

Cellular biological study on mRNA expression mechanisms depending on culture conditions in *Aspergillus oryzae*

サトンデウィシット, パコーンスウィット

<https://hdl.handle.net/2324/7396299>

出版情報 : Kyushu University, 2025, 博士 (農学), 課程博士
バージョン :

権利関係 : Public access to the fulltext file is restricted for unavoidable reason (3)



氏 名	パコーンスウィット サトンデウィシット			
論 文 名	Cellular biological study on mRNA expression mechanisms depending on culture conditions in <i>Aspergillus oryzae</i> (黄麹菌における培養条件に依存した mRNA 発現メカニズムの細胞生物学的研究)			
論文調査委員	主 査	九州大学	准教授	樋口 裕次郎
	副 査	九州大学	教 授	竹川 薫
	副 査	九州大学	教 授	松岡 健

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* は、日本酒、味噌、醤油などの日本の伝統的な発酵・醸造産業で利用されてきた糸状菌であり、有用な加水分解酵素を安全にかつ多量に分泌する能力を持つ。酵母などの単細胞真菌とは異なり、黄麹菌は複数の核を有する菌糸体からなる多核多細胞生物である。これまでに黄麹菌においても、分子細胞生物学的にタンパク質分泌機構の研究がなされてきたが、細胞の構造的複雑性ゆえに、時空間的な分子制御機構に関しては未解明な点が多い。特に、黄麹菌を穀類や豆類といった固体基質で生育させる固体培養においては、液体培養に比べて酵素の分泌生産能が高いことが知られているが、酵素をコードする遺伝子の mRNA 発現機構の詳細についてはわかっていない。また黄麹菌においては、タンパク質の高分泌生産時において、小胞体ストレスが誘導されているという報告があるが、その際の mRNA 発現制御については明らかにされていない。そうした背景の下、本研究では黄麹菌において培養条件依存的に mRNA が発現し細胞内で局在するメカニズムについて、細胞生物学的な解析を行っている。

最初に、液体培養では発現せず、固体培養特異的に発現することが知られているグルコアミラーゼをコードする *glaB* 遺伝子を解析対象に、生細胞において mRNA 可視化を可能にする MS2 システムを黄麹菌に導入している。蛍光顕微鏡による解析の結果、*glaB* mRNA 由来のドット様の蛍光シグナルが細胞質に観察され、これらは液体培養では見られず、 α 化米を用いた固体培養において観察されることを確認している。

次に、さまざまな培養条件下での *glaB* mRNA の発現を蛍光顕微鏡により解析している。まず、液体培地に α 化米を入れて培養した液体麹培養において、*glaB* mRNA の発現を確認している。さらに、固体培養のどのような要因が *glaB* の発現を誘導するのかを検討している。そして、実際の米麹培養を模した高温、低水分活性、物理的障壁によるストレス環境が、液体条件下でも *glaB* mRNA の発現を誘導することを確認している。以上の結果から、固体培養特異的な mRNA 発現の分子機構を明らかにする上での基盤となる解析手法の提示に至っている。

さらに、黄麹菌において小胞体ストレス誘導時に発現され、小胞体シャペロンをコードする *bipA* 遺伝子を解析対象に MS2 システムを適用することに成功している。そして、小胞体ストレスを誘導するジチオスレイトール (DTT) 処理により、実際に *bipA* mRNA に由来するドット様蛍光シグナルが細胞質に観察されることを確認している。また、異なる濃度で DTT 処理を実施した結果、1 mM の濃度で最も高い *bipA* mRNA 発現誘導を見出している。DTT 処理後の時間経過に伴う発現を解析したところ、*bipA* mRNA の存在量が DTT 処理後の 1 時間でピークに達し、3 時間後には通常レベル

まで低下することを明らかにしている。さらに、1 時間の DTT 処理後に DTT を除去すると、*bipA* mRNA は 1.5 時間の間に速やかに分解されていくことが示された。こうした結果から、小胞体ストレスに応答して mRNA 存在量を制御する機構の存在を提示している。

続いて DTT 処理後の *bipA* mRNA の細胞内局在を解析した結果、菌糸多細胞の基部から先端まで広く分布することを示している。また、小胞体マーカーでトランスロコンである AoSec61 と微小管マーカーで α -チューブリンである AtuA との共局在解析により、DTT による小胞体ストレス下で *bipA* mRNA が小胞体膜および微小管と共局在することを示している。さらに、DTT 非存在下では、微小管重合阻害剤であるノコダゾール処理により *bipA* mRNA の長距離移動が有意に抑制されることから、微小管を介した輸送が示唆されている。一方で、DTT 処理により *bipA* mRNA の発現を誘導すると、ノコダゾール処理の有無にかかわらず *bipA* mRNA の動態が見られなくなることを観察している。そこで、*bipA* mRNA の動態と翻訳状態との関連を解析する目的で翻訳阻害剤であるシクロヘキシミド処理を行ったところ、移動している *bipA* mRNA のドット数が有意に増加したことから、静止している *bipA* mRNA は翻訳状態にあることを示している。このように、小胞体ストレスを生細胞においてリアルタイムで可視化解析するための手法を提示している。

以上要するに、本研究は黄麹菌において、培養条件依存的に mRNA が発現し局在するメカニズムについて細胞生物学的に明らかにしている。特に、産業上重要な黄麹菌の固体培養や分泌生産時に誘導される小胞体ストレス時における mRNA 発現機構について解明しており、これらの研究内容は応用微生物学および分子細胞生物学の発展に寄与する価値ある業績と認める。

よって、本研究者は博士（農学）の学位を得る資格を有するものと認める。