

The 22<sup>nd</sup> Conference on

# Fungal Genetics

and

# Molecular Biology

第 22 回糸状菌分子生物学コンファレンス

2023 年 11 月 21 - 22 日

あわぎんホール

パークウェストン

糸状菌分子生物学研究会

<http://www.biosci.osakafu-u.ac.jp/fmbsj/>

## 目次

コンファレンスプログラム	2
会場案内	3
発表演題および講演時間	5
特別講演要旨	20
シンポジウム要旨	23
口頭発表講演要旨	35
ポスター発表講演要旨	44
発表者索引	98
糸状菌分子生物学研究会会則	102
糸状菌分子生物学研究会運営委員名簿	
第 22 回糸状菌分子生物学コンファレンス実行委員	103
糸状菌遺伝子研究会賛助会員	104

## 第 22 回糸状菌分子生物学コンファレンス

日時：2023年11月21日(火)-22日(水)

会場：あわぎんホール（徳島市）

主催：糸状菌分子生物学研究会

協賛：糸状菌遺伝子研究会，徳島化学工学懇話会

### 11月21日（火）

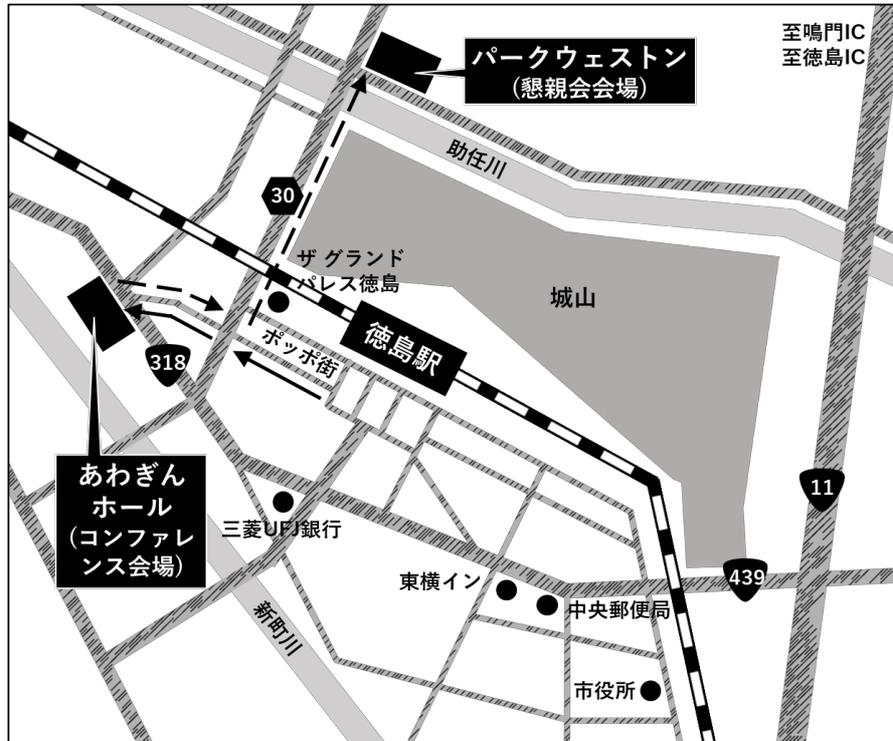
- 11:00 – 受付
- 12:00 – 12:05 開会の辞
- 12:05 – 13:35 シンポジウム（S-1,-2,-3）
- 13:35 – 13:45 休憩
- 13:45 – 14:45 シンポジウム（S-4,-5）
- 14:50 – 16:20 ポスター発表（奇数）
- 16:30 – 17:30 特別講演（有江 力 先生・東京農工大学）
- 18:30 – 20:30 懇親会（パークウエストン）

### 11月22日（水）

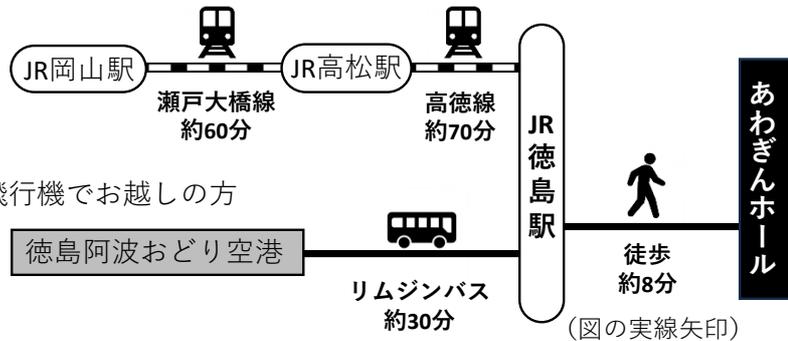
- 9:15 – 受付
- 9:30 – 11:00 ポスター発表（偶数）
- 11:00 – 12:00 昼食
- 12:00 – 14:00 口頭発表（O-1～O-10）
- 14:00 – 14:15 休憩
- 14:15 – 15:51 口頭発表（O-11～18）
- 16:00 – 16:45 総会・表彰式
- 16:45 – 16:50 閉会の辞

# 会場案内

## あわぎんホールおよび周辺案内図



### ■電車でお越しの方 (JR)



### ■飛行機でお越しの方



### ■お車でお越しの方

※あわぎんホールには駐車場はございません。  
車でお越しの方は県営地下駐車場 (有料) 等をご利用ください。

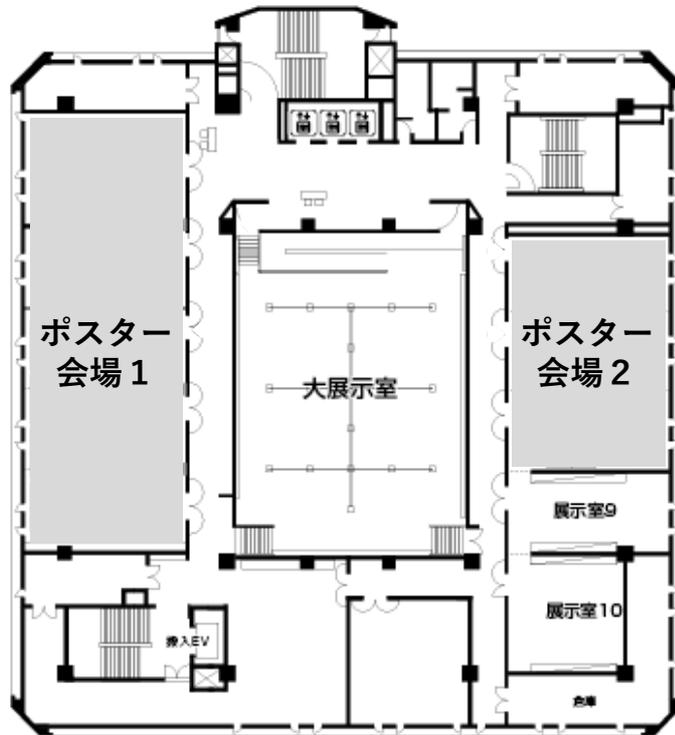
あわぎんホールHP <http://www.kyoubun.or.jp/>

### ■あわぎんホール -> パークウェストン

徒歩で約11分 (図の破線矢印)

# あわぎんホール平面図

3F



4F



**発表演題および講演時間**

**11月21日(火) 16:30 - 17:30**

**特別講演**

[座長：堀内裕之(東京大学)]

「土壌伝染性子囊菌 *Fusarium oxysporum* の発病・病原性分化機構解析の現状」

東京農工大学 大学院農学研究院

有江 力

**11月21日(火) 12:05 - 14:45**

**シンポジウム**

「遺伝子組換えを用いない微生物育種」

[座長：佐野元昭(S1,2,3), 石田博樹(S4,5)]

**12:05-12:35**

**S-1** 「次世代の麹菌を育種するために～黄麹菌のゲノム編集技術開発～」

独立行政法人 酒類総合研究所

織田 健

**12:35-13:05**

**S-2** 「シンクロトロン光照射による紅麹菌の育種改良とその変異特性解析」

佐賀大学農学部・鹿児島大学大学院連合農学研究科

後藤 正利

**13:05-13:35**

**S-3** 「GMDによる迅速・低コストな汎用高生産変異株スクリーニング技術」

金沢工業大学・ゲノム生物学研究所

町田 雅之

**13:45-14:15**

**S-4** 「麹菌 *Aspergillus oryzae* の育種技術とその応用」

月桂冠株式会社 総合研究所

戸所 健彦

**14:15-14:45**

**S-5** 「醤油麹菌キシラン分解活性低下変異株の育種と淡口醤油への応用」

ヒガシマル醤油株式会社 研究所

眞岸 範浩

口頭発表 (O-1~O-10) 11月22日(水) 12:00 - 14:00

[座長: 坂本裕一(O-1,2), 鈴木聡(O-3,4), 加藤直樹(O-5,6,7), 寺内裕貴(O-8,9,10)]

- 12:00 O-1 転写因子 AmyR の活性化に関わるコウジカビの新規イソマルトースセンサー遺伝子の同定  
ジョン ダミン, 渡嘉敷直杏, 新谷智子, 新谷尚弘, 五味勝也 (東北大学・農学研究科)
- 12:12 O-2 麹菌を宿主とする *in vivo* クローニング法による天然物生合成経路の迅速再構築の検討  
青木翔吾, 尾崎太郎, 菅原章公, 森下陽平, 浅井禎吾 (東北大院薬)
- 12:24 O-3 麹菌における異種天然化合物の生産性に関与する新規制御因子の同定  
吉岡弘史<sup>1</sup>, 原中実穂<sup>1</sup>, 齋藤直也<sup>1</sup>, 片山琢也<sup>1,2</sup>, 南篤志<sup>3</sup>, 及川英秋<sup>4</sup>, 丸山潤一<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>東大院・農生科・応生工, <sup>2</sup>東大・微生物連携機構, <sup>3</sup>北大院・理, <sup>4</sup>中国・五邑大)
- 12:36 O-4 ヒラタケの担子胞子生産に必須な真正担子菌特異的タンパク質リン酸化酵素遺伝子の同定  
小深田剛士<sup>1</sup>, 山崎風雅<sup>1</sup>, 中沢威人<sup>1</sup>, 菅野純子<sup>1</sup>, Minji Oh<sup>2</sup>, 河内護之<sup>1</sup>, 坂本正弘<sup>1</sup>, 本田与一<sup>1</sup> (<sup>1</sup>京大院・農, <sup>2</sup>RDA, the Republic of Korea)
- 12:48 O-5 制限酵素により誘導されるゲノム再編成を利用した糸状菌休眠遺伝子活性化法の開発  
天井涼太<sup>1</sup>, 森下陽平<sup>1</sup>, 河野宏光<sup>2</sup>, 尾崎太郎<sup>1</sup>, 菅原章公<sup>1</sup>, 太田邦史<sup>2</sup>, 浅井禎吾<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>東北大院・薬, <sup>2</sup>東大院・総合文化)
- 13:00 O-6 糸状菌 *Aspergillus nidulans* の菌糸生長時における脂質動態の解析  
岩間亮<sup>1,2,6</sup>, 岡橋伸幸<sup>3,6</sup>, 加藤遼<sup>4,5,6</sup>, 奥崎紗矢<sup>4,5</sup>, 楊淳児<sup>1</sup>, 矢野隆章<sup>4,5</sup>, 田中拓男<sup>4,5</sup>, 松田史生<sup>3</sup>, 堀内裕之<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>東大院・農生科・応生工, <sup>2</sup>東大・微生物連携, <sup>3</sup>阪大・院情報, <sup>4</sup>徳島大・pLED, <sup>5</sup>理研, <sup>6</sup>JST ACT-X)
- 13:12 O-7 *Phanerochaete chrysosporium* におけるヘムによる解糖系, TCA 回路の制御機構の解明  
釣上竜河<sup>1</sup>, 三浦大典<sup>2</sup>, 加藤雅士<sup>1</sup>, 志水元亨<sup>1</sup> (<sup>1</sup>名城大・農, <sup>2</sup>産総研・バイオメディカル研究部門)
- 13:24 O-8 アカパンカビにおける *exo1* 欠損による短寿命表現型の原因の考察  
柳澤健斗<sup>1</sup>, 大竹花織<sup>2</sup>, 吉原亮平<sup>1</sup>, 畠山晋<sup>1</sup>, 田中秀逸<sup>1</sup> (<sup>1</sup>埼玉大・院理工, <sup>2</sup>埼玉大・理・生体制御学)
- 13:36 O-9 麹菌 *Aspergillus oryzae* の細胞融合を制御する新規因子の同定  
片山琢也, 丸山潤一 (東大院・農生科・応生工, 東大・微生物連携機構)

13:48 O-10 *Aspergillus fumigatus* における GPI アンカー糖鎖の生理的意義

門岡千尋<sup>1</sup>, 田中大<sup>2</sup>, 藤田盛久<sup>3</sup>, 岡拓二<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>崇城大・生物生命, <sup>2</sup>東北医薬大・薬,  
<sup>3</sup>岐阜大・iGCORE)

口頭発表 (O-11~O-18) 11月22日(水) 14:15 - 15:51

[座長: 上地敬子(O-11,12), 沼本穂(O-13,14,15), 辻健也(O-16,17,18)]

- 14:15 O-11 黄麹菌 *Aspergillus oryzae* の菌体内メタロエンドペプチダーゼ oryzalysin の局在解析  
井上実希, 小川翠, 北浦健太郎, 森山裕充, 佐々木信光, 田中瑞己, 山形洋平 (農工大院・応生化)
- 14:27 O-12 核酸系うまみ成分分解能の低下した麹菌株における酸性ホスファターゼの特性解析  
酒井香奈江<sup>1</sup>, 鈴木忠宏<sup>2</sup>, 堀井悠一郎<sup>3</sup>, 和久豊<sup>4</sup>, 楠本憲一<sup>1</sup> (1 阪大院・工, 2 農研機構, 3 新潟食品研, 4 (株) ビオック)
- 14:39 O-13 細菌-糸状菌間相互作用におけるトランスクリプトームの比較解析  
戸田征宏<sup>1</sup>, Gayan Abeyasinghe<sup>1</sup>, 菅澤威仁<sup>2</sup>, 高谷直樹<sup>1,3</sup>, 竹下典男<sup>1,3</sup> (1 筑波大・生命環境, 2 筑波大・医学医療, 3 筑波大・MiCS)
- 14:51 O-14 麹菌における同株のコロニー間で生じる増殖抑制に関与する遺伝子の同定  
浜中祐弥<sup>1</sup>, 片山琢也<sup>1,2</sup>, 黒田裕樹<sup>3</sup>, 丸山潤一<sup>1,2</sup> (1 東大院・農生科・応生工, 2 東大・微生物連携機構, 3 慶應大・環境情報)
- 15:03 O-15 *Aspergillus aculeatus* において形態形成制御因子はセロビオースに応答した遺伝子発現誘導を制御する  
志賀結衣<sup>1</sup>, 菊矢咲季<sup>1</sup>, 川口剛司<sup>1,2</sup>, 谷修治<sup>1,2</sup> (阪府大・生環科<sup>1</sup>, 阪公大院・農<sup>2</sup>)
- 15:15 O-16 灰色かび病菌 *Botrytis cinerea* が植物由来の抗菌物質を代謝・排出する機構に関する研究  
芦田晃<sup>1</sup>, 黒柳輝彦<sup>1</sup>, バラサグ サラリア アブリエル<sup>1</sup>, 福島啓太<sup>1</sup>, 鈴木孝征<sup>2</sup>, 田中愛子<sup>1</sup>, 佐藤育男<sup>1</sup>, 千葉壮太郎<sup>1</sup>, 小鹿一<sup>1</sup>, 竹本大吾<sup>1</sup> (1 名大院・生命農学, 2 中部大・応用生物)
- 15:27 O-17 植物葉圏の非病原性細菌 *Chitinophaga* sp. はアブラナ科炭疽病菌の病原性を促進する  
田中香帆<sup>1</sup>, 田中智佳子<sup>1</sup>, 石田史子<sup>1</sup>, 山口美幸<sup>1</sup>, 竹下典男<sup>2</sup>, 田中茂幸<sup>1</sup> (1 摂南大・農, 2 筑波大・MiCS)
- 15:39 O-18 植物病原性糸状菌 *Fusarium oxysporum* の微小空間における伸長と病原性の関連  
酒造ひなた<sup>1</sup>, 井谷綾花<sup>1</sup>, 山本里穂<sup>1</sup>, 高谷直樹<sup>1</sup>, 佐藤良勝<sup>2</sup>, Antonio Di Pietro<sup>3</sup>, 竹下典男<sup>1</sup> (1 筑波大・MiCS, 2 名古屋大・ITbM, 3 コルドバ大)

## ポスター発表

11月21日(火) 14:50 – 16:20 (奇数番号)

11月22日(水) 9:30 – 11:00 (偶数番号)

(\*は学生)

- \* P-1 ヒラタケの担子胞子生産に必須な真正担子菌特異的タンパク質リン酸化酵素遺伝子の同定  
小深田剛士<sup>1</sup>, 山崎風雅<sup>1</sup>, 中沢威人<sup>1</sup>, 菅野純子<sup>1</sup>, Minji Oh<sup>2</sup>, 河内護之<sup>1</sup>, 坂本正弘<sup>1</sup>, 本田与一<sup>1</sup> (1京大院・農, 2RDA, the Republic of Korea)
  
- \* P-2 *Aspergillus fumigatus* の真菌型ガラクトマンナン生合成に関わる $\alpha$ -1,2-マンノース転移酵素 CmsA の遺伝子破壊による菌糸成長抑制を抑圧する変異株の変異点解析  
岸田凜太郎<sup>1</sup>, 門岡千尋<sup>1</sup>, 田中大<sup>2</sup>, 平大輔<sup>1</sup>, 岡拓二<sup>1</sup> (1崇城大院・工, 2東北医薬大・薬)
  
- \* P-3 温度測定法による麹菌菌糸分散株の培養液の混合時間の評価  
薄田隼弥<sup>1</sup>, 武藤清明<sup>1</sup>, 市川暉<sup>1</sup>, 宮澤拳<sup>1</sup>, 吉見啓<sup>2,3</sup>, 加藤好一<sup>4</sup>, 阿部敬悦<sup>1,3</sup> (1東北大院・農, 2京大院・地環学, 3東北大・未来研, 4佐竹マルチミクス・攪拌研)
  
- \* P-4 鯉節カビに内在するマイコウイルスの探索  
武馬聖二<sup>1,2</sup>, 浦山俊一<sup>3,4</sup>, 周防玲<sup>1</sup>, 糸井史朗<sup>1</sup>, 岡田茂<sup>5</sup>, 二宮章洋<sup>5</sup> (1日大・生物資源, 2東大・農, 3筑波大・生命環境, 4筑波大・MiCS, 5東大院・農生科)
  
- \* P-5 黄麹菌における光遺伝学的手法を用いた有用物質高生産の試み  
福原遼一郎, 井上慶士, 河西建輔, 竹川薫, 樋口裕次郎 (九大院・生資環・生命機能)
  
- \* P-6 転写因子 AmyR の活性化に関わるコウジカビの新規イソマルトースセンサー遺伝子の同定  
ジョン ダミン, 渡嘉敷直杏, 新谷智子, 新谷尚弘, 五味勝也 (東北大学・農学研究科)
  
- \* P-7 A comprehensive examination of heterokaryon incompatibility and strain phylogenetic diversity in the industrial filamentous fungus *Aspergillus oryzae*  
Yahong Zou<sup>1</sup>, Chan Lu<sup>1</sup>, Takuya Katayama<sup>1,2</sup>, Kazuhiro Iwashita<sup>3</sup>, Jun-ichi Maruyama<sup>1,2</sup>  
(1Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, 2CRIIM, The Univ. of Tokyo, 3NRIB)
  
- \* P-8 麹菌異種発現系によるアマトキシシン類の生合成研究  
根岸透子, 尾崎太郎, 菅原章公, 森下陽平, 浅井禎吾 (東北大院薬)
  
