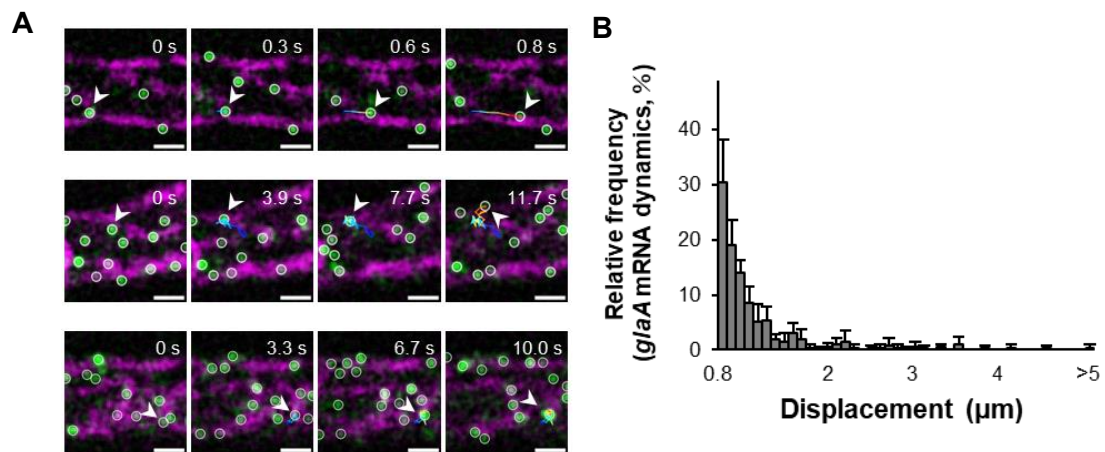


Fig. 3-2-5 ER 近傍における *glaA* mRNA 動態の観察と輸送距離の定量

glaA-MS2-S61 株を CD (maltose) 培地で 30°C, 24 時間培養した。A : *glaA* mRNA 動態と ER の共局在画像を示す。上から分子モーター様動態、ブラウン様動態、制限動態を示す。白矢印は *glaA* mRNA を示す。スケールバーは 2 μ m を示す。B : *glaA* mRNA 動態の距離の定量グラフを示す。相対度数を算出した。エラーバーは SD を示す。

3-3. 細胞骨格重合阻害時における小胞体形態解析

3-2 の解析より、*glaA* mRNA は ER 構造と近位にある細胞骨格の生体分子モーターを利用する可能性が高いと考えられる。しかし、ER 構造と細胞骨格の関連性は糸状菌でほとんど明らかにされていない。*A. nidulans* では、菌糸頂端の ER 構造がアクチンケーブル依存的に分極することが報告されている (Ane Markina-Iñarrairaegui et al., 2013)。*glaA* mRNA は菌糸頂端から約 50 μm 後方にかけて分散しているため、菌糸頂端以外の ER 構造と細胞骨格の関係性についてを明らかにする必要がある。

微小管重合阻害剤 nocodazole (Noc) とアクチンケーブル重合阻害剤 latrunculin B (LatB) を添加し、*glaA* mRNA の輸送動態と ER 構造に与える影響について解析を行った。そこでまず、*A. oryzae* で Noc 添加により微小管重合が阻害されるか確認を行った。初期エンドソーム (early endosome : EE) は微小管の Kinesin-3 に結合することにより菌糸細胞内で双方向に輸送される。そこで、EE を可視化する NSIDSER5 株を用いて、Noc 添加時に EE 動態が停止することを確認し、Noc により微小管重合が阻害されることを確認した (Fig. 3-3-1)。続いて、*A. oryzae* で LatB 添加によりアクチンケーブル重合が阻害されるか確認を行った。アクチン重合関連因子はアクチンケーブルと同様に菌糸頂端に局在する。そこで、アクチンパッチ形成関連因子 AoAbp1 を可視化する abE1 株と Lifeact を可視化する PaLaG 株を用いて、LatB 添加時に AoAbp1 と Lifeact の菌糸頂端局在が崩壊することを確認し、LatB によりアクチンケーブル重合が阻害されることを確認した (Fig. 3-3-2)。DMSO 添加時でも Lifeact の菌糸頂端局在が低下したが、DMSO に毒性があり生育が弱まったことに起因すると考えられた (Fig. 3-3-2C)。

Noc 添加時の解析を行ったところ、*glaA* mRNA は速やかに消失し輸送動態を解析することが困難であった (Fig.3-2-3)。一方で、ER 構造は核膜 ER と皮質 ER を除く細胞質 ER の著しい崩壊が確認された (Fig. 3-3-3)。Lat 添加時の解析を行ったところ、*glaA* mRNA は Noc 添加時と同様に速やかに消失し輸送動態を解析することが困難であった (Fig.3-2-3)。一方で、ER 構造はほとんど影響が見られず、菌糸頂端で一部崩壊しているようであった (Fig. 3-3-3)。これらのデータを統合するために、細胞質 ER の面積を算出することで Noc 添加時に有意に細胞質 ER が減少することを示した (Fig.3-3-4)。以上の結果から、*glaA* mRNA は ER 構造に近位である微小管上の生体分子モーターであるキネシンにより輸送される可能性が示唆された。

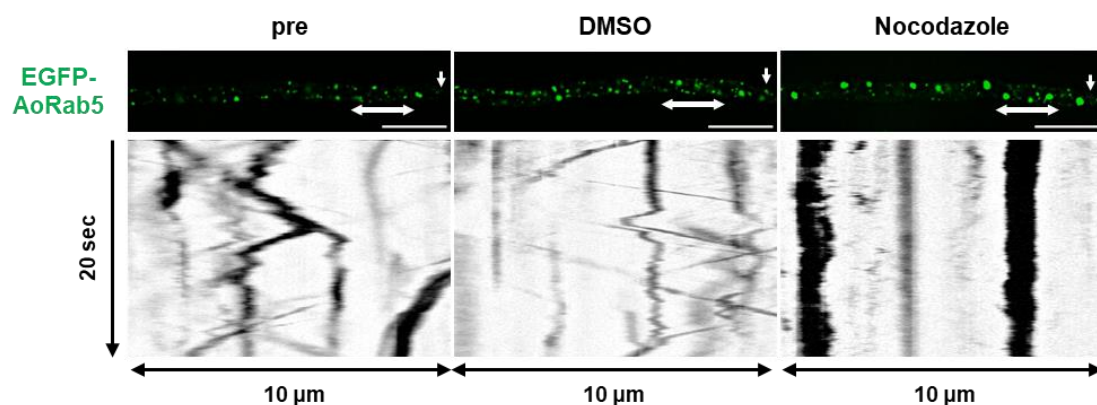


Fig. 3-3-1 Noc 添加時における EE の輸送動態解析

NSIDSER5 株を CD 培地で 30℃, 20 時間培養した。タイムラプス解析を行い、EE 動態をカイモグラフにより解析を行った。上部は局在解析画像、下部はカイモグラフを示す。白両矢印はカイモグラフの解析領域を示す。スケールバーは 10 μm を示す

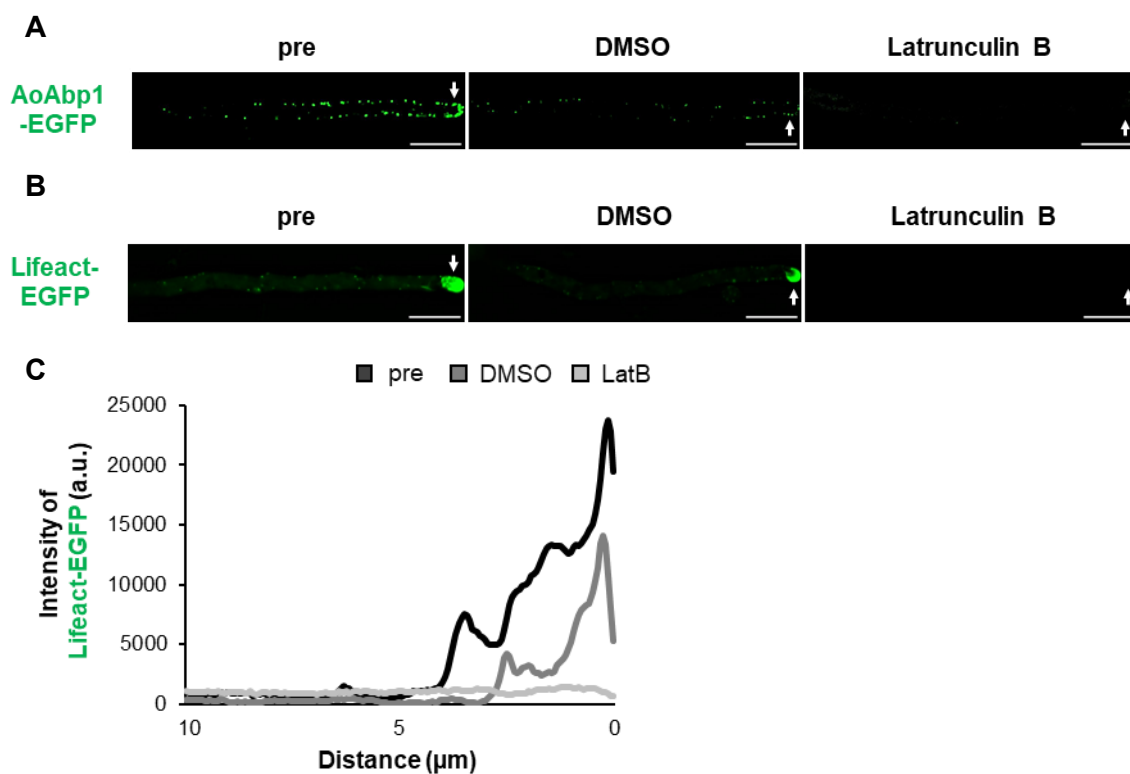


Fig. 3-3-2 LatB 添加時におけるアクチンケーブルの局在解析

abE1 株を M 培地、PaLaG 株を CD 培地で 30℃, 20 時間培養した。A : abE1 株で可視化した Abp1 の局在解析画像を示す。B : PaLaG 株で可視化したアクチンケーブルの局在解析画像を示す。C : B で示したアクチンケーブルの輝度グラフを示す。pre は阻害剤添加前の局在を示す。白矢印は菌糸先端を示す。スケールバーは 10 μm を示す。

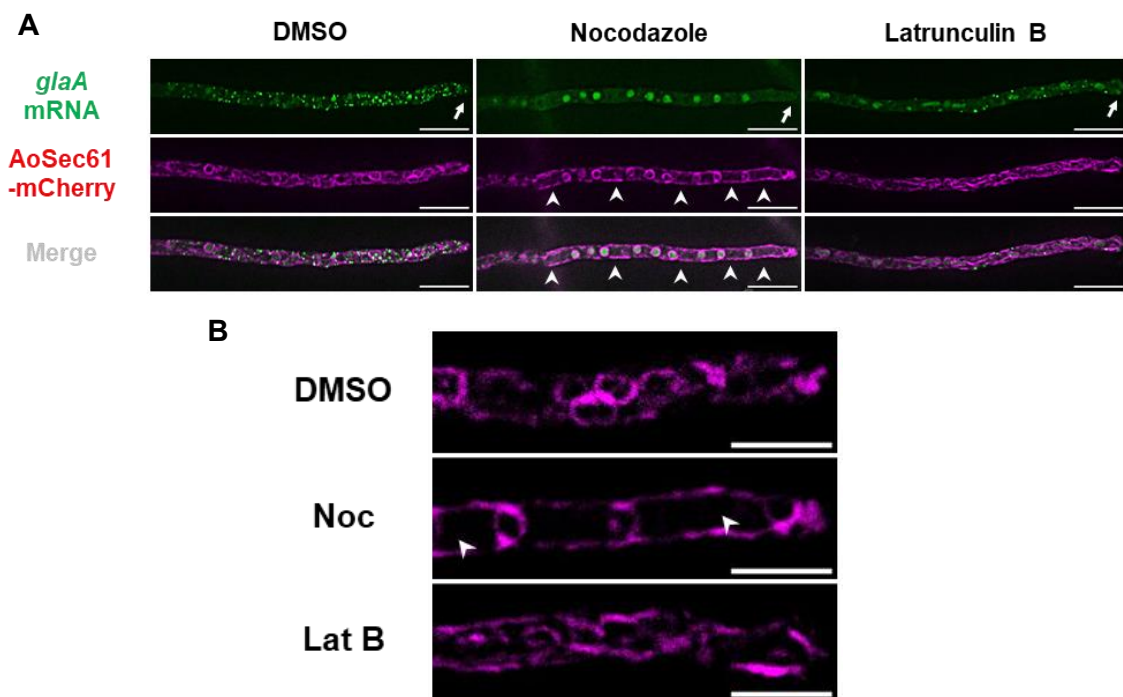


Fig. 3-3-3 細胞骨格重合阻害剤添加時における *glaA* mRNA と ER の共局在解析

glaA-MS2-S61 株を CD (maltose) 培地で 30℃, 24 時間培養した。A : *glaA* mRNA と ER の共局在解析画像を示す。B : ER 局在の拡大画像を示す。白矢印は菌糸先端、短い白矢印は ER 構造の崩壊部分を示す。スケールバーは 10 μ m を示す

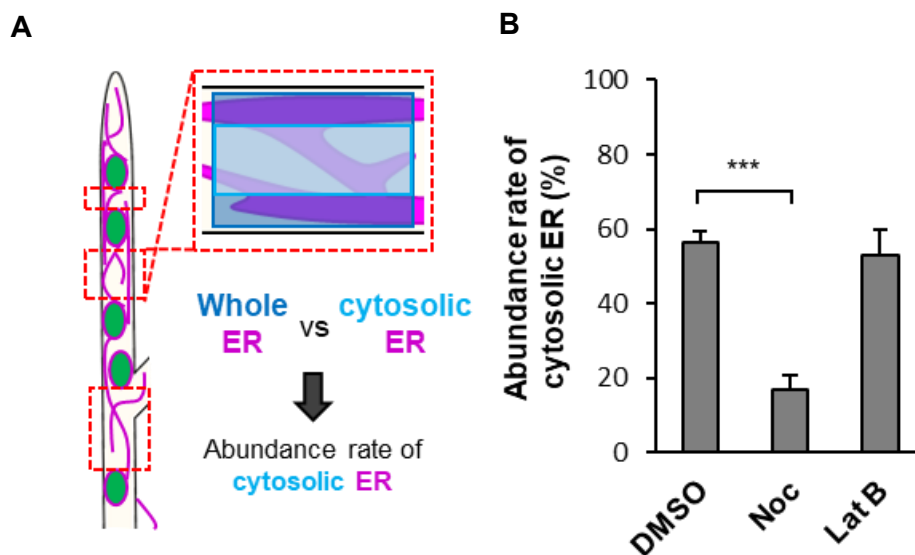


Fig. 3-3-4 細胞骨格重合阻害剤添加時の ER 面積の定量

glaA-MS2-S61 株を CD (maltose) 培地で 30℃, 24 時間培養した。A: 細胞質 ER の面積算出方法を示す。B : 細胞質 ER の面積比の測定グラフを示す (n=5)。エラーバーは SD を示す。有意差は***: $p < 0.001$ を示す。

3-4. *glaA* mRNA と微小管の共局在解析

動物細胞は微小管依存的な ER 形成が報告されている (Lu et al., 2009)。3-3 の結果を踏まえ、ER 構造と微小管の関連性について解析を行った。*sC* をマーカー遺伝子として PpS61mCS を EGFP-AtuA 株に形質転換し、微小管と ER を可視化する AtuAS61 株の作製を行った。微小管と ER の共局在解析を行うと、一部の ER 構造が微小管と共局在を示した (Fig. 3-4-1A)。また、微小管上で ER 形成される様子も観察された (Fig. 3-4-1B)。したがって、糸状菌の ER 構造は細胞内で微小管と強く関連することが示唆された。

glaA mRNA は微小管上で輸送されることが示唆されることから、*glaA* mRNA と微小管の関連性について解析を行った。*sC* をマーカー遺伝子として PaEAtuA を *glaA*-MS2-PP 株に形質転換し、*glaA* mRNA と微小管を可視化する *glaA*-MS2-AtuA 株の作製を行った。*glaA* mRNA の輸送軌跡と微小管の共局在解析を行うと、*glaA* mRNA の輸送軌跡は微小管が存在する領域で共局在を示した (Fig. 3-4-2)。*glaA* mRNA の輸送動態を観察したところ、微小管に沿って *glaA* mRNA が輸送されている様子が観察された (Fig. 3-4-3, Fig. 3-4-4)。以上の結果から、*glaA* mRNA は微小管上で輸送されることを示した。

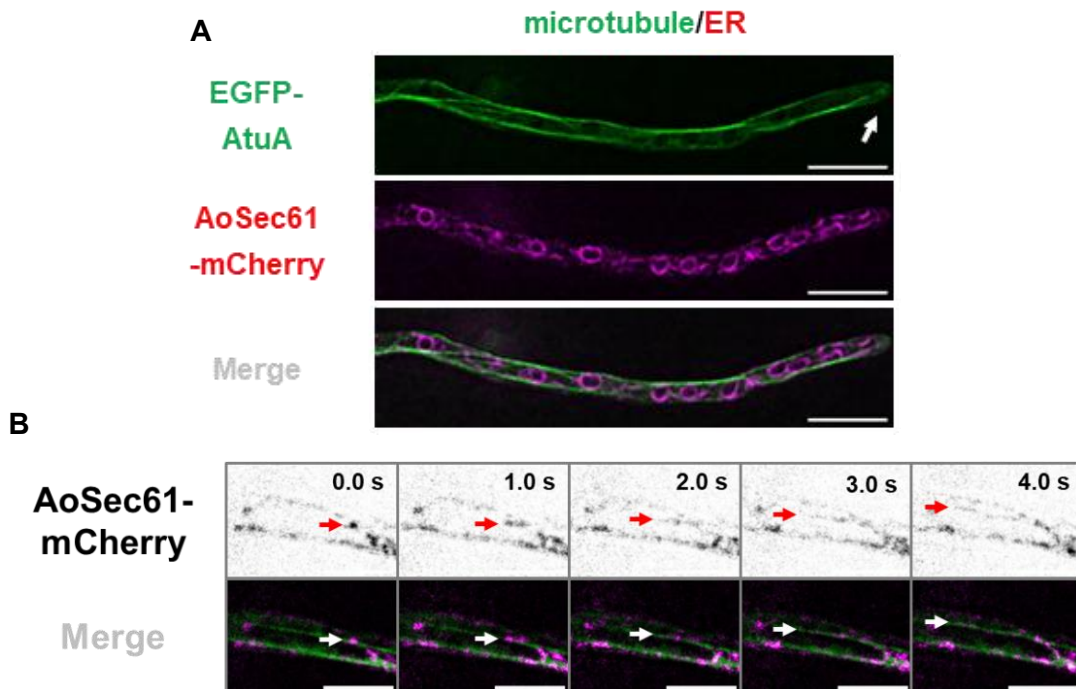


Fig. 3-4-1 微小管と ER の共局在解析および共動態観察

AtuAS61 株を CD (maltose) 培地で 30°C, 24 時間培養した。A：白矢印は菌糸先端を示す。スケールバーは 10 μ m を示す。B：ER の形成動態を示す。白矢印と赤矢印は ER 構造を示す。スケールバーは 2 μ m を示す

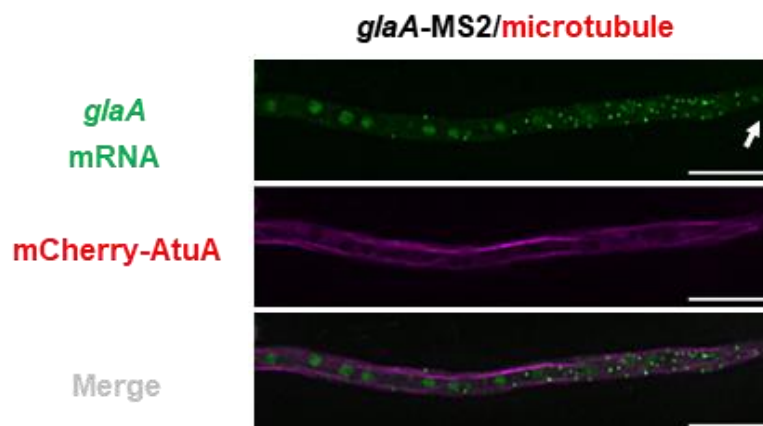


Fig. 3-4-2 *glaA* mRNA と微小管の共局在解析

AtuAS61 株を CD (maltose) 培地で 30°C, 24 時間培養した。白矢印および赤矢印は ER 構造の伸長箇所を示す。スケールバーは 2 μ m を示す

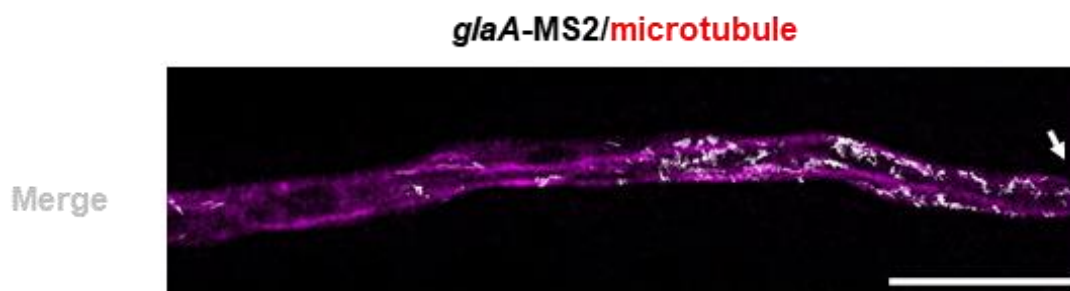


Fig. 3-4-3 *glaA* mRNA の輸送動態と微小管の共局在解析

glaA-MS2-AtuA 株を CD (maltose) 培地で 30°C, 24 時間培養した。*glaA* mRNA をトラッキング解析し、それにより得られた *glaA* mRNA の輸送動態の軌跡を微小管とマージした。スケールバーは 10 μ m を示す。

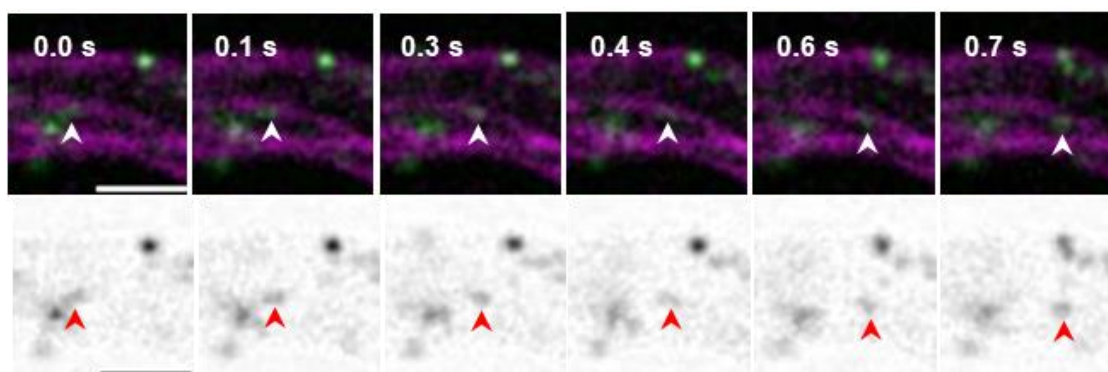


Fig. 3-4-4 *glaA* mRNA と微小管の共動態観察

glaA-MS2-AtuA 株を CD (maltose) 培地で 30°C, 24 時間培養した。*glaA* mRNA の輸送動態を示す。白矢印と赤矢印は *glaA* mRNA を示す。スケールバーは 2 μ m を示す。

3-5. *glaA* mRNA と初期エンドソームの共動態解析

3-4 の結果を踏まえ、*glaA* mRNA は *U. maydis* の mRNA 局在制御機構と同様に、EE に結合して輸送される可能性が示唆された。そこで、*glaA* mRNA と EE の関連性について解析を行った。そこで、低分子量 G タンパク質 AoRab5 に mCherry を融合し EE の可視化を行った。*sC* をマーカー遺伝子として、*glaA*-MS2-PP 株に pgPpmCR5 を形質転換し、*glaA* mRNA と EE を同時に可視化する *glaA*-MS2-R5 株の作製を行った。カイモグラフで *glaA* mRNA と EE の輸送動態を確認したところ、白矢印で示す *glaA* mRNA の輸送動態は EE の輸送動態と共局在を示さなかった。さらに、橙矢印で示す *glaA* mRNA の輸送動態を詳しく観察すると、EE の輸送動態と異なるタイミングで同じレール上を輸送される様子が確認された (Fig. 3-5-1)。したがって、*glaA* mRNA は EE 非依存的に輸送されることが示された。以上の結果から、*glaA* mRNA は *U. maydis* の mRNA 局在制御機構と異なり EE 非依存的に輸送される可能性が示唆された。

EE 非依存的に *glaA* mRNA が輸送されることを裏付けるため、EE と kinesin-3 を繋ぐ *Aohok1* 欠失株で *glaA* mRNA の細胞内局在と輸送動態の解析を行った。mRNA 輸送が崩壊した影響について、出芽酵母の ER 局在性 mRNA は輸送機構の崩壊により核膜 ER に留まることが報告されている (Schmid et al., 2006)。もし *glaA* mRNA が EE 非依存的に輸送されるならば、その細胞内局在と輸送距離に影響を与えないことが予想される。*pyrG* をマーカー遺伝子として NotI 処理した $\Delta Aohok1$ -*pyrG* cassette を *glaA*-MS2-SAP 株に形質転換し、*Aohok1* 遺伝子を欠失した *glaA*-MS2- $\Delta H1$ 株の作製を行った (Fig. 3-5-2)。*sC* をマーカー遺伝子として *glaA*-MS2 株に pgPtmCN の形質転換を行い、核を可視化した *glaA*-MS2- $\Delta H1N$ 株の作製を行った。*glaA*-MS2- $\Delta H1N$ 株で *glaA* mRNA の局在解析を行ったところ、*glaA* mRNA は WT と同様の局在が観察され、細胞内局在に対する影響が見られなかった (Fig. 3-5-3, Fig. 3-5-4A)。そこで、*glaA* mRNA の輸送距離について解析を行ったところ、*glaA* mRNA は *Aohok1* の欠失により輸送距離が低下した (Fig. 3-5-4B)。*U. maydis* の kinesin-3 は *Aohok1* 欠失時に EE との結合能が低下することが報告されている (Bielska et al., 2014)。*glaA* mRNA は EE の輸送動態と共局在を示さないことを踏まえると、*Aohok1* 欠失株における *glaA* mRNA の輸送距離の低下が kinesin-3 の機能不全に起因すると考えられた。以上の結果より、*glaA* mRNA は EE 非依存的に kinesin-3 と結合することで輸送される可能性が示唆された。

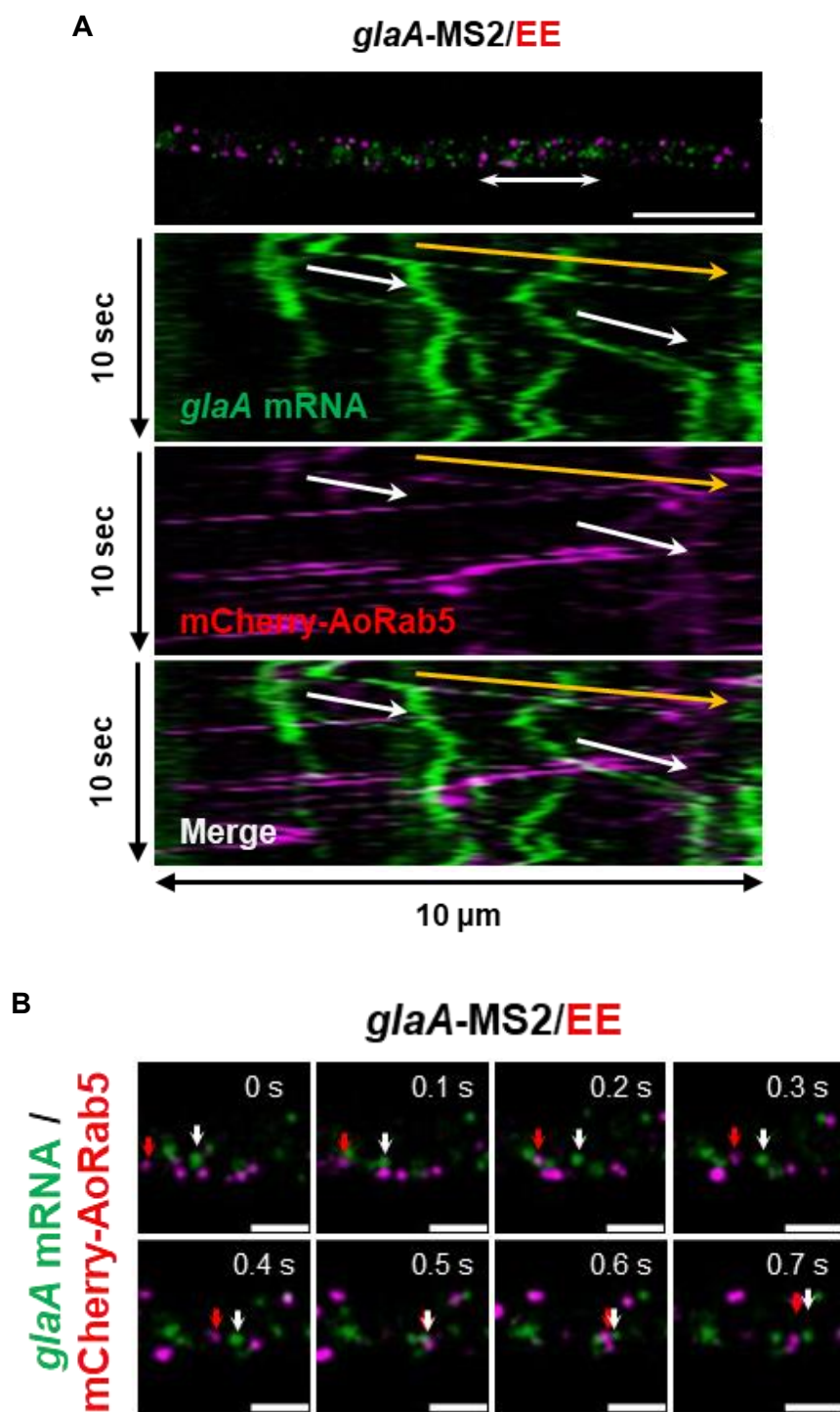


Fig. 3-5-1 *glaA* mRNA と EE の共動態解析

glaA-MS2-R5 株を CD (maltose) 培地で 30℃, 24 時間培養した。A: *glaA* mRNA 動態と EE 動態のカイモグラフを示す。スケールバーは 10 μm を示す。白両矢印はカイモグラフの解析領域を示す。B: オレンジ色矢印で示す *glaA* mRNA 動態と EE 動態のタイムラプス画像を示す。白矢印は *glaA* mRNA、赤矢印は EE を示す。スケールバーは 2 μm を示す。

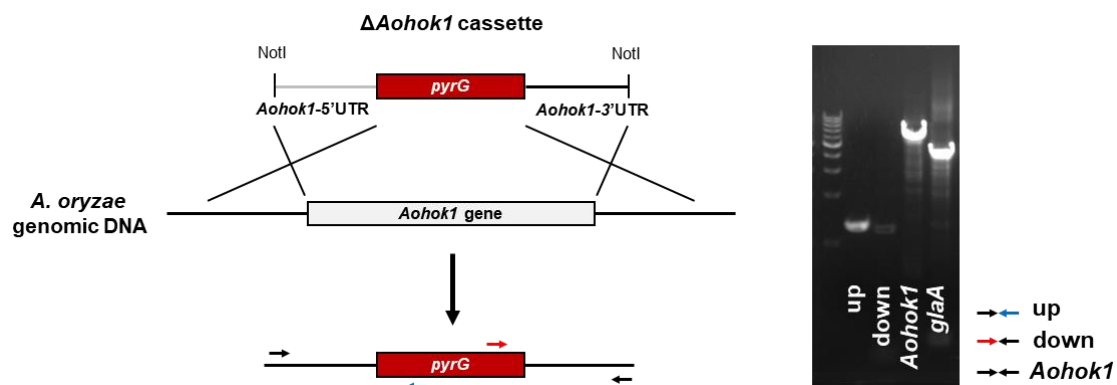


Fig. 3-5-2 *Aohok1* の遺伝子破壊法

A: 相同組み換えにより *Aohok1* を欠失するスキームを示す。B: *Aohok1* 欠失を確認した電気泳動写真を示す。*Aohok1* を欠失できなかった場合、約 4 kbp にバンドが得られる。

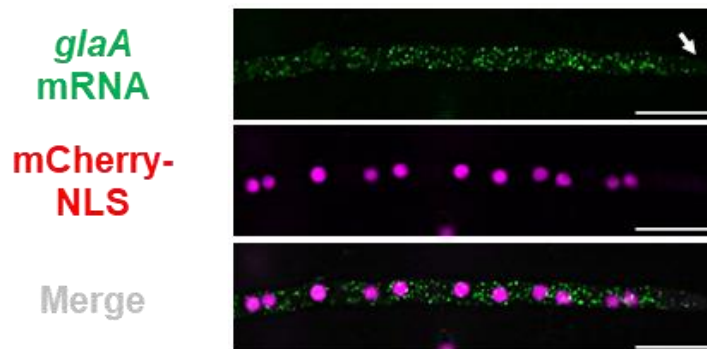


Fig. 3-5-3 *Aohok1* 欠失時における *glaA* mRNA の細胞内局在解析

glaA-MS2- Δ H1N 株を CD (maltose) 培地で 30°C, 24 時間培養した。スケールバーは 10 μ m を示す。白矢印は菌糸先端を示す。

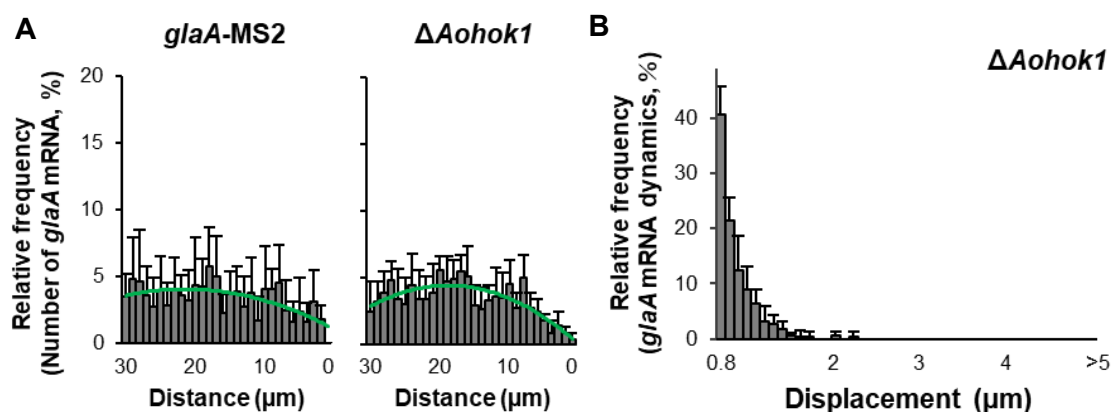


Fig. 3-5-4 *Aohok1* 欠失時における *glaA* mRNA 数と輸送距離の定量

glaA-MS2- Δ H1N 株を CD (maltose) 培地で 30°C, 24 時間培養した。A: 菌糸先端の *glaA* mRNA 数を示す (n=5)。緑線は多項式近似曲線を示す。B: *glaA* mRNA の輸送距離を示す (n=5)。エラーバーは SD を示す。

考察

本章では、*A. oryzae* の菌糸細胞内における *glaA* mRNA の菌糸局在と細胞内局在を明らかにすることを目的に研究を行った。*glaA* mRNA の菌糸局在について調査を行い、*glaA* mRNA が分泌部位近傍で局在制御されることを明らかにした。*glaA* mRNA は先端領域に最も多く局在したことから、菌糸頂端が主要な分泌部位であることが示唆された。さらに、*glaA* mRNA は隔壁領域にも局在することを明らかにし、菌糸細胞の隔壁分泌を一層支持する結果が得られた (Hayakawa et al., 2011)。*glaA* mRNA の転写誘導解析を行った際に、*glaA* mRNA は転写誘導に一度も菌糸全域で増加せず、分泌部位近傍で部位特異的に増加し続けた。このことから、*glaA* mRNA は分泌部位近傍における部位特異的な転写活性化により局在制御されることが示唆された。以上の結果を統合すると、*A. oryzae* は分泌部位近傍で分泌酵素 mRNA を局在制御することで、転写から分泌までのプロセスを空間的に効率化し、高度なタンパク質を維持している可能性が示唆された。

glaA mRNA の細胞内局在について調査を行い、*glaA* mRNA が ER 近傍で動態を示すことを確認し、そのほとんどがブラウン様動態か静止動態であることを明らかにした。微小管に沿って ER 構造が形成されることを明らかにし、ER 近傍の微小管上で分泌型酵素 mRNA が輸送される可能性を支持する結果が得られた。さらに、*glaA* mRNA は微小管上で生体分子モーター様動態を示し、EE 非依存的に輸送されていたことから、kinesin-3 により輸送される可能性が示唆された。以上の結果を統合すると、*U. maydis* と異なる輸送機構により、分泌型酵素 mRNA が小胞体近傍で輸送されることで、その翻訳を効率化している可能性が示唆された。しかし、菌糸の厚み方向を含めた解析が困難であったため、*glaA* mRNA が ER 近傍で輸送されることを断言できない。先端領域の ER 構造は細長い菌糸細胞内で密に形成されるようであり、*glaA* mRNA が遊離状態であっても恒常的に ER と近位であり、生体分子モーターがなくても *glaA* mRNA が ER にリクルートできる可能性が考えられる。

glaA mRNA の転写制御機構として、転写制御因子の局在制御する方法が考えられる。アミラーゼ高発現条件下において、転写誘導因子 AmyR と転写抑制因子 CreA は全ての核に局在する場所が確認されている (Suzuki et al., 2015; Tanaka et al., 2018)。CreA は核外排出されなくてもアミラーゼ遺伝子のサイレンサー領域から乖離できるため、分泌部位近傍の核で転写抑制が解除されれば、部位特異的に *glaA* mRNA を転写活性化できる

と考えられる。CreA 欠失株で *glaA* mRNA の局在解析を行うことで明らかにできるかもしれない。また別の方法として、分泌部位近傍の核で AmyR のプロモーター結合量を増加させることで部位特異的に転写活性化できると考えられる。しかし、AmyR の結合量を菌糸部位ごとに解析する技術が確立されていない。

D. melanogaster や *X. laevis* では、細胞内で mRNA の濃度勾配を生み出すために、空間的に転写箇所を制御することが知られている (Levine, 2010; Peng and Zhang, 2018; Whitney et al., 2023)。多くの遺伝子は 5'UTR にあるエンハンサー領域に転写活性化因子が結合することで、部位特異的に転写活性化が制御される。*A. oryzae* のアミラーゼ遺伝子も 5'UTR にエンハンサー領域があり、転写活性化因子 HAP complex (AoCP) が結合することが報告されている (Kato et al., 2002; Kato, 2005)。AoCP は HapB, HapC, HapE から構成されており、炭素源に関わらずアミラーゼ遺伝子のエンハンサー領域にある CCAAT 配列を認識して結合する。AoCP の欠失により、アミラーゼの発現が著しく低下することが確認されている。*glaA* mRNA は AoCP により転写制御される可能性が考えられるが、全ての核に AoCP が局在することが報告されている。また、AoCP の相互作用因子 HapX が同定されていることから、AoCP の相互作用因子により *glaA* mRNA が転写制御される可能性も考えられる (Hortschansky et al., 2007)。

glaA mRNA が ER 近傍で輸送されるならば、その輸送媒体として ER 形成に寄与する kinesin-1 が候補となる (Lu et al., 2009; Woźniak et al., 2009; Dimitrova-Paternoga et al., 2021)。しかし、*glaA* mRNA は EE と同じレール上で輸送され、*Aohok1* を欠失すると輸送距離が低下したことから、kinesin-3 を利用する可能性が高いと考えられる。したがって、kinesin-1 が *glaA* mRNA の輸送に関与するならば、ER 近傍の短距離動態に関与すると予想された。これらの仮説を証明するためにも、キネシン欠失株で *glaA* mRNA の細胞内局在と輸送動態に与える影響を確認する必要がある。また、*glaA* mRNA は菌糸先端から 50~70 μm 付近にかけて局在していたが、菌糸全域に分散しない理由として ER 構造が関連すると考えられた。糸状菌の ER 構造は先端領域で分極しており (Markina-Iñarrairaegui et al., 2013)、菌糸先端から 50~70 μm 付近でより複雑な ER の網状構造が観察された。*Xenopus laevis* では、分極形成された ER 構造が mRNA の非対称性に寄与することが示唆されている (Hwang et al., 2022)。さらなる解明には、空間的な ER 構造制御機構に関する解析が必要となる。

第4章 *glaA* mRNA の細胞内輸送機構に関する研究

序

U. maydis の mRNA 局在制御機構において、mRNA は kinesin-3 を動力源とする EE に結合することで輸送されるため、*A. oryzae* も同様である可能性が考えられる。しかし、*glaA* mRNA は EE 非依存的に輸送されることを明らかにし、*U. maydis* の mRNA 局在制御機構と異なることを示した。一方で、*glaA* mRNA は ER 近傍の微小管上で生体分子モーター様動態が確認されたことから、ER 近傍で輸送するためにキネシンを利用する可能性が示唆された。それが EE 非依存的であったことから、*glaA* mRNA は複数の RBP を介して kinesin-1 もしくは kinesin-3 に結合する可能性が考えられた。したがって、kinesin-1 および kinesin-3 を欠失させ、*glaA* mRNA の細胞内局在と輸送動態を確認するとともに、ER 局在化に与える影響を確認する必要がある。

神経細胞の mRNA は細胞質で EE やリソソームに結合し、樹状細胞や軸索の末端に長距離輸送される。それだけでなく、mRNA は RNP を介してキネシンもしくはダイニンに結合する輸送機構も存在する (Das et al., 2021; Costa et al., 2021)。多くの mRNA はブラウン様動態や静止動態であり、EE やリソソームに依存的な生体分子モーター様動態も存在することが分かっている (Das et al., 2021)。*glaA* mRNA は神経細胞の mRNA と同様の動態パターンを示しており、キネシンやダイニンに依存した輸送機構が存在する可能性が高いと考えられる。mRNA の ER 局在化に関して、出芽酵母の ER 局在性 mRNA が Myo4 を欠失しても ER に局在化できることから、*A. oryzae* でキネシンを欠失しても *glaA* mRNA が ER に局在する可能性が考えられる。

本章では *glaA* mRNA の輸送媒体の解明を目的として研究を行った。*glaA*-MS2 株で kinesin-1 (AoKin1) と kinesin-3 (AoKin3) を欠失させ、*glaA* mRNA の細胞内局在と輸送動態に与える影響と ER 局在化に与える影響について解析を行った。

4-1. *Aokin3/Aokin1* 欠失株の作製

kinesin-1 は平均速度 0.8~1 $\mu\text{m/s}$ 、kinesin-3 は 1~2 $\mu\text{m/s}$ の速さで移動する (Cai et al., 2009)。糸状菌は EE 動態から kinesin-3 が同様の速度であることが示唆されている (Wedlich-Söldner et al., 2002; Schuchardt et al., 2005; Lenz et al., 2006; Steinberg, 2011)。多くの mRNA は微小管のマイナス端からプラス端に輸送されることから、*U. maydis* の kinesin-1 と kinesin-3 に相当するホモログ因子として、*A. oryzae* で AoKin1 と AoKin3 を新たに見出した (Fig. 4-1-1, Fig. 4-1-2) (Zhang et al., 2010)。

pyrG をマーカー遺伝子として NotI 処理した $\Delta Aokin1$ -*pyrG* cassette を *glaA*-MS2-S Δ P 株に形質転換し、*Aokin1* 遺伝子を欠失した *glaA*-MS2- Δ K1 株の作製を行った (Fig. 4-1-3)。*pyrG* をマーカー遺伝子として NotI 処理した $\Delta Aokin3$ -*pyrG* cassette を *glaA*-MS2-S Δ P 株に形質転換し、*Aokin3* 遺伝子を欠失した *glaA*-MS2- Δ K3 株の作製を行った (Fig. 4-1-4)。*Aokin1* 遺伝子と *Aokin3* 遺伝子の相同組換え領域を増幅するために、*A. oryzae* RIB40 のゲノム DNA を使用した。動物細胞でリソソームの輸送に kinesin-1 と kinesin-3 の両方を利用することが報告されていることから (Guardia et al., 2016)、*glaA* mRNA の輸送媒体として AoKin3 と AoKin1 の両方を利用する可能性を否定できない。そこで、*Aokin3* と *Aokin1* の二重遺伝子破壊株の作製を行った。*AnptrA* をマーカー遺伝子として NotI 処理した $\Delta Aokin1$ -*ptrA* cassette を *glaA*-MS2- Δ K3 株に形質転換し、*Aokin1* 遺伝子と *Aokin3* 遺伝子を欠失した *glaA*-MS2- $\Delta\Delta$ K1K3 株の作製を行った。