- \* P-9 麹菌を宿主とする *in vivo* クローニング法による天然物生合成経路の迅速再構築の検討  
青木翔吾, 尾崎太郎, 菅原章公, 森下陽平, 浅井禎吾 (東北大院薬)

- \* P-10 有用二次代謝産物生産糸状菌 *Humicola nigrescens* におけるゲノム編集系の確立  
堀野翔真, 荒添貴之, 鎌倉高志 (東理大院・創域理工)
- \* P-11 黄麹菌 ΔAG-GAG 株を宿主としたニゲラン合成遺伝子多コピー導入株の解析  
阿部多恵<sup>1</sup>, 平田風子<sup>1</sup>, 與古田佳世<sup>1</sup>, 阿部啓悦<sup>2</sup>, 外山博英<sup>1</sup>, 上地敬子<sup>1</sup>, 水谷治<sup>1</sup> (1琉球大院・農, 2東北大院・農)
- \* P-12 黒麹菌ニゲラン合成酵素遺伝子への部位特異的変異導入がニゲラン合成へ与える影響  
平田風子<sup>1,2</sup>, 水谷治<sup>1,2</sup>, 平良東紀<sup>1,2</sup>, 上地敬子<sup>1,2</sup> (1鹿児島大・連合農学研究科, 2琉球大・農学部)
- \* P-13 麹菌における異種天然化合物の生産性に関与する新規制御因子の同定  
吉岡弘史<sup>1</sup>, 原中実穂<sup>1</sup>, 齋藤直也<sup>1</sup>, 片山琢也<sup>1,2</sup>, 南篤志<sup>3</sup>, 及川英秋<sup>4</sup>, 丸山潤一<sup>1,2</sup> (1東大院・農生科・応生工, 2東大・微生物連携機構, 3北大院・理, 4中国・五邑大)
- P-14 Searching the possible reason of different growth in RIB40 and RIB143 responding to humic acid  
Liyun Liu, Kanae Sakai, Takumi Tanaka, Ken-Ichi Kusumoto  
(Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)
- P-15 麹菌 *Aspergillus oryzae* におけるドロップレット培養とセルソーターを利用した α-アミラーゼ高発現株の取得検討  
渡邊夏仁<sup>1</sup>, 戸所健彦<sup>1</sup>, 志田洋介<sup>2</sup>, 小笠原渉<sup>2</sup>, 石田博樹<sup>1</sup> (1月桂冠・総研, 2長岡技科大・生物)
- P-16 *Aspergillus oryzae* の酵素発現への光照射の影響  
鈴木聡<sup>1</sup>, 稲岡隆史<sup>1</sup>, 楠本憲一<sup>2</sup> (1農研機構・食品研, 2阪大院・工)
- P-17 麹菌群総合ゲノムデータベース(CAoGDX)の開発について  
片岡涼輔<sup>1</sup>, シャロン マリー バヘナ-ガリド<sup>1</sup>, 小林拓嗣<sup>1</sup>, 織田健<sup>1</sup>, 岩下和裕<sup>1,2</sup> (1独立行政法人酒類総合研究所, 2広島大学統合生命科学研究科)
- P-18 白麹菌におけるクエン酸排出輸送体 CexA ホモログの機能解析  
西谷篤<sup>1,2</sup>, 平松健太郎<sup>3</sup>, 門岡千尋<sup>4</sup>, 廣島杏香<sup>3</sup>, 澤田和敬<sup>5</sup>, 奥津果優<sup>3</sup>, 吉崎由美子<sup>1,3</sup>, 高峯和則<sup>1,3</sup>, 後藤正利<sup>6</sup>, 玉置尚徳<sup>1,3</sup>, 二神泰基<sup>1,3</sup> (1鹿大・連農, 2鹿大・先科セ, 3鹿大・農, 4崇城大, 5佐工技セ, 6佐大・農)
- P-19 遊離 DGLA 生産麹菌変異株における *tkl* 過剰発現化と *agsB* ノックアウトによる生産向上  
玉野孝一<sup>1,2</sup>, 中井汐里<sup>3</sup>, 高山晴香<sup>1</sup>, 今井泰彦<sup>4</sup> (1産総研・生物プロセス研究部門, 2産総研・CBBDOIL, 3北海道ハイテク専門学校, 4野田産業科学研究所)

- P-20** シイタケにおける品種間ゲノム比較  
坂本裕一, 佐藤志穂, 吉田裕史, 及川香梨, 清水元樹 (岩手生工研)
- P-21** 野生型 *Aspergillus section Nigri* 糸状菌を用いた分散株取得法の検討  
渡嘉敷直杏, 五味勝也 (東北大院・農)
- P-22** 多様な環境分離菌株を用いた屋内環境の真菌叢解析技術構築  
加藤晴朗, 重宗尚文, 矢野剛久 (花王株式会社・安全性科学研究所)
- \* **P-23** 黄麹菌における *glaA* mRNA の細胞内局在制御  
守田湧貴, 竹川薫, 樋口裕次郎 (九大院・生資環・生命機能)
- \* **P-24** 原子間力顕微鏡による糸状菌 *Aspergillus nidulans* 細胞表層の観察手法の検討  
陳博宇<sup>1</sup>, 岩間亮<sup>1,2,4</sup>, Alexis Borowiak<sup>3</sup>, 菊池洋輔<sup>3</sup>, 宮澤佳甫<sup>3,4</sup>, 福間剛士<sup>3</sup>, 堀内裕之<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>東大院・農生科・応生工, <sup>2</sup>東大・微生物連携, <sup>3</sup>金沢大・WPI-NanoLSI, <sup>4</sup>JST ACT-X)
- \* **P-25** 麹菌における核を丸ごと分解するヌクレオファジーの分子機構の解析  
橋本真宇<sup>1</sup>, 山口誉登<sup>1</sup>, 木村聡<sup>2</sup>, 有岡学<sup>1,3</sup> (<sup>1</sup>東大院・農生科・応生工, <sup>2</sup>東大院農・技術基盤センター, <sup>3</sup>東大・CRIIM,)
- \* **P-26** 麹菌における核の増加と菌糸形態および酵素生産性の関連  
井谷綾花<sup>1</sup>, 一ノ瀬恵<sup>1</sup>, 細田柊志<sup>1</sup>, 高谷直樹<sup>1</sup>, 織田健<sup>2</sup>, 山下秀行<sup>3</sup>, 酒井香奈江<sup>4</sup>, 田中拓未<sup>4</sup>, 楠本憲一<sup>4</sup>, 竹下典男<sup>1</sup> (<sup>1</sup>筑波大・MiCS, <sup>2</sup>酒類研, <sup>3</sup>樋口松之助商店, <sup>4</sup>阪大院・工)
- \* **P-27** マイコウイルスの細胞外膜小胞 (EV) 産生誘導及び EV への内在化  
町谷和彦<sup>1</sup>, 浦山俊一<sup>2</sup>, 萩原大祐<sup>2</sup> (<sup>1</sup>筑波大・生物資源, <sup>2</sup>筑波大・生命環境系)
- \* **P-28** 黄麹菌における  $\beta$ -tubulin mRNA の可視化解析  
川富溪舟, 守田湧貴, 竹川薫, 樋口裕次郎 (九大院・生資環・生命機能)
- \* **P-29** 糸状菌 *Aspergillus nidulans* における PE 合成酵素遺伝子の欠失によるミトコンドリアの形態変化  
楊淳児<sup>1</sup>, 岩間亮<sup>1,2</sup>, 福田良一<sup>1,2</sup>, 堀内裕之<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>東大院・農生科・応生工, <sup>2</sup>東大・微生物連携)
- \* **P-30** 黄麹菌のゲノム編集時に生じる大規模欠失への非相同末端結合修復経路の関与について  
山崎鮎奈, 上元優, 森田ひづき, 渡嘉敷直杏, 外山博英, 水谷治 (琉球大院・農)

- \* P-31 **黄麹菌 *Aspergillus oryzae* おけるグルコシルセラミドの機能解析**  
 七反田和<sup>1</sup>, 福原遼一郎<sup>2</sup>, 守田湧貴<sup>2</sup>, 樋口裕次郎<sup>2</sup>, 竹川薫<sup>2</sup> ( <sup>1</sup>九大農・発酵化学, <sup>2</sup>九大院・生資環)
- \* P-32 **麹菌 *Aspergillus oryzae* における新規オートファジーレセプターの探索**  
 坂根巧, 武田陽一, 菊間隆志 (立命大院・生命科学)
- \* P-33 **麹菌が産生する細胞外膜小胞の複数の菌株による比較解析**  
 齊藤美緒<sup>1</sup>, 岩橋由佳<sup>1</sup>, 浦山俊一<sup>1,2</sup>, 萩原大祐<sup>1,2</sup> ( <sup>1</sup>筑波大・生命環境系, <sup>2</sup>MiCS)
- \* P-34 **アカパンカビにおける *exo1* 欠損による短寿命表現型の原因の考察**  
 柳澤健斗<sup>1</sup>, 大竹花織<sup>2</sup>, 吉原亮平<sup>1</sup>, 畠山晋<sup>1</sup>, 田中秀逸<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>埼玉大・院理工, <sup>2</sup>埼玉大・理・生体制御学)
- \* P-35 **麹菌における GPCR-Gα間相互作用の解析**  
 坂元勇月<sup>1</sup>, 有岡学<sup>1,2</sup> ( <sup>1</sup>東大院・農生科・応生工, <sup>2</sup>東大・CRIIM)
- \* P-36 **担子菌 *Coprinopsis cinerea* における栄養飢餓とオートファジーの関係**  
 北原昂希<sup>1</sup>, 麻田恭彦<sup>2</sup>, 渡邊彰<sup>2</sup> ( <sup>1</sup>香川大院・農, <sup>2</sup>香川大・農)
- P-37 ***Aspergillus oryzae* の生育に対しリグニンが及ぼす影響の解析**  
 田中拓未<sup>1</sup>, 劉利雲<sup>1</sup>, 酒井香奈江<sup>1</sup>, Sharon Marie Bahena-Garrido<sup>2</sup>, 山下秀行<sup>3</sup>, 岩下和裕<sup>2</sup>, 楠本憲一<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup>阪大院・工, <sup>2</sup>樋口松之助商店, <sup>3</sup>酒総研)
- P-38 ***Aspergillus fumigatus* における GPI アンカー糖鎖の生理的意義**  
 門岡千尋<sup>1</sup>, 田中大<sup>2</sup>, 藤田盛久<sup>3</sup>, 岡拓二<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>崇城大・生物生命, <sup>2</sup>東北医薬大・薬, <sup>3</sup>岐阜大・iGCORE)
- P-39 **麹菌 *Aspergillus oryzae* の細胞融合を制御する新規因子の同定**  
 片山琢也, 丸山潤一 (東大院・農生科・応生工, 東大・微生物連携機構)
- P-40 **黄麹菌 *Aspergillus oryzae* ハイドロフォビン *RolA* と *HypB* 破壊株の表現型の解析**  
 寺内裕貴<sup>1,2,4</sup>, 辻健也<sup>2</sup>, 星田尚司<sup>1,3</sup>, 赤田倫治<sup>1,3</sup>, 吉見啓<sup>2,4</sup>, 田中千尋<sup>2,4</sup>, 本田与一<sup>2</sup>, 河内護之<sup>2</sup> ( <sup>1</sup>山口大・中高温研, <sup>2</sup>京大院・農, <sup>3</sup>山口大院・創成科学, <sup>4</sup>京大院・地環学)
- \* P-41 **Influence of fermentation parameter to production of isoprimeverose-producing enzyme in genetically engineered *Aspergillus oryzae***  
 Baihaqqi Fahmi<sup>1</sup>, Suzuki Tomohiro<sup>1</sup>, Wakai Satoshi<sup>2,3</sup>, Kahar Prihardi<sup>1</sup>, Kondo Akihiko<sup>1,2</sup>, Ogino Chiaki<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup>Grad. Sch. Eng, Kobe Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., <sup>3</sup>JAMSTEC)

- \* P-42 *Aspergillus nidulans* が生産する主要なラムノガラクトツロナンリアーゼの構造と生理学的役割の  
解明  
鈴木裕満<sup>1</sup>, 亀山綾音<sup>1</sup>, 高須賀太一<sup>2</sup>, 堀千明<sup>3</sup>, 加藤雅士<sup>1</sup>, 志水元亨<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>名城大・農, <sup>2</sup>北  
大・農, <sup>3</sup>北大・地球環境科学)
- \* P-43 白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* 由来カフェ酸ジオキシゲナーゼの機能解析  
加藤大志<sup>1</sup>, 三浦大典<sup>2</sup>, 加藤雅士<sup>1</sup>, 志水元亨<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>名城大・農, <sup>2</sup>産総研・バイオメディカル研  
究部門)
- \* P-44 麹菌ハイドロフォビン RoIA の親水-疎水界面特異的な自己組織化現象の機構解明  
高橋尚央<sup>1</sup>, 寺内裕貴<sup>2</sup>, 田中拓未<sup>3</sup>, 吉見啓<sup>4</sup>, 藪浩<sup>5</sup>, 阿部敬悦<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>東北大院・農, <sup>2</sup>山口大・  
中高温研, <sup>3</sup>阪大院・工, <sup>4</sup>京大院・地環学, <sup>5</sup>東北大・AIMR)
- \* P-45 *Aspergillus nidulans* における新規  $\beta$ -D-ガラクトフラノシダーゼの同定と機能解析  
関口仁<sup>1</sup>, 山田久恵<sup>1</sup>, 豊田早紀<sup>1</sup>, 松永恵美子<sup>1</sup>, 渡邊真宏<sup>2</sup>, 樋口裕次郎<sup>1</sup>, 竹川薫<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>九大  
院・生資環・生命機能, <sup>2</sup>産業技術総合研究所)
- \* P-46 麹菌 *Aspergillus oryzae* 由来パラベンヒドロラーゼ AoPrbA の触媒ポケット近傍のアミノ酸置換  
によるタンナーゼ活性の獲得  
箱田倫子, 加藤智江, 塩野義人, 小関卓也 (山形大院・農)
- \* P-47 黄麹菌 *Aspergillus oryzae* の菌体内メタロエンドペプチダーゼ oryzalysin の局在解析  
井上実希, 小川翠, 北浦健太郎, 森山裕充, 佐々木信光, 田中瑞己, 山形洋平 (農工大院・応  
生化)
- \* P-48 アカパンカビ PNGase におけるアミノ酸置換が脱糖鎖機能に与える影響の検討  
山中晴加<sup>1</sup>, 鈴木匡<sup>2</sup>, 畠山晋<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>埼玉大・院, <sup>2</sup>糖鎖代謝生化研・理研和光)
- \* P-49 *Aspergillus nidulans* 由来新規 P450 還元酵素の機能解析  
小島才卓, 鈴木康太, 勝木希, 榊尾俊介, 志水元亨, 高谷直樹 (筑波大院・生命環境/ MiCS)
- \* P-50 キシログルカンの分解に関与する麹菌 *Aspergillus oryzae* 由来  $\alpha$ -フコシダーゼの同定  
島田尚季<sup>1</sup>, 亀山昭彦<sup>2</sup>, 松沢智彦<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>香川大・農, <sup>2</sup>産総研・細胞分子工学)
- P-51 麹菌のエンド・プロセッシブ型キシログルカナーゼ  
松沢智彦<sup>1</sup>, 中道優介<sup>2</sup>, 島田尚季<sup>1</sup>, 渡邊真宏<sup>2</sup> ( <sup>1</sup>香川大・農, <sup>2</sup>産総研・機能化学)
- P-52 黒麹菌細胞壁多糖ニゲランの分子量制御に関わる  $\alpha$ -グルカノトランスフェラーゼの解析  
上地敬子, 島袋雛, 平田風子, 水谷治, 平良東紀 (琉球大・農)

- P-53** 核酸系うまみ成分分解能の低下した麹菌株における酸性ホスファターゼの特性解析  
酒井香奈江<sup>1</sup>, 鈴木忠宏<sup>2</sup>, 堀井悠一郎<sup>3</sup>, 和久豊<sup>4</sup>, 楠本憲一<sup>1</sup> (1 阪大院・工, 2 農研機構, 3 新潟食品研, 4 (株) ビオック)
- \* **P-54** 固体培養特異的に発現する麹菌 *glbB* 遺伝子プロモーターの *AmyR* のシスエレメント  
青西洋平, 大沼司, 渡部昭, 新谷尚弘, 五味勝也 (東北大学院・農)
- \* **P-55** *Aspergillus aculeatus* において形態形成制御因子はセロピオースに応答した遺伝子発現誘導を制御する  
志賀結衣<sup>1</sup>, 菊矢咲季<sup>1</sup>, 川口剛司<sup>1,2</sup>, 谷修治<sup>1,2</sup> (1 阪府大・生環科, 2 阪公大院・農)
- \* **P-56** 真菌における dipeptidyl peptidase を介した酸化ストレス応答機構の解析  
中谷早希<sup>1</sup>, 遊亀翔太<sup>2</sup>, 川口剛司<sup>1,2</sup>, 谷修治<sup>1,2</sup> (1 大阪公大院・農, 2 阪府大院・生環科)
- \* **P-57** 細菌-糸状菌間相互作用におけるトランスクリプトームの比較解析  
戸田征宏<sup>1</sup>, Gayan Abeyasinghe<sup>1</sup>, 菅澤威仁<sup>2</sup>, 高谷直樹<sup>1,3</sup>, 竹下典男<sup>1,3</sup> (1 筑波大・生命環境, 2 筑波大・医学医療, 3 筑波大・MiCS)
- \* **P-58** 糸状菌における鉄代謝制御機構：転写制御因子 HapX と相互作用するタンパク質の機能解析  
三浦綾夏, 原崎茜蓮, 吾妻友貴, 小林吉生, 兒島孝明, 志水元亨, 加藤雅士 (名城大・農)
- \* **P-59** 麹菌における同株のコロニー間で生じる増殖抑制に関与する遺伝子の同定  
浜中祐弥<sup>1</sup>, 片山琢也<sup>1,2</sup>, 黒田裕樹<sup>3</sup>, 丸山潤一<sup>1,2</sup> (1 東大院・農生科・応生工, 2 東大・微生物連携機構, 3 慶應大・環境情報)
- \* **P-60** *Asergillus nidulans* におけるセルラーゼ遺伝子特異的転写因子 ClrB の機能ドメイン解析  
深田文香, 内田祐衣, 木村哲哉, 國武絵美 (三重大院・生資)
- \* **P-61** *Trichoderma reesei* における窒素制御とセルラーゼ生産の関係  
藤本健志<sup>1</sup>, 平沢大樹<sup>2</sup>, 志田洋介<sup>1</sup>, 小笠原渉<sup>1</sup> (1 長岡技大・物質生物, 2 都城高専・物質)
- \* **P-62** アカパンカビの交配に関わる遺伝子の探索  
吉野航, 一石昭彦 (東洋大院・生命科学)
- \* **P-63** 黄麹菌 PrtR の窒素源応答と活性化機構の解明  
沼澤里佳<sup>1</sup>, 田中優花子<sup>2</sup>, 西岡佐和子<sup>2</sup>, 辻遼太郎<sup>2</sup>, 伊藤喜之<sup>3</sup>, 田中瑞己<sup>1,2</sup>, 山形洋平<sup>1,2</sup>  
(1 農工大院・連農, 2 農工大院・応生化, 3 農工大・スマートコアファシリティー推進機構)