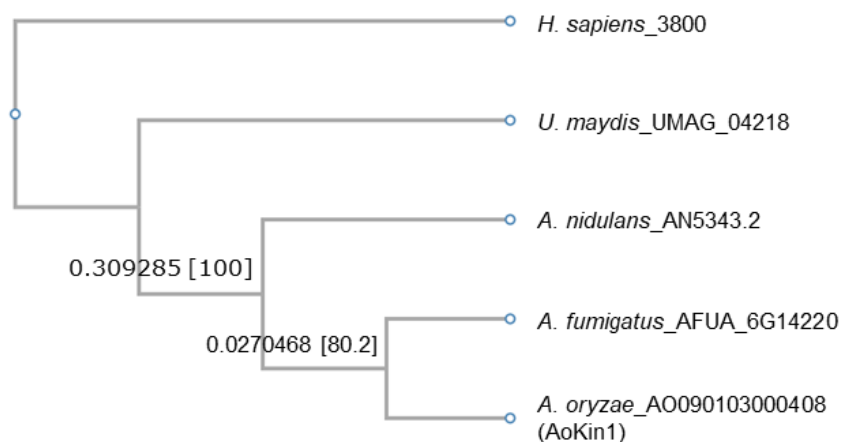


Fig. 4-1-1 AoKin1 の遺伝子系統樹

Genome Net (<https://www.genome.jp/tools/blast/>) の BLAST 検索による結果を示す (AoKin1 in *A. oryzae*)。

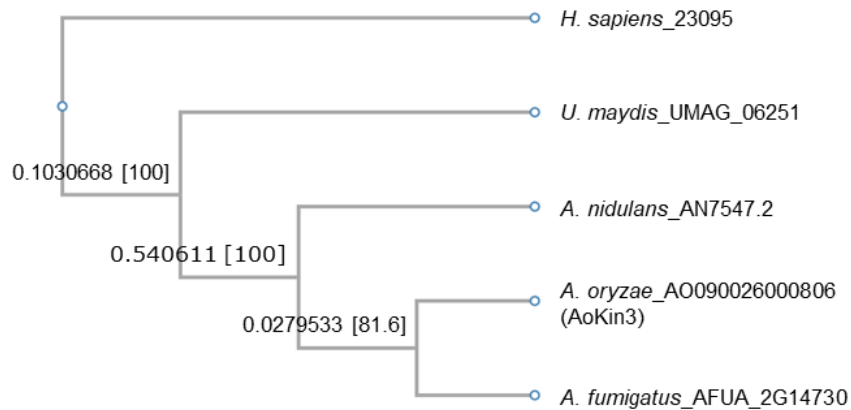


Fig. 4-1-2 AoKin3 の遺伝子系統樹

Genome Net (<https://www.genome.jp/tools/blast/>) の結果を示す。

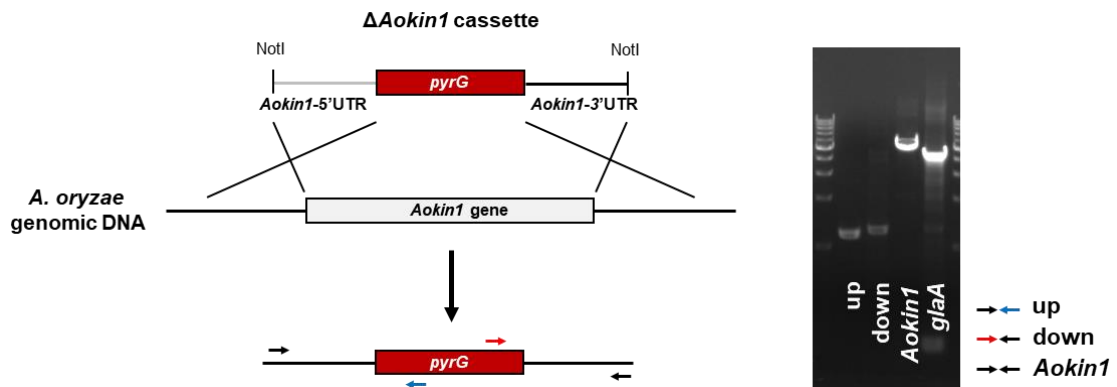


Fig. 4-1-3 Aokin1 の遺伝子破壊法

A: 相同組み換えにより *Aokin1* を欠失するスキームを示す。B: *Aokin1* 欠失を確認した電気泳動写真を示す。*Aokin1* を欠失できなかった場合、約 5.2 kbp にバンドが得られる。

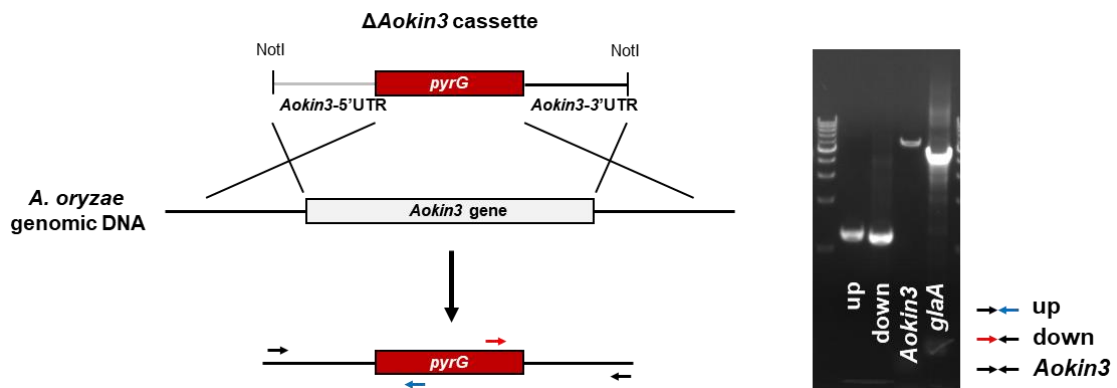


Fig. 4-1-4 Aokin3 の遺伝子破壊法

A: 相同組み換えにより *Aokin3* を欠失するスキームを示す。B: *Aokin3* 欠失を確認した電気泳動写真を示す。*Aokin3* を欠失できなかった場合、約 4 kbp にバンドが得られる。

4-2. *Aokin3/Aokin1* 欠失株の表現型解析

Aspergillus 属糸状菌のキネシンについて、*A. nidulans* で生育と EE 動態に対する影響に関する十分な知見が得られている *kinesin-3* 欠失株と *kinesin-1* 欠失株で生育遅延が確認されているが、*kinesin-1* 欠失株の方が著しく生育が阻害される (Zekert and Fischer et al., 2009)。この知見が *A. oryzae* に共通するか、炭素源がグルコース、マルトース、馬鈴薯デンプンの CD 培地で表現型解析を行った。また、富栄養条件下の完全培地である DPY で表現型解析を行った。その結果、*glaA*-MS2- Δ K1 株と *glaA*-MS2- Δ K3 株で生育遅延が確認され、*glaA*-MS2- Δ K1 株の方が著しく生育が阻害された (Fig. 4-2-1)。*glaA*-MS2- $\Delta\Delta$ K1K3 株は *glaA*-MS2- Δ K1 株と似た表現型を示したが、分生子形成がより低下しているようであった。*glaA*-MS2- Δ K1 株と *glaA*-MS2- Δ K3 株でアミラーゼ分泌量が著しく低下した場合、野生株よりも多糖存在化の生育が遅延すると考えられる。しかし、*glaA*-MS2- Δ K1 株と *glaA*-MS2- Δ K3 株は野生株と同等の生育遅延を示し、生育に必要なアミラーゼ分泌量を維持できる可能性が示唆された (Fig. 4-2-2)。*glaA*-MS2- Δ K1 株と *glaA*-MS2- $\Delta\Delta$ K1K3 株は既に生育が著しく抑制されていたため、アミラーゼ分泌量の低下による生育遅延が反映されなかった可能性が高いと考えられる。

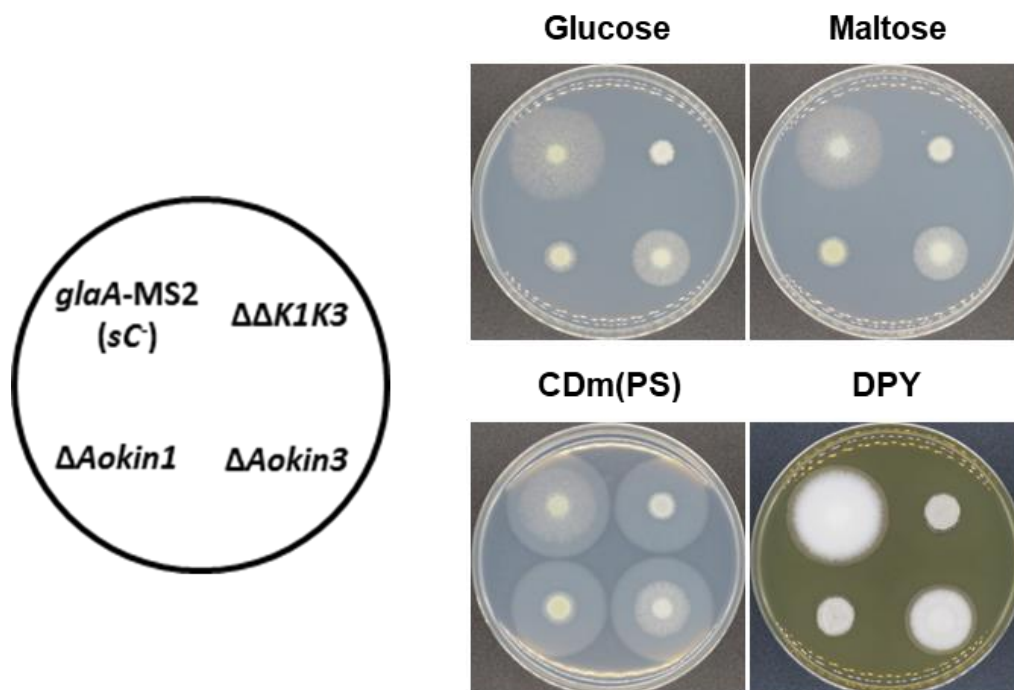


Fig. 4-2-1 *Aokin3/Aokin1* 欠失株における表現型解析

glaA-MS2-PP 株 (左上)、*glaA*-MS2- Δ K1S61 株 (左下)、*glaA*-MS2- Δ K3S 株 (右下)、*glaA*-MS2- $\Delta\Delta$ K1K3S61 株 (右上) を 30℃、3 日間培養した。

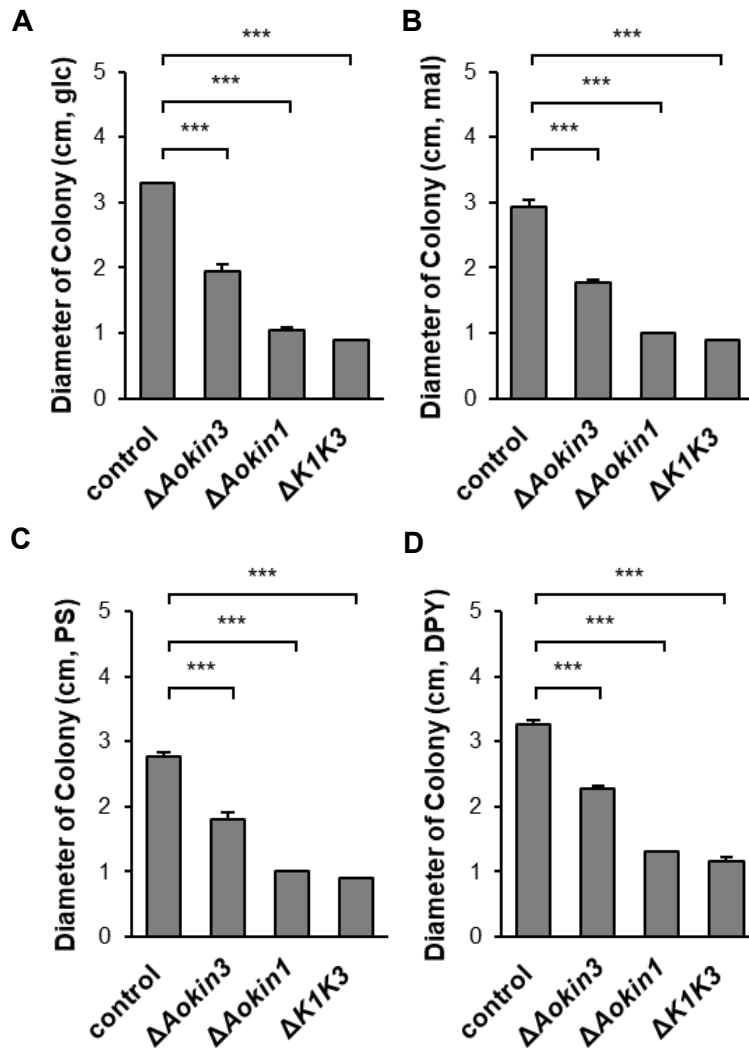


Fig. 4-2-2 Aokin3/Aokin1 欠失株におけるコロニー径測定

glaA-MS2-ΔK1S61 株、*glaA*-MS2-ΔK3S61 株、*glaA*-MS2-ΔΔK1K3S61 株炭素源の異なる CD 培地で 30°C、3 日間培養した (n=3)。A：グルコース、B：マルトース、C：馬鈴薯デンプン、D：DPY で生育したコロニーの直径を示す。エラーバーは SD を示す。***は p<0.001 を示す。

4-3. Aokin3/Aokin1 欠失株における初期エンドソームの動態解析

A. nidulans の kinesin-3 は微小管のプラス端に輸送された後に、dynein を利用して微小管のマイナス端に積荷物質を輸送する (Qiu et al., 2022)。その際、kinesin-1 は dynein を微小管のプラス端に輸送する役割を持つめ、kinesin-1 欠失株で菌糸頂端に EE が蓄積することが報告されている (Zekert and Fischer et al., 2009)。これらの知見が *A. oryzae* に共通するか、*glaA*-MS2-ΔK1 株、*glaA*-MS2-ΔK3 株で EE の動態解析を行った。*sC* をマ

一カー遺伝子として pgPpmCR5 を *glaA*-MS2- Δ K1 株、*glaA*-MS2- Δ K3 株に形質転換し、EE を可視化する *glaA*-MS2- Δ K1R5 株、*glaA*-MS2- Δ K3 R5 株の作製を行った。EE の輸送動態について解析を行ったところ、*glaA*-MS2- Δ K1 株と *glaA*-MS2- Δ K3 株で EE の輸送動態が著しく低下した (Fig. 4-3-1)。*glaA*-MS2- Δ K1 株は菌糸先端で EE が高度に蓄積していた。表現型解析の結果と統合すると、AoKin1 と AoKin3 はそれぞれ kinesin-1 と kinesin-3 に相当する機能を持つことが示された。

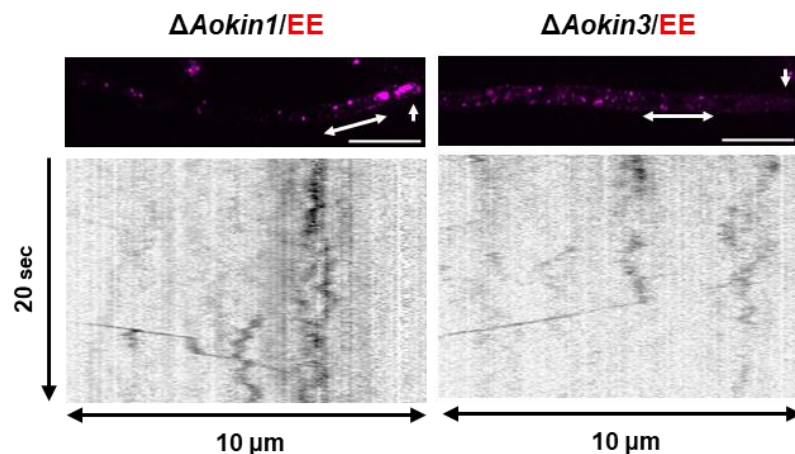


Fig. 4-3-1 Aokin3/Aokin1 欠失株における EE の輸送動態解析

glaA-MS2- Δ K1R5 株、*glaA*-MS2- Δ K3 R5 株を CD (maltose) 培地で 30℃、24 時間培養した。スケールバーは 10 μ m を示す。白両矢印はカイモグラフの解析領域を示す。白矢印は菌糸先端を示す。

4-4. Aokin3/Aokin1 欠失株における *glaA* mRNA の輸送動態解析

AoKin1 と AoKin3 は kinesin-1 と kinesin-3 に相当することが示唆されたため、これらが欠失した際の *glaA* mRNA の輸送動態に関する解析を行った。*glaA* mRNA の輸送距離の測定を行ったところ、全ての株で *glaA* mRNA の輸送距離が低下した (Fig. 4-4-1)。*glaA*-MS2- Δ K1N 株は AoKin3 の機能不全により *glaA* mRNA の輸送距離が低下したと考えられることから、kineisn-3 により *glaA* mRNA が長距離輸送されることが示唆された。

glaA mRNA の細胞内局在について解析を行ったところ、*glaA*-MS2- Δ K1N 株と *glaA*-MS2- Δ K1K3N 株で菌糸頂端付近の *glaA* mRNA が基部側に後退していた (Fig. 4-4-2)。sC をマーカー遺伝子として pgPtmCN を *glaA*-MS2- Δ K1 株、*glaA*-MS2- Δ K3 株、*glaA*-MS2- Δ K1K3 株に形質転換を行い、核を可視化する *glaA*-MS2- Δ K1N 株、*glaA*-MS2- Δ K3N 株、*glaA*-MS2- Δ K1K3N 株の作製を行った。菌糸頂端付近の *glaA* mRNA 数の測定を行った

ところ、*glaA*-MS2- Δ K1N 株と *glaA*-MS2- $\Delta\Delta$ K1K3N 株で *glaA* mRNA が有意に減少していた (Fig. 4-4-3, Fig. 4-4-4A)。*glaA* mRNA は部位特異的な転写活性化により局在制御されるため、菌糸頂端から核までの距離を測定したところ、*glaA*-MS2- Δ K1N 株と *glaA*-MS2- $\Delta\Delta$ K1K3N 株で有意に核が後退していた (Fig. 4-4-4B)。以上の結果を統合すると、AoKin1 と AoKin3 は *glaA* mRNA の局在制御に必須でないことが示唆された。

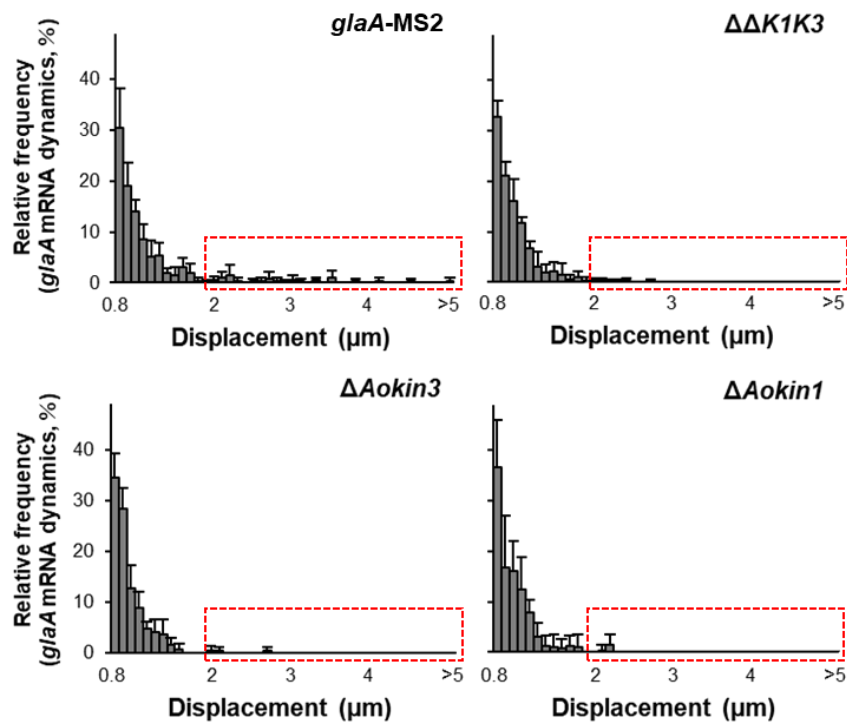


Fig. 4-4-1 AoKin3/AoKin1 欠失株における *glaA* mRNA の輸送距離の定量

glaA-MS2- Δ K1 株、*glaA*-MS2- Δ K3 株、*glaA*-MS2- $\Delta\Delta$ K1K3 株を CDm (maltose) 培地で 30°C, 24 時間培養した。*glaA* mRNA の輸送距離を示す (n=5)。赤枠は 2 μ m 以上の動態を示す。エラーバーは SD を示す。

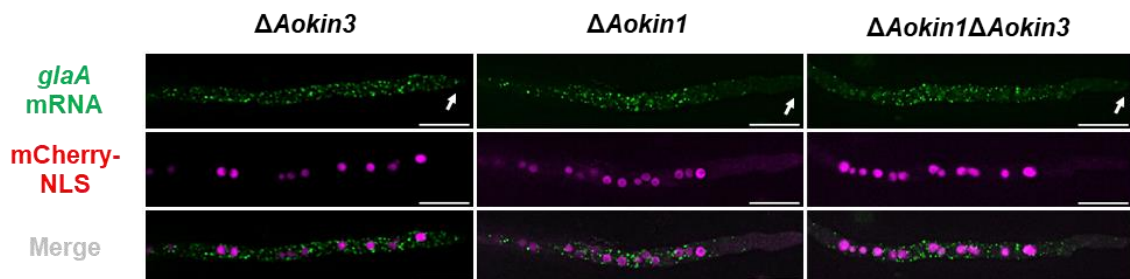


Fig. 4-4-2 AoKin3/AoKin1 欠失株における *glaA* mRNA の細胞内局在解析

glaA-MS2- Δ K1N 株、*glaA*-MS2- Δ K3N 株、*glaA*-MS2- $\Delta\Delta$ K1K3N 株を CD (maltose) 培地で 30°C, 24 時間培養した。スケールバーは 10 μ m を示す。白矢印は菌糸先端を示す。

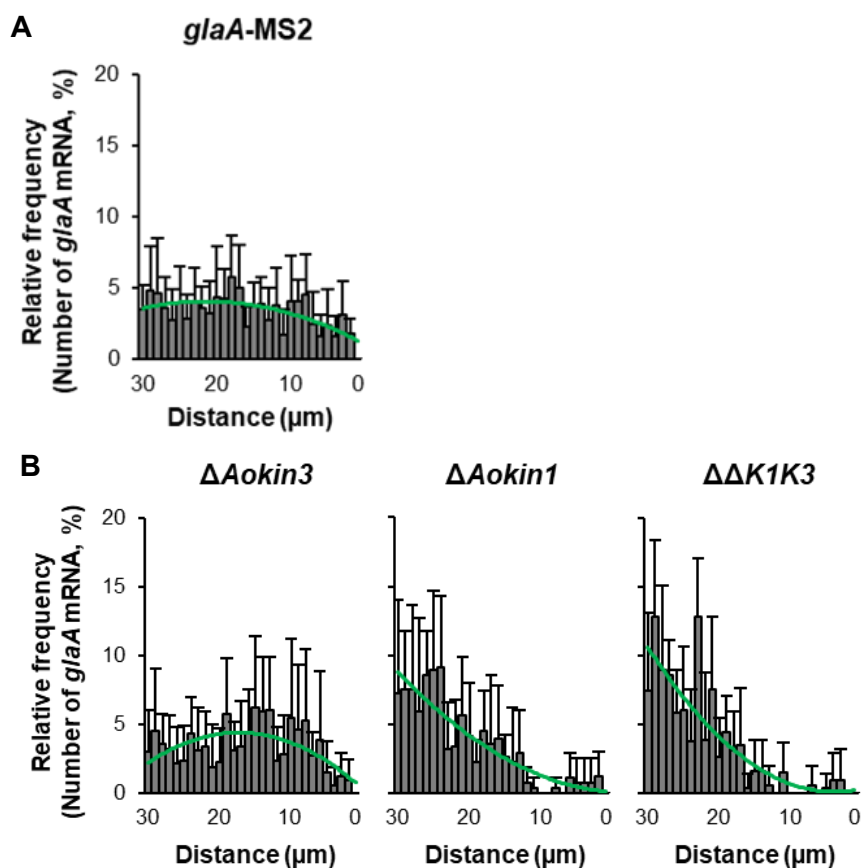


Fig. 4-4-3 Aokin3/Aokin1 欠失株における *glaA* mRNA 数の定量

A: *glaA*-MS2 株の *glaA* mRNA 数を示す (n=5)。B: *glaA*-MS2- $\Delta K1N$ 株、*glaA*-MS2- $\Delta K3N$ 株、*glaA*-MS2- $\Delta\Delta K1K3N$ 株の *glaA* mRNA 数を示す (n=5)。緑線は多項式近似曲線を示す。エラーバーは SD を示す。

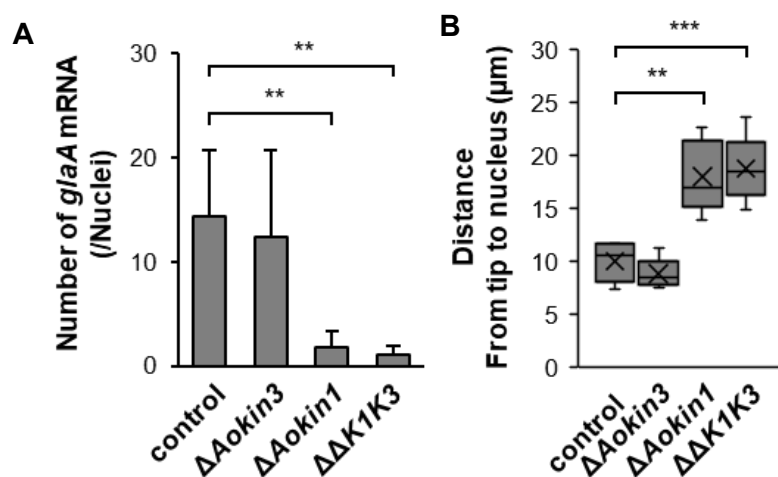


Fig. 4-4-4 Aokin3/Aokin1 欠失株における *glaA* mRNA 数と核位置の定量

A: *glaA* mRNA 数を示す (n=5)。エラーバーは SD を示す。B: 菌糸先端と核の距離を示す (n=5)。**は $P < 0.01$, ***は $P < 0.001$ を示す

4-5. *Aokin3/Aokin1* 欠失株における *glaA* mRNA と小胞体の共局在解析

glaA mRNA はキネシンモーター欠失時に輸送距離が低下したが、細胞内で分散した状態が維持されていた。そうした動態が ER 構造に非依存적であるならば、ER の共局在率も低下すると考えられた。そこで、*sC* をマーカー遺伝子として、*glaA*-MS2- Δ K1 株、*glaA*-MS2- Δ K3 株、*glaA*-MS2- $\Delta\Delta$ K1K3 株に pgPpS61mCS の形質転換を行い、ER を可視化する *glaA*-MS2- Δ K1S61 株、*glaA*-MS2- Δ K3S61 株、*glaA*-MS2- $\Delta\Delta$ K1K3S61 株の作製を行った。これらの株で *glaA* mRNA と ER は共局在しているようであったが、*glaA*-MS2- Δ K1S61 株と *glaA*-MS2- $\Delta\Delta$ K1K3S61 株で ER 構造の崩壊が見られた (Fig. 4-5-1)。実際に細胞質 ER の面積を測定すると、*glaA*-MS2- Δ K1S61 株と *glaA*-MS2- $\Delta\Delta$ K1K3 S61 株で有意に低下していた (Fig. 4-5-2A)。*glaA*-MS2- Δ K1S61 株と *glaA*-MS2- $\Delta\Delta$ K1K3 S61 株で *glaA* mRNA と ER の共局在率の低下した可能性が考えられた。そこで、これらの株で *glaA* mRNA と ER の共局在解析を行った。その結果、各キネシンモーター欠失株とコントロール株の共局在率に大きな差が見られなかった (Fig. 4-5-2B)。これらの結果から、キネシンモーターは *glaA* mRNA の ER 局在化に影響しない可能性が示唆された。

glaA mRNA が ER に局在化できるのであれば、十分なグルコアミラーゼ活性が得られると考えられる。そこで、*glaA*-MS2- Δ K1 株、*glaA*-MS2- Δ K3 株、*glaA*-MS2- $\Delta\Delta$ K1K3 株でグルコアミラーゼ活性の測定を行った。*glaA*-MS2- Δ K1 株、*glaA*-MS2- Δ K3 株、*glaA*-MS2- $\Delta\Delta$ K1K3 株を培養した DPY 培地の培養上清を使用して、糖化力分別定量キットによるグルコアミラーゼ活性の測定を行った。その結果、全ての株で WT と同等のグルコアミラーゼ活性が得られた (Fig. 4-5-3)。これらの結果から、キネシンモーターは *glaA* mRNA の翻訳効率に影響しない可能性が示唆された。

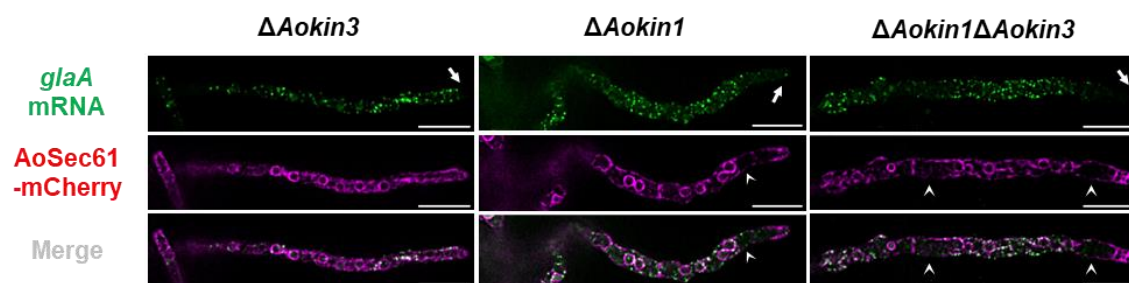


Fig. 4-5-1 *Aokin3/Aokin1* 欠失株における *glaA* mRNA と ER の共局在解析

glaA-MS2- Δ K1S61 株、*glaA*-MS2- Δ K3S61 株、*glaA*-MS2- $\Delta\Delta$ K1K3S61 株を CD (maltose) 培地で 30°C, 24 時間培養した。スケールバーは 10 μ m を示す。白矢印は菌糸先端を示す。

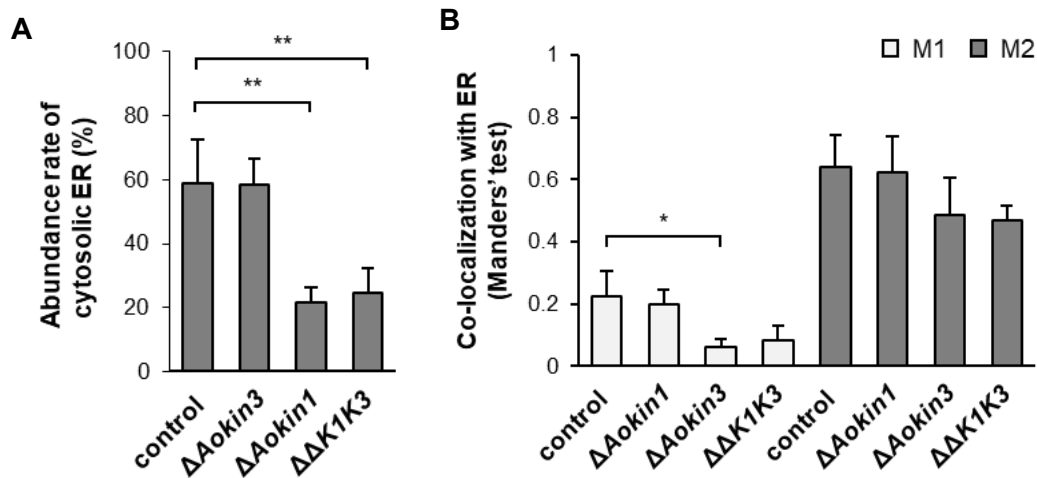


Fig. 4-5-2 *Aokin3/Aokin1* 欠失株における *glaA* mRNA と ER の共局在評価

glaA-MS2- $\Delta K1S61$ 株、*glaA*-MS2- $\Delta K3S61$ 株、*glaA*-MS2- $\Delta\Delta K1K3S61$ 株を CD (maltose) 培地で 30°C, 24 時間培養した。A: 細胞質 ER の面積比を示す (n=5)。エラーバーは SD を示す。**は P<0.01 を示す。B: *glaA* mRNA と ER の共局在率を示す (n=5)。共局在率は Mander's test により算出を行った (M1=ER vs ER & *glaA* mRNA, M2=*glaA* mRNA vs ER & *glaA* mRNA)。M2 のグラフが *glaA* mRNA と ER の共局在率にあたる。エラーバーは SD を示す。*は P<0.05 を示す。

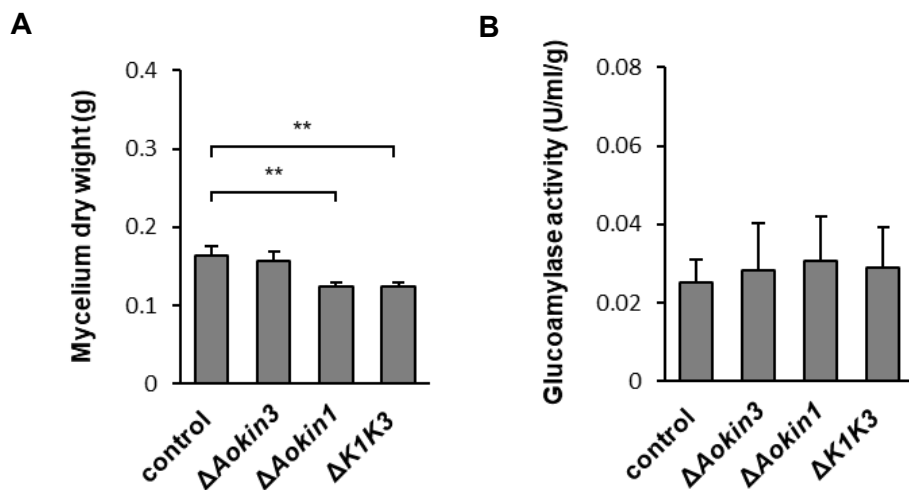


Fig. 4-5-3 *Aokin3/Aokin1* 欠失株におけるグルコアミラーゼ活性測定

glaA-MS2- $\Delta K1S61$ 株、*glaA*-MS2- $\Delta K3S61$ 株、*glaA*-MS2- $\Delta\Delta K1K3S61$ 株を DPY 培地で 30°C, 3 日間培養した。その後、培養上清を採取し、糖化力分別定量キットでグルコアミラーゼ活性の測定を行った。A: 乾燥菌体重量を示す (n=3)。B: グルコアミラーゼ活性を示す (n=3)。エラーバーは SD を示す。**は P<0.01 を示す。

考察

本章では、キネシンモーター依存的に *glaA* mRNA が ER 近傍で輸送される可能性が示唆されたことから、*glaA* mRNA の輸送機構の解明を目的に研究を行った。*glaA* mRNA 動態はほとんどがブラウン様動態であるが、低い割合で分子モーター様動態が見られる。分子モーター様動態について、EE 非依存的でありながら *Aohok1* 欠失時と *Aokin3* 欠失時に *glaA* mRNA の輸送距離が低下したことから、*Aokin3* により長距離輸送されることが強く示唆された。*Aokin1* 欠失時にも *glaA* mRNA の輸送距離が低下したが、kinesin-1 は dynein 輸送に関与することが考えられるため、このことに起因すると示唆された。しかし、*Aokin3* 欠失時に *glaA* mRNA の細胞内局在に影響が見られなかったことから、*Aokin3* による *glaA* mRNA の長距離輸送がその局在化に重要でないことが示唆された。一方で、*Aokin1* 欠失時は菌糸先端から *glaA* mRNA が後退しており、それが菌糸先端からの核の後退に起因すると示唆されたことから、核の位置で制御する部位特異的な転写制御機構が *glaA* mRNA の局在化に最も重要であることが示された。そして、多核という性質を活かし、mRNA 輸送に掛かるエネルギーを省くことで、効率的に mRNA を局在化させることが示唆された。*glaA* mRNA の長距離輸送について生理学的意義を明確にできなかったが、細胞内拡散をサポートしているのではないかと考えられた。

多くの分泌型酵素 mRNA は生物学的プロセスが共通することから、部位特異的な転写制御機構により局在制御されると示唆される。しかし、ER 近傍の *glaA* mRNA 動態が生体分子モーターを利用するか依然として不明である。ただ、細長い菌糸細胞内で部位特異的に mRNA 濃度を高めるだけであれば、転写の位置と量を制御することが最も効率的であると考えられる。細く長い菌糸細胞内で mRNA を充足できれば、多くの mRNA が生体分子モーターを必須とせずとも、小胞体局在シグナルにより翻訳サイトに到達できると考えられる。細胞全域で必要となることが予想される解糖系関連因子や微小管重合関連因子などをコードする mRNA も同様である可能性が予想される。一方で、菌糸頂端などの核がない領域に局在するタンパク質 (e.g., アクチンケーブル関連因子, ポラリソーム関連因子) は、不要なタンパク質合成を回避するために局在箇所近傍の細胞質で翻訳すると考えられ、生体分子モーターが必須である可能性が高いと考えられる。それに対し、分泌酵素は菌糸先端と隔壁に輸送されるが、細胞質に広く存在する ER で翻訳されるため該当しないと考える。

AoKin1 が ER 付近の *glaA* mRNA 動態に関与し、AoKin3 が長距離動態に関与するのではないかと予想した。しかし、*Aokin1* 欠失時と *Aokin3* 欠失時で *glaA* mRNA の輸送距離が低下したが、その多くが細胞内で分散して ER に局在していた。*S. cerevisiae* では、*ASH1* mRNA を輸送するミオシンモーターの *Myo4* を欠失しても、*She2-She3* 複合体により ER に局在化できることが示されている (Schmid et al., 2006)。*A. oryzae* は *She2-She3* 複合体に相当するホモログ因子が見つからないが、ER 近傍で方向性のあるブラウン様動態が見えることから、*She2-She3* 複合体に類似する機能を持つ未知の因子を介して ER 近傍で *glaA* mRNA が輸送される可能性が示唆される。ER 局在性 mRNA は ER 近傍で輸送することで翻訳効率が高まると考えられるため、ER 近傍の *glaA* mRNA 動態とキネシンモーターの関係性を明確にする必要があるが、生体分子モーターを 1 分子可視化する技術が確立されていない。*Aokin1* 欠失時に細胞質 ER 構造が著しく崩壊したことから、糸状菌においても *kineisn-1* により ER 構造が分化・伸長すると考えられ、*Aokin1* により ER 近傍で物質輸送ができると予想される。将来的に AoKin1 や AoKin3 の一分子可視化が可能となれば、*glaA* mRNA の輸送機構の解明に繋がる重要な知見が得られるだろう。

第5章 ストレス条件下における *glaA* mRNA の細胞内局在化機構に関する研究

序

多くの mRNA はその転写量と安定性によって一定の細胞内レベルが保たれている。細胞の状態に最適な mRNA レベルを維持することで、不要な細胞内プロセスの進行を回避することができる (Monaghan et al., 2023)。mRNA は恒常的に分解されているが、ストレス条件下で細胞内代謝を低下させるためにより分解される (Bresson et al., 2020)。mRNA の代謝制御機構として、RNP の凝集により形成される Processing-body (P-body) やストレス顆粒が知られる。P -body は恒常的に細胞内で形成されるが、ストレス顆粒はストレス条件下で形成される (Riggs et al., 2020)。真核生物に共通した細胞小器官であるが、どの生物種でも一時的に mRNA を凝集させる生理学的意義は明らかとなっていない。mRNA の翻訳を可逆的に調節できることから、分泌型酵素 mRNA の翻訳量調節に関与していれば、その分泌量を制御する新たな機構として期待できる。

糸状菌の P-body とストレス顆粒は、動物細胞や出芽酵母と比較すると生理学的意義がほとんど明らかとなっていない。いくつかの糸状菌種で P-body やストレス顆粒が可視化されており、その中では *A. oryzae* で最も研究が進んでいる。ストレス条件下で P-body とストレス顆粒の形成が増加するため、他の生物種と類似する形成プロセスである可能性が高い。一方で、ストレス顆粒は菌糸頂端と隔壁に形成されることが報告されており、細胞形状に特化した形成プロセスが存在する可能性も示唆されるものの (Huang et al., 2013)、そうした領域以外の mRNA がストレス条件下に制御されるのかは不明である。高温ストレス条件下や ER ストレス条件下の分泌型酵素 mRNA について、P-body やストレス顆粒の関係性を明らかにすることで、産業的な培養時にタンパク質分泌が mRNA レベルで制御される可能性を見いだせるかもしれない。さらに、糸状菌における P-body やストレス顆粒の役割についても多くの知見が得られるだろう。

本章では、*glaA* mRNA が P-body とストレス顆粒により翻訳制御される可能性を見出すことを目的として研究を行った。高温ストレスと ER ストレスにより *glaA* mRNA が P-body とストレス顆粒に共局在を示すか解析を行った。また、*glaA* mRNA が P-body とストレス顆粒により翻訳制御される可能性を見出すために、P-body とストレス顆粒が ER と共局在を示すか解析を行った。

5-1. ストレス顆粒/P-body 共局在解析用株の作製

A. oryzae は P-body 構成因子として AoDcp2、ストレス顆粒構成因子として AoPab1 と AoPub1 が知られる (Huang et al., 2013)。動物細胞や出芽酵母と共通性を深めるため、AoEdc3 と AoBre5 を見いだした。AoEdc3 は出芽酵母で P-body 形成に寄与する Edc3 のオルソログである (Fig.5-1-1)。AoBre5 は動物細胞でストレス顆粒形成に寄与する G3BP1 のオルソログである (Fig.5-1-2) (Rinnerthaler et al., 2013)。sC をマーカー遺伝子として pgPpD2mC と pgPpE3mC を *glaA*-MS2-PP 株に形質転換を行い、P-body を可視化する *glaA*-MS2-E3 株と *glaA*-MS2-D2 株の作製を行った。sC をマーカー遺伝子として pgPpP1mC と pgPpB5mC を *glaA*-MS2-PP 株に形質転換を行い、ストレス顆粒を可視化する *glaA*-MS2-B5 株と *glaA*-MS2-P1 株の作製を行った。

P-body とストレス顆粒 は細胞小器官の中で特徴的な形態であり、ストレス条件下で数や大きさが増大する。AoEdc3 と AoBre5 が P-body とストレス顆粒の構成因子であることを確認するために、高温ストレス条件下で AoEdc3、AoBre5 が AoDcp2、AoPab1 と同じ挙動を示すか解析を行った。45℃、10 分間の高温ストレスにより、AoDcp2 と AoEdc3 は菌糸全域で P-body を示すドット様局在が観察され、AoPab1 と AoBre5 は菌糸頂端でストレス顆粒を示すドット様局在が観察された (Fig. 5-1-3, Fig. 5-1-4) (Huang et al., 2013)。これらの結果は先行研究と酷似しており、AoEdc3 が P-body 構成因子であり、AoBre5 がストレス顆粒構成因子であることが示された。

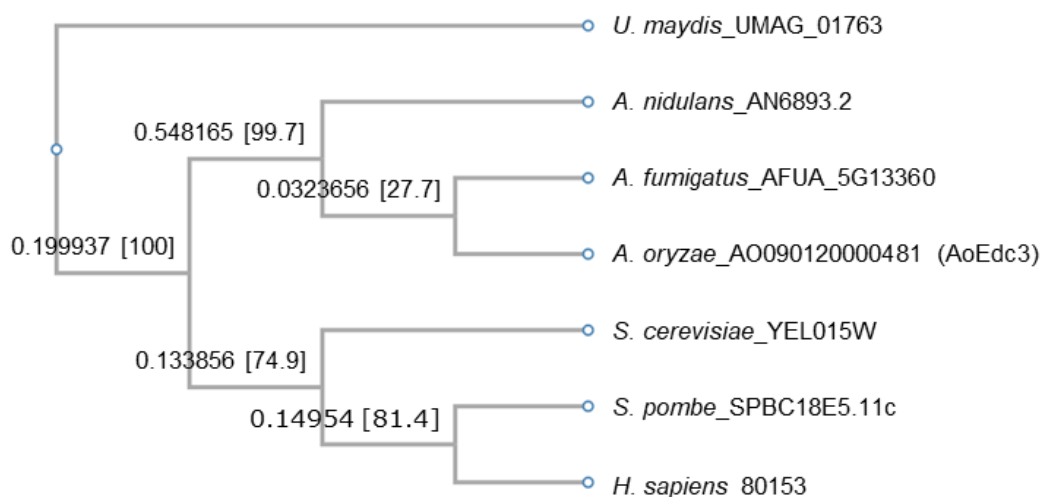


Fig. 5-1-1 AoEdc3 の遺伝子系統樹

Genome Net (<https://www.genome.jp/tools/blast/>) の BRAST 検索による結果を示す (AoEdc3 in *A. oryzae*)。