- \* P-64 アカパンカビ *rad-7*, *rad-16* 遺伝子の発現解析  
呂慧, 椎崎一宏, 一石昭彦 (東洋大院・生命科学)
- \* P-65 鯉節カビ *Aspergillus chevalieri* の生活環に関する遺伝子の解析  
平松健太郎<sup>1</sup>, 森一樹<sup>2</sup>, 門岡千尋<sup>3</sup>, 奥津果優<sup>1</sup>, 吉崎由美子<sup>1</sup>, 高峯和則<sup>1</sup>, 田代康介<sup>2</sup>, 玉置尚徳<sup>1</sup>, 二神泰基<sup>1</sup> (鹿児島大院・農林水産, <sup>2</sup>九大院・農, <sup>3</sup>崇城大・生物生命)
- \* P-66 一酸化窒素特異的な転写誘導を担う *Aspergillus nidulans* の転写因子の発見  
天久まどか, 榎尾俊介, 高谷直樹 (筑波大・生命環境・MiCS)
- P-67 担子菌ヒラタケの高セルロース分解活性変異株における原因遺伝子 *roc1* の同定  
中沢威人, 本田与一 (京大院・農)
- P-68 ウシグソヒトヨタケ *Coprinopsis cinerea* がもつ光受容体の特性  
伏見圭司<sup>1</sup>, 深澤茉愛<sup>2</sup>, 星野宏季<sup>2</sup>, 村口元<sup>3</sup>, 坂本裕一<sup>4</sup>, 成川礼<sup>2</sup> (神戸大・イノベ, <sup>2</sup>都立大・理学, <sup>3</sup>秋田県大・生物資源, <sup>4</sup>岩手生工研・生物資源)
- P-69 *Aspergillus* 糸状菌におけるアミラーゼ遺伝子発現を誘導する糖アナログの効果  
沼本穂<sup>1</sup>, 森山貴博<sup>2</sup>, 田邊理子<sup>2</sup>, 寄立麻琴<sup>2</sup>, 平井剛<sup>2</sup>, 加藤直樹<sup>1</sup> (摂南大・農, <sup>2</sup>九大院・薬)
- P-70 Pan-genome analyses to elucidate genomic diversity and evolution of *Aspergillus oryzae*  
Sharon Marie Bahena-Garrido<sup>1</sup>, Masahiro Ezaki<sup>2</sup>, Akito Nishizawa<sup>2</sup>, Yuko Komatsu<sup>1</sup>, Ryouzuke Kataoka<sup>1</sup>, Kazuhiro Iwashita<sup>1</sup> (<sup>1</sup>NRIB, <sup>2</sup>GeneBay, Inc.)
- P-71 高発現による生育阻害を利用したスクリーニング法の XlnR 機能制御因子探索への適用  
五味勝也, 新谷智子 (東北大・院農)
- \* P-72 糸状菌間相互作用に関与する糸状菌の揮発性化合物 (rVOC) の探索  
中村洸<sup>1</sup>, 浦山俊一<sup>1,2</sup>, 萩原大祐<sup>1,2</sup> (筑波大・生命環境, <sup>2</sup>筑波大・MiCS)
- \* P-73 分散型麹菌の酵素高生産メカニズム解明に向けた菌糸先端のミトコンドリア分布解析  
鈴木智大<sup>1</sup>, 松本琴音<sup>1</sup>, 若井暁<sup>2,3</sup>, 近藤昭彦<sup>2</sup>, 荻野千秋<sup>1</sup> (神戸大院・工, <sup>2</sup>神戸大院・イノベ, <sup>3</sup>海洋機構)
- \* P-74 *Phanerochaete chrysosporium* におけるヘムによる解糖系, TCA 回路の制御機構の解明  
釣上竜河<sup>1</sup>, 三浦大典<sup>2</sup>, 加藤雅士<sup>1</sup>, 志水元亨<sup>1</sup> (名城大・農, <sup>2</sup>産総研・バイオメディカル研究部門)

- \* P-75 糸状菌由来新規ステロールアミノ酸誘導体の機能解析および相互作用タンパク質の探索  
 今井誠<sup>1</sup>, 横川大祐<sup>1</sup>, 立松俊祐<sup>1</sup>, 佐賀裕亮<sup>1</sup>, Frédéric Fischer<sup>2</sup>, Hubert D. Becker<sup>2</sup>, 久城哲夫<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup>明治大・院農・農芸化学, <sup>2</sup>ストラスブール大)
  
- \* P-76 糸状菌由来新規エルゴステロールアミノ酸誘導体の生理機能解析  
 横川大祐<sup>1</sup>, 佐賀裕亮<sup>1</sup>, Frédéric Fischer<sup>2</sup>, Hubert D. Becker<sup>2</sup>, 久城哲夫<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>明治大・院農・農  
 芸化学, <sup>2</sup>ストラスブール大)
  
- \* P-77 微生物菌叢との共培養特異的な白麹菌の二次代謝物質生産能  
 前田空<sup>1</sup>, 永野幸生<sup>2</sup>, Myat Htoo San<sup>2</sup>, 二神泰基<sup>3</sup>, 小林元太<sup>1</sup>, 後藤正利<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>佐賀大院・農,  
<sup>2</sup>総合分析センター, <sup>3</sup>鹿児島大院・農林水産)
  
- \* P-78 紅麹菌 *Monascus pilosus* の生物機能活性を示す新規二次代謝産物の探索と同定  
 古瀬結萌<sup>1</sup>, 川添嘉徳<sup>2</sup>, 小林元太<sup>1</sup>, 後藤正利<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>佐賀大院・農, <sup>2</sup>先進健康)
  
- \* P-79 麹菌 *Aspergillus oryzae* のオートファジー欠損株におけるコウジ酸高生産の分子機構の解析  
 松下天斗<sup>1</sup>, 陳俊林<sup>2</sup>, 有岡学<sup>1,2</sup> ( <sup>1</sup>東大院・農生科・応生工, <sup>2</sup>東大・CRIIM)
  
- \* P-80 麹菌のピルビン酸代謝フラックス制御が及ぼすタンパク質生産への影響  
 松本琴音<sup>1</sup>, 鈴木智大<sup>1</sup>, 若井暁<sup>2,3</sup>, 近藤昭彦<sup>2</sup>, 荻野千秋<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>神戸大院・工, <sup>2</sup>神戸大院・イノ  
 ベ, <sup>3</sup>海洋機構)
  
- \* P-81 糸状菌の異物代謝に関わる酵素遺伝子の同定と解析  
 柴田眞也<sup>1</sup>, 小泉慶明<sup>2</sup>, 長坂実咲<sup>1</sup>, 松井宏介<sup>1</sup>, 前田一行<sup>1</sup>, 中嶋佑一<sup>1</sup>, 安藤直子<sup>2</sup>, 木村真<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup>名大院・生命農, <sup>2</sup>東洋大院・理工)
  
- \* P-82 制限酵素により誘導されるゲノム再編成を利用した糸状菌休眠遺伝子活性化法の開発  
 天井涼太<sup>1</sup>, 森下陽平<sup>1</sup>, 河野宏光<sup>2</sup>, 尾崎太郎<sup>1</sup>, 菅原章公<sup>1</sup>, 太田邦史<sup>2</sup>, 浅井禎吾<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>東北  
 大院・薬, <sup>2</sup>東大院・総合文化)
  
- \* P-83 *Bipolaris maydis* の CRZ1 破壊による菌糸生育抑制とオフィオボリン A 過剰分泌  
 藪田翔<sup>1</sup>, 尾上魁<sup>1</sup>, 辻健也<sup>1</sup>, Diana Cecilia Ruiz-Nava<sup>2</sup>, 中道隆哉<sup>1</sup>, 義本祐介<sup>1</sup>, 吉見啓<sup>1,2</sup>, 宮下  
 正弘<sup>1</sup>, 宮川恒<sup>1</sup>, 田中千尋<sup>1,2</sup> ( <sup>1</sup>京大院・農, <sup>2</sup>京大院・地環学)
  
- \* P-84 *Trichoderma harzianum* THIF08 株による気体状硫化カルボニルを利用した硫黄同化  
 飯塚瑠翔<sup>1</sup>, 服部祥平<sup>2</sup>, 大津巖生<sup>3</sup>, 片山葉子<sup>4</sup>, 吉田誠<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>農工大院・農, <sup>2</sup>南京大, <sup>3</sup>筑波  
 大院・生命環境, <sup>4</sup>東文研)

- P-85** 糸状菌 *Aspergillus nidulans* の菌糸生長時における脂質動態の解析  
 岩間亮<sup>1,2,6</sup>, 岡橋伸幸<sup>3,6</sup>, 加藤遼<sup>4,5,6</sup>, 奥崎紗矢<sup>4,5</sup>, 楊淳児<sup>1</sup>, 矢野隆章<sup>4,5</sup>, 田中拓男<sup>4,5</sup>, 松田史生<sup>3</sup>, 堀内裕之<sup>1,2</sup> (1 東大院・農生科・応生工, 2 東大・微生物連携, 3 阪大・院情報, 4 徳島大・pLED, 5 理研, 6 JST ACT-X)
- P-86** *cis*-デカリン含有テトラミン酸は昆虫エクジステロイド生合成に関わるグルタチオン *S*-転移酵素 Noppera-bo を阻害する  
 加藤直樹<sup>1,2</sup>, 海老原佳奈<sup>3</sup>, 野川俊彦<sup>2</sup>, 二村友史<sup>2</sup>, 松田一彦<sup>4</sup>, 長田裕之<sup>2</sup>, 丹羽隆介<sup>3</sup>, 高橋俊二<sup>2</sup>  
 (1 摂南大, 2 理研 CSRS, 3 筑波大, 4 近畿大)
- \* **P-87** シコクビエいもち病菌 (*Pyricularia oryzae* pathotype *Eleusine*) の3つの非病原力遺伝子を認識するコムギの新規抵抗性遺伝子の単離  
 土屋玲奈<sup>1</sup>, 加納裕康<sup>1</sup>, 岩川瑞希<sup>1</sup>, 安倍史高<sup>2</sup>, 足助聡一郎<sup>1</sup>, 土佐幸雄<sup>1</sup> (1 神戸大院農, 2 農研機構作物研)
- \* **P-88** 果樹炭疽病菌 *Colletotrichum fioriniae* GCA6 における糖誘導型形態分化の制御機構に関する研究  
 佐々木優<sup>1</sup>, 和泉尚登<sup>1</sup>, 坂本茉由<sup>1</sup>, 入枝泰樹<sup>2</sup> (1 信大・農, 2 信大・大学院農)
- \* **P-89** 炭疽病菌の付着器機能にメラニン化が果たす役割の再考  
 大澤武留<sup>1</sup>, 武末和穂<sup>2</sup>, 工藤健央<sup>1</sup>, 入枝泰樹<sup>3</sup> (1 信大・院総合理工, 2 信大・農, 3 信大・大学院農)
- \* **P-90** 植物病原性糸状菌 *Fusarium oxysporum* の微小空間における伸長と病原性の関連  
 酒造ひなた<sup>1</sup>, 井谷綾花<sup>1</sup>, 山本里穂<sup>1</sup>, 高谷直樹<sup>1</sup>, 佐藤良勝<sup>2</sup>, Antonio Di Pietro<sup>3</sup>, 竹下典男<sup>1</sup> (1 筑波大・MiCS, 2 名古屋大・ITbM, 3 コルドバ大)
- \* **P-91** *Colletotrichum fioriniae* GCA6 に由来する植物の胚軸伸長を促進する物質の単離と同定  
 本田莉夏子<sup>1</sup>, 桐山寛生<sup>1</sup>, 大神田淳子<sup>2,3</sup>, 真壁秀文<sup>2,3</sup>, 河村篤<sup>3</sup>, 入枝泰樹<sup>2,3</sup> (1 信大・農, 2 信大・大学院農, 3 信大・バイオメディカル研)
- \* **P-92** 卵菌 *Phytophthora infestans* の形態変化におけるアネキシン様タンパク質の機能解析  
 藤島里佐子<sup>1</sup>, 川口剛司<sup>1,2</sup>, 谷修治<sup>1,2</sup> (1 阪府大・生環科, 2 大阪公大院・農)
- \* **P-93** *Bipolaris maydis* におけるポリオキシン耐性の原因遺伝子の探索  
 玉木裕<sup>1</sup>, 辻健也<sup>1</sup>, 吉見啓<sup>1,2</sup>, 田中千尋<sup>1,2</sup> (1 京大院・農, 2 京大院・地環学)

- \* P-94 ヒストン H3 の K9 および K27 トリメチル化は牧草共生糸状菌 *Epichloë festucae* の共生関連遺伝子の宿主感染時特異的な発現に關与する  
三浦敦土, 一柳健司, 佐藤育男, 千葉壯太郎, 田中愛子, 竹本大吾 (名大院・生命農学)
- \* P-95 菌類ウイルスによる宿主表現型への影響は株レベルで特異性を示す  
渡邊青陽<sup>1</sup>, 浦山俊一<sup>2,3</sup>, 萩原大祐<sup>2,3</sup> (1 筑波大院・生命地球環境, 2 筑波大・生命環境系, 3 筑波大・MiCS)
- \* P-96 *Bipolaris maydis* における菌糸徒長を伴う付着器形成不全の原因遺伝子の同定  
安本駿作<sup>1</sup>, 佐波雅史<sup>1</sup>, 辻健也<sup>1</sup>, 吉見啓<sup>1,2</sup>, 泉津弘佑<sup>3</sup>, 河内護之<sup>1</sup>, 本田与一<sup>1</sup>, 田中千尋<sup>1,2</sup>  
(1 京大院・農, 2 京大院・地環学, 3 滋賀県大院・環境)
- \* P-97 コムギ赤カビ病菌における新規ステロール誘導体加水分解酵素の機能解析  
関澤大地<sup>1</sup>, 金子雅弘<sup>1</sup>, 横川大祐<sup>1</sup>, Frédéric Fischer<sup>2</sup>, Hubert D. Becker<sup>2</sup>, 久城哲夫<sup>1</sup> (1 明治大・院農・農芸化学, 2 ストラスブール大)
- \* P-98 *Bipolaris maydis* における Kre6 様タンパク質の機能解析  
山田夕月<sup>1</sup>, 辻健也<sup>1</sup>, 吉見啓<sup>1,2</sup>, 河内護之<sup>1</sup>, 本田与一<sup>1</sup>, 田中千尋<sup>1,2</sup> (1 京大院・農, 2 京大院・地環学)
- \* P-99 *In vitro* 試験による Tolnifanide の作用点解明への試み  
長根悠介<sup>1</sup>, 田代英里香<sup>1</sup>, 松原佳耶<sup>1</sup>, 泉津弘佑<sup>2</sup>, 寺内裕貴<sup>3</sup>, 辻健也<sup>1</sup>, 吉見啓<sup>1,4</sup>, 宮川恒<sup>1</sup>, 田中千尋<sup>1,4</sup> (1 京大院・農, 2 滋賀県大院・環境, 3 山口大・中高温研, 4 京大院・地環学)
- \* P-100 染色体喪失実験により見出された, ミツバ株枯病菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cripti* の病原性アクセサリー染色体  
戸畑幸治, 加藤有紀子, 小寺俊丞, 齊藤大幹, 小松健, 有江力 (農工大院・農学府)
- \* P-101 灰色かび病菌 *Botrytis cinerea* が植物由来の抗菌物質を代謝・排出する機構に関する研究  
芦田晃<sup>1</sup>, 黒柳輝彦<sup>1</sup>, バラサグ サラリア アブリエル<sup>1</sup>, 福島啓太<sup>1</sup>, 鈴木孝征<sup>2</sup>, 田中愛子<sup>1</sup>, 佐藤育男<sup>1</sup>, 千葉壯太郎<sup>1</sup>, 小鹿一<sup>1</sup>, 竹本大吾<sup>1</sup> (1 名大院・生命農学, 2 中部大・応用生物)
- P-102 我が国におけるアスペルギルスフミガタスの遺伝系統の分布と薬剤耐性に関する研究  
Xiaohui He<sup>1</sup>, 楠屋陽子<sup>2</sup>, 萩原大祐<sup>1,3,4</sup>, 豊留孝仁<sup>1,5</sup>, 新居鉄平<sup>1</sup>, Bian Cai<sup>6</sup>, 永山聖樹<sup>7</sup>, 柴田紗帆<sup>1</sup>, 渡邊哲<sup>1</sup>, 高橋弘喜<sup>1,8,9</sup> (1 千葉大・真菌, 2 NITE・NBRC, 3 筑波大・生命環境, 4 筑波大・MiCS, 5 帯畜大・獣医, 6 BGI, 7 千葉大・医学薬学府, 8 千葉大・分子キラル, 9 千葉大・植物科学)
- P-103 植物葉圏の非病原性細菌 *Chitinophaga* sp. はアブラナ科炭疽病菌の病原性を促進する  
田中香帆<sup>1</sup>, 田中智佳子<sup>1</sup>, 石田史子<sup>1</sup>, 山口美幸<sup>1</sup>, 竹下典男<sup>2</sup>, 田中茂幸<sup>1</sup> (1 摂南大・農, 2 筑波大・MiCS)

**P-104** *Aspergillus fumigatus* の細胞死誘導因子の機能解析

宮澤拳, 高塚翔吾, 壇辻百合香, 犬飼達也, 梅山隆, 星野泰隆, 村長保憲, 山越智, 宮崎義継 (感  
染研・真菌部)

**P-105** 不適応型炭疽病菌群をツールとして活用した重層的植物免疫システムの体系化

入枝泰樹<sup>1</sup>, 平賀さつき<sup>2</sup>, 伊藤研児<sup>2</sup>, 竹内浩美<sup>2</sup> (1信大・学術院農, 2信大・農)

**P-106** イネいもち病菌の転写因子 Pro1 機能変異によるマイコウイルスの治癒現象

内田百岳<sup>1</sup>, 浦山俊一<sup>2</sup>, 藤晋一<sup>3</sup>, 萩原大祐<sup>2</sup>, 森山裕充<sup>4</sup>, 荒添貴之<sup>1</sup>, 鎌倉高志<sup>1</sup> (1東理大・  
創域理工, 2筑波大・生命環境, 3秋田県大・生物資源, 4農工大・農)

**P-107** ペクチンによる付着器形成の誘導を示さない *Bipolaris maydis* 突然変異株の解析

徳岡柚月<sup>1</sup>, 安本駿作<sup>1</sup>, 佐波雅史<sup>1</sup>, 辻健也<sup>1</sup>, 吉見啓<sup>1,2</sup>, 泉津弘佑<sup>3</sup>, 河内護之<sup>1</sup>, 本田与一<sup>1</sup>,  
田中千尋<sup>1,2</sup> (1京大院・農, 2京大院・地環学, 3滋賀県大院・環境)

# Special Lecture

## 特別講演

### 土壌伝染性子囊菌 *Fusarium oxysporum* の発病・病原性分化機構解析の現状

有江 力

(東京農工大学 大学院農学研究院)

*Fusarium oxysporum* は環境中に普遍的に生息する子囊菌である。一方で *F. oxysporum* は、土壌伝染性植物病原菌としても知られ、多種の植物に重篤な萎凋性病害を引き起こす。多種植物に病気を起こすため多犯性（多様な植物に感染する）と理解されがちであるが、1株ごとの宿主特異性がとても高く、宿主範囲に基づく120以上の分化型 (form; forma specialis) が置かれているのが特徴である。例えば、f. sp. *lycopersici* はトマト (*Solanum lycopersicum*)、f. sp. *conglutinans* はキャベツ (*Brassica oleracea*)、f. sp. *crypti* はミツバ (*Cryptotaenia japonica*)、f. sp. *cubense* はバナナ (*Musa* spp.) のみに感染する。分化型の下位に、感染できる植物品種の範囲に基づくレース (race) が分化している場合も多い。

*F. oxysporum* の発病機構は、Beckman (1987) に生物学・生化学観点からまとめられている。その後の分子生物学の進歩は、病原性の分子レベルでの解明に寄与した。Arie (1998) は、Di Pietro (1998) と時を同じくして、*F. oxysporum* 初の病原性関連遺伝子として、植物組織構成成分であるペクチンを分解するポリガラクトナーゼをコードする遺伝子をクローニングした。その後現在までの25余年間に、遺伝子のREMI法等によるランダム破壊や標的破壊、発現解析、プロテオーム解析等によって50以上の病原性関連遺伝子が報告されてきた。例えば、膜貫通タンパク質遺伝子 *FDP1*、セロビオース：キノン酸化還元酵素遺伝子 *FCD1*、アスパラギン酸プロテイナーゼ遺伝子 *sap1*、ピルビン酸脱炭酸酵素遺伝子 *pdcl* 等である。また、*Aspergillus nidulans* で分生子形成制御に関与する *abaA* のホモログ *FoabaA* 破壊株は、維管束内で孢子 (bud cell) を形成できなくなり、トマト地上部への進展が遅れ、その結果萎凋病の発病も遅延した。すなわち、*F. oxysporum* の道管内での転移や上部への進展に bud cell が重要な役割を果たすことを示した。ペクチン分解酵素等の植物組織構成成分分解や基礎代謝に関わる酵素をコードする遺伝子の単独の破壊は病原性の喪失につながる場合が多く、*F. oxysporum* が補完的機能を有する酵素を複数保持しているためと考えられている。

その後、トマト萎凋病菌のレース決定因子として、小型染色体に座乗する *Six4* 等のエフェクター遺伝子が見いだされた (Rep 2004; Houterman 2008, 2009)。著者らは、2008年に高知県で発生したトマト萎凋病菌の新型レース3において、*Six4* が転移因子 *hormin* の挿入によって破壊されていることを発見、これが新たな病原性を有する株出現のドライビングフォースであることを示した (Inami 2012)。我が国の国菌とされる *A. oryzae* のゲノム解読 (2005) に続き、*F. oxysporum* でもゲノム解読・比較が行われ (Ma 2010)、以降、発病・病原性分化機構の理解に大きな変革を及ぼした。すなわち、*F. oxysporum* が、生育に必要ないわゆるコア染色体と、生育に不要で dispensable なアクセサリ染色体 (領域) を持つこと、アクセサリ染色体の欠損や転移が病原性に影響すること、前出のエフェクター遺伝子が

アクセサリ染色体に乗ること，アクセサリ染色体に転移因子が多いこと等が明らかになった。紡錘糸形成阻害剤であるベノミルの処理で，キャベツ萎黄病菌，バナナ萎凋病菌やミツバ株枯病菌のアクセサリ染色体欠損株が作出され，それぞれの病原性に関わる染色体上の病原性関連遺伝子の解析が行われている（戸畑 2023）。

近年，多様な病原のエピデミック（感染拡大）に注目が集まっている。筆者らは，トマト萎凋病菌の起源を探るため，トマトの原産地である南米（ペルー等）および二次的分化の中心地であるメキシコにおいて，野生種および移行期トマトの採集を実施，それらから分子系統学的に萎凋病菌にとても近縁の *F. oxysporum* を分離した。これらの株はトマトに病原性を持たず，さらに，上述のアクセサリ染色体を持たなかった。これに基づき，トマト萎凋病菌は，トマト栽培化の過程で，トマトに定着能を持つ非病原性 *F. oxysporum* から生じたものと推察した（Inami 2014）。病原性株の出現や病原性進化には，アクセサリ染色体の水平移動や，転移因子の働きが関与していると考えられる。バナナ萎凋病（パナマ病）菌も拡大が懸念される病原の一つである。70 年ほど前，この病原が世界のバナナ生産地で拡大し，当時主流の系統であった Gros Michel を壊滅状態に追い込んだ。この品種に代わる抵抗性を有する系統 Cavendish が世界の輸出入市場を席卷していたが，近年 Cavendish を犯すレースである TR4 がアジアから豪州，アフリカ，そして 2019 年には南米に拡大，世界市場に及ぼす影響が懸念されている。分子系統樹上で，世界各国から分離されたレース TR4 菌株は 1 つのクラスターを成し，レース TR4 が人為的に移動していることが示唆されている。実際の栽培者は，例えばバナナ Cavendish を圃場に植える時，Cavendish に *F. oxysporum* による病害が発生するかを知りたがる。筆者らは栽培者の要望にも応えるべく，上述の基礎的データに基づき，植物体や土壌から *F. oxysporum* の分化型やレースを識別するための PCR や LAMP 検出系の構築にも取り組んでいる。

Arie T et al. (1998) *Ann Phytopathol Soc Jpn* **64**:7–15 ; Beckman CH (1987) *The Nature of Wilt Diseases of Plants*. APS, MN, USA ; Di Pietro A, Roncero MI (1998) *Mol Plant-Microbe Interact* **11**:91–98 ; Houterman PM et al. (2008) *PLoS Pathog* **58**:970–978 ; Houterman PM et al. (2009) *Plant J* **58**:970–978 ; Inami K et al. (2012) *PLoS One* **7**:e44101 ; Inami et al. (2014) *Microb Environ* **29**:200–210 ; Ma LJ et al. (2010) *Nature* **464**:367–373 ; 戸畑幸治ら (2023) 第 22 回糸状菌分子生物学コンファレンス ; Rep M et al. (2004) *Sci Rep* **7**:9042

## ご略歴

- 1986年3月 東京大学農学系研究科修士課程修了
- 1989年3月 東京大学農学系研究科博士課程修了 農学博士
- 1989年3月 日本学術振興会博士特別研究員（東京大学）
- 1989年6月 理化学研究所 研究院
- 2000年4月 東京農工大学助教授農学部
- 2004年4月 国立大学法人東京農工大学助教授大学院共生科学技術研究部
- 2010年4月 国立大学法人東京農工大学教授大学院農学研究院
- 2019年4月 国立大学法人東京農工大学副学長
- 2020年4月 国立大学法人東京農工大学理事・副学長（-現在）

## その他，学会関係

- 2010年度 日本植物病理学会 学会賞「土壌伝染性フザリウム菌の発病機構と分子系統解析に関する研究」
- 2017年7月 糸状菌分子生物学研究会 会長（令和3年6月まで）
- 2019年度 日本農薬学会 業績賞（研究）「フザリウムによる植物病害の防除と検診，分子遺伝学に関する研究」
- 2020年度 日本植物病理学会 会長

# Symposium

「遺伝子組換えを用いない微生物育種」

## 次世代の麴菌を育種するために～黄麴菌のゲノム編集技術開発～

織田 健

(独立行政法人 酒類総合研究所)

## Cas9 直接導入法による麴菌のゲノム編集とその応用

麴菌は、日本の醸造・発酵産業に深く関わり有用菌株が求められているが、多核、交雑が出来ない等の理由により育種が非常に難しい。そのような困難を打ち破ったのが、Cas9 によるゲノム編集である。本講演では、当所で開発しているゲノム編集育種技術について概説する。黄麴菌では、東京大学の片山らによりプラスミドで導入された Cas9 および sgRNA を発現する系でゲノム編集が出来ることが初めて報告された<sup>1)</sup>。その後、プラスミドで発現した TALEN でのゲノム編集の成功も報告された<sup>2)</sup>。一方で我々は、ゲノム編集を施した育種体に細胞外で加工した核酸又はその複製物の残存がなければ、遺伝子組換えとしない点を踏まえ、育種体が遺伝子組換え生物に該当する可能性を減らす方法として、DNA を一切用いず Cas9 酵素及び sgRNA の複合体 (RNP) のみを直接導入しゲノム編集する系を検討した。pyrG を破壊するゲノム編集を実施したところ、1 残基の欠失や 1kb ほどの欠失など多様な変異を持つ株が得られ、RNP 直接導入によりゲノム編集が実施出来ることが示された。さらに産業上使用されてきた多様な麴菌について同手法を適用したところ、効率は違えどもゲノム編集が実施出来ることが示され、プロトプラスト-PEG 法が適用できる糸状菌で汎用できることが考えられた。また、Cas9 以外にも、dCas9、Cas9::RFP、Cas12(Cpf1)などでも同様に直接導入でゲノム編集に成功し、酵素を変えることで多様なゲノム編集を起こせることが示された。Cas9 により遺伝子ターゲティングが出来ることから、アームなしのマーカのノックインによる遺伝子破壊を検討したところ、有意に高い確率で実施出来ることが示された。通常のノックインでは遺伝子マーカーが使用され、育種を希望する株それぞれのマーカー破壊株 (宿主) をあらかじめ準備する必要がある。そこで、複数の sgRNA の導入で多重破壊が出来るメリットを活かし、マーカー及び目的遺伝子に対する sgRNA を導入し、マーカーによる選抜を行うことで目的遺伝子の破壊を達成する共ゲノム編集を *wA* と *pyrG* の同時破壊により実証した<sup>3)</sup>。この技術開発により市販の Cas9 と目的とするターゲットの sgRNA を購入することで自前の産業株に対して、直ちにゲノム編集が実施できることとなった。共ゲノム編集の技術を応用し、コウジ酸などの麴菌の 2 次代謝物生産性の制御を主眼として、遺伝子組換えで汎用される一般的な手法である遺伝子破壊、ノックイン、相同組換え、小規模欠失、大規模欠失を実施し確認したところ、いずれも効率よく実施出来ることが示された<sup>4)</sup>。

## 共ゲノム編集による実用育種の事例

開発したゲノム編集技術を実利用されている吟醸用麴菌である OIS01 株に適用し、一連の生合成遺伝子は存在するが生産量が少ないエルゴチオネインの高生産系の構築、また日本酒醸造では一般にオフフレーバーとなるムレ香の原因であるイソバレルアルデヒド生合

成遺伝子 *mreA* を破壊する実用育種を実施した。エルゴチオネイン生産系では、ソルビトールプロモーターを導入する相同組換えのゲノム編集により、約 33 倍の生産量の向上が見出された。*mreA* 破壊では、米麴中でのイソバレルアルデヒド生成能が低下し、製成酒イソバレルアルデヒド量は閾値以下に低減し、30°C、90 日間の強制劣化試験でも閾値をわずかに越える程度に留まることが示された。このように産業上有用な形質を実用株に付加できることが示された。

### 直接導入法によるゲノム編集のオフターゲット解析

これまでに開発してきたゲノム編集技術は、Cas9 に依存しているためオフターゲット問題が介在する。それぞれのターゲットに対する sgRNA は、一般にオフターゲットが生じないよう各種ツールを利用して設計される。当所では、CRISPRdirect に *A. oryzae* RIB40 や *A. luchuensis* RIB2604 のゲノム配列の登録を依頼し、環境を整備した。さらに同ツールで設計した sgRNA 候補については、GGGenome にて検索を実施し、オフターゲット候補を抽出し確認している。実際に Cas9 直接導入によるゲノム編集でのオフターゲットの有無について解析するため、親株 RIB40 から同系統の 1 回継代株、2 回継代株、プロトプラスチ化復帰株、*pyrG* ゲノム編集株の全ゲノム解析を実施し、変異を抽出したところ、いずれの株でも親株と比較して平均約 310 ヶ所程度の変異が生じており有意な差はなかった。さらに使用した sgRNA に対するオフターゲット候補部位について精査したところ、変異は生じていなかった。よって、今回の系においては継代、ゲノム編集操作を通じて、異常な変異を生じる可能性は低いと考えられた。さらに、糸状菌では発見されていないが、ほ乳類では、変異導入に使用された sgRNA がゲノム中に逆転写して導入される RMDR (RT-product-mediated DSB repair) の現象が報告されている<sup>5)</sup>。そこで今回の菌株群について農環研が開発した k-mer 法による外来性 DNA 検出ツール<sup>6)</sup> にてショートリードデータを用いて解析したところ、いずれの株においても統計的に有意に相同性があるリードは無かったことから、ゲノム中には使用した sgRNA に由来する配列は存在しないことが示された。このように、Cas9 直接導入法でのゲノム編集法の安全性を担保するために、育種株についてオフターゲット解析などを実施出来る環境を構築している。

### 次世代の麴菌

約 150 年前に麴菌が純粋分離され研究が萌芽し、約 30 年前に形質転換系が開発されることで研究が加速し、麴菌の分子生物学的な知見が蓄積されてきた。開発したゲノム編集技術を利用することにより、過去の研究成果が実用されることに繋がって行く。今後は、ゲノム編集育種により麴菌の潜在的な能力が花開き、パブリックアクセプタンスの状況に対応しながら麴菌のさらなる利活用が拡がることが期待される。

本研究の一部は、JST 産学共創プラットフォーム共同利用推進プログラム (OPERA) および共創の場形成支援プログラム (COI-NEXT) コンソーシアムでの研究成果である。

## 引用文献

- 1: T. Katayama *et al.*, *Biotechnology Letters*, 38(4), 637-642(2016)
- 2: O. Mizutani *et al.*, *J. Biosci. Biotechnol.*, 123(3), 287-293(2017)
- 3: 特許6994730, 特許7141648
- 4: 織田健, 温古知新, 60, 29-35(2023)
- 5: R. Ono *et al.*, *Scientific Reports*, 5, 2281(2015)
- 6: T. Itoh *et al.*, *Scientific Reports*, 10(1), 4914(2020)

## **Development of genome editing technique in *Aspergillus oryzae* for breeding next generation Koji.**

**Ken Oda**

**(Div. of Brewing microbiology, Nat. Res. Inst. of Brewing)**

## ご略歴

- 2002年 生物系特定産業技術研究支援センター 研究員（於：酒類総合研究所）
- 2003年 東北大学大学院農学研究科 農学博士
- 2006年 金沢工業大学ゲノム生物工学研究所 特別研究員および新エネルギー・産業技術総合開発機構 特別研究員兼任
- 2008年 ジョージア大学植物生物学部 ポスドクリサーチフェロー
- 2013年 酒類総合研究所 研究員
- 2017年 酒類総合研究所 主任研究員（現在に至る）

## シンクロトロン光照射による紅麴菌の育種改良と

## その変異特性解析

後藤 正利

(佐賀大学農学部・鹿児島大学大学院連合農学研究科)

微生物の育種改良法として、遺伝子組換え技術や最新のゲノム編集技術が利用され、発展してきた。これらの技術は、改良のゴールへ意図した通りに比較的短期間で到達できる可能性が高い。しかし、醸造微生物、食品利用微生物に対しての遺伝子組換え技術の適用は、消費者から忌避される可能性も高い。一方、化学薬剤や UV 照射等の物理的な方法を用いる従来からの微生物変異誘発法は、ランダムに遺伝子中の塩基に変異を誘発し選抜するため、改良微生物を取得する時間は長期を要する。しかし、予期しない変異導入によって物質高生産などの新たな獲得形質が生じる仕組みを明らかにすることも期待でき、実際に食品製造微生物での適用例は多い。

紅麴菌は、東南アジア、中国、沖縄で伝統的な発酵食品の製造に用いられている。また、本菌が有用な機能性を示す二次代謝産物を生産することから、米に繁殖させた紅麴が食品のサプリメントとして世界で広く販売されている。有用な二次代謝産物として、紅麴色素やモナコリン K (MK) がよく知られている。紅麴色素は、抗酸化作用を示す食品の着色料として利用されている。MK は、コレステロール値の低下作用や血圧上昇を抑制する作用を示すスタチンの類縁化合物である。一方、紅麴菌の二次代謝産物としてカビ毒シトリニン (CT) も知られている。

演者らは紅麴菌 *Monascus purpureus* KUPM5 株に対して、NTG 処理や UV 照射により変異を誘発させ、KUPM5 株が微量生産する CT の生産性をさらに低下させた<sup>1)</sup>。この研究の実施途中で、佐賀県九州シンクロトロン光研究センターで微生物の変異誘発実験を行う機会を得た。シンクロトロン光は、紫外線、極紫外線、軟 X 線、硬 X 線を含む広範な連続波長からなる放射光である。シンクロトロン光照射による微生物の育種改良については、酵母の 1 例の報告があるのみで、ゲノム解析に基づく変異塩基についての情報はなかった。そこで、シンクロトロン光照射による変異導入の特徴をゲノム解析レベルで明らかにするために、紅麴菌<sup>2)</sup>と清酒酵母<sup>3)</sup>を微生物材料としてシンクロトロン光照射を行なった。本シンポジウムでは、シンクロトロン光照射により *M. purpureus* KUPM5 株に変異を導入して取得した MK 高生産変異株の特性と得られた変異株におけるゲノム上の変異情報について紹介する。また、同じく子囊菌に分類される清酒酵母と紅麴菌との変異様式の相違についても紹介する。

## 引用文献

1: Ketkaeo, S., Sanpamongkolchai, W., Morakul, S., Baba, S., Kobayashi, G., Goto, M.

*J. Gen. Appl. Microbiol.*, **66**, 163 (2020)

2: Ketkaeo, S., Nagano, Y., Baba, S., Kimura, K., Futagami, T., Sanpamongkolchai, W., Kobayashi,

G., Goto, M. *J. Biosci. Bioeng.*, **133**, 362 (2022)

3: Baba, S., Hamasaki, T., Sawada, K., Orita, R., Nagano, Y., Kimura, K., Goto, M., Kobayashi, G. *J. Biosci. Bioeng.*, **132**, 265 (2021)

**Improvement of *Monascus purpureus* by synchrotron light irradiation and genome analysis of the mutants isolated.**

Masatoshi Goto

(Agri. Saga Univ., Grad. Sch. Agri. Sci. Kagoshima Univ.)