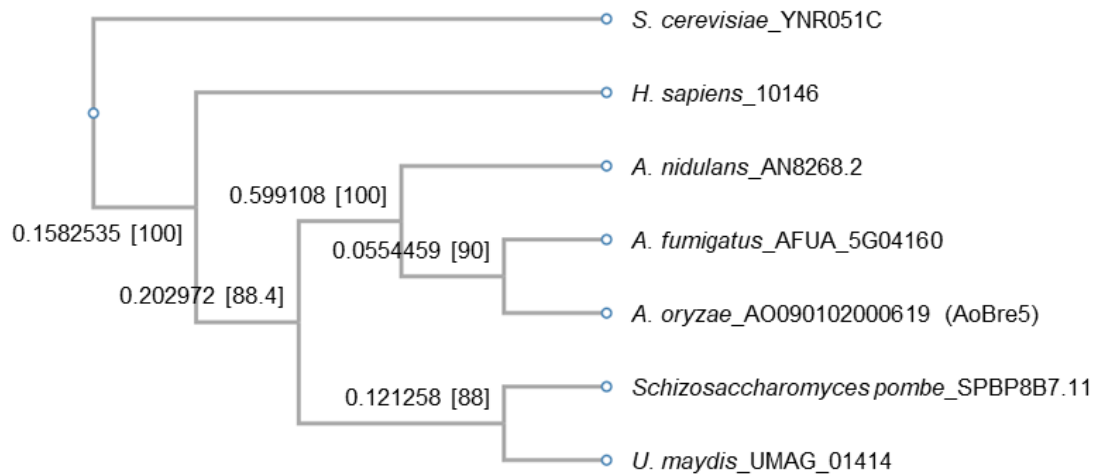


Fig. 5-1-2 AoBre5 の遺伝子系統樹

Genome Net (<https://www.genome.jp/tools/blast/>) の BRAST 検索による結果を示す (AoBre5 in *A. oryzae*)。

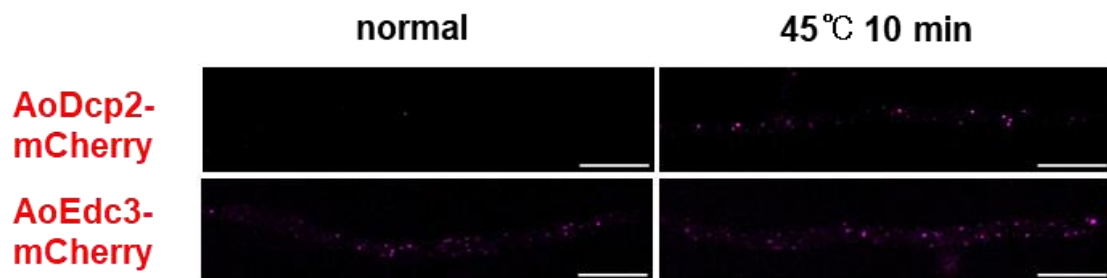


Fig. 5-1-3 高温ストレス条件下における P-body の細胞内局在解析

glaA-MS2-E3 株と *glaA*-MS2-D2 株を CD (maltose) 培地で 30°C, 24 時間培養し、45°C, 10 分間の高温ストレスに晒した。白矢印は菌糸先端、白短矢印は P-body を示す。スケールバーは 10 μm を示す。

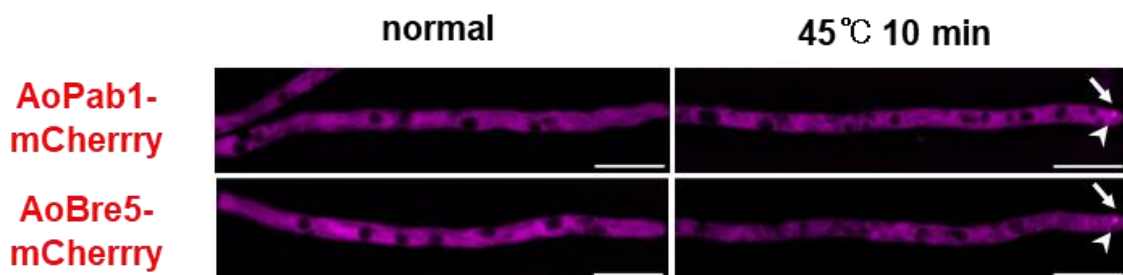


Fig. 5-1-4 高温ストレス条件下におけるストレス顆粒の細胞内局在解析

glaA-MS2-B5 株と *glaA*-MS2-P1 株を CD (maltose) 培地で 30°C, 24 時間培養し、45°C, 10 分間の高温ストレスに晒した。白矢印は菌糸先端、白短矢印はストレス顆粒 を示す。スケールバーは 10 μm を示す。

5-2. 高温ストレス条件下における細胞内局在解析

A. oryzae は高温培養時にアミラーゼの分泌量が増加するため、麹培養時に 40℃以上の高温で培養される場合がある。その培養条件で、P-body やストレス顆粒に *glaA* mRNA が局在するか確認を行う必要がある。しかし、37℃以上で一晩培養すると MCP-2×MCP が核に局在せず、MS2 system が機能しないことが予想された (data not shown)。そこで、通常条件下で培養後に 45℃, 10 分間の高温ストレスに晒し、P-body とストレス顆粒に *glaA* mRNA の共局在解析を行った。45℃, 10 分間の高温ストレスにより、*glaA* mRNA は P-body とストレス顆粒に共局在を示し、特に P-body により多く共局在を示した。(Fig. 5-2-1, Fig. 5-2-2)。 *S. cerevisiae* のストレス顆粒は高温ストレス条件下で細胞全域に形成される。したがって、糸状菌の P-body はストレス顆粒の役割を代替する可能性も考えられた (Shattuck et al., 2019)。以上の結果から、*glaA* mRNA は高温ストレス条件下で P-body とストレス顆粒に局在することを示した。

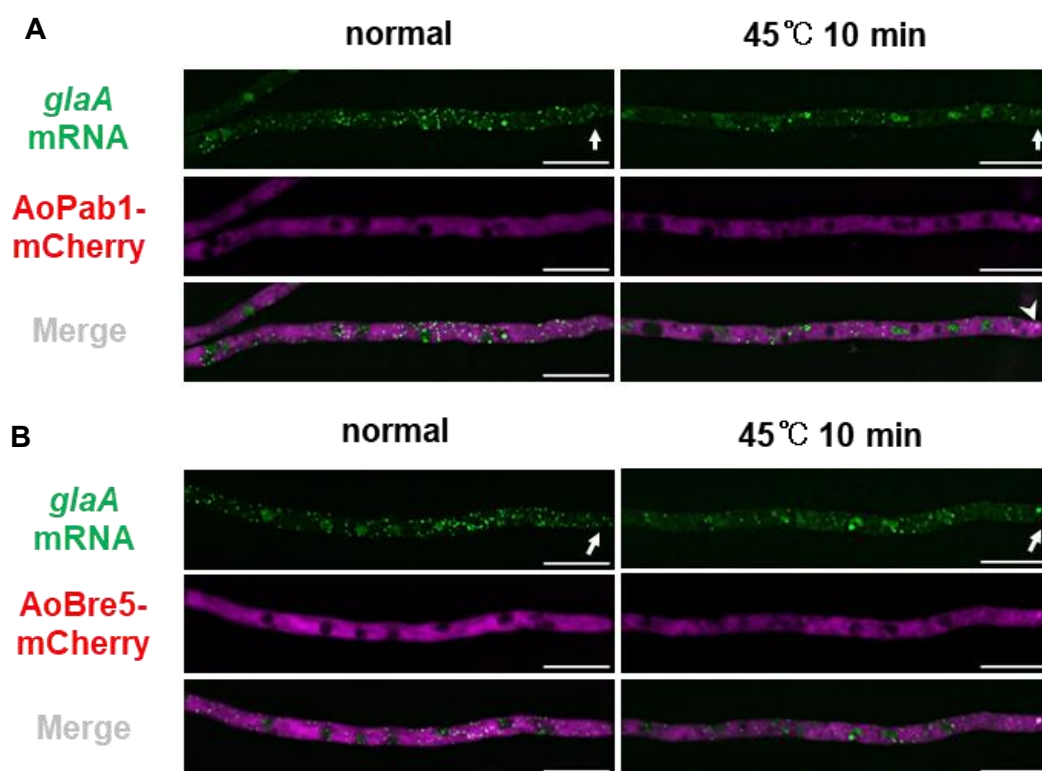


Fig. 5-2-1 高温ストレス条件下における *glaA* mRNA とストレス顆粒の共局在解析

glaA-MS2-B5 株と *glaA*-MS2-P1 株を CD (maltose) 培地で 30℃, 24 時間培養し、45℃, 10 分間の高温ストレスに晒した。ストレス顆粒を A: AoPab1 と B: AoBre5 で可視化した。白矢印は菌糸先端、白短矢印は共局在箇所を示す。スケールバーは 10 μm を示す。

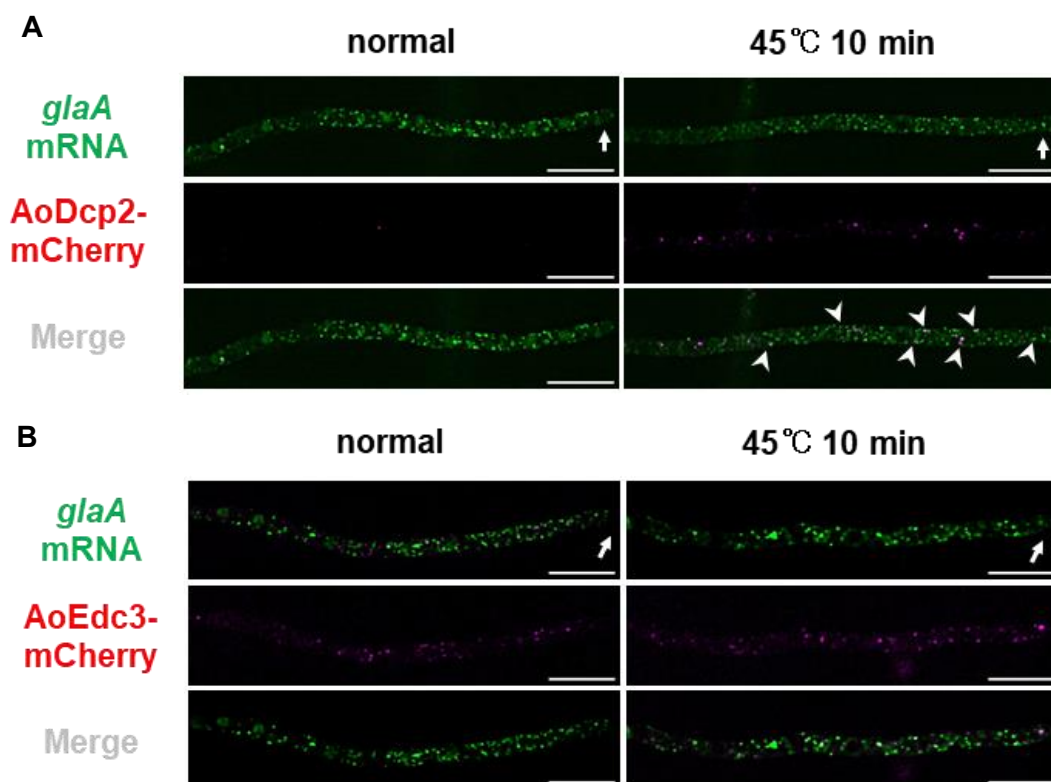


Fig. 5-2-2 高温ストレス条件下における *glaA* mRNA と P-body の共局在解析

glaA-MS2-D2 株と *glaA*-MS2-E3 株を CD (maltose) 培地で 30°C, 24 時間培養し、45°C, 10 分間の高温ストレスに晒した。P-body を A: AoDcp2 と B: AoEdc3 で可視化した。白矢印は菌糸先端、白短矢印は共局在箇所を示す。スケールバーは 10 μm を示す。

5-3. 持続的な高温ストレス条件下における細胞内局在解析

ストレス顆粒は主に mRNA と RBP で構成される凝集体構造であり、ストレス条件下に mRNA を一時的に貯蔵する役割を果たす。したがって、ストレス顆粒は mRNA と局在が同期すると考えられ、他の生物種で細胞全域に形成されることが確認されている (Gwon et al., 2021)。 *A. oryzae* において、頂端局在性 mRNA はアクチンケーブル関連因子しか確認されず、その多くが頂端よりも後方に広く分散していた (Morita et al., 2021)。したがって、 *A. oryzae* のストレス顆粒は mRNA 貯蔵の役割を果たす上で形成量が合理的ではないと考えられた。ストレス顆粒は強いストレス負荷で形成量が増加するため、より長い高温ストレス条件下でストレス顆粒の局在解析を行った。 *sC* をマーカー遺伝子として pgPpE3mC を *glaA*-MS2-sCPP 株に形質転換を行い、P-body を可視化する *glaA*-

MS2-E3sC 株の作製を行った。*ptrA* をマーカー遺伝子として pgPpB5mTBPP を *glaA*-MS2-E3sC 株に形質転換を行い、ストレス顆粒を可視化する *glaA*-MS2-E3B5 株の作製を行った。AoPab1 と AoDcp2 で P-body とストレス顆粒の可視化を行った。*niaD* をマーカー遺伝子として pgPpP1G を NSPID1 株に形質転換を行い、ストレス顆粒を可視化する PpP1G 株の作製を行った。*sC* をマーカー遺伝子として pgPpD2mC を PpP1G 株に形質転換を行い、P-body を可視化する PpP1GD2mCh 株の作製を行った。

45℃、30 分間の高温ストレスにより、ストレス顆粒は菌糸全域で形成誘導され、多くの *glaA* mRNA と共局在を示した (Fig. 5-3-1)。MCP-2×EGFP が機能していない可能性が懸念されたため、smFISH 法により *glaA* probe で *glaA* mRNA を可視化し、*glaA* mRNA とストレス顆粒の共局在解析を行った。45℃、30 分間の高温ストレスにより、smFISH 法で可視化した *glaA* mRNA はストレス顆粒共局在を示した (Fig. 5-3-2)。*glaA* mRNA は 45℃、10 分間の高温ストレスで主に P-body と共局在を示したため、菌糸全域で形成誘導されたストレス顆粒が P-body と共局在を示すか解析を行った。45℃、30 分間の高温ストレスにより、ストレス顆粒は一部が菌糸頂端後方でも P-body と共局在を示した (Fig. 5-3-3)。したがって、*A. oryzae* のストレス顆粒は *S. cerevisiae* と異なる形成機構であり、P-body を必要としないことが示唆された (Buchan et al., 2008)。以上の結果から、糸状菌のストレス顆粒はストレス負荷の強さで形成量が制御されており、ストレス負荷が一定以上になると菌糸全域で形成されることを示した。ストレス顆粒の形成量増加が強いストレス負荷をトリガーとするため、*glaA* mRNA は産業的な培養時に P-body による制御を受ける可能性が示唆された。

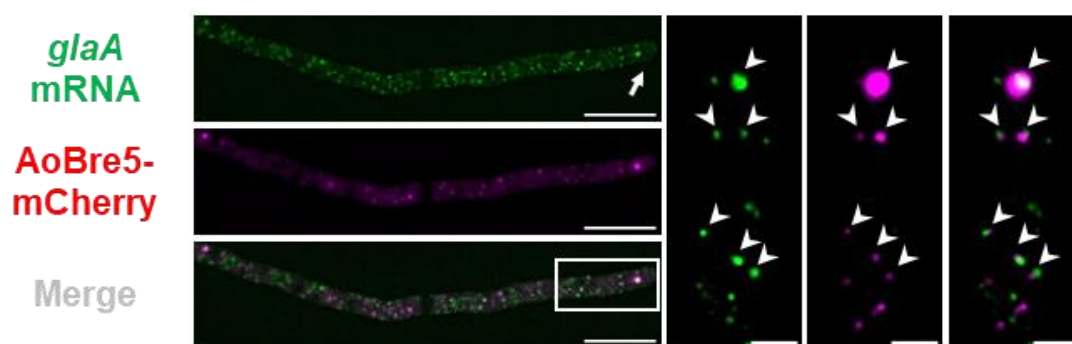


Fig. 5-3-1 高温ストレス条件下におけるストレス顆粒と *glaA* mRNA の共局在解析

glaA-MS2-E3B5 株を CD (maltose) 培地で 30℃、24 時間培養し、45℃、30 分間の高温ストレスに晒した。白矢印は菌糸先端、白短矢印は共局在箇所を示す。スケールバーは 10 μm を示す。

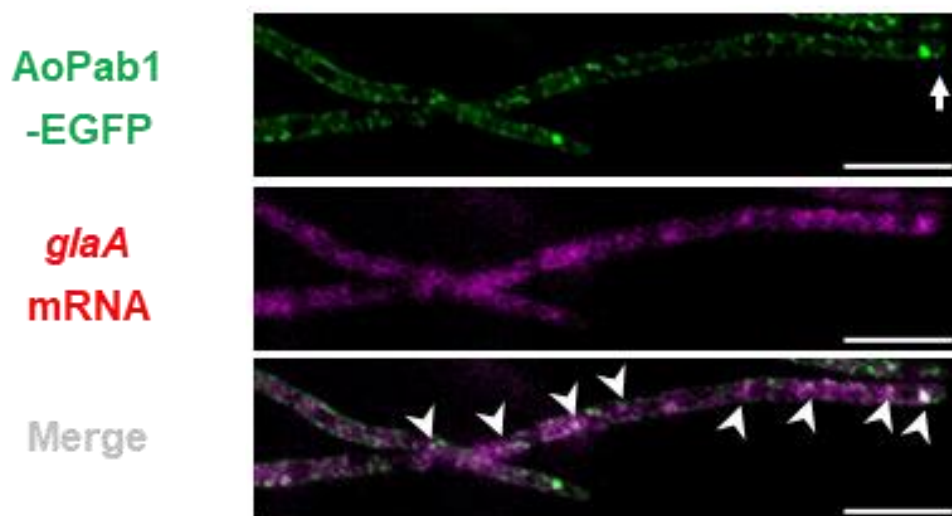


Fig. 5-3-2 smFISH 法による *glaA* mRNA とストレス顆粒の共局在解析

PpP1G 株を CDm (maltose) 培地で 30℃, 24 時間培養した。スケールバーは 10 μm を示す。白矢印は菌糸先端、白短矢印は共局在箇所を示す。

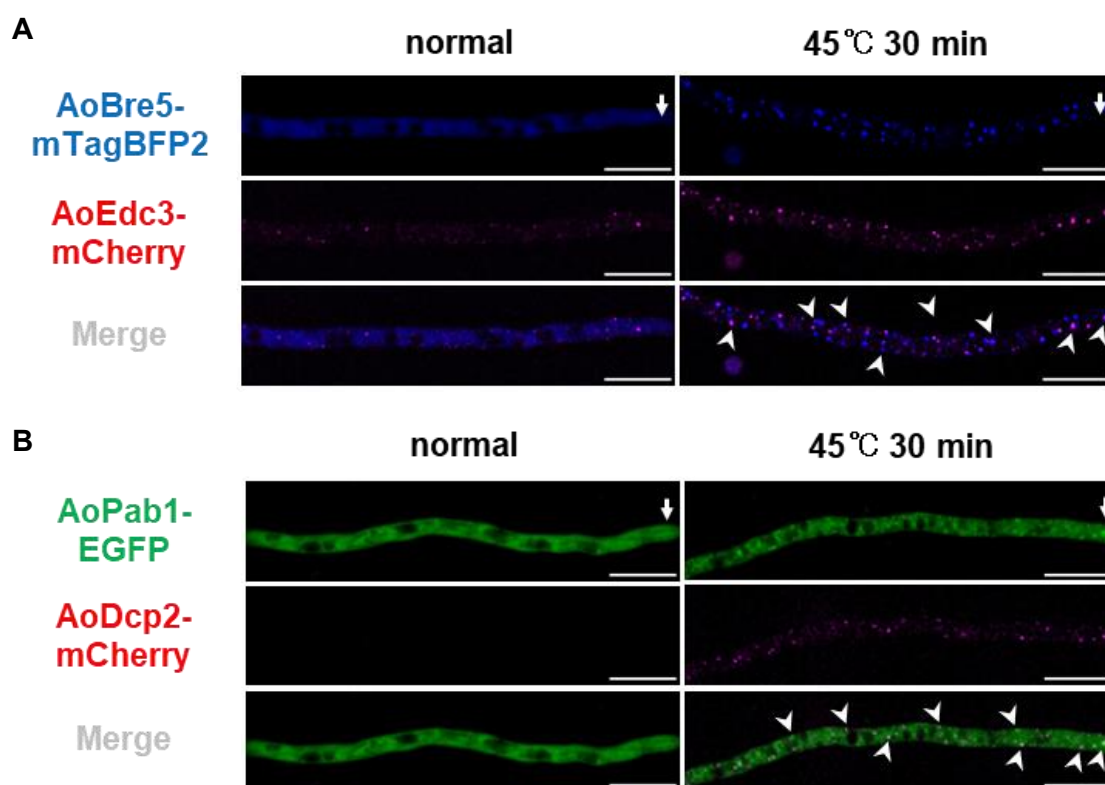


Fig. 5-3-3 高温ストレス条件下におけるストレス顆粒と P-body の共局在解析

A : *glaA*-MS2-E3B5 株と B : PpP1GD2mCh 株を CD (maltose) 培地で 30℃, 24 時間培養し、45℃, 30 分間の高温ストレスに晒した。白矢印は菌糸先端、白短矢印は共局在箇所を示す。スケールバーは 10 μm を示す。

5-4. ストレス顆粒の分散速度解析

ストレス顆粒はストレス緩和時に凝集が分散することで、ストレス条件下に特異的な形成が制御される。糸状菌のストレス顆粒は形成条件が確認されているものの、分散条件については調査が行われていない。そのストレス顆粒が機能的であるか確認するために、ストレス緩和時にストレス顆粒が分散することを示す必要がある。45°C、30 分間でストレス顆粒を形成させた後に、30°C で培養しストレス顆粒が分散するか解析を行ったところ、ストレス顆粒は2 時間後にほぼ完全に分散した (Fig. 5-4-1)。 *S. cerevisiae* のストレス顆粒はストレス緩和から約 1 時間後に約 40% が分散し、約 2 時間後にほぼ完全に分散することが報告されている (Shattuck et al., 2019)。 *A. oryzae* のストレス顆粒は、菌糸頂端以外のストレス顆粒が約 1 時間半で分散した後に、菌糸頂端のストレス顆粒が最後に分散した (Fig. 5-4-1)。したがって、菌糸頂端のストレス顆粒は構造体内外の流動性が低く、mRNA の翻訳量調節の場として適さない可能性が示唆された。以上の結果を統合すると、*A. oryzae* は2 段階の分散プロセスがあり、菌糸頂端以外のストレス顆粒が翻訳量調節に機能する可能性が示唆された。

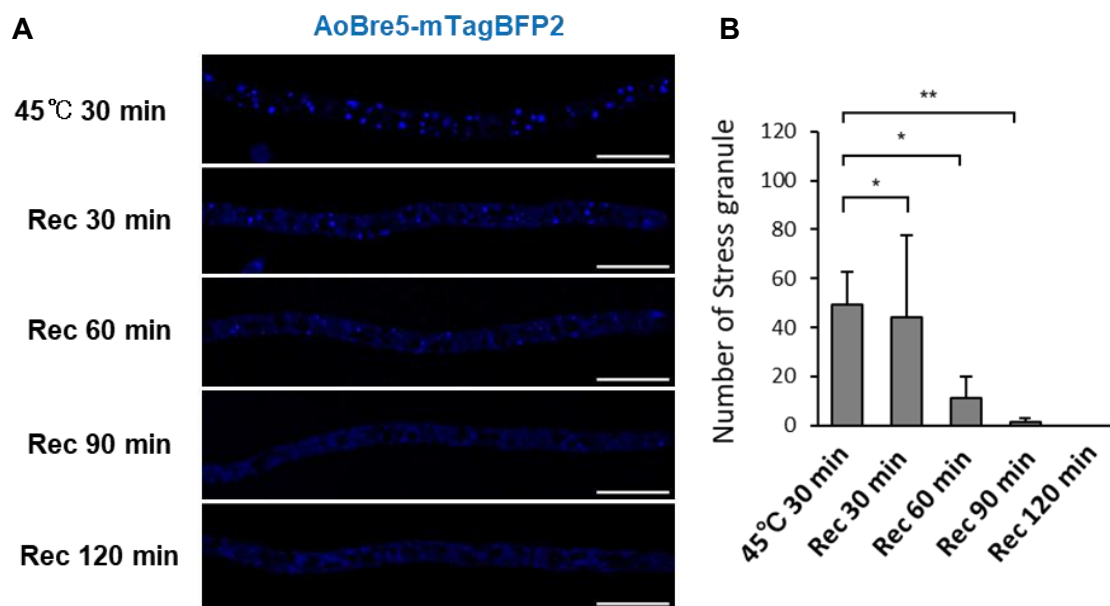


Fig. 5-4-1 ストレス緩和によるストレス顆粒の分散解析

glaA-MS2-E3B5 株を CD (maltose) 培地で 30°C, 24 時間培養し、45°C, 30 分間の高温ストレスに晒した。A: ストレス緩和時のストレス顆粒の局在解析画像を示す。スケールバーは 10 μm を示す。B: ストレス緩和時の *glaA* mRNA 数を示す (n=5)。エラーバーは SD を示す。*は p<0.05、**は P<0.01 を示す。

5-5. 小胞体ストレス条件下における細胞内局在解析

A. oryzae はタンパク質高分泌時に ER ストレスが誘発されることから、ER ストレス応答 (unfolded protein response : UPR) 機構がタンパク質分泌機構の律速になることが示唆されている (Tanaka et al., 2015)。UPR 機構は全ての真核生物に存在する普遍的な生物学的プロセスであり、翻訳抑制、mRNA 分解、ER 関連分解 (ER-associated degradation : ERAD)、シャペロンタンパク質およびオートファジーを誘導し ER ストレスを軽減する (Chen et al. 2023)。高等生物では、ER 膜に存在する PERK、IRE1、ATF6 により ER ストレスを感知し UPR 機構を活性化する。一方で、真菌は高等生物と異なり Ire1 のみで ER ストレスを感知し UPR 機構を活性化する。*S. cerevisiae* の Ire1 は ER ストレス時に UPR 標的遺伝子 (e.g., ERAD 関連因子、シャペロンタンパク質) の転写因子 Hac1 をスプライシングし、ERAD やシャペロンタンパク質の機能を活性化する。

A. oryzae は IreA が ER ストレスを感知し UPR 機構を活性化する。タンパク質高分泌の恒常性に UPR 機構が必須であり、IreA 欠失により多糖条件下で著しく生育が阻害される (Tanaka et al., 2015)。*A. oryzae* は分泌型酵素 mRNA の転写をフィードバック抑制する repression under secretion stress (RESS) と呼ばれる機構も存在する (Penttilä et al., 2004)。*A. oryzae* は IreA 依存性分解 (Ire1-dependent mRNA decay : RIDD) が保存されており、ER ストレス時に分泌型酵素 mRNA が迅速に分解されることが報告されている (Tanaka et al., 2023)。一方で、ER ストレス条件下にストレス顆粒が形成誘導されるため、*glaA* mRNA がストレス顆粒に貯蔵される可能性が考えられた。

ER ストレス誘導剤である dithiothreitol (DTT) の添加により、P-body とストレス顆粒は 1 時間が経っても形成誘導されなかった (Fig. 5-5-1, Fig. 5-5-2)。DTT を添加して 1 時間後に、一部の菌糸で P-body とストレス顆粒の形成が確認された (Fig. 5-5-1, Fig. 5-5-2)。一方で、*glaA* mRNA は 30 分から 60 分で消失し、DTT 非添加の培地で培養すると再度出現した (Fig. 5-5-3)。したがって、*glaA* mRNA は ER ストレスにより RESS で分解されたことが示唆された。先行研究でストレス顆粒は DTT を添加して 1 時間後にストレス顆粒が確認されている。その際、ストレス顆粒は菌糸頂端だけにしか形成されないようであり、*glaA* mRNA の翻訳制御に関与しないことが示唆される。以上の結果を統合すると、*glaA* mRNA は ER ストレス条件下で P-body とストレス顆粒により制御されず、RESS による分解が優先されることが示唆された。

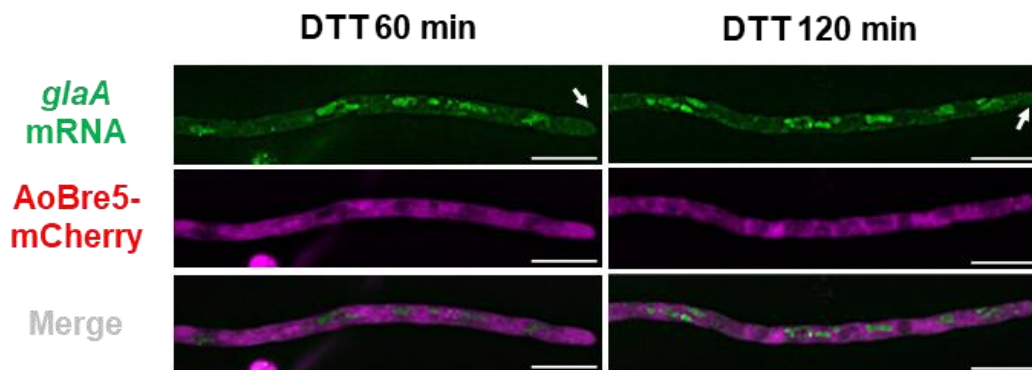


Fig. 5-5-1 ER ストレス条件下における *glaA* mRNA とストレス顆粒の共局在解析
CD (maltose) 培地にて 30℃, 24 h で培養し局在解析を行った。スケールバーは 10 μ m を示す。白矢印は菌系先端を示す。

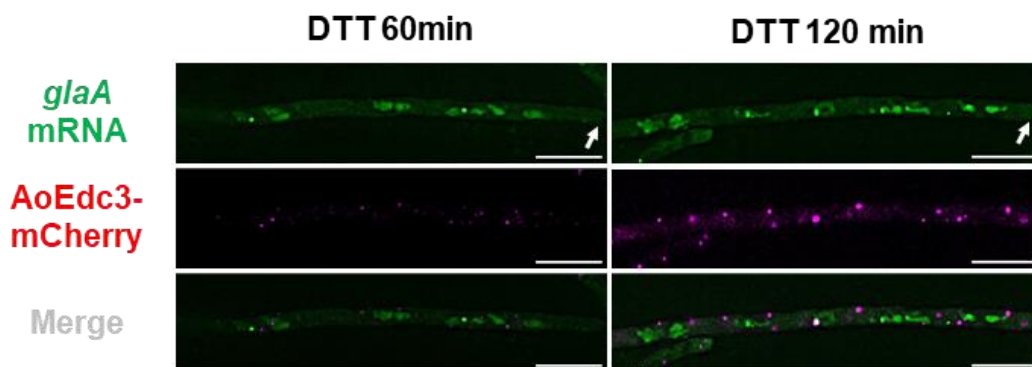


Fig. 5-5-2 ER ストレス条件下における *glaA* mRNA と P-body の共局在解析
CD (maltose) 培地にて 30℃, 24 h で培養し局在解析を行った。スケールバーは 10 μ m を示す。白矢印は菌系先端を示す。

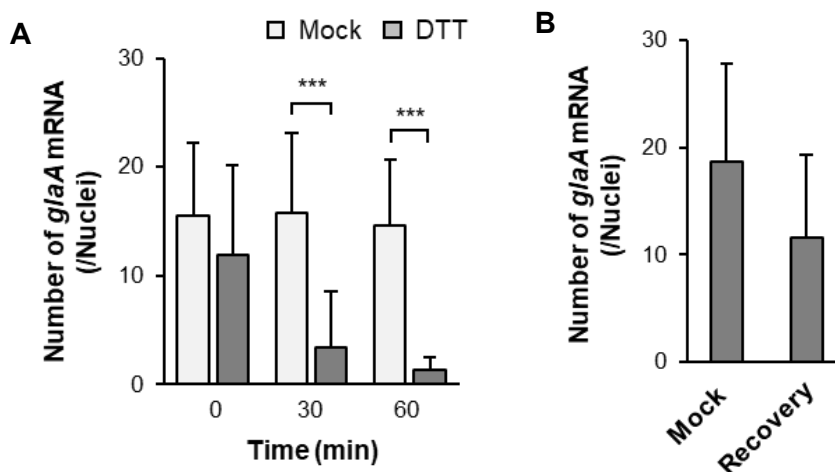


Fig. 5-5-3 ER ストレス条件下における *glaA* mRNA 数の定量
A: ER ストレス添加後の *glaA* mRNA 数の定量グラフを示す (n=10)。B: ストレス緩和時の *glaA* mRNA 数の定量グラフを示す (n=10)。エラーバーは SD を示す。***は P<0.001 を示す。

5-6. ストレス顆粒と P-body の細胞内局在解析

glaA mRNA は高温ストレス条件下に P-body とストレス顆粒に翻訳制御されるか全く明らかとなっていない。P-body とストレス顆粒に局在する *glaA* mRNA の翻訳動態を観察する必要があるが、糸状菌は翻訳動態を可視化する技術が確立されていない。一方で、*glaA* mRNA が ER で翻訳されるならば、P-body とストレス顆粒は ER に共局在する必要がある。そこで、P-body とストレス顆粒が ER に共局在を示すか解析を行った。*sC* を遺伝子マーカーとして PpS61mCS を *glaA*-MS2-sCPP 株に形質転換を行い、ER を可視化する *glaA*-MS2-S61sC 株の作製を行った。*ptrA* をマーカー遺伝子として pgPpB5mTBPP と pgPpE3mTBPP を *glaA*-MS2-S61sC 株に形質転換を行い、ER と P-body およびストレス顆粒を可視化する *glaA*-MS2-S61B5 株と *glaA*-MS2-S61E3 株の作製を行った。

45°C、30 分間の高温ストレスにより、P-body とストレス顆粒はその多くが ER と共局在を示した (Fig. 5-6-1, Fig. 5-6-2)。また、P-body とストレス顆粒は *glaA* mRNA と ER 近傍で共局在を示した (Fig. 5-6-1, Fig. 5-6-2)。したがって、*glaA* mRNA は ER 近傍で P-body とストレス顆粒に局在化し、高温ストレス条件下で翻訳制御される可能性が示唆された。ER 形成が微小管依存的であることが示唆されていることから、P-body とストレス顆粒も微小管と連携している可能性が示唆された。そこで、 α -tubulin である *AtuA* に mCherry を融合発現し、P-body とストレス顆粒が微小管と共局在を示すか解析を行った。*ptrA* をマーカー遺伝子として pgPamTBA*AtuA* を PpP1GD2mCh 株に形質転換を行い、微小管を可視化する PpP1GD2mChAmTB 株の作製を行った。

45°C、30 分間の高温ストレスにより、微小管構造は著しく崩壊していたが P-body とストレス顆粒のようなドット様蛍光が観察された (Fig. 5-6-3)。そのドット様蛍光はストレス緩和時により 2 時間後に完全に分散し、再び微小管構造を示すチューブ状局在を示した (Fig. 5-6-3)。さらに、そのドット様蛍光は P-body とストレス顆粒に共局在を示した (Fig. 5-6-4)。したがって、微小管は高温ストレスにより崩壊し、 α -tubulin が P-body とストレス顆粒に局在化することを示した。高温ストレス時の P-body とストレス顆粒が動的でないことから、P-body とストレス顆粒は α -tubulin と局在化するために微小管構造と連携する必要がある。以上の結果を統合すると、P-body とストレス顆粒は微小管依存的 ER 近傍で形成される可能性が示唆された。P-body がリボソームを含まないことを考慮すると、*glaA* mRNA は輸送過程で P-body に局在する可能性が示唆された。

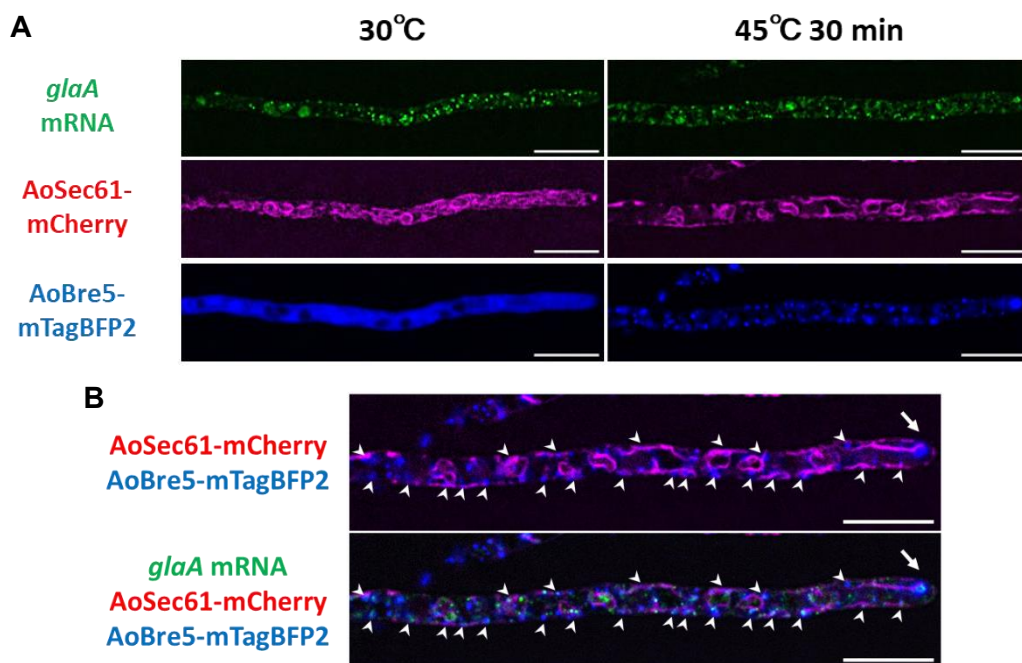


Fig. 5-6-1 ストレス顆粒と ER の共局在解析

45°C, 30 分間の高温ストレスに晒してから局在解析を行った。A：各因子の局在解析画像を示す。B:共局在画像を示す。白矢印は菌糸先端、白短矢印は共局在箇所を示す。スケールバーは 10 μm を示す。

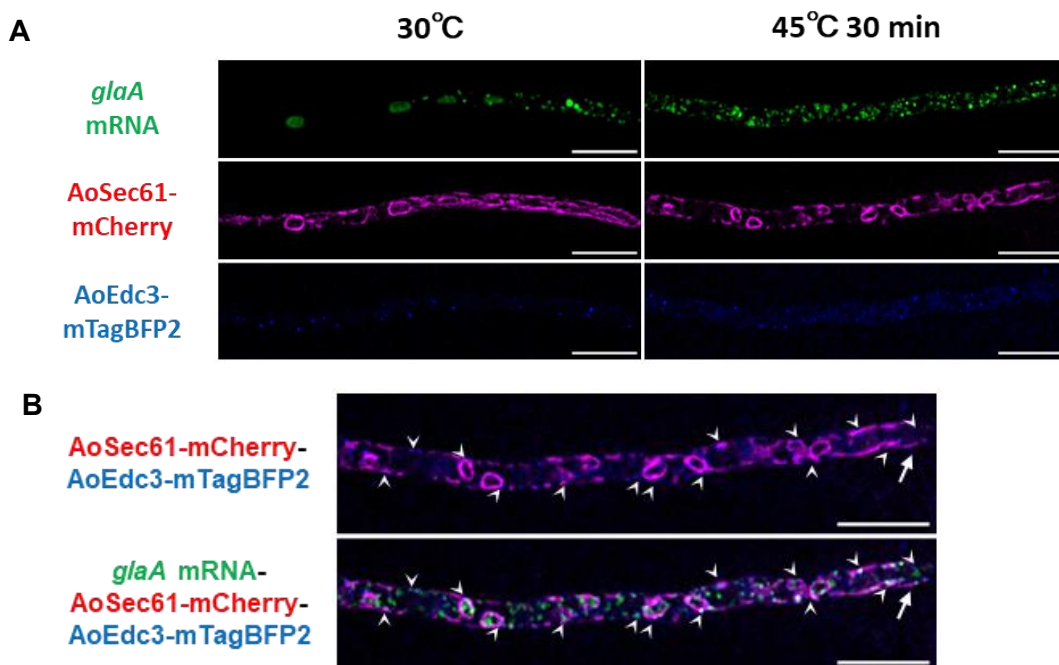


Fig. 5-6-2 P-body と ER の共局在解析

45°C, 30 分間の高温ストレスに晒してから局在解析を行った。A：各因子の局在解析画像を示す。B:共局在画像を示す。白矢印は菌糸先端、白短矢印は共局在箇所を示す。スケールバーは 10 μm を示す。

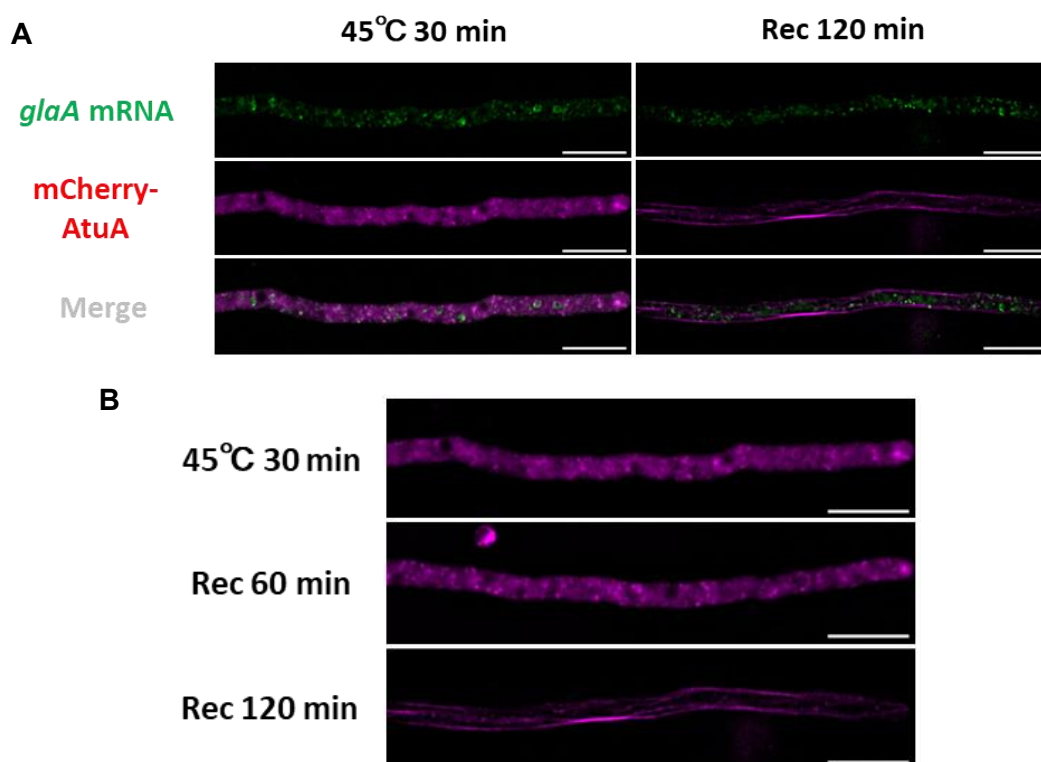


Fig. 5-6-3 高温ストレスによる微小管の細胞内局在解析

CD (maltose) 培地にて 30°C, 24 h で培養し、45°C, 30 分間の高温ストレスに晒してから局在解析を行った。A: *glaA* mRNA と微小管の共局在解析画像を示す。B: ストレス緩和時 (Rec) の微小管の局在画像を示す。白矢印は菌糸先端を示す。スケールバーは 10 μ m を示す。