ご略歴

- 1990年3月 九州大学農学部農芸化学科卒業
- 1995年3月 九州大学大学院農学研究科博士後期課程修了 博士（農学）
- 1995年4月 九州大学農学部 助手
- 2001年9月 米国イリノイ大学シカゴ校 文部科学省在外研究員  
(2002年8月まで)
- 2007年4月 九州大学大学院農学研究院 助教
- 2009年4月 九州大学大学院農学研究院未来創成微生物学寄附講座  
(三和酒類株式会社) 客員准教授
- 2011年4月 同上 准教授
- 2016年4月 佐賀大学農学部生命機能科学科 教授
- 2016年10月 鹿児島大学大学院連合農学研究科（博士課程）教授

## GMD による迅速・低コストな汎用高生産変異株スクリーニング技術

町田 雅之

(金沢工業大学・ゲノム生物工学研究所)

GMD (Gel Microdroplet) は、直径数十  $\mu\text{m}$  のアガロース等の微粒子で、内部に微生物等の細胞を封入して培養することができる。GMD は従来より、交替生産能が向上した CHO 細胞のスクリーニングなどに利用されてきたが、微生物への定量的な適用例が存在しなかった。発表者らは、蛍光検出の高感度化や培養の最適化などを行い、GMD によるタンパク質の分泌生産量が向上した微生物変異株のスクリーニングを可能にした<sup>1)</sup>。しかしこの方法は、高感度化のためのタグの導入が必要であること、タンパク質にしか利用できない課題があった。そこで現在は、タンパク質だけでなく化合物に広げることで、大規模・ハイスループットな汎用スクリーニング技術とするための研究を進めている (図 1)。ここでは、これまでの GMD を用いた生産性向上の実例として、 $\beta$  ガラクトシダーゼ ( $\beta$ -Gal) 分泌酵母の生産向上変異株のスクリーニング、およびアミノ酸を生産する大腸菌の生産性向上について報告する。

分泌型  $\beta$ -Gal は糸状菌 *Aspergillus niger* 由来の遺伝子を用い、恒常発現プロモーターに接続して酵母に導入することで発現させた。この酵母株を培養して UV 照射し、1 個の GMD に 1 個程度以下の細胞数になるように限界希釈して封入した。またこの時、生産株にレポーター株細胞を混合して同時に封入した。レポーター株は、Galactose の添加によって GFP (蛍光タンパク質) を発現する酵母であり、培地中の Lactose から  $\beta$ -Gal 活性によって生じた Galactose を検出することができる。この様にして作製した GMD を 1 晩培養し、オンチップバイオテクノロジー社の On-chip Sort を用いて、約 30 万個の GMD から、蛍光強度が高いものを数十~100 個程度分離した。これらをプレートに撒いてコロニーを作らせた後、それぞれのコロニー由来の細胞を個別に培養して  $\beta$ -Gal 活性を測定したところ、1/2 以上の確率で 2 倍以上の生産向上変異株が取得された。また、20 株に 1 個程度の割合で 3 倍程度以上に生産量が向上した変異株が得られた (図 2)。この様な株の出現確率は一般的に 2,000 個に 1 個程度と考えられていることから、1,000 倍程度の濃縮ができたと考えている。

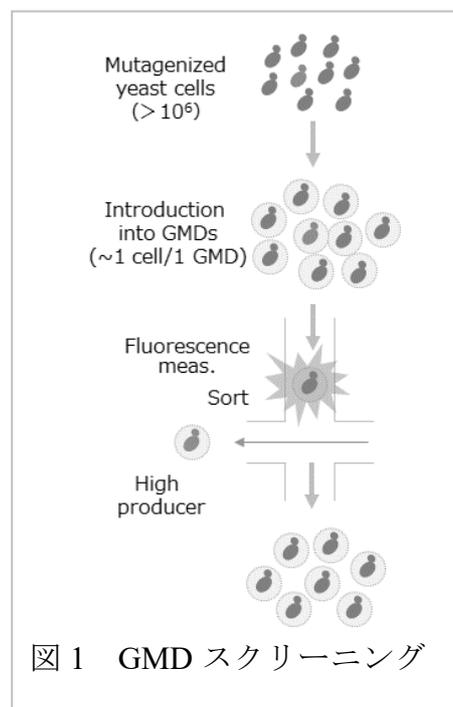


図 1 GMD スクリーニング

次に Tryptophan (Trp) の分泌生産能が向上した大腸菌の獲得を試みた。組換えによる生産では、培地中の Trp の存在で Trp 生合成経路の活性が抑制されるが、転写発現抑制因子である TrpR の破壊、酵素活性の抑制制御を解除した TrpE<sup>fbr</sup>, AroG<sup>fbr</sup> 変異を導入することでこの抑制が解除され、Trp が高生産化されることが分かっている。そこで、親株として  $\Delta$ TrpR を用い、UV で変異処理した細胞集団として用い、Trp で蛍光が誘導されるレポーター細胞とともに GMD に封入して培養した。こうして調製した GMD をソートすることで高確率に Trp の分泌生産が数倍程度に向上した変異株の取得に成功した。

現在は、これらの取得された変異株の性質の解析を進めると共に、様々な化合物や酵素の生産性向上の実例の蓄積を行っている。

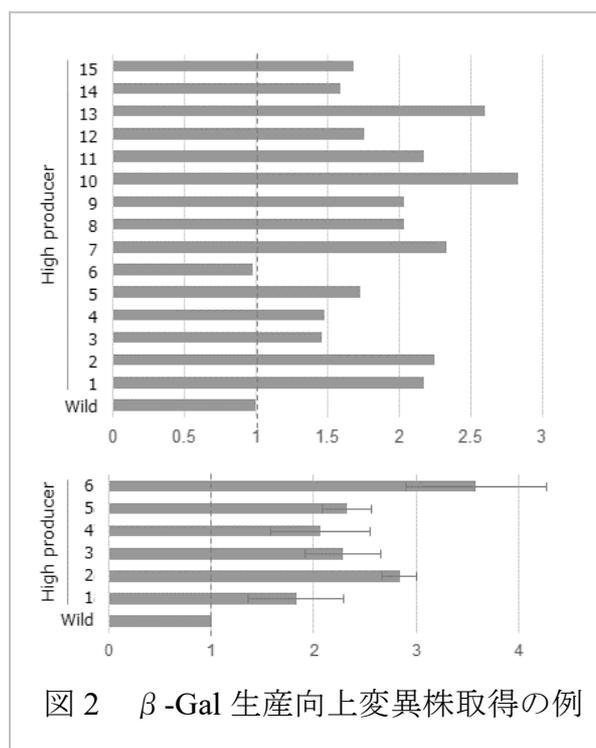


図2  $\beta$ -Gal 生産向上変異株取得の例

1. Fujitani, H., Tsuda, S., Ishii, T. & Machida, M., High-throughput screening of high protein producer budding yeast using gel microdrop technology. Biorxiv, BIORXIV/2019/830596.

**High-throughput and low-cost screening of microbes with enhanced protein and chemical productivity using gel microdroplet**

Masayuki Machida (Genome Biotech. Lab, Kanazawa Institute of Technology)

## ご略歴

- 1981年3月 東京大学農学部農芸化学科卒業  
1983年3月 東京大学大学院農学系研究科農芸化学専攻修士課程終了，修士号取得  
1986年3月 東京大学大学院農学系研究科農芸化学専攻博士課程終了，博士号取得  
1986年4月 工業技術院化学技術研究所  
1993年～94年 製品評価技術センター（現独立行政法人製品評価技術基盤機構）併任  
1993年 工業技術院生命工学工業技術研究所（機構改革で所名変更）  
2001年 独立行政法人産業技術総合研究所 分子細胞工学研究部門主任研究員  
（独立行政法人化で所名変更）  
2002年～04年 独立行政法人産業技術総合研究所 糖鎖工学研究センターチームリーダー  
2004年～06年 独立行政法人産業技術総合研究所 生物機能工学研究部門グループリーダー  
2004年～08年 独立行政法人産業技術総合研究所  
セルエンジニアリング研究部門グループリーダー  
2008年～10年 独立行政法人産業技術総合研究所 イノベーション推進室総括企画主幹  
2010年～12年 独立行政法人産業技術総合研究所 生物プロセス研究部門主幹研究員  
生物システム工学研究グループリーダー兼任  
2012年～18年 国立研究開発法人産業技術総合研究所  
生物プロセス研究部門総括研究主幹  
生物システム工学特別研究チームリーダー兼任  
1999年～2018年 金沢工業大学客員教授  
2009年～2018年 東京農工大学客員教授  
2018年～現在 金沢工業大学教授 ゲノム生物工学研究所所長，地方創生研究所兼任

## 受賞

- 2003年度 日本醸造協会技術賞，「麹菌 EST 解析」（麹菌遺伝子解析推進委員会）  
2007年度 日本醸造学会特別賞，「麹菌ゲノム解析」（麹菌ゲノム解析委員会）

## その他

- 2005年～2020年 財団法人中小企業ベンチャー振興基金審査委員  
2005年～2011年 Aspergillus Genome Research Policy Committee  
2009年～2010年 日本生物工学会理事  
2010年～2023年 市場創造研究会理事

## 麹菌 *Aspergillus oryzae* の育種技術とその応用

戸所 健彦

(月桂冠株式会社 総合研究所)

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* は清酒・焼酎・味噌・醤油などの醸造食品製造に用いられる、産業上最も重要な糸状菌の一つである。それら多様な用途に対して求められる機能は異なるため、それぞれに適した菌を選択し、さらには育種することが重要である。遺伝子組換え微生物の利用は食品を購入する消費者に広く受容されているとはいえ、非組み換えによる育種技術が用いられる。私がこれまでに関係した黄麹菌の育種の中から関係するものについて3点ご紹介する。

### 1. デフェリフェリクリシン高生産麹菌株の育種

デフェリフェリクリシンは麹菌により産生される、強い鉄キレート能力を有する二次代謝産物である。デフェリフェリクリシンは高い抗酸化活性をはじめとして様々な有益な機能性を有することから、大量生産による事業化を検討してきた。なかでも、大量生産方法の確立のためには高生産麹菌の取得が最も重要であると考え、自然変異による育種を実施してきた。具体的には15世代にわたる自然変異処理と選抜の繰り返しにより、親株の10倍以上の生産性を持つ菌株の育種に成功している。これらの株の世代ごとのゲノム解析を実施したところ、育種に伴って本菌株のゲノムには膨大な数の遺伝子レベルの変異が生じており、さらには大規模欠損をも生じていることが判明した。これらの遺伝子変異の蓄積数の推移や、表現型において生じた変化についてご紹介する。

### 2. 新規ピリチアミン耐性マーカー *thiI* による麹菌ゲノム編集

ゲノム編集は古典的な遺伝子組み換えとは異なり、ゲノム編集による機能欠損変異は自然変異と同等であると考えられる。企業の立場としてゲノム編集した微生物を産業上実用化する予定はないものの、麹菌の遺伝子研究ツールとしては重要である。我々は麹菌のゲノム編集について研究するなかで、利便性の高いマーカーが必要であると考えて検討した結果、新規なピリチアミンマーカー遺伝子 *thiI* を取得した。*thiI* を用いたゲノム編集の効果について紹介するとともに、*thiI* マーカーを利用して機能確認した一例として、麹菌に存在するフェルロイルエステラーゼ *faeA* が清酒中のオフフレーバー4VGの前駆体生成原因遺伝子であることを同定した研究についても紹介する。

### 3. ドロップレット・セルソーターを用いた麹菌の育種

ドロップレット・セルソーターは、各種微生物の選択的培養や選抜に用いられる方法である。近年これら機器の機能が向上しており、それらを用いて麹菌の育種・選抜に応用できるのではないかと考えて検討したので一部紹介する。

#### Breeding of industrial strain of *Aspergillus oryzae* and its application

Takehiko Todokoro

(Research inst., Gekkeikan Sake Co., Ltd)

ご略歴

2007年 京都大学農学部 応用生命科学科 卒業

2009年 京都大学大学院生命科学研究科 統合生命科学専攻 修士課程修了

2009年 月桂冠株式会社入社

現在 月桂冠株式会社 総合研究所 副主任研究員

## 醤油麹菌キシラン分解活性低下変異株の育種と淡口醤油への応用

眞岸 範浩

(ヒガシマル醤油株式会社 研究所)

醤油は大豆と小麦を主原料とし、麹菌、乳酸菌、酵母による発酵を利用して特有の味わいや風味を醸し出す日本の伝統的な醸造調味料である。醤油醸造には「一麹、二糶、三火入れ」という言葉があり、原料の分解に必要な酵素群を麹菌に生産させる製麹工程、麹菌酵素による原料の分解ならびに乳酸菌、酵母の発酵に関わる諸味工程、そして麹菌酵素の失活や乳酸菌、酵母などの殺菌に加え色調や香りを整える火入れ工程が醤油の品質を左右する重要な工程とされている。醤油の品質を決定する要素は色・味・香りであるが、淡い色合いと穏やかな醤油風味により食材の色や持ち味、だし風味を生かすことを特長とする淡口醤油では、特に色が重要視される。醤油の色は糖とアミノ酸が非酵素的に反応するアミノカルボニル反応（別名メイラード反応）により生成するメラノイジンによるものである。この反応に寄与しやすい糖は、醤油原料中に多量に存在するヘキソースよりも、存在量の少ないペントースであることが報告されている<sup>1)</sup>。ペントースは原料に存在するヘミセルロース（アラビノキシラン、アラビノガラクトタンなど）が麹菌の生産するキシラナーゼ、キシロシダーゼ、ガラクタナーゼ、アラビノフラノシダーゼなどのヘミセルラーゼによって分解、遊離すると考えられる。麹菌の生産する酵素力価と醤油の色度の相関を調べた報告によると、ヘミセルラーゼが醤油色度への寄与率が高いことが報告されている<sup>2,3)</sup>。我々は色度をより低下させた淡口醤油の製造を目的として、アミノカルボニル反応に対する寄与率の高いペントースの中でもキシロースに着目し、麹菌からのアプローチを行ってきた。本講演では、醤油原料（大豆、小麦）からキシロースを遊離すると考えられるキシラナーゼとキシロシダーゼの生産能が低下した麹菌株を変異処理により取得し、この変異株を用いた醤油の醸造特性について調べた事例について紹介する<sup>4,7)</sup>。

弊社保有株である *Aspergillus oryzae* HL-15 株を親株とし、0.1% *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidin で変異処理を行い、キシラン培地でのハロー形成能を指標にキシラン分解活性低下変異株 LX-02 株を取得した。LX-02 株はキシラナーゼとキシロシダーゼの活性がそれぞれ親株である HL-15 株に比べ 41%、19% に低下した。その他の醤油醸造に重要な酵素であるプロテアーゼやアミラーゼ、グルタミナーゼの活性は HL-15 株と同等であった。LX-02 株はキシラナーゼやキシロシダーゼ以外にもフェルラ酸エステラーゼや CM セルラーゼなどの酵素活性も HL-15 株に比べて低下しており、これら酵素群の発現制御因子である XlnR に変異が生じていることが考えられた。そこで、LX-02 株の XlnR 構造遺伝子の塩基配列を HL-15 株のそれと比較すると、一塩基欠損が生じ、588 番目のアミノ酸からフレームシフトが生じていること、648 番目の読み枠にストップコドンが出現し、C 末端側の約 1/3 が欠損した不完全な XlnR が生産されていることが分かり、キシラナーゼ、キシロシダーゼの活性低下の要因と推測された。

キシラン分解活性低下変異株 LX-02 株を用いて、淡口醤油の小スケール試醸試験を行ったところ、親株の HL-15 株を使用した対照に比べ LX-02 株を用いた試験では諸味中での遊離ペントース量は 60% 程度と低く推移し、生揚醤油での色度が対照の約 87% に低下した。全窒素やホルモール態窒素などの成分には差は見られなかった。また、得られた生揚醤油

について、火入れ（80℃, 1分）・おり下げ（55℃, 15時間）による加熱褐変（非酸化褐変）および火入れ醤油を開放条件（30℃）で保管し、酸化褐変させた場合の濃化度合いを対照と比較したところ、火入れ・おり下げによる非酸化褐変では濃化度合いに差は見られなかったが、酸化褐変での濃化度合いは対照の火入れ醤油が保管6日目で初発の約181%であったのに対し、LX-02株を用いた試験の火入れ醤油では約166%と対照に比べ濃化が抑えられていた。

以上の結果より、キシラン分解活性低下変異株であるLX-02株を利用することにより、諸味工程における着色低下と製品醤油の使用における酸化褐変の抑制が期待でき、実用株として有用な菌株であることが示された。

#### 引用文献

- 1: 橋場弘長：醬研, 11, 189（1985）
- 2: 中台忠信：醬研, 11, 67（1985）
- 3: 木村功ら：醸協, 87, 566（1985）
- 4: 中田佳幸ら：醸協, 94, 346（1999）
- 5: 橋本忠明ら：醬研, 27, 131（2001）
- 6: 橋本忠明ら：醸協, 97, 196（2002）
- 7: 橋本忠明ら：醬研, 31, 211（2005）

#### **Breeding of *Aspergillus oryzae* Mutant with Low Levels of Xylanolytic Enzymes from Soy Sauce *Koji* Mold and Utilization for the Production Usukuchi Soy Sauce**

Norihiro Magishi

(Research Laboratory, Higashimaru Shoyu Co., Ltd.)

#### ご略歴

1999年3月 大阪大学大学院工学研究科応用生物専攻前期課程修了  
1999年4月 ヒガシマル醤油株式会社入社  
2014年4月 ヒガシマル醤油株式会社研究所醸造開発課課長  
2016年11月 京都大学大学院農学研究科 論文博士（農学）授与  
2021年4月 ヒガシマル醤油株式会社研究所副所長兼検査課課長  
2023年4月 ヒガシマル醤油株式会社研究所副所長  
2023年7月 大阪大学招へい准教授  
現在に至る

# Oral Session

## \*O-1 (P-6)

### 転写因子 AmyR の活性化に関わるコウジカビの新規イソマルトースセンサー遺伝子の同定

ジョン ダミン, 渡嘉敷直杏, 新谷智子, 新谷尚弘, 五味勝也 (東北大学・農学研究科)

*Aspergillus oryzae*, or koji mold, is known for its ability to produce high levels of hydrolytic enzymes including amylolytic and proteolytic enzymes, which are used in various industrial applications such as Japanese fermented foods and beverages. In *A. oryzae*, the regulation of amylolytic enzyme gene expression is controlled by the fungal-specific transcription factor AmyR, which regulates the expression of  $\alpha$ -amylase, glucoamylase, and  $\alpha$ -glucosidase genes. The induction of AmyR activity is triggered by isomaltose most effectively compared to glucose or maltose. However, isomaltose was found to be barely incorporated into the fungal cells both in *A. oryzae* and *Aspergillus nidulans*, suggesting the existence of an unidentified isomaltose sensor on the plasma membrane. In this study, to identify the isomaltose sensor, *A. nidulans* mutant strains showing good growth on isomaltose agar were isolated from the strain that showed a defective growth due to overexpression of *brlA*, a transcription factor required for conidiation, with the strong  $\alpha$ -amylase gene promoter. Genomic DNA of the most promising candidates were used for whole genome sequencing to compare genetic polymorphisms between mutant strains. SNP analysis revealed that mutation in the putative coding sequences (CDS) was included in the major facilitator superfamily (MFS) transport proteins. Interestingly, different kinds of polymorphisms were identified in this CDS in common. This MFS transporter is considered to be an isomaltose sensor of interest in this study, because deletion of the gene restored growth of the *A. nidulans* strain harboring the *brlA* overexpression cassette on isomaltose agar medium. Furthermore, the relative expression level of amylolytic genes as well as *amyR* decrease significantly in the disruption mutant, demonstrating this CDS affects on the AmyR induction pathway.

#### A novel isomaltose sensor identification involved in the activation of the transcription factor AmyR in *Aspergillus*

Jeong Da Min, Jikian Tokashiki, Tomoko Shintani, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi

(Grad. Sch. Agric Sci., Univ. of Tohoku)

## \*O-2 (P-9)

### 麴菌を宿主とする *in vivo* クローニング法による天然物生合成経路の迅速再構築の検討

青木翔吾, 尾崎太郎, 菅原章公, 森下陽平, 浅井禎吾 (東北大院薬)

糸状菌が生産する天然物は様々な活性を示すため医薬資源として重要であり、特に非リボソームペプチド (NRP) には、抗生物質 penicillin や免疫抑制剤 cyclosporine に代表されるように顕著な生物活性を持つ化合物が多い。糸状菌ゲノム上には一株当たり 5 つ程度と多くの非リボソームペプチド合成酵素 (NRPS) 遺伝子が存在するため、生物活性天然物の資源として有望であるが、ゲノムマイニングと異種発現による探索例は少なく天然物資源として未開拓である。これは、通常 10 kb を超える NRPS 遺伝子のクローニングや宿主への導入が煩雑であることが一因にあると考えられる、本研究では糸状菌 NRP 探索法の確立を目的として、麴菌を宿主とする簡便かつ迅速な異種発現法の構築を検討した。

CRISPR-Cas9 による二本鎖切断の修復機構の一つとして相同組換え (HDR) がある。この際、外来遺伝子をドナーとして HDR を誘導することで宿主の染色体上に標的遺伝子を組み込むことが可能である。そこで、標的遺伝子を HDR で再構築可能な断片として PCR で増幅し、大腸菌等を用いるクローニング操作を回避して、遺伝子断片を麴菌に直接導入する手法を検討した。初めに機能既知のテルペン合成酵素遺伝子を用いて予備検討を行ったところ、プラスミド DNA をドナーにする従来の手法と遜色ない効率で遺伝子を導入できることが判明した。そこで、テルペンやポリケチド、NRP 等複数の機能既知生合成遺伝子を材料として、導入する遺伝子の長さや断片数、HDR の際の断片間オーバーラップ長を様々検討し、NRPS を探索するための条件を設定した。続いて、研究室が保有する糸状菌株から 12 種の NRPS 遺伝子を選別し、確立した手法を用いて麴菌へ導入した。得られた形質転換体の代謝物を LC-MS で分析したところ、複数の株で形質転換体に特異的なピークが確認できたため、現在化合物の単離と構造解析を進めている。

#### Rapid reconstitution of the biosynthetic machineries of fungal natural products by *Aspergillus oryzae*-mediated *in vivo* cloning

Shogo Aoki, Taro Ozaki, Akihiro Sugawara, Yohei Morishita, Teigo Asai

(Grad. Sch. Pharm. Sci., Tohoku Univ.)

## \*O-3 (P-13)

### 麹菌における異種天然化合物の生産性に関する新規制御因子の同定

吉岡弘史<sup>1</sup>, 原中実穂<sup>1</sup>, 齋藤直也<sup>1</sup>, 片山琢也<sup>1,2</sup>, 南篤志<sup>3</sup>, 及川英秋<sup>4</sup>, 丸山潤一<sup>1,2</sup> (東大院・農生科・応生工, <sup>2</sup>東大・微生物連携機構, <sup>3</sup>北大院・理, <sup>4</sup>中国・五邑大)

麹菌 *Aspergillus oryzae* は近年天然化合物の異種生産宿主として生合成研究に用いられており, その生産性向上は産業利用において重要である。酵母においては単一の制御因子の改変による代謝フラックスの改良が報告されているが, 糸状菌では同様のアプローチによる研究は進んでいない。*A. oryzae* において代謝の制御因子を発見できれば, 糸状菌の二次代謝に関連する代謝フラックスの制御機構が解明されるとともに, 遺伝子改変による異種天然化合物の生産性向上につながることを期待される。本研究では, *A. oryzae* を用いた異種天然化合物の生産性に関する制御因子の同定と代謝における機能解析を目的とした。

担子菌由来の抗生物質であるジテルペン pleuromutilin を異種天然化合物生産のモデルとしたスクリーニング<sup>1)</sup>において, *A. oryzae* での過剰発現により異種天然化合物生産が大幅に抑制された複数の遺伝子に着目し, これらを破壊することで反対に生産性が向上するかを調べた。pleuromutilin 生産株における各遺伝子の破壊の結果, 破壊により 2.7 倍の pleuromutilin 生産量の増加および生育低下を示す遺伝子を見いだした。この遺伝子は転写因子をコードし, 他の糸状菌のオルソログでは植物への病原性の関与が報告されているが代謝における機能は不明である。現在, トランスクリプトーム解析によって, 代謝関連遺伝子の発現への影響を調べている。

1) 原中ら, 日本農芸化学会 2022 年度大会 4B04-01

### Identification of a novel regulator for productivity of heterologous natural compounds in *Aspergillus oryzae*

Hiroshi Yoshioka<sup>1</sup>, Miho Haranaka<sup>1</sup>, Naoya Saito<sup>1</sup>, Takuya Katayama<sup>1,2</sup>, Atsushi Minami<sup>3</sup>, Hideaki Oikawa<sup>4</sup>, Jun-ichi Maruyama<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, <sup>2</sup>CRIIM, UTokyo, <sup>3</sup>Grad. Sch. Sci., Hokkaido Univ., <sup>4</sup>Wuyi Univ., China)

## \*O-4 (P-1)

### ヒラタケの担子胞子生産に必須な真正担子菌特異的タンパク質リン酸化酵素遺伝子の同定

小深田剛士<sup>1</sup>, 山崎風雅<sup>1</sup>, 中沢威人<sup>1</sup>, 菅野純子<sup>1</sup>, Minji Oh<sup>2</sup>, 河内護之<sup>1</sup>, 坂本正弘<sup>1</sup>, 本田与一<sup>1</sup> (京大院・農, <sup>2</sup>RDA, the Republic of Korea)

胞子を生産しない食用きのこ株の作出は, 栽培施設の環境改善や生態系の遺伝子汚染防止に役立つ。しかし, 胞子生産を完全に不全化させる遺伝子変異はあまり知られていない。本研究では, 効率的な無胞子株の分子育種につなげる目的で, 主要な食用きのこの一つであるヒラタケの胞子生産に必須な遺伝子を同定した。候補遺伝子を絞り込むために, まずヒラタケで RNA-seq 解析を行い, 子実体のひだの部分でのみ転写蓄積量が豊富な遺伝子を 134 個絞り込んだ。これらの遺伝子から, 同調的な減数分裂及び胞子形成が起こるウシグソヒトヨタケでも同様に, 胞子形成時期の傘でのみ転写蓄積量が豊富な遺伝子を, RNA-seq データ (Muraguchi *et al.*, 2015 PLoS ONE) を用いて, さらに絞り込んだ。相同性解析の結果, 絞り込んだ遺伝子の中に, 真正担子菌特異的な推定カルモジュリン依存性リン酸化酵素遺伝子が見つかった (*gsk1* と命名)。この遺伝子の変異株を作製するため, Cas9 および gRNA の発現カセットを有するプラスミドを, 野生ダイカリオン株 (PC9×#64) に導入した。得られたダイカリオンのハイグロマイシン耐性形質転換体全 6 株のうち, 1 株で胞子生産数が 0 であった。またゲノム PCR の結果から, この 1 株のみで両核への *gsk1* 変異導入が示唆された。この株の担子器を Hoechst 33342 で染色し蛍光観察したところ, Prophase II での減数分裂進行停止が明らかになった。以上の結果より, Gsk1 はヒラタケの減数分裂進行および胞子生産に必須であることが示唆された。

### Putative agaricomycetes-specific protein kinase is essential for basidiospore production in *Pleurotus ostreatus*

Takeshi Kobukata<sup>1</sup>, Fuga Yamasaki<sup>1</sup>, Takehito Nakazawa<sup>1</sup>, Junko Sugano<sup>1</sup>, Minji Oh<sup>2</sup>, Moriyuki Kawauchi<sup>1</sup>, Masahiro Sakamoto<sup>1</sup>, Yoichi Honda<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Grad. Sch. of Agr., Kyoto Univ., <sup>2</sup>RDA, the Republic of Korea)

## \*O-5 (P-82)

### 制限酵素により誘導されるゲノム再編成を利用した糸状菌休眠遺伝子活性化法の開発

天井涼太<sup>1</sup>, 森下陽平<sup>1</sup>, 河野宏光<sup>2</sup>, 尾崎太郎<sup>1</sup>, 菅原章公<sup>1</sup>, 太田邦史<sup>2</sup>, 浅井禎吾<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>東北大院・薬,  
<sup>2</sup>東大院・総合文化)

【目的】糸状菌のゲノム上に存在する膨大な数の生合成遺伝子クラスター (BGC) は、ほとんどが通常の培養条件下では発現しない休眠 BGC であり、新規天然物の探索源として注目されている。それら休眠 BGC 由来の新規活性化化合物の獲得を目的として様々な二次代謝活性化法が開発されてきた。しかし、既存の手法で活性化できる休眠 BGC は一菌株当たり一割以下であり、糸状菌が保有する豊富な遺伝子資源を十分に活用するに至っていない。そのため従来法で獲得できなかった新規天然物にアクセスできる新しい手法の開発が望まれている。これまでに酵母と植物を対象として、核内への制限酵素の導入による DNA 二本鎖切断が修復される際に大規模ゲノム再編成が誘導され、多様な形質変化株が生じる事が報告された (*Nat Commun* 9, 1995 (2018))。これを糸状菌に適用すれば、位置効果による二次代謝の変化が起こると考えた。また、DNA 上に制限酵素サイトが高頻度に出現する四塩基認識の制限酵素を用いる事で多様な組換えパターンを誘導できるため、従来法より多くの形質が得られると期待した。

【方法・結果】高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 由来の制限酵素 *taqI* 遺伝子を、*amyB* または *enoA* のプロモータの下流に組み込んだベクターを作製し、モデル糸状菌 *Aspergillus niger* に導入した。得られた形質転換株を *TaqI* の DNA 切断活性が認められる温度で継代を続けた結果、野生株と比較して菌糸生長速度や胞子形成能の低下したものなど、形質が変化した株を多数得ることに成功した。HPLC を用いた代謝分析の結果、いくつかの形質変化株で二次代謝の活性化が確認され、その二次代謝プロファイルは様々なパターンを示していた。また野生株と形質変化株の比較ゲノム解析により、制限酵素による切断に起因する DNA の欠損などの再編成が生じた事が示唆された。

### Activation of fungal cryptic biosynthetic gene clusters using genome rearrangement induced by endonuclease

Ryota Amai<sup>1</sup>, Yohei Morishita<sup>1</sup>, Hiromitsu Kono<sup>2</sup>, Taro Ozaki<sup>1</sup>, Akihiro Sugawara<sup>1</sup>, Kunihiro Ohta<sup>2</sup>, Teigo Asai<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Grad. School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku Univ., <sup>2</sup>Grad. School of Arts and Sciences, The Univ. of Tokyo)

## O-6 (P-85)

### 糸状菌 *Aspergillus nidulans* の菌糸生長時における脂質動態の解析

岩間亮<sup>1,2,6</sup>, 岡橋伸幸<sup>3,6</sup>, 加藤遼<sup>4,5,6</sup>, 奥崎紗矢<sup>4,5</sup>, 楊淳児<sup>1</sup>, 矢野隆章<sup>4,5</sup>, 田中拓男<sup>4,5</sup>, 松田史生<sup>3</sup>, 堀内裕之<sup>1,2</sup> ( <sup>1</sup>東大院・農生科・応生工, <sup>2</sup>東大・微生物連携, <sup>3</sup>阪大・院情報, <sup>4</sup>徳島大・pLED, <sup>5</sup>理研, <sup>6</sup>JST ACT-X)

脂質分子には極めて多様な分子種が存在し、生体膜の主要構成成分になる分子種や細胞内でエネルギー源として使用される分子種がある。我々は、糸状菌 *Aspergillus nidulans* を液体培養した際に、生体膜の主要構成成分であるリン脂質の組成が経時的にダイナミックに変動し、特に発芽時に不飽和度の高い脂質が増加することを明らかにしてきた。今回、我々は *A. nidulans* を寒天培地で培養して形成されるコロニーの局所的なリン脂質解析を行い、コロニー中心部と比較してコロニー辺縁部では、ホスファチジルエタノールアミン含量が高く、不飽和度の高いリン脂質の含量も高いことを示した。さらに、リン脂質以外の脂質成分にも着目し、*A. nidulans* を液体培養した際のノンターゲットリポドミクスを行った。その結果、主要なリン脂質成分以外の多様な脂質成分においても、発芽時に不飽和度の高い脂質が増加することが明らかとなった (1)。これらの解析において、脂肪滴 (lipid droplet, LD) の主成分であるトリアシルグリセロールにおいて多様な分子種が検出されたことに着目し、菌糸内の LD をライン照明型ラマン顕微鏡で観察したところ、菌糸先端から後方にかけて部位に応じて LD の脂質成分が異なる可能性が示唆された。本発表では、これら LD 組成の菌糸内での空間的不均一性の要因・生理的意義についても議論する。

1) Iwama et al., *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids*, 1868, 159379 (2023)

### Lipid dynamics during filamentous growth in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*.

Ryo Iwama<sup>1,2,6</sup>, Nobuyuki Okahashi<sup>3,6</sup>, Ryo Kato<sup>4,5,6</sup>, Saya Okuzaki<sup>4,5</sup>, Chuner Yang<sup>1</sup>, Taka-aki Yano<sup>4,5</sup>, Takuo Tanaka<sup>4,5</sup>, Fumio Matsuda<sup>3</sup>, Hiroyuki Horiuchi<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo, <sup>2</sup>CRIIM, UTokyo, <sup>3</sup>Grad. Sch. Info. Sci. Tech., Osaka Univ., <sup>4</sup>pLED, Tokushima Univ., <sup>5</sup>RIKEN, <sup>6</sup>JST ACT-X)

## \*O-7 (P-74)

### ***Phanerochaete chrysosporium* におけるヘムによる解糖系, TCA 回路の制御機構の解明**

釣上竜河<sup>1</sup>, 三浦大典<sup>2</sup>, 加藤雅士<sup>1</sup>, 志水元亨<sup>1</sup> (<sup>1</sup>名城大・農, <sup>2</sup>産総研・バイオメディカル研究部門)

白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* はリグニン分解酵素であるリグニンペルオキシダーゼやマンガンペルオキシダーゼ, 多様なシトクロム P450 といったヘムタンパク質を細胞外に大量に生産することが知られており, 非常に優れたヘムおよびヘムタンパク質の合成能を有している。しかし, ヘム自身は光増感作用を有し強い細胞毒性を持つ化合物である。そのため, *P. chrysosporium* を含むいくつかの担子菌はヘムの毒性に対処する独自のヘム管理・高度利用機構を有すると考えられる。リグニンフラグメントであるバニリンを含む培地で *P. chrysosporium* を培養後, 無細胞抽出液中のヘム結合性タンパク質をアフィニティー精製により網羅的に解析した結果, クエン酸シンターゼ (CS), グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) が同定された。CS と GAPDH を異種発現させ, ヘミンを加えてアッセイすると酵素活性が阻害された。さらに, 紫外可視分光法とラマン分光法で得られたスペクトルから, CS の His 残基がヘムと直接結合することが示された。以上の結果から, *P. chrysosporium* は, 遊離のヘムと CS 及び GAPDH が直接相互作用することで, 解糖系及び TCA 回路のカーボンフラックスを制御し, ヘムの合成を抑制するダイナミックなヘム管理機構を有していることを明らかにした。

### **Pathway Crosstalk between the Central Metabolic and Heme Biosynthetic Pathways in the Basidiomycete**

#### ***Phanerochaete chrysosporium***

Ryoga Tsurigami<sup>1</sup>, Daisuke Miura<sup>2</sup>, Masashi Kato<sup>1</sup>, Motoyuki Shimizu<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Fac. of Agri., Univ. of Meiji, <sup>2</sup>Biomedical Dept., AIST)

## \*O-8 (P-34)

### **アカパンカビにおける *exo1* 欠損による短寿命表現型の原因の考察**

柳澤健斗<sup>1</sup>, 大竹花織<sup>2</sup>, 吉原亮平<sup>1</sup>, 畠山晋<sup>1</sup>, 田中秀逸<sup>1</sup> (<sup>1</sup>埼玉大・院理工, <sup>2</sup>埼玉大・理・生体制御学)

5'→3'エキソヌクレアーゼである EXO1 は真核生物に広く保存されており, 相同組換えやミスマッチ修復など様々なプロセスに関与することが知られている。子囊菌類に属するモデル糸状菌のアカパンカビにおいては *exo1* (NCU06089) にコードされている。我々は *exo1* 欠損株 ( $\Delta$ *exo1* 株) が2週間程度で菌糸生長を終止する短寿命表現型を示すことを発見し, その短寿命化メカニズムを解析している。EXO1 のゲノム維持に関する一般的な知見より, EXO1 の関わる何らかのプロセスが妨げられ, 野生株よりもハイペースに変異が蓄積した結果,  $\Delta$ *exo1* 株では早期に菌糸生長を終止すると考えられるが, その具体的なメカニズムは明らかとなっていない。本発表では,  $\Delta$ *exo1* 株の示す短寿命表現型の原因は複数存在し, 少なくとも一つは体細胞分裂時の相同組換えの異常であることを報告する。さらに, 減数分裂時の組換えイベントにおいても何らかの異常が生じており, その異常に起因する変異によって, 短寿命表現型が相加的に現れている可能性も示す。相同組換えにおける EXO1 の役割と, この遺伝子の欠損の結果の一つとして生じる短寿命表現型との関係について, 分子メカニズムを考察したい。

### **Discussions on occurrence factors of short lifespan which are caused by disruption of *exo1* gene in *Neurospora***

Kento Yanagisawa<sup>1</sup>, Kaori Otake<sup>2</sup>, Ryouhei Yoshihara<sup>1</sup>, Shin Hatakeyama<sup>1</sup>, Shuuitsu Tanaka<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Grad. Sch. of Sci. & Eng., Saitama Univ., <sup>2</sup>Dep. of Regulatory. Biol., Fac. of Sci., Saitama Univ.)

## O-9 (P-39)

### 麴菌 *Aspergillus oryzae* の細胞融合を制御する新規因子の同定

片山琢也, 丸山潤一 (東大院・農生科・応生工, 東大・微生物連携機構)

糸状菌では菌糸を伸長している栄養生長中でも細胞どうしが融合し、この過程は接合型には依存しないことから酵母で見られる接合とは異なっている。アカパンカビ *Neurospora crassa* では細胞融合の制御に関与する多くの因子が同定されているが、糸状菌特有の制御機構には未解明な部分が残されている。最近、ほかの糸状菌において、*N. crassa* で未同定だった新規の糸状菌特異的な制御因子が見いだされた<sup>1,2)</sup>。そのため、糸状菌特有の細胞融合の制御機構に未同定の因子が存在する可能性が考えられた。そこで本研究では、我々が細胞融合の解析系を確立している麴菌 *Aspergillus oryzae* において新規の細胞融合制御因子を探索し、その解析を行った。

RNA-seq 解析から既知の細胞融合関連遺伝子と同様の発現パターンを示し、糸状菌特異的に存在する遺伝子を絞り込んだ。代謝関連遺伝子を除いた 65 個の遺伝子破壊株を作製・解析したところ、細胞融合効率が顕著に低下した株が取得された。その原因遺伝子は Rho ファミリー GTPase に対する Guanine nucleotide exchange factor をコードすると推定され、このタンパク質を FdmA (Fusion-Defective Mutant A) と命名した。FdmA は子囊菌門の糸状菌に保存されていた一方で、分裂酵母の Gef1 と系統的に近くに位置したものの、Gef1 には保存されていない領域を N 末端側と C 末端側に有していた。FdmA は融合しようとしている菌糸部位に数分おきに局在するという特徴的なパターンを示し、細胞融合部位において機能することが示唆された。さらに、FdmA の C 末端領域の欠損によりその局在が見られなくなり、細胞融合効率が低下した。これらのことから、FdmA はその C 末端領域を介して糸状菌特有の細胞融合の制御に関与する可能性が考えられた。

<sup>1)</sup>Tanaka *et al.*, *Mol. Microbiol.*, 2020; <sup>2)</sup>Katayama *et al.*, *Mol. Microbiol.*, 2021

#### Identification of a novel factor involved in cell fusion of *Aspergillus oryzae*

Takuya Katayama, Jun-ichi Maruyama

(Dept. of Biotechnol. and CRIIM, The Univ. of Tokyo)

## O-10 (P-38)

### *Aspergillus fumigatus* における GPI アンカー糖鎖の生理的意義

門岡千尋<sup>1</sup>, 田中大<sup>2</sup>, 藤田盛久<sup>3</sup>, 岡拓二<sup>1</sup> (<sup>1</sup>崇城大・生物生命, <sup>2</sup>東北医薬大・薬, <sup>3</sup>岐阜大・

iGCORE)

グリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) アンカーは、全ての真核生物において保存されたタンパク質の細胞表面提示システムである。酵母や哺乳類において、GPI アンカーの生合成に関与する遺伝子の欠損は、細胞表面で働くタンパク質を細胞膜に繋ぎ止めることができなくなるため致死となることが知られている。本研究では、糸状菌における GPI アンカーの生理的な役割を明らかにすることを目的とした。

まず、*A. fumigatus* において、GPI アンカーの 3 つ目のマンノース (Man) 残基へのエタノールアミンリン酸 (EtNP) の転移に関わる *pigO* と *pigF* および、EtNP へタンパク質を転移するトランスアミダーゼ複合体の構成因子をコードする *pigK*, *gaaA*, *pigT*, *pigS*, *pigU* の各遺伝子破壊株の構築を試みた結果、いずれの破壊株も取得できたため、糸状菌において GPI アンカーを介したタンパク質の係留は生育に必須ではないことが示された。これらの GPI 生合成関連遺伝子の破壊株は生育が顕著に遅延し、菌糸の一部がいびつに膨らむバルーン構造を示した。次に GPI アンカーの 2 つ目、3 つ目の Man 残基の転移に関与する *pigV* と *pigB* 遺伝子の破壊株の構築を試みたものの、ヘテロカリオン破壊株のみ取得されたため、GPI アンカーのコア糖鎖は糸状菌においても生育に必須であることが示唆された。興味深いことに、4 つ目の Man 残基の転移に関与する *smpC* 遺伝子の破壊株は、取得できた全 GPI 生合成関連遺伝子破壊株の中で最も深刻な生育遅延を示した。また、*smpC* 破壊株は菌糸をほとんど形成できず、細胞全体が大きく膨らむ異常な細胞形態を示した。そこで、*smpC* 破壊株の細胞壁可溶性画分を抽出し、<sup>1</sup>H-NMR 解析を行った結果、真菌型ガラクトマンナン (FTGM) の存在を示す固有のケミカルシフトが消失していることが示されたため、これまで謎であった FTGM のキャリア分子は GPI アンカー糖鎖であることが確定した。以上の結果より、糸状菌において GPI アンカーは菌糸の形成に必須であり、タンパク質を細胞表面に係留する機能よりも、FTGM を含めたその糖鎖構造自体に重要な役割が存在することが示唆された。

#### Analysis of the physiological role of GPI glycans in *Aspergillus fumigatus*.

Chihiro Kadooka<sup>1</sup>, Yutaka Tanaka<sup>2</sup>, Morihisa Fujita<sup>3</sup>, Takuji Oka<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Fac. Biotech. Life Sci., Sojo Univ., <sup>2</sup>Div. Pharm., TMPU., <sup>3</sup>iGCORE., Gifu Univ.)