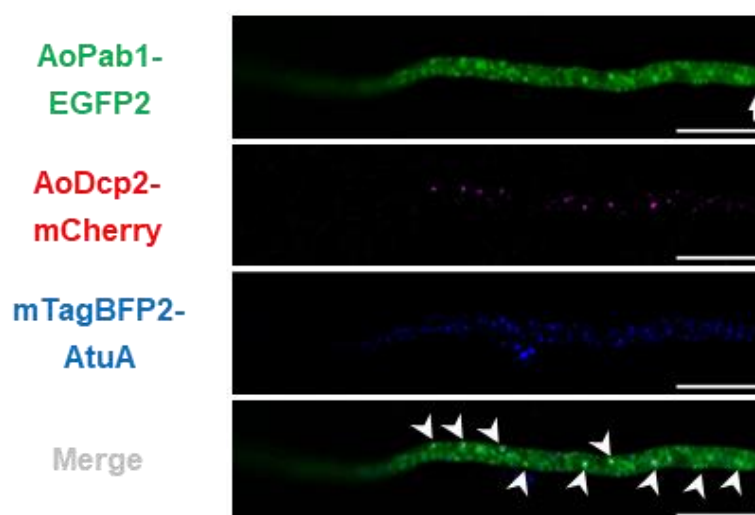


Fig. 5-6-4 高温ストレス条件下のストレス顆粒、P-body と微小管の共局在解析

CD (maltose) 培地にて 30°C, 24 h で培養し、45°C, 30 分間の高温ストレスに晒してから局在解析を行った。白矢印は菌糸先端、白短矢印は共局在箇所を示す。スケールバーは 10 μ m を示す。

考察

本章では、P-body とストレス顆粒が mRNA の翻訳量調節に機能することから、それらが分泌型酵素 mRNA の翻訳量調節に寄与している可能性を考え、*glaA* mRNA と P-body およびストレス顆粒の共局在解析を行った。今回の解析により、*glaA* mRNA は高温ストレス条件下において ER 近傍で P-body とストレス顆粒に局在することを示し、分泌型酵素 mRNA が P-body とストレス顆粒により翻訳制御される可能性を見出した。一方で、*glaA* mRNA は ER ストレス条件下で迅速に喪失し、P-body とストレス顆粒に局在しなかった。したがって、分泌型酵素 mRNA は ER ストレスの細胞応答による分解が優先されることが示唆された。産業的な培養時の ER ストレスは著しい生育阻害を示さないため、DTT 添加による ER ストレスよりも弱いと考えられる。異種タンパク質を高分泌生産させるとより強い ER ストレスが生じるため、そうした条件で P-body が異種タンパク質 mRNA を翻訳制御するかもしれない (Ohno et al., 2011)。

45°C、10 分間の高温ストレスにより、ストレス顆粒は菌糸頂端だけしか形成されなかった。しかし、45°C、30 分間の高温ストレスに晒すと、ストレス顆粒は菌糸頂端だけでなく菌糸全域に形成されるようになった。したがって、*A. oryzae* のストレス顆粒は糸状菌のストレス顆粒はストレス負荷の強さにより形成量が制御されることが示唆された (Chevalier et al., 2023)。ストレスの種類にかかわらず、*A. oryzae* のストレス顆粒は菌糸頂端で形成されることから、ストレス時の普遍的な形成機構であることが示唆された (Huang et al., 2013)。一般に、ストレス顆粒はストレス負荷により大きさや数変動し、ストレス負荷のない細胞で蓄積すると毒性を示す (Wheeler et al., 2016)。したがって、ストレス顆粒はストレスを緩和すると分散し細胞内から完全に消失する。ストレス顆粒の分散機構はストレスの暴露時間に応じて異なり、弱いストレス負荷だと Cdc48 にコア因子が引き抜かれて分散するが、強いストレス負荷だとオートファジー機構により丸ごと分解される (Gwon et al., 2021)。*A. oryzae* のストレス顆粒はストレス緩和後から約 2 時間でほぼ完全に分散することを見出した。菌糸頂端のストレス顆粒はストレスの緩和後も分散されにくく、他のストレス顆粒よりも流動性が低いことが示唆された。したがって、*A. oryzae* のストレス顆粒は他の生物種と同様のプロセスで分散されることが示唆された。そして、菌糸頂端のストレス顆粒は他のストレス顆粒よりも流動性が低いことが示唆され、mRNA の翻訳制御と異なる役割を果たす可能性が考えられた。

一般的に、ストレス顆粒は ER 局在性 mRNA を含まないことが報告されている (Khong et al., 2017)。しかし、ストレス顆粒は DTT 添加時に一部の ER 局在性 mRNA を取り込むことが報告され (Child et al., 2021)、ER 局在性 mRNA に対するストレス顆粒の役割については不明な点が多い (Nicchitta et al., 2022)。*glaA* mRNA は高温ストレス条件下でストレス顆粒へ局在したが、DTT 添加時の ER ストレス条件で急速に分解されてストレス顆粒へ局在しなかった。したがって、分泌酵素 mRNA はストレス顆粒に局在する ER 局在性 mRNA であることが示唆された。Hela cell のストレス顆粒は DTT 添加後から約 1 時間でストレス顆粒が形成される (Child et al., 2021)。しかし、*A. oryzae* のストレス顆粒は DTT 添加後から約 2 時間が経過しても形成誘導されず、約 2 時間が経つと菌糸頂端で形成誘導されるようになった。一方で、P-body はストレス顆粒と同様の応答が見られたが、約 2 時間が経つと菌糸全域で大きく肥大したことから、ストレス顆粒よりも強く形成誘導されるようであった。以上の結果を統合すると、ストレス顆粒は動物細胞と真菌細胞で ER ストレスによる形成応答が異なる可能性が示唆され、真菌細胞のストレス顆粒として理解を深める必要があると考えられた。

IV. 要約

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* は、古来、日本酒や味噌などの日本の伝統的な発酵醸造産業で利用される有用な微生物であり、多様な加水分解酵素を安全かつ多量に分泌する。そのタンパク質分泌機構を分子細胞生物学的に解明し、タンパク質分泌能に一層優れる株を分子育種することで、産業利用の拡大が期待できる。一方で、*A. oryzae* は多数の核を含む細胞が連なった多核多細胞菌糸であり、その特徴的な細胞構造からタンパク質分泌機構も単細胞生物に比べて複雑であると考えられる。

mRNA 局在制御機構は遺伝子発現の時空間制御に必須であり、タンパク質の局所的な翻訳・合成に寄与し、その機能を最大化すると考えられている。*A. oryzae* は分泌型酵素を菌糸頂端と隔壁に局在させることから、それらを mRNA レベルで局在制御することで、タンパク質分泌を空間的に効率化している可能性が考えられる。しかし、*A. oryzae* を含め *Aspergillus* 属糸状菌において mRNA 局在制御機構に関する知見はほとんどない。そこで本研究では、*A. oryzae* における mRNA 局在制御機構を明らかにすることを目的とした。

Aspergillus 属糸状菌の菌糸細胞内で、mRNA 局在がタンパク質ごとに制御されるかを明らかにするために、細胞内局在が異なる 6 種類のタンパク質をコードする mRNA の局在解析を行った。その結果、菌糸頂端、菌糸全域、菌糸先端近傍の 3 種類の mRNA 局在が確認され、菌糸細胞内で mRNA 局在がタンパク質ごとに制御されることが示唆された。また、菌糸全域に局在する mRNA が非局在性 mRNA であるならば、*amyB* mRNA を含む分泌型酵素 mRNA が生理学的意義のもと局在制御される可能性が考えられた。

分泌型酵素 mRNA は細胞内輸送により局在制御される可能性が考えられたため、生体内 mRNA を可視化する MS2 system の確立を試みた。*A. oryzae* が高分泌する加水分解酵素グルコアミラーゼ (GlaA) を標的に MS2 system を *glaA* mRNA に適用した *glaA*-MS2 株の作製を行い、*glaA* mRNA と思われるドット様蛍光の観察に成功した。

glaA mRNA を示すドット蛍光を定量することで、*glaA* mRNA が分泌部位近傍の核で

転写活性化されることで、先端領域と隔壁領域に有意に多く局在することを明らかにした (Fig. 1B)。さらに、そうした局在箇所について調査を行い、*glaA* mRNA が小胞体 (ER) に局在することを明らかにした。その中で、一部の *glaA* mRNA は ER 近傍でブラウン様動態と分子モーター様動態を示し、少ない割合で初期エンドソーム非依存的な長距離輸送も観察され、*Aohok1* 欠失時に輸送距離が低下することを明らかにした。以上の結果から、分泌部位近傍で分泌型酵素 mRNA を局在制御し、タンパク質分泌を空間的に効率化する可能性が示唆された。

微小管上の生体分子モーターである AoKin1 (kinesin-1) と AoKin3 (kinesin-3) が、*glaA* mRNA を輸送する可能性が示唆された。*Aokin3* および *Aokin1* を欠失すると、*glaA* mRNA の輸送距離が低下した。*Aokin1* 欠失時は dynein が輸送不全であることから、AoKin3 により長距離輸送されることが示唆された。しかし、*Aokin3* を欠失しても *glaA* mRNA の細胞内局在に顕著な影響が確認されなかった。また、*glaA* mRNA は *Aokin3* と *Aokin1* を欠失させても、依然として ER に局在を示し、グルコアミラーゼ活性にも有意な差が見られなかった。以上の結果から、*glaA* mRNA の局在制御機構において、AoKin3 と AoKin1 は必須ではなく、分泌部位近傍における部位特異的な転写制御機構が最も重要であることが示唆された。

A. oryzae は産業利用時には高温で培養されることがあり、またタンパク質高分泌時には ER ストレスを生じることが知られる。P-body とストレス顆粒はストレス条件下で mRNA の翻訳量調節に機能するため、分泌型酵素 mRNA も調節される可能性が考えられた。45°C、30 分間の高温ストレスでは、*glaA* mRNA が P-body とストレス顆粒に局在することを明らかにした。一方で、10 mM dithiothreitol 添加による ER ストレスでは、P-body とストレス顆粒が形成誘導されず、細胞質から *glaA* mRNA が迅速に消失した。以上の結果から、*glaA* mRNA は高温ストレス時に P-body とストレス顆粒により翻訳量調節され、ER ストレス時には転写抑制と mRNA 分解が優先されることが示唆された。

V. 参考文献

- Al-Sheikh H., Watson A.J., Lacey G.A., Punt P.J., MacKenzie D.A., Jeenes D.J., Pakula T., Penttilä M., Alcocer M.J.C., Archer D.B. Endoplasmic reticulum stress leads to the selective transcriptional downregulation of the glucoamylase gene in *Aspergillus niger*. *Mol Microbiol.* 2004; 53(6):1731-4
- Aronov S., Gelin-Licht R., Zipor G., Haim L., Safran E., Gerst J. E. mRNAs encoding polarity and exocytosis factors are cotransported with the cortical endoplasmic reticulum to the incipient bud in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 2007; 27(9):3441-55
- Bahry E., Breimann L., Zouinkhi M., Epstein L., Kolyvanov K., Mamrak N., King B., Long X., Harrington K.I.S., Lionnet T., Preibisch S. RS-FISH: precise., interactive., fast., and scalable FISH spot detection. *Nat Methods.* 2022; 19(12):1563-1567
- Bartholomai B.M., Gladfelter A.S., Loros J.J., Dunlap J.C. Quantitative single molecule RNA-FISH and RNase-free cell wall digestion in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol.* 2021; 156:103615
- Becht P., König J., Feldbrügge M. The RNA-binding protein Rrm4 is essential for polarity in *Ustilago maydis* and shuttles along microtubules. *J Cell Sci.* 2006; 119(Pt 23):4964-73
- Bertrand E., Chartrand P., Schaefer M., Shenoy S.M., Singer R.H., Long R.M. Localization of *ASH1* mRNA particles in living yeast. *Mol Cell.* 1998; 2(4):437-45
- Bielska E., Schuster M., Roger Y., Berepiki A., Soanes D.M., Talbot N.J., Steinberg G. Hook is an adapter that coordinates kinesin-3 and dynein cargo attachment on early endosomes. *J Cell Biol.* 2014; 204(6):989-1007
- Bose M., Lampe M., Mahamid J., Ephrussi A. Liquid-to-solid phase transition of oskar ribonucleoprotein granules is essential for their function in *Drosophila* embryonic development. *Cell.* 2022; 185(8):1308-1324.e23
- Bresson S., Shchepachev V., Spanos C., Turowski T.W., Rappsilber J., Tollervey D. Stress-Induced Translation Inhibition through Rapid Displacement of Scanning Initiation Factors. *Mol Cell.* 2020; 80(3): 470–484.e8
- Buchan J.R., Muhlrad D., Parker R. P bodies promote stress granule assembly in

Saccharomyces cerevisiae. *J Cell Biol.* 2008; 183(3):441-55

Buxbaum A.R., Haimovich G., Singer R.H. In the right place at the right time: visualizing and understanding mRNA localization. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2015; 16(2):95-109

Buxbaum A.R., Wu B., Singer R.H. Single β -actin mRNA detection in neurons reveals a mechanism for regulating its translatability. *Science.* 2014; 343(6169):419-22

Böhl F., Kruse C., Frank A., Ferring D., Jansen R.P. She2p, a novel RNA-binding protein tethers *ASH1* mRNA to the Myo4p myosin motor via She3p. *EMBO J.* 2000; 19(20):5514-24

Cai D., McEwen D.P., Martens J.R., Meyhofer E., Verhey K.J. Single molecule imaging reveals differences in microtubule track selection between Kinesin motors. *PLoS Biol.* 2009; 7(10):e1000216

Cai D., McEwen D.P., Martens J.R., Meyhofer E., Verhey K.J. Single molecule imaging reveals differences in microtubule track selection between Kinesin motors. *PLoS Biol.* 2009; 7(10):e1000216

Cassella L and Ephrussi A. Subcellular spatial transcriptomics identifies three mechanistically different classes of localizing RNAs. *Nat Commun.* 2022; 13(1):6355

Chartrand P., Meng X. H., Huttelmaier S., Donato D., Singer R. H. Asymmetric sorting of *ash1p* in yeast results from inhibition of translation by localization elements in the mRNA. *Mol Cell.* 2002; 10(6):1319-30

Chartrand P., Meng X. H., Singer R. H., Long R. M. Structural elements required for the localization of *ASH1* mRNA and of a green fluorescent protein reporter particle in vivo. *Curr Biol.* 1999; 9(6):333-6

Chaudhuri A., Das S., Das B. Localization elements and zip codes in the intracellular transport and localization of messenger RNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2020; 11(4):e1591

Chen J., McSwiggen D., Ünal E. Single Molecule Fluorescence In Situ Hybridization (smFISH) Analysis in Budding Yeast Vegetative Growth and Meiosis. *J Vis Exp.* 2018; (135): 57774

Chen X., Shi C., He M., Xiong S., Xia X. Endoplasmic reticulum stress: molecular mechanism and therapeutic targets. *Signal Transduct Target Ther.* 2023; 8(1):352

Chevalier L., Pinar M., Borgne R.L., Durieu C., Peñalva M.A., Boudaoud A., Minc N. Cell wall

dynamics stabilize tip growth in a filamentous fungus. *PLoS Biol.* 2023; 21(1):e3001981

Child J.R., Chen Q., Reid D.W., Jagannathan S., Nicchitta C.V. Recruitment of endoplasmic reticulum-targeted and cytosolic mRNAs into membrane-associated stress granules. *RNA.* 2021; 27(10):1241-1256

Christensen J.R and Reck-Peterson S.L. Hitchhiking Across Kingdoms: Cotransport of Cargos in Fungal., Animal., and Plant Cells. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2022; 38:155-178

Cioni J.-M., Lin J.Q., Holtermann A.V., Koppers M., Jakobs M.A.H., Azizi A., Turner-Bridger B., Shigeoka T., Franze K., Harris W.A and Holt C.E. Late Endosomes Act as mRNA Translation Platforms and Sustain Mitochondria in Axons. *Cell.* 2019; 176(1-2): 56–72.e15

Costa I.D., Buchanan C.N., Zdradzinski M.D., Sahoo P.K., Smith T.P., Thames E., Kar A.N., Twiss J.L. The functional organization of axonal mRNA transport and translation. *Nat Rev Neurosci.* 2021; 22(2):77-91

Cui Y., Cao W., He Y., Zhao O., Wakazaki M., Zhuang X., Gao J., Zeng Y., Gao C., Ding Y., Wong H.Y., Wong W.S., Lam H.K., Wang P., Ueda T., Rojas-Pierce M., Toyooka K., Kang B.-H., Jiang L. A whole-cell electron tomography model of vacuole biogenesis in *Arabidopsis* root cells. *Nat Plants.* 2019; 5(1):95-105

Das S., Vera M., Gandin V., Singer R.H., Tutucci E. Intracellular mRNA transport and localized translation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2021; 22(7):483-504

Dimitrova-Paternoga L., Jagtap P.K.A., Cyrklaff A., Vaishali., Lapouge K., Sehr P., Perez K., Heber S., Löw C., Hennig J., Ephrussi A. Molecular basis of mRNA transport by a kinesin-1-atypical tropomyosin complex. *Genes Dev.* 2021; 35(13-14):976-991

Dimou S., Dionysopoulou M., Sagia G.M., Dhalluin G. Golgi-Bypass Is a Major Unconventional Route for Translocation to the Plasma Membrane of Non-Apical Membrane Cargoes in *Aspergillus nidulans*. *Front Cell Dev Biol.* 2022; 10:852028

Egan M.J., McClintock M.A., Reck-Peterson S.L. Microtubule-based transport in filamentous fungi. *Curr Opin Microbiol.* 2012; 15(6):637-45

Farajzadeh N., Shahbadian K., Bouaziz Y., Querido E., Chartrand P. Phosphorylation controls the oligomeric state of She2 and mRNA localization in yeast. *RNA.* 2023; 29(6):745-755

Fujikawa D., Nakamura T., Yoshioka D., Li Z., Moriizumi H., Taguchi M., Tokai-Nishizumi N.,

Kozuka-Hata H., Oyama M., Takekawa M. Stress granule formation inhibits stress-induced apoptosis by selectively sequestering executioner caspases. *Curr Biol.* 2023; 33(10):1967-1981.e8

Fusco D., Accornero N., Lavoie B., Shenoy S.M., Blanchard J.-M., Singer R.H., Bertrand E. Single mRNA molecules demonstrate probabilistic movement in living mammalian cells. *Curr Biol.* 2003; 13(2):161-167

Gavis E.R and Lehmann R. Localization of nanos RNA controls embryonic polarity. *Cell.* 1992; 71(2):301-13

Gow N.A.R., Latge J.-P., Munro C.A. The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function. *Microbiol Spectr.* 2017; 5(3)

Grousl T., Vojtova J., Hasek J., Vomastek T. Yeast stress granules at a glance. *Yeast.* 2022; 39(4):247-261

Gu W., Deng Y., Zenklusen D., Singer R.H. A new yeast PUF family protein., Puf6p., represses *ASH1* mRNA translation and is required for its localization. *Genes Dev.* 2004; 18(12):1452-65

Guardia C.M., Farías G.G., Jia R., Pu J., Bonifacino J.S. BORC Functions Upstream of Kinesins 1 and 3 to Coordinate Regional Movement of Lysosomes along Different Microtubule Tracks. *Cell Rep.* 2016; 17(8):1950-1961

Guo Y., Yang F., Tang X. An Overview of Protein Secretion in Yeast and Animal Cells. *Methods Mol Biol.* 2017; 1662:1-17

Gwon Y., Maxwell B.A., Kolaitis R.-M., Zhang P., Kim H.J., Taylor J.P. Ubiquitination of G3BP1 mediates stress granule disassembly in a context-specific manner. *Science.* 2021; 372(6549):eabf6548

Hata Y., Kitamoto K., Gomi K., Kumagai C., Tamura G. Functional elements of the promoter region of the *Aspergillus oryzae glaA* gene encoding glucoamylase. *Curr Genet.* 1992; 22(2):85-91

Hayakawa Y., Ishikawa E., Shoji J., Nakano H., Kitamoto K. Septum-directed secretion in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Mol Microbiol.* 2011; 81(1):40-55

Hermesh O and Jansen R.-P. Take the (RN)A-train: localization of mRNA to the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta.* 2013; 1833(11):2519-25

Higuchi Y and Takegawa K. Single-Molecule FISH Reveals Subcellular Localization of α -Amylase and Actin mRNAs in the Filamentous Fungus *Aspergillus oryzae*. *Front Microbiol.* 2020; 11:578862

Higuchi Y. Membrane Traffic in *Aspergillus oryzae* and Related Filamentous Fungi. *J Fungi (Basel)*. 2021; 7(7):534

Higuchi Y., Ashwin P., Roger Y., Steinberg G. Early endosome motility spatially organizes polysome distribution. *J Cell Biol.* 2014; 204(3):343–357

Higuchi Y., Shoji J., Arioka M., Kitamoto K. Endocytosis is crucial for cell polarity and apical membrane recycling in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Eukaryot Cell.* 2009; 8(1):37-46

Hobson B.D., Kong L., Angelo M.F., Lieberman O.J., Mosharov E.V., Herzog E., Sulzer D., Sims P.A. Subcellular and regional localization of mRNA translation in midbrain dopamine neurons. *Cell Rep.* 2022; 38(2):110208

Hofmann S., Kedersha N., Anderson P., Ivanov P. Molecular mechanisms of stress granule assembly and disassembly. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2021; 1868(1):118876

Hortschansky P., Eisendle M., Al-Abdallah Q., Schmidt A.D., Bergmann S., Thön M., Kniemeyer O., Seeber B.A.B., Werner E.R., Kato M., Brakhage A.A., Haas H. Interaction of HapX with the CCAAT-binding complex--a novel mechanism of gene regulation by iron. *EMBO J.* 2007; 26(13):3157-68

Hosomi A., Iida K., Cho T., Iida H., Kaneko M., Suzuki T. The ER-associated protease Ste24 prevents N-terminal signal peptide-independent translocation into the endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 2020; 295(30):10406-10419

Hu Y., Xu J., Gao E., Fan X., Wei J., Ye B., Xu S., Ma W. Enhanced single RNA imaging reveals dynamic gene expression in live animals. *Elife.* 2023; 12:e82178

Huang H.-T., Maruyama J., Kitamoto K. *Aspergillus oryzae* AoSO is a novel component of stress granules upon heat stress in filamentous fungi. *PLoS One.* 2013; 8(8):e72209

Huynh H. H., Morita N., Sakamoto T., Katayama T., Miyakawa T., Tanokura M., Chiba Y., Shinkura R., Maruyama J. Functional production of human antibody by the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Fungal Biol Biotechnol.* 2020; 28:7:7