## \*O-11(P-47)

### 黄麹菌 *Aspergillus oryzae* の菌体内メタロエンドペプチダーゼ oryzalysin の局在解析

井上実希, 小川翠, 北浦健太朗, 森山裕充, 佐々木信光, 田中瑞己, 山形洋平 (農工大院・応生化)

Oryzalysin は黄麹菌 *Aspergillus oryzae* の有する菌体内メタロエンドペプチダーゼであり, *A. oryzae* には 3 つの oryzalysin 遺伝子が存在する (以下 *olsA*, *olsB*, *olsC*)。Oryzalysin は *Saccharomyces cerevisiae* が有する saccharolysin の *A. oryzae* におけるホモログである。Saccharolysin はミトコンドリアでミスフォールディングタンパク質の分解により生じたペプチドの分解に関与することが明らかとなっている。*A. oryzae* においても同様の機能を持つ可能性が考えられた。しかし, 各 oryzalysin の欠損株が 2,4-dinitrophenol 存在下で control 株とは異なる表現型を示す一方, *OlsA*, *OlsB*, *OlsC* にはミトコンドリア・ターゲティングシグナルに相当する配列は見られなかった。よって, *A. oryzae* の oryzalysin はミトコンドリア以外に局在し, 特異的な機能を有する可能性も考えられた。

本研究では *OlsA*, *OlsB*, *OlsC* の機能を解析するにあたり, *OlsA*, *OlsB*, *OlsC* と HA tag, tdTomato の融合タンパク質発現株を用い, 蛍光観察による局在解析を行った。その結果, *OlsA* が細胞質に局在する可能性が示唆された。*OlsB*, *OlsC* に関しては, 36 時間培養後の菌体でミトコンドリアへの局在の可能性が示唆された一方で, 48 時間培養後の菌体では局在が細胞質に移る可能性が示唆された。*OlsA*, *OlsB*, *OlsC* のより詳細な局在決定のために, 細胞分画とウエスタンブロット解析を用いた生化学的解析によりミトコンドリア, リソソーム, ペルオキシソームの分離を行った。ショ糖密度勾配を用いた細胞分画とマーカー酵素の活性測定による各 oryzalysin の局在解析について報告する。

#### Localization analysis of intracellular metalloendopeptidase oryzalysin in *Aspergillus oryzae*.

Miki Inoue, Midori Ogawa, Kentarou Kitaura, Hiromitsu Moriyama, Nobumitsu Sasaki, Mizuki Tanaka, Youhei Yamagata

(Dept. of Applied Biological Science, Tokyo Univ. of Agriculture and Technology)

## O-12 (P-53)

### 核酸系うまみ成分分解能の低下した麹菌株における酸性ホスファターゼの特性解析

酒井香奈江<sup>1</sup>, 鈴木忠宏<sup>2</sup>, 堀井悠一郎<sup>3</sup>, 和久豊<sup>4</sup>, 楠本憲一<sup>1</sup> (<sup>1</sup>阪大院・工, <sup>2</sup>農研機構, <sup>3</sup>新潟食品研, <sup>4</sup>(株)ビオック)

だし入り味噌の製造過程ではだしの添加前に, 核酸系うまみ成分の分解活性を持つ麹菌由来の酵素, 酸性ホスファターゼ(AP)を失活させるための加熱処理が必要である。我々は加熱処理の工程を回避するため, AP活性の大きく低下した麹菌 KBN8048 株(KBN)をスクリーニングしてきた。これまでの研究で, 13 個ある麹菌の推定 AP 遺伝子のうち 5 つに KBN 特異的なアミノ酸置換が存在すること [R4 本学会発表], AP 遺伝子がリン酸による発現制御を受けていることなどが分かっている [1, 2]。しかし, KBN で AP 活性が大きく低下した原因はまだ明らかになっていない。そこで, 本研究では KBN の AP の特性を解析し, 活性が大きく低下した原因を詳しく調べることにした。リン酸による発現制御パターンと KBN の AP 活性低下の様子から, 5 つの変異 AP のうち AphB と AphC が AP 活性低下の原因ではないかと考えられたため, KBN を含む 3 種類の菌株由来の配列を持つ AphB と AphC をそれぞれ *tefl* プロモーターの制御化で高発現させたところ, KBN 型の配列を持つコンストラクトのみ液体培養の培養上清や菌体破碎物中にほとんど活性が確認できなかった。更に KBN 株において AP 活性低下の一番の原因と考えられる AphC については破壊株を作製したところ, 寒天プレートのコロニー上では KBN 型の配列を持っていても AP 活性が確認できることが分かった。コロニー上での各 AphC 活性を調べてみると, KBN 型の配列を持つものは温度や pH に対する安定性などが他とは異なるといった特性が明らかになった。

[1: Marui *et al.*, 2013, Int J Food Microbiol., 2: Yasuda *et al.*, 2014, Food Sci. Technol. Res.]

#### Characterization of acid phosphatases in *Aspergillus oryzae* strain with reduced “umami” degradation activity.

Kanae Sakai<sup>1</sup>, Tadahiro Suzuki<sup>2</sup>, Yuichiro Horii<sup>3</sup>, Yutaka Wagu<sup>4</sup>, Ken-Ichi Kusumoto<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., <sup>2</sup>NARO, <sup>3</sup>Niigata Food Res. Center, <sup>4</sup>Bio'c)

## \*O-13 (P-57)

### 細菌-糸状菌間相互作用におけるトランスクリプトームの比較解析

戸田征宏<sup>1</sup>, Gayan Abeysinghe<sup>1</sup>, 菅澤威仁<sup>2</sup>, 高谷直樹<sup>1,3</sup>, 竹下典男<sup>1,3</sup> ( <sup>1</sup>筑波大・生命環境, <sup>2</sup>筑波大・医学医療, <sup>3</sup>筑波大・MiCS)

細菌-糸状菌間相互作用 (bacterial-fungal interactions, BFIs) は生態系の機能に大きな影響を及ぼしているが、その機序はほとんど明らかにされていない。糸状菌 *Aspergillus nidulans* と枯草菌 *Bacillus subtilis* を共培養することで、*B. subtilis* が菌糸上を移動して拡散・増殖することや、*B. subtilis* が分泌するビタミン B1 (チアミン) が菌糸生長を促進することが示されている (Life Sci Alliance 2020)。さらに、多様な系統の糸状菌と細菌を組み合わせた共培養の解析から、相互作用の選択性・特異性が示されている。本研究では、系統の異なる複数の細菌 (*B. subtilis*, *Kluyvera intermedia*, *Pseudomonas aeruginosa*) と糸状菌 (*Alternaria alternata*, *A. nidulans*, *Aspergillus niger*, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium oxysporum*) からそれぞれ 1 株ずつ、計 9 通りの組み合わせで共培養し、共培養の組み合わせによる生育の変化を評価した。続いて双方のトランスクリプトームを取得し、細菌と糸状菌の組み合わせによって共通あるいは特異的な相互作用に着目して解析を行った。糸状菌のトランスクリプトームの解析により、BFI の特異性は二次代謝産物、毒素、抗生物質の生合成および抗酸化活性などの糸状菌の防御機構と直接的な相関があることが示された。オミクス解析により、*A. niger* の *B. subtilis* に対する抑制作用は、二次代謝産物である pyranonigrin A の生産増加に起因していることが示された。さらに、細菌と糸状菌のそれぞれについてビタミンやアミノ酸の生合成に関わる遺伝子の発現に変化がみられたことから、細菌と糸状菌の間でこれらの物質の受け渡しが行われている可能性にも着目した。

### Comparative analysis of transcriptomes in bacterial-fungal interactions

Mahiro Toda<sup>1</sup>, Gayan Abeysinghe<sup>1</sup>, Takehito Sugasawa<sup>2</sup>, Naoki Takaya<sup>1,3</sup>, Norio Takeshita<sup>1,3</sup>

(<sup>1</sup>Inst. of Life and Env. Sci., Univ. of Tsukuba, <sup>2</sup>Inst. of Med., Univ. of Tsukuba, <sup>3</sup>MiCS, Univ. of Tsukuba)

## \*O-14 (P-59)

### 麹菌における同株のコロニー間で生じる増殖抑制に関与する遺伝子の同定

浜中祐弥<sup>1</sup>, 片山琢也<sup>1,2</sup>, 黒田裕樹<sup>3</sup>, 丸山潤一<sup>1,2</sup> ( <sup>1</sup>東大院・農生科・応生工, <sup>2</sup>東大・微生物連携機構, <sup>3</sup>慶應大・環境情報)

糸状菌では異種または同種異株どうしを寒天培地上で対峙培養した際に、向かい合った 2 つのコロニーの増殖が抑制される拮抗作用 antagonistic effect が生じることが知られている。一方、我々は麹菌 *Aspergillus oryzae* の野生株 RIB40 を対峙培養した際に同種同株どうしにもかかわらず、コロニー間で増殖抑制が生じることを糸状菌で初めて見いだした<sup>1)</sup>。本研究では *A. oryzae* でこの現象が生じるメカニズムを解明するため、対峙培養におけるコロニー間の増殖抑制に関与する遺伝子の探索を行った。

これまでに RIB40 株を用いた RNA-seq 解析の結果から、コロニー間の増殖抑制時に二次代謝関連遺伝子の発現が上昇していることを明らかにした<sup>1)</sup>。この結果にもとづき、糸状菌の二次代謝の制御因子 LacA をコードする遺伝子を破壊したところ、増殖抑制が生じなくなった。また、*A. oryzae* の転写制御遺伝子破壊株ライブラリを用いたスクリーニングを行い、G タンパク質シグナル伝達の調節因子 RGS タンパク質をコードする *flbA* 遺伝子の破壊株で増殖抑制が生じないことを見いだした。以上の結果から、対峙培養のコロニー間の増殖抑制に関与する遺伝子を初めて発見し、これらがコードする LacA と FlbA は糸状菌において広範な遺伝子発現調節への関与が報告されていることから、遺伝子発現調節を介して増殖抑制を制御する可能性が考えられた。現在、LacA や FlbA と協調して機能するタンパク質、RNA-seq 解析において *laeA* および *flbA* の破壊株で発現変動を示した遺伝子を対象として、コロニー間の増殖抑制を制御する遺伝子群を探索している。

1) 浜中ら、第 20 回糸状菌分子生物学コンファレンス、P-48 (2021)

### Identification of genes involved in growth inhibition between colonies of the same strain in *Aspergillus oryzae*

Yuya Hamanaka<sup>1</sup>, Takuya Katayama<sup>1,2</sup>, Hiroki Kuroda<sup>3</sup>, Jun-ichi Maruyama<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, <sup>2</sup>CRIIM, The Univ. of Tokyo, <sup>3</sup>Fac. of Env. and Info. Stud., Keio Univ.)

## \*O-15 (P-55)

### *Aspergillus aculeatus* において形態形成制御因子はセロビオースに応答した遺伝子発現誘導を制御する

志賀結衣<sup>1</sup>, 菊矢咲季<sup>1</sup>, 川口剛司<sup>1,2</sup>, 谷修治<sup>1,2</sup> (阪府大・生環科<sup>1</sup>, 阪公大院・農<sup>2</sup>)

【目的】 *Aspergillus aculeatus* におけるマンノビオースとセロビオースに応答した酵素遺伝子の発現は、転写因子 ManR を介して誘導される。当研究グループはこれまでに、UDP-glucose 4-epimerase がマンノビオースに応答した遺伝子発現誘導に必須であること、隔壁形成因子の SepM が、セロビオースに応答した遺伝子発現制御に関与していること、また SepM は、隔壁形成を促進するキナーゼ様タンパク質 (SepL) と相互作用することを見出した。そこで本研究は、形態形成に関わる因子の機能を解析し、ManR が異なる誘導物質からのシグナルを受けて遺伝子発現を誘導する分子機構を解明することを目的とした。

【方法・結果】 *A. aculeatus* *sepL* 破壊株 ( $\Delta$ *sepL*) および *sepL* 相補株 (*CsepL*) を用いた解析により、 $\Delta$ *sepL* では隔壁形成能が約 1/10 に低下すること、セロビオースに応答した遺伝子発現誘導能が消失する一方で、マンノビオースに応答した遺伝子発現誘導能は低下するのみであることを見出した。次に、隔壁は細胞壁と同じ成分から構成されていることから、cell wall integrity (CWI) 経路の関与を解析した。CWI 経路からのシグナルを受ける転写因子 *rlmA* 単独破壊は遺伝子発現誘導に影響しなかったものの、*sepM* および *rlmA* 二重破壊によりセロビオースに応答した酵素遺伝子発現誘導能は消失した。なお、マンノビオース応答した遺伝子発現誘導能は低下したのみであった。これらの結果より、ManR を介したセロビオースに応答する遺伝子発現誘導経路に、隔壁形成因子と CWI 経路の転写因子が特異的に関わっていることが遺伝学的に示された。

### Regulators involved in morphogenesis in *Aspergillus aculeatus* control the cellobiose-responsive induction of cellulolytic enzyme genes

Yui Shiga<sup>1</sup>, Saki Kikuya<sup>1</sup>, Takashi Kawaguchi<sup>1,2</sup>, Shuji Tani<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>Osaka Pref. Univ., <sup>2</sup>Osaka Metropolitan Univ.)

## \*O-16 (P-101)

### 灰色かび病菌 *Botrytis cinerea* が植物由来の抗菌物質を代謝・排出する機構に関する研究

芦田晃<sup>1</sup>, 黒柳輝彦<sup>1</sup>, バラサグ サラリア アブリエル<sup>1</sup>, 福島啓太<sup>1</sup>, 鈴木孝征<sup>2</sup>, 田中愛子<sup>1</sup>, 佐藤育男<sup>1</sup>, 千葉壮太郎<sup>1</sup>, 小鹿一<sup>1</sup>, 竹本大吾<sup>1</sup> (1名大院・生命農学, 2中部大・応用生物)

灰色かび病菌 *B. cinerea* は、1,400 種以上の植物に感染する多犯性の病原性糸状菌であり、様々な植物種が生産する多様な抗菌物質 (ファイトアレキシン) に対して概して高い耐性を持つ。ナス科植物のファイトアレキシンであるカプシジオールやリシチン、ブドウなどの生産するレスベラトロール、アブラナ科植物のブラシニン、マメ科植物のグリセオリンを処理した灰色かび病菌の RNAseq 解析を行ったところ、それぞれのファイトアレキシン処理によって顕著に発現誘導される 20-100 程度の遺伝子が見出され、異なる処理区それぞれで比較的特異的な遺伝子が誘導されていた。特定のファイトアレキシン処理によって誘導される遺伝子群には、処理したファイトアレキシンの解毒化酵素や排出トランスポーターの遺伝子が含まれていたことから、灰色かび病菌は多様なファイトアレキシンの構造あるいは毒性を識別して、適切な耐性機構を活性化できることが示された。本発表では、灰色かび病菌の特殊なファイトアレキシン代謝機構および認識機構の解明のための実験系の確立についても報告する。

### Metabolism and efflux mechanism of *Botrytis cinerea* to a diverse phytoalexins from various plant families

Akira Ashida<sup>1</sup>, Teruhiko Kuroyanagi<sup>1</sup>, Abriel Salaria Bulasag<sup>1</sup>, Keita Fukushima<sup>1</sup>, Takamasa Suzuki<sup>2</sup>, Aiko Tanaka<sup>1</sup>, Ikuo Sato<sup>1</sup>, Sotaro Chiba<sup>1</sup>, Makoto Ojika<sup>1</sup>, Daigo Takemoto<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Grad. Sch. Bioagr. Sci., Nagoya Univ., <sup>2</sup>Coll. Biosci. Biotech., Chubu Univ.)

## O-17(P-103)

### 植物葉圏の非病原性細菌 *Chitinophaga* sp. はアブラナ科炭疽病菌の病原性を促進する

田中香帆<sup>1</sup>, 田中智佳子<sup>1</sup>, 石田史子<sup>1</sup>, 山口美幸<sup>1</sup>, 竹下典男<sup>2</sup>, 田中茂幸<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>摂南大・農, <sup>2</sup>筑波大・MiCS)

植物葉圏には非病原性細菌群が常在するが、これらが植物病原糸状菌の病原性にどのような影響を与えるかはよく知られていない。我々は、シロイヌナズナ(*At*)の葉から培養可能な細菌群を単離し、*At* に感染する糸状菌であるアブラナ科炭疽病菌(*Ch*)の病原性に与える影響を調べた。各細菌を *Ch* の孢子と共に *At* 葉に接種したところ、*Chitinophaga* 属細菌は有意に *Ch* の病斑形成を促進した。*At* 葉における微生物叢解析の結果、*Chitinophaga* 属細菌は植物葉圏の常在細菌であることが示唆された。次に、”*Ch* のみを接種”および”*Chitinophaga* 属細菌と *Ch* を共接種”した *At* 葉間における植物遺伝子の発現変動解析を行ったところ、両者間で大きな違いは見られなかった。このことから、*Chitinophaga* 属細菌は植物にではなく、*Ch* に影響を与えると考えられた。そこで、*Ch* の孢子と *Chitinophaga* 属細菌をスライドガラス上で共培養し、形態形成を顕微鏡観察した。その結果、*Ch* のみの場合では植物侵入に必須の構造物である付着器が1つの孢子から1つ形成されるのに対し、*Chitinophaga* 属細菌存在下では付着器が1つの孢子から2つ形成された。また、この二次付着器の形成は大腸菌との共培養では誘導されなかった。*Chitinophaga* 属細菌存在下における植物葉上での *Ch* の感染行動を観察すると、スライドガラス上と同じく *Ch* は二次付着器を形成し、またこの二次付着器からも植物に侵入していた。さらに、二次付着器の形成は、*Chitinophaga* 属細菌培養上清のみでも誘導された。以上より、*Chitinophaga* 属細菌の分泌物が *Ch* の二次付着器の形成を誘導し、植物侵入効率を向上させていると考えられた。今後、*Chitinophaga* 属細菌が分泌する物質の同定を試みる。

### Phyllospheric nonpathogenic bacterium *Chitinophaga* sp. promotes virulence of *Colletotrichum higginsianum*.

Kaho Tanaka<sup>1</sup>, Chikako Tanaka<sup>1</sup>, Fumiko Ishida<sup>1</sup>, Miyuki Yamaguchi<sup>1</sup>, Norio Takeshita<sup>2</sup>, Shige-yuki Tanaka<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Faculty of Agriculture, Setsunan Univ., <sup>2</sup>Univ. of Tsukuba, MiCS)

## \*O-18 (P-90)

### 植物病原性糸状菌 *Fusarium oxysporum* の微小空間における伸長と病原性の関連

酒造ひなた<sup>1</sup>, 井谷綾花<sup>1</sup>, 山本里穂<sup>1</sup>, 高谷直樹<sup>1</sup>, 佐藤良勝<sup>2</sup>, Antonio Di Pietro<sup>3</sup>, 竹下 典男<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>筑波大・MiCS, <sup>2</sup>名古屋大・ITbM, <sup>3</sup>コルドバ大)