Hwang H., Yun S., Arcanjo R.B., Divyanshi., Chen S., Mei W., Nowak R.A., Taejoon., Kwon J.Y. Regulation of RNA localization during oocyte maturation by dynamic RNA-ER association and remodeling of the ER. *Cell Rep.* 2022; 41(11):111802

Inoue H., Nojima H., Okayama H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene.* 1990; 96:23-8

Jankowski S., Pohlmann T., Baumann S., Müntjes K., Devan S. K., Zander S., Michael Feldbrügge. The multi PAM2 protein Upa2 functions as novel core component of endosomal mRNA transport. *EMBO Rep.* 2019; 20(9):e47381

Jeffery W. R., Tomlinson C. R., Brodeur R. D. Localization of actin messenger RNA during early ascidian development. *Dev Biol.* 1983; 408-17

Jia J., Wang F., Bhujabal Z., Peters R., Mudd M., Duque T., Allers L., Javed R. Salemi M. Behrends C., Phinney B., Johansen T., Deretic V. Stress granules and mTOR are regulated by membrane atg8ylation during lysosomal damage. *J Cell Biol.* 2022; 221(11):e202207091

Kato M. An overview of the CCAAT-box binding factor in filamentous fungi: assembly, nuclear translocation, and transcriptional enhancement. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2005; 69(4):663-72

Kato M., Tateyama Y., Hayashi K., Naruse F., Oonishi R., Tanoue S., Tanaka A., Kobayashi T., Tsukagoshi N. A quantity control mechanism regulating levels of the HapE subunit of the Hap complex in *Aspergillus nidulans*: no accumulation of HapE in hapC deletion mutants. *FEBS Lett.* 2002; 512(1-3):227-9

Kato Y and Nakamura A. Roles of cytoplasmic RNP granules in intracellular RNA localization and translational control in the *Drosophila* oocyte. *Dev Growth Differ.* 2012; 54(1):19-31

Khong A., Matheny T., Jain S., Mitchell S.F., Wheeler J.R., Parker R. The Stress Granule Transcriptome Reveals Principles of mRNA Accumulation in Stress Granules. *Mol Cell.* 2017; 68(4):808-820.e5

Kubodera T., Yamashita N., Nishimura A. Pyrithiamine resistance gene (ptrA) of *Aspergillus oryzae*: cloning, characterization and application as a dominant selectable marker for transformation. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2000; 64(7):1416-21

Kuratsu M., Taura A., Shoji J., Kikuchi S., Arioka M., Kitamoto K. Systematic analysis of SNARE localization in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genet Biol.* 2007;

44(12):1310-23

Kühn R., Torres R.M. Cre/*loxP* recombination system and gene targeting. *Methods Mol Biol.* 2002; 180:175-204

Lee J. E., Cathey P. I., Wu H., Parker R, Voeltz G. K. Endoplasmic reticulum contact sites regulate the dynamics of membraneless organelles. *Science.* 2020; 367(6477):eaay7108

Lenz J.H., Schuchardt I., Straube A., Steinberg G. A dynein loading zone for retrograde endosome motility at microtubule plus-ends. *EMBO J.* 2006; 25(11):2275-86

Levine M. Transcriptional enhancers in animal development and evolution. *Curr Biol.* 2010; 20(17):R754-63

Li Q., Higuchi Y., Tanabe K., Katakura Y., Takegawa K. Secretory production of N-glycan-deleted glycoprotein in *Aspergillus oryzae*. *J Biosci Bioeng.* 2020; 129(5):573-580

Li W., Maekiniemi A., Sato H., Osman C., Singer R.H. An improved imaging system that corrects MS2-induced RNA destabilization. *Nat Methods.* 2022; 19(12):1558-1562

Liao Y.-C., Fernandopulle M.S., Wang G., Choi H., Hao L., Drerup C.M., Patel R., Qamar S., Nixon-Abell J., Shen Y., Meadows W., Vendruscolo M., Knowles T.P.J., Nelson M., Czekalska M.A., Musteikyte G., Gachechiladze M.A., Stephens C.A., Pasolli H.A., Forrest L.R., George-Hyslop P.S., Lippincott-Schwartz J., Ward M.E. RNA Granules Hitchhike on Lysosomes for Long-Distance Transport., Using Annexin A11 as a Molecular Tether. *Cell.* 2019; 179(1): 147–164.e20

Livingston N.M., Kwon J., Valera O., Saba J.A., Sinha N.K., Reddy P., Nelson B., Wolfe C., Ha T., Green R., Liu J., Wu B. Bursting translation on single mRNAs in live cells. *Mol Cell.* 2023; 83(13):2276-2289.e11

Long R.M., Gu W., Lorimer E., Singer R.H., Chartrand P. She2p is a novel RNA-binding protein that recruits the Myo4p-She3p complex to *ASH1* mRNA. *EMBO J.* 2000; 19(23):6592-601

Long R.M., Singer R.H., Meng X., Gonzalez I., Nasmyth K., Jansen R.P. Mating type switching in yeast controlled by asymmetric localization of *ASH1* mRNA. *Science.* 1997; 277(5324):383-7

Lu L, Mark S Ladinsky, Tom Kirchhausen. Cisternal organization of the endoplasmic reticulum during mitosis. *Mol Biol Cell.* 2009 Aug;20(15):3471-80

Luo Y., Na Z., Slavoff S. A. P-Bodies: Composition, Properties, and Functions. *Biochemistry*. 2018; 57(17):2424-2431

Mamun M.A.A., Katayama T., Cao W., Nakamura S., Maruyama J. A novel Pezizomycotina-specific protein with gelsolin domains regulates contractile actin ring assembly and constriction in perforated septum formation. *Mol Microbiol*. 2020; 113(5):964-982

Markina-Iñarrairaegui A., Pantazopoulou A., Espeso E.A., Peñalva M.A. The *Aspergillus nidulans* peripheral ER: disorganization by ER stress and persistence during mitosis. *PLoS One*. 2013 Jun 24;8(6):e67154

Maruyama J., Kitamoto K. Multiple gene disruptions by marker recycling with highly efficient gene-targeting background (DeltaligD) in *Aspergillus oryzae*. *Biotechnol Lett*. 2008; 30(10):1811-7

Maruyama J., Nakajima H., Kitamoto K. Visualization of nuclei in *Aspergillus oryzae* with EGFP and analysis of the number of nuclei in each conidium by FACS. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2001; 65(7):1504-10

Mateju D., Eichenberger B., Voigt F., Eglinger J., Roth G., Chao J.A. Single-Molecule Imaging Reveals Translation of mRNAs Localized to Stress Granules. *Cell*. 2020; 183(7):1801-1812.e13

Mitsue T., Saha, B.C., Ueda S. Glucoamylase of *Aspergillus oryzae* cultured on steamed rice. *J. Appl. Biochem*. 1979; 1:5-6

Monaghan L., Longman D., Cáceres J.F. Translation-coupled mRNA quality control mechanisms. *EMBO J*. 2023; 42(19):e114378

Morita Y., Katakura Y., Takegawa K., Higuchi Y. Correlative Localization Analysis Between mRNA and Enhanced Green Fluorescence Protein-Fused Protein by a Single-Molecule Fluorescence in situ Hybridization Using an *egfp* Probe in *Aspergillus oryzae*. *Frontiers in Fungal Biology*. 2021; 2:721398

Morita Y., Kikumatsu F., Higuchi Y., Katakura Y., Takegawa K. Characterization and functional analysis of ERAD-related AAA+ ATPase Cdc48 in *Aspergillus oryzae*. *Fungal Biol*. 2020; 124(9):801-813

Müller J., Pohlmann T., Feldbrügge M. Core components of endosomal mRNA transport are evolutionarily conserved in fungi. *Fungal Genet Biol*. 2019; 126:12-16

- Müntjes K., Devan S.K., Reichert A.S., Feldbrügge M. Linking transport and translation of mRNAs with endosomes and mitochondria. *EMBO Rep.* 2021; 22(10):e52445
- Nakajima K., Asakura T., Maruyama J., Morita Y., Oike H., Shimizu-Ibuka A., Misaka T., Sorimachi H., Arai S., Kitamoto K., Abe K. Extracellular Production of Neoculin, a Sweet-Tasting Heterodimeric Protein with Taste-Modifying Activity, by *Aspergillus oryzae*. *Appl Environ Microbio.* 2006; 72:3716-23
- Nemoto T., Maruyama J., Kitamoto K. Contribution ratios of *amyA*., *amyB*., *amyC* genes to high-level α -amylase expression in *Aspergillus oryzae*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2012; 76(8):1477-83
- Nicchitta C.V. An emerging role for the endoplasmic reticulum in stress granule biogenesis. *Semin Cell Dev Biol.* 2022; S1084-9521(22)00275-0
- Niedner A., Edelmann F.T., Niessing D. Of social molecules: The interactive assembly of *ASH1* mRNA-transport complexes in yeast. *RNA Biol.* 2014; 11(8): 998–1009
- Niessing D., Jansen R.-P., Pohlmann T., Feldbrügge M. mRNA transport in fungal top models. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2018; 9(1)
- Nishimura E.O., Zhang J.C., Werts A.D., Goldstein B., Lieb J.D. Asymmetric Transcript Discovery by RNA-seq in *C. elegans* Blastomeres Identifies neg-1., a Gene Important for Anterior Morphogenesis. *PLoS Genet.* 2015; 11(4):e1005117
- Ohno A., Maruyama J., Nemoto T., Arioka M., Kitamoto K. A carrier fusion significantly induces unfolded protein response in heterologous protein production by *Aspergillus oryzae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2011; 92:1197-1206
- Olgeiser L., Haag C., Boerner S., Ule J., Busch A., Koepke J., König J., Feldbrügge M., Zarnack K. The key protein of endosomal mRNP transport Rrm4 binds translational landmark sites of cargo mRNAs. *EMBO Rep.* 2019; 20(1):e46588
- Paquin N., Ménade M., Poirier G., Donato D., Drouet E., Chartrand P. Local activation of yeast *ASH1* mRNA translation through phosphorylation of Khd1p by the casein kinase Yck1p. *Mol Cell.* 2007; 26(6):795-809
- Parker R and Sheth U. P bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Mol Cell.* 2007; 25(5):635-46

Peng Y and Zhang Y. Enhancer and super-enhancer: Positive regulators in gene transcription. *Animal Model Exp Med.* 2018; 1(3):169-179

Pichon X, Robert M.-C, Bertrand E., Singer R.H., Tutucci E. New Generations of MS2 Variants and MCP Fusions to Detect Single mRNAs in Living Eukaryotic Cells. *Methods Mol Biol.* 2020; 2166:121-144

Protter D.S.W and Parker R. Principles and Properties of Stress Granules. *Trends Cell Biol.* 2016 Sep;26(9):668-679

Qiu R., Zhang J., Xiang X. Kinesin-1 autoinhibition facilitates the initiation of dynein cargo transport. *J Cell Biol.* 2023; 222(3):e202205136

Quentin D., Schuhmacher J.S., Klink B.U., Lauer J., Shaikh T.R., Veld P.J.H.I., Welp L.M., Urlaub H., Zerial M., Raunser S. Structural basis of mRNA binding by the human FERRY Rab5 effector complex. *Mol Cell.* 2023; 83(11):1856-1871.e9

Rahman S and Zenklusen D. Single-molecule resolution fluorescent in situ hybridization (smFISH) in the yeast *S. cerevisiae*. *Methods Mol Biol.* 2013; 1042:33-46

Reid D.W and Nicchitta C.V. Diversity and selectivity in mRNA translation on the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2015; 16(4):221-31

Riggs C.L., Kedersha N., Ivanov P., Anderson P. Mammalian stress granules and P bodies at a glance. *J Cell Sci.* 2020; 133(16):jcs242487

Rinnerthaler M., Lejskova R., Grousl T., Stradalova V., Heeren G., Richter K., Breitenbach-Koller L., Malinsky J., Hasek J., Pascal M.B. Mmi1., the yeast homologue of mammalian TCTP., associates with stress granules in heat-shocked cells and modulates proteasome activity. *PLoS One.* 2013; 8(10):e77791

Riquelme M., Aguirre J., Bartnicki-García S., Braus G.H., Feldbrügge M., Fleig U., Hansberg W., Herrera-Estrella A., Kämper J., Kück U., Mouriño-Pérez R.R., Takeshita N., Fischer R. Fungal Morphogenesis., from the Polarized Growth of Hyphae to Complex Reproduction and Infection Structures. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2018; 82(2):e00068-17

Saha, B.C., Mitsue T., Ueda S. Glucoamylase produced by submerged culture of *Aspergillus oryzae*. *Starch-Stärke.* 1979; 31(9):307-314

Samardak K., Moriel-Carretero M. Daughter cell-targeted mRNAs can achieve segregation

without the universal Endoplasmic Reticulum docker She2p. *MicroPubl Biol.* 2021; 2021:10.17912/micropub.biology.000458

Sandoval M. C., Heberle A. M., Rehbein U., Barile C., Pittol J. M. R., Thedieck K. mTORC1 Crosstalk With Stress Granules in Aging and Age-Related Diseases. *Front Aging.* 2021; 2: 761333

Sattler L and Graumann P.L. Real-Time Messenger RNA Dynamics in *Bacillus subtilis*. *Front Microbiol.* 2021; 12:760857

Schindelin J., Arganda-Carreras I., Frise E., Kaynig V., Longair M., Pietzsch T., Preibisch S., Rueden C., Saalfeld S., Schmid B., Tinevez J.-Y., White D.J., Hartenstein V., Eliceiri K., Tomancak P., Cardona A. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods.* 2012; 9(7):676-82

Schmid M., Jaedicke A., Du T.-G., Jansen R.-P. Coordination of endoplasmic reticulum and mRNA localization to the yeast bud. *Curr Biol.* 2006; 16(15):1538-43

Schuchardt I., Assmann D., Thines E., Schuberth C., Steinberg G. Myosin-V, Kinesin-1, and Kinesin-3 cooperate in hyphal growth of the fungus *Ustilago maydis*. *Mol Biol Cell.* 2005; 16(11):5191-201

Schuhmacher J.S., Dieck S.T., Christoforidis S., Landerer C., Gallesio J.D., Lena., Hersemann S.S., Schäfer R., Giner A., Toth-Petroczy A., Kalaidzidis Y., Bohnsack K.E., Bohnsack M.T., Schuman E.M., Zerial M. The Rab5 effector FERRY links early endosomes with mRNA localization. *Mol Cell.* 2023; 83(11):1839-1855.e13

Shattuck J.E., Paul K.R., Cascarina S.M., Ross E.D. The prion-like protein kinase Sky1 is required for efficient stress granule disassembly. *Nat Commun.* 2019; 10(1):3614

Sheth U and Parker R. Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science.* 2003; 300(5620):805-8

Steinberg G and Perez-Martin J. *Ustilago maydis*, a new fungal model system for cell biology. *Trends Cell Biol.* 2008; 18(2):61-7

Steinberg G. Motors in fungal morphogenesis: cooperation versus competition. *Curr Opin Microbiol.* 2011; 14(6):660-7

Sun N.-H., Chen D.-Y., Ye L.-P., Sheng G., Gong J.-J., Chen B.-H., Lu Y.-M., Han F. CRISPR-

Sunspot: Imaging of endogenous low-abundance RNA at the single-molecule level in live cells. *Theranostics*. 2020; 10(24):10993-11012

Suzuki K., Tanaka M., Konno Y., Ichikawa T., Ichinose S., Hasegawa-Shiro S., Shintani T., Gomi K. Distinct mechanism of activation of two transcription factors., AmyR and MalR., involved in amylolytic enzyme production in *Aspergillus oryzae*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2015; 99(4):1805-15

Tada S., Gomi K., Kitamoto K., Takahashi K., Tamura G., Hara S. 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*. 1991; 229(2):301-6

Takahara T and Maeda T. Transient sequestration of TORC1 into stress granules during heat stress. *Mol Cell*. 2012; 47(2):242-52

Takizawa P.A and Vale R.D. The myosin motor., Myo4p., binds Ash1 mRNA via the adapter protein., She3p. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97(10):5273-8

Tanaka M and Gomi K. Induction and Repression of Hydrolase Genes in *Aspergillus oryzae*. *Front Microbiol*. 2021; 12:677603

Tanaka M, Zhang S, Sato S, Yokota J, Sugiyama Y, Kawarasaki Y, Yamagata Y, Gomi K, Shintani T. Physiological ER stress caused by amylase production induces regulated Ire1-dependent mRNA decay in *Aspergillus oryzae*. *Commun Biol*. 2023; 6(1):1009

Tanaka M., Ichinose S., Shintani T., Gomi K. Nuclear export-dependent degradation of the carbon catabolite repressor CreA is regulated by a region located near the C-terminus in *Aspergillus oryzae*. *Mol Microbiol*. 2018; 110(2):176-190

Tanaka M., Shintani T., Gomi K. Unfolded protein response is required for *Aspergillus oryzae* growth under conditions inducing secretory hydrolytic enzyme production. *Fungal Genet Biol*. 2015; 85:1-6

Togo Y., Higuchi Y., Katakura Y., Takegawa K. Early endosome motility mediates α -amylase production and cell differentiation in *Aspergillus oryzae*. *Sci Rep*. 2017; 7(1):15757

Tominaga M., Lee Y.-H., Hayashi R., Suzuki Y., Yamada O., Sakamoto K., Gotoh K., Akita O. Molecular analysis of an inactive aflatoxin biosynthesis gene cluster in *Aspergillus oryzae* RIB strains. *Appl Environ Microbiol*. 2006; 72:484-90

Tsuchiya K., Tada S., Gomi K., Kitamoto K., Kumagai C., Jigami Y., Tamura G. High level expression of the synthetic human lysozyme gene in *Aspergillus oryzae*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1992; 38:109-14

Tutucci E., Maekiniemi A., Snoep S.L., Seiler M., van Rossum K., van Niekerk D.D., Savakis P., Zarnack K., Singer R.H. Cyclin CLB2 mRNA localization determines efficient protein synthesis to orchestrate bud growth and cell cycle progression. *BioRxiv.* 2022; Preprint

Tutucci E., Vera M., Biswas J., Garcia J., Parker R., Singer R.H. An improved MS2 system for accurate reporting of the mRNA life cycle. *Nat Methods.* 2018; 15(1):81-89

Verdín J., Sánchez-León E., Rico-Ramírez A.M., Martínez-Núñez L., Fajardo-Somera R.A., Riquelme M. Off the wall: The rhyme and reason of *Neurospora crassa* hyphal morphogenesis. *Cell Surf.* 2019; 5: 100020.

Viotti C. ER to Golgi-Dependent Protein Secretion: The Conventional Pathway. *Methods Mol Biol.* 2016; 1459:3-29

Watanabe J., Tanaka H., Mogi Y., Yamazaki T., Suzuki K., Watanabe T., Yamada O., Akita O. Loss of *Aspergillus oryzae amyR* function indirectly affects hemicellulolytic and cellulolytic enzyme production. *J Biosci Bioeng.* 2011; 111(4):408-13

Wedlich-Söldner R., Straube A., Friedrich M.W., Steinberg G. A balance of KIF1A-like kinesin and dynein organizes early endosomes in the fungus *Ustilago maydis*. *EMBO J.* 2002; 21(12):2946-57

Wheeler J.R., Matheny T., Jain S., Abrisch R., Parker R. Distinct stages in stress granule assembly and disassembly. *Elife.* 2016; 5:e18413

Whitney P.H., Shrestha B., Xiong J., Zhang T., Rushlow C.A. Shadow enhancers modulate distinct transcriptional parameters that differentially effect downstream patterning events. *Development.* 2022; 149(21):dev200940

Williams T.D., Cacioppo R., Agrotis A., Black A., Zhou H., Rousseau A. Actin remodelling controls proteasome homeostasis upon stress. *Nat Cell Biol.* 2022; 24(7):1077-1087

Woźniak M.J., Bola B., Brownhill K., Yang Y.-C., Levakova V., Allan V.J. Role of kinesin-1 and cytoplasmic dynein in endoplasmic reticulum movement in VERO cells. *J Cell Sci.* 2009 Jun 15;122(Pt 12):1979-89

Youn J.-Y., Dyakov B.J.A., Zhang J., Knight J.D.R., Vernon R.M., Forman-Kay J.D., Gingras A.-C. Properties of Stress Granule and P-Body Proteomes. *Mol Cell*. 2019; 76(2):286-294

Zekert N and Fischer R. The *Aspergillus nidulans* kinesin-3 UncA motor moves vesicles along a subpopulation of microtubules. *Mol Biol Cell*. 2009 Jan;20(2):673-84

Zhang J., Zhuang L., Lee Y., Abenza J.F., Peñalva M.A., Xiang X. The microtubule plus-end localization of *Aspergillus* dynein is important for dynein-early-endosome interaction but not for dynein ATPase activation. *J Cell Sci*. 2010; 123(Pt 20):3596-604

Zhang L., Si Q., Yang K., Zhang W., Okita T.W., Tian L. mRNA Localization to the Endoplasmic Reticulum in Plant Endosperm Cells. *Int J Mol Sci*. 2022; 23(21):13511

Zhang S., Ban A., Ebara N., Mizutani O., Tanaka M., Shintani T., Gomi K. Self-excising Cre/mutant lox marker recycling system for multiple gene integrations and consecutive gene deletions in *Aspergillus oryzae*. *J Biosci Bioeng*. 2017; 123(4):403-411

VI. 謝辞

本研究に際しご指導ご鞭撻を賜りました九州大学大学院農学研究院発酵化学研究室の竹川薫教授、樋口裕次郎准教授、博士論文副査を御担当いただきました九州大学大学院農学研究院植物栄養学研究室の松岡健教授に心より感謝申し上げます。

qRT-PCR 解析にて大変お世話になりました九州大学大学院農学研究院細胞制御工学研究室の片倉喜範教授、MS2 system の確立に際しプラスミド (pANPXP-Cre) を分譲していただきました東北大学大学院農学研究科生物産業創成科学専攻発酵微生物学寄附講座の五味勝也教授、THUNDER imaging system による顕微鏡解析にて大変お世話になりました九州大学大学院農学研究院研究教育支援センター技術室生命科学ユニットの奥川友紀様に心より感謝申し上げます。また、次世代研究者挑戦的研究プログラム (No. JPMJSP2136) にて研究費等を支援して頂いた国立研究開発法人科学技術振興機構に心より感謝申し上げます。

最後に博士論文研究および作成にあたり、多くの実験でサポートしていただきました技術専門職員の松永恵美子様、技術補佐員の島幸江様、発酵化学研究室の皆様に心より感謝申し上げます。