糸状菌は基質や宿主に吸着し菌糸を侵入させて生長する。土壌を通じて感染・共生する糸状菌 *Fusarium oxysporum* は、根表面から菌糸を侵入させ、植物細胞間を伸長し内生する。菌糸が維管束組織まで到達すると、植物の細胞死や通水障害を誘導し病原性を示す。このとき菌糸は微小な植物細胞間を伸長し生長するため、菌糸が自身よりも狭い空間で伸長する能力は病原性にも関わることが予想される。これまでに、菌糸直径より細い  $1\mu\text{m}$  幅の流路を持つマイクロ流体デバイス内で7種の糸状菌を培養しライブイメージングで解析することで、菌糸の伸長速度と微小流路の通過能のトレードオフが示された。(Fukuda et al., mBio 2021)。

本研究では菌糸の微小空間における伸長と病原性の関連を明らかにするため、*F. oxysporum* の病原性が低下する遺伝子破壊株18株(3つのMAPK経路、感染分化 *Fmk1*・高浸透圧適応 *Hog1*・細胞壁再構築 *Mpk1* 経路の遺伝子など)を同デバイス内で生育させ、微小流路の通過率と病原性の程度を比較した。結果、細胞壁の完全性に欠陥のある欠損株(*Mpk1*, キチン合成酵素, グルカン合成酵素など)で通過率が低下した。それらは病原性も低下することから、細胞壁の再構築による微小空間への伸長能力が病原性に重要であることが示唆された。一方、感染時の分化に必須な *Fmk1* 経路因子の破壊株では病原性が低下するものの、通過率は低下しなかった。以上より、菌糸の微小空間における伸長能力と感染時の分化の2つの経路がそれぞれ独立に病原性に関わることが示唆された。

### Relationship between elongation in microspace and virulence of plant pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*

Hinata Miki<sup>1</sup>, Ayaka Itani<sup>1</sup>, Riho Yamamoto<sup>1</sup>, Naoki Takaya<sup>1</sup>, Yoshikatu Sato<sup>2</sup>, Antonio Di Pietro<sup>3</sup>, Norio Takeshita<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Univ. of Tsukuba, MiCS, <sup>2</sup>Univ. of Nagoya, ITbM, <sup>3</sup>Univ. of Córdoba)

# Poster Session

## \*P-1 (O-4)

### ヒラタケの担子胞子生産に必須な真正担子菌特異的タンパク質リン酸化酵素遺伝子の同定

小深田剛士<sup>1</sup>, 山崎風雅<sup>1</sup>, 中沢威人<sup>1</sup>, 菅野純子<sup>1</sup>, Minji Oh<sup>2</sup>, 河内護之<sup>1</sup>, 坂本正弘<sup>1</sup>, 本田与一<sup>1</sup> (京大院・農,<sup>2</sup>RDA, the Republic of Korea)

胞子を生産しない食用きのこ株の作出は、栽培施設の環境改善や生態系の遺伝子汚染防止に役立つ。しかし、胞子生産を完全に不全化させる遺伝子変異はあまり知られていない。本研究では、効率的な無胞子株の分子育種につなげる目的で、主要な食用きのこの一つであるヒラタケの胞子生産に必須な遺伝子を同定した。候補遺伝子を絞り込むために、まずヒラタケで RNA-seq 解析を行い、子実体のひだの部分でのみ転写蓄積量が豊富な遺伝子を 134 個絞り込んだ。これらの遺伝子から、同調的な減数分裂及び胞子形成が起こるウシグソヒトヨタケでも同様に、胞子形成時期の傘でのみ転写蓄積量が豊富な遺伝子を、RNA-seq データ (Muraguchi *et al.*, 2015 PLoS ONE) を用いて、さらに絞り込んだ。相同性解析の結果、絞り込んだ遺伝子の中に、真正担子菌特異的な推定カルモジュリン依存性リン酸化酵素遺伝子が見つかった (*gsk1* と命名)。この遺伝子の変異株を作製するため、Cas9 および gRNA の発現カセットを有するプラスミドを、野生ダイカリオン株 (PC9×#64) に導入した。得られたダイカリオンのハイグロマイシン耐性形質転換体全 6 株のうち、1 株で胞子生産数が 0 であった。またゲノム PCR の結果から、この 1 株のみで両核への *gsk1* 変異導入が示唆された。この株の担子器を Hoechst 33342 で染色し蛍光観察したところ、Prophase II での減数分裂進行停止が明らかになった。以上の結果より、Gsk1 はヒラタケの減数分裂進行および胞子生産に必須であることが示唆された。

### Putative agaricomycetes-specific protein kinase is essential for basidiospore production in *Pleurotus ostreatus*

Takeshi Kobukata<sup>1</sup>, Fuga Yamasaki<sup>1</sup>, Takehito Nakazawa<sup>1</sup>, Junko Sugano<sup>1</sup>, Minji Oh<sup>2</sup>, Moriyuki Kawauchi<sup>1</sup>, Masahiro Sakamoto<sup>1</sup>, Yoichi Honda<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Grad. Sch. of Agr., Kyoto Univ., <sup>2</sup>RDA, the Republic of Korea)

## \*P-2

### *Aspergillus fumigatus* の真菌型ガラクトマンナン生合成に関わる $\alpha$ -1,2-マンノース転移酵素 CmsA の遺伝子破壊による菌糸成長抑制を抑圧する変異株の変異点解析

岸田凜太郎<sup>1</sup>, 門岡千尋<sup>1</sup>, 田中大<sup>2</sup>, 平大輔<sup>1</sup>, 岡拓二<sup>1</sup> (崇城大院・工,<sup>2</sup>東北医薬大・薬)

病原性糸状菌である *Aspergillus fumigatus* の細胞表層に局在する真菌型ガラクトマンナン (FTGM) は、 $\alpha$ -1,2-マンノテトラオースが 9~10 個  $\alpha$ -1,6-結合したマンナン主鎖に  $\beta$ -1,5- $\beta$ -1,6-ガラクトフラン側鎖が  $\beta$ -1,2-もしくは  $\beta$ -1,3-結合した多糖である。FTGM のマンナン主鎖の生合成に関与する  $\alpha$ -1,2-マンノース転移酵素遺伝子である *cmsA* の破壊株は、菌糸伸長速度および分生子形成能が著しく低下する。 $\Delta cmsA$  を平板無機塩培地において培養すると、一部分から菌糸成長が回復した変異株が自然発生した。本研究では、 $\Delta cmsA$  抑圧変異株 (RKF-1 株) の責任遺伝子の同定を目的とした。

RKF-1 株ゲノムを次世代シーケンサーにより解析したところ、CmsA と協働して FTGM のマンナン主鎖生合成を担う  $\alpha$ -1,6-マンノース転移酵素 AnpA の ORF 領域に 28 塩基の挿入変異が見出された。そこで大腸菌による発現系を用いて変異型 AnpA を発現および精製し、酵素活性を測定した結果、変異型 AnpA はマンノース転移活性を示さなかった。 $\Delta cmsA \Delta anpA$  二重破壊株を構築し、菌糸伸長速度および分生子形成数について解析したところ、RKF-1 株や  $\Delta anpA$  と同程度まで改善された。以上のことから、RKF-1 株における抑制変異の責任遺伝子は *anpA* であることが明らかになり、 $\Delta cmsA$  株における生育遅延は AnpA による異常糖鎖の蓄積によってもたらされることが示唆された。

### Identification of an extragenic suppressor for the growth defect in the *cmsA* deletion mutant in *Aspergillus fumigatus*.

Rintaro Kishida<sup>1</sup>, Chihiro Kadooka<sup>1</sup>, Yutaka Tanaka<sup>2</sup>, Daisuke Hira<sup>1</sup>, Takuji Oka<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Sojo Univ., <sup>2</sup>Dept.Pharm., Tmpu.)

### \*P-3

#### 温度測定法による麹菌菌糸分散株の培養液の混合時間の評価

薄田隼弥<sup>1</sup>, 武藤清明<sup>1</sup>, 市川暉<sup>1</sup>, 宮澤拳<sup>1</sup>, 吉見啓<sup>2,3</sup>, 加藤好一<sup>4</sup>, 阿部敬悦<sup>1,3</sup> (1東北大院・農, 2京大院・地環学, 3東北大・未来研, 4佐竹マルチミクス・攪拌研)

麹菌をはじめとする糸状菌の通気攪拌培養では、菌体の生育とともに培養液の粘度が著しく上昇し、物質生産性を低下させることが知られる。当研究室では、麹菌がもつ細胞表面多糖である  $\alpha$ -1,3-glucan および galactosaminogalactan を欠損する株（分散株）が液体培地中で菌糸分散型の形態を示し、分散株の組換え酵素生産量が向上し、培養液粘度が低下することを示してきた<sup>1,2</sup>。Computational Fluid Dynamics (CFD) 解析により槽内の混合状態を定量評価したところ、野生株の培養液は著しく混合不良である一方、分散株では槽内の流れが改善することが示された。本研究では、CFD 解析の結果を実際の培養液を用いて実証することを目的に、麹菌培養液の通気攪拌時の混合時間を実測した。

混合時間を多点温度測定法により評価した。計測には、麹菌の野生株および分散株を 2.2 L の YPDS 培地にて 60 時間培養して得られた培養液を使用した。600 rpm, 1 vvm で通気攪拌し、25°C に温調した培養槽の槽底から少量の熱湯を注入し、槽内の 14 ヶ所に設置した熱電対によって温度変化を測定した。その結果、熱湯投入後、分散株では野生株と比べて液面付近の温度変化が迅速に起こり、混合時間は野生株の約 1/5 倍となった。これらの結果は、CFD 解析によって得られた槽内の流れの特徴と良く整合した。分散株では粘度低下により混合が良好となり、混合時間が大幅に短縮されることが示された。

1) Miyazawa et al. *Front. Microbiol.* (2019) 10:2090; 2) Ichikawa et al. *J. Biosci. Bioeng.* (2022) 133(1):39-45

#### Experimental analysis of mixing time in fermentation of an *Aspergillus oryzae* hyphal dispersed mutant

Shunya Susukida<sup>1</sup>, Kiyooki Muto<sup>1</sup>, Hikaru Ichikawa<sup>1</sup>, Ken Miyazawa<sup>1</sup>, Akira Yoshimi<sup>2,3</sup>, Yoshikazu Kato<sup>4</sup>, Keietsu Abe<sup>1,3</sup> (1Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., 2Grad. Sch. Glob. Env. Stud., Kyoto Univ., 3NICHe, Tohoku Univ., 4Satake MultiMix Corp.)

### \*P-4

#### 鯉節カビに内在するマイコウイルスの探索

武馬聖二<sup>1,2</sup>, 浦山俊一<sup>3,4</sup>, 周防玲<sup>1</sup>, 糸井史朗<sup>1</sup>, 岡田茂<sup>5</sup>, 二宮章洋<sup>5</sup> (1日大・生物資源, 2東大・農, 3筑波大・生命環境, 4筑波大・MiCS, 5東大院・農生科)

鯉節は重要な水産食品であり、カツオの切り身を煮熟後、燻して乾燥させたものを荒節、荒節にカビをつけ発酵させたものを枯節や本枯節と呼ぶ。鯉節発酵に関わるカビは鯉節カビと呼ばれ、*Aspergillus* 属糸状菌が優占することが明らかになっており、鯉節カビは枯節特有の風味形成に関わると考えられている。

マイコウイルスは真菌に内在するウイルスであり、宿主に様々な生理的影響を与える。過去に多くの *Aspergillus* 属糸状菌からマイコウイルスが報告されていることから、我々は、鯉節カビにもある程度の割合でマイコウイルスが感染しており、発酵に影響を与えるとの仮説を立てた。本研究では、鯉節カビに内在するマイコウイルスの多様性を明らかにすることを目的とした。枯節から分離された *Aspergillus* 属糸状菌 5 種 9 株について二本鎖 RNA の電気泳動をおこなったところ、そのうち 2 種 3 株にウイルスが内在することが示唆された。そこで、次世代シーケンサーによりウイルスのゲノム配列を決定した結果、発酵における優占種である *Aspergillus chevalieri* 計 2 株から 6 種（トティ、フザリ、ポリマイコ、クライソ、ミト、パルティティ）、*Aspergillus sulphureus* から 1 種（パルティティ）のウイルスが検出された。現在、ウイルスが宿主に与える影響を明らかにするために、抗ウイルス薬を用いてウイルスの除去を試みている。一部のウイルスについては非感染株が得られており、ウイルスが宿主の表現型に与える影響についても報告する予定である。

#### Search for mycoviruses endogenous to katsuobushi-mold

Seiji Buma<sup>1,2</sup>, Syun-ichi Urayama<sup>3,4</sup>, Rei Suo<sup>1</sup>, Shiro Itoi<sup>1</sup>, Shigeru Okada<sup>5</sup>, Akihiro Ninomiya<sup>5</sup>

(1College of Biores. Sci., Nihon Univ., 2Fac. of Agric., The Univ. of Tokyo, 3Fac. of Life & Environ. Sci., Univ. of Tsukuba, 4MiCS, Univ. of Tsukuba, 5Grad. Sch. of Agric. & Life Sci., The Univ. of Tokyo)

## \*P-5

### 黄麹菌における光遺伝学的手法を用いた有用物質高生産の試み

福原遼一郎, 井上慶士, 河西建輔, 竹川薫, 樋口裕次郎 (九大院・生資環・生命機能)

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* は多核多細胞の糸状菌であり, 様々な有用酵素の分泌能に加え, 有用二次代謝産物の生産能も有している。そのため, 有用物質生産の宿主として利用されており, 生産効率強化のための様々な手法が試みられている。微生物を用いた有用物質生産においては, 必要な酵素群を細胞内で高発現させる方法が一般的である。しかし, 複数段階の酵素反応の場合, 中間代謝物が次反応の酵素と空間的に効率良く反応できず, 目的生成物が多く得られないケースが考えられる。また, 単純な酵素群の高発現は宿主細胞に過剰な代謝産物生産を強いることになり, 細胞の生育に悪影響を及ぼす可能性も考えられる。そこで本研究では, 光遺伝学的手法を黄麹菌に導入し, 細胞質において高発現させた酵素群の凝集・解離を制御することで, 目的物質の高効率生産段階と細胞生育段階を制御可能な生産システムの構築を目的とした。

黄麹菌が生合成する有用物質の一つに, 高い抗酸化作用を示すエルゴチオネイン (EGT) が存在する。EGT の推定生合成酵素である AoEgtA/B/C の3つの酵素の局在解析から, EGT はヒスチジンを初発物質として, 細胞質において生合成されることが示唆された。そこで, これら3つの生合成酵素に青色光受容タンパク質である Cry2 を融合し, 青色光による酵素群の凝集・解離の制御を試みる。実際に, Cry2-EGFP-AoEgtA を過剰発現する黄麹菌株を作製し, この融合タンパク質が青色光の照射により, ドット状凝集体を形成することを蛍光顕微鏡解析により確認した。現在, 形成した酵素凝集体の凝集・解離の制御についてさらなる解析と検討を行っており, EGT 生産性への影響についても評価する予定である。

### An optogenetic approach to the high production of useful substances in *Aspergillus oryzae*

Ryoichiro Fukuhara, Keishi Inoue, Kensuke Kawanishi, Kaoru Takegawa, Yujiro Higuchi

(Dept. of Biosci. Biotechnol., Kyushu Univ.)

## \*P-6 (O-1)

### 転写因子 AmyR の活性化に関わるコウジカビの新規イソマルトースセンサー遺伝子の同定

ジョン ダミン, 渡嘉敷直杏, 新谷智子, 新谷尚弘, 五味勝也 (東北大学・農学研究科)

*Aspergillus oryzae*, or koji mold, is known for its ability to produce high levels of hydrolytic enzymes including amylolytic and proteolytic enzymes, which are used in various industrial applications such as Japanese fermented foods and beverages. In *A. oryzae*, the regulation of amylolytic enzyme gene expression is controlled by the fungal-specific transcription factor AmyR, which regulates the expression of  $\alpha$ -amylase, glucoamylase, and  $\alpha$ -glucosidase genes. The induction of AmyR activity is triggered by isomaltose most effectively compared to glucose or maltose. However, isomaltose was found to be barely incorporated into the fungal cells both in *A. oryzae* and *Aspergillus nidulans*, suggesting the existence of an unidentified isomaltose sensor on the plasma membrane. In this study, to identify the isomaltose sensor, *A. nidulans* mutant strains showing good growth on isomaltose agar were isolated from the strain that showed a defective growth due to overexpression of *brlA*, a transcription factor required for conidiation, with the strong  $\alpha$ -amylase gene promoter. Genomic DNA of the most promising candidates were used for whole genome sequencing to compare genetic polymorphisms between mutant strains. SNP analysis revealed that mutation in the putative coding sequences (CDS) was included in the major facilitator superfamily (MFS) transport proteins. Interestingly, different kinds of polymorphisms were identified in this CDS in common. This MFS transporter is considered to be an isomaltose sensor of interest in this study, because deletion of the gene restored growth of the *A. nidulans* strain harboring the *brlA* overexpression cassette on isomaltose agar medium. Furthermore, the relative expression level of amylolytic genes as well as *amyR* decrease significantly in the disruption mutant, demonstrating this CDS affects on the AmyR induction pathway.

### A novel isomaltose sensor identification involved in the activation of the transcription factor AmyR in *Aspergillus*

Jeong Da Min, Jikian Tokashiki, Tomoko Shintani, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi

(Grad. Sch. Agric Sci., Univ. of Tohoku)

## \*P-7

### A comprehensive examination of heterokaryon incompatibility and strain phylogenetic diversity in the industrial filamentous fungus *Aspergillus oryzae*

Yahong Zou<sup>1</sup>, Chan Lu<sup>1</sup>, Takuya Katayama<sup>1,2</sup>, Kazuhiro Iwashita<sup>3</sup>, Jun-ichi Maruyama<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, <sup>2</sup>CRIIM, The Univ. of Tokyo, <sup>3</sup>NRIB)

In filamentous fungi, cell fusion between genetically incompatible strains leads to growth inhibition or cell death, which is termed heterokaryon incompatibility. The filamentous fungus *Aspergillus oryzae* has numerous diverse strains that are selectively used in Japanese food fermentation (e.g. sake, soy sauce, and *miso*). In our previous study, *A. oryzae* RIB strains were classified into compatible groups, and the strains incompatible with each other basically belong to separate phylogenetic clades<sup>1)</sup>. In this study, by investigating the *A. oryzae tane-koji* (TK) strains, of which whole genome sequences were phylogenetically analyzed<sup>2)</sup>, we aimed to extensively understand the heterokaryon incompatibility in diverse strains.

To explore the connection between the overall diversity of *A. oryzae* strains and phylogeny, we selected 20 TK strains representing diverse phylogenetic clades. Compatibility analysis together with RIB strains by protoplast fusion revealed that compatible group classification exhibited a consistency with the phylogenetic clades. To investigate naturally occurring cell fusion, the heterokaryotic cells formed via cell fusion were analyzed by co-culturing. Strains belonging to separate phylogenetic clades did not form heterokaryon cells detected. However, unexpectedly, no heterokaryon cells were detected in some of strain pairings from the same clade, dissimilar to the compatibility results of protoplast fusion, leading to further phylogenetic grouping of sub-clades. These findings suggest the presence of additional self/nonself recognition mechanisms besides heterokaryon incompatibility in the diverse *A. oryzae* strains.

1) Lu *et al.* (2020) Annual meeting of JSBBA 3A10a09. 2) Watarai *et al.* (2019) DNA Res. 26, 465-472.

## \*P-8

### 麹菌異種発現系によるアマトキシン類の生合成研究

根岸透子, 尾崎太郎, 菅原章公, 森下陽平, 浅井禎吾 (東北大院薬)

$\alpha$ -amanitin (**1**) に代表されるアマトキシンは担子菌類が生産する強力な RNA ポリメラーゼ II の阻害薬であり、抗がん剤としての開発が進められている。構造的な特徴としては、トリプトファンとシステインの架橋により構築されるトリプタチオニンと呼ばれる構造が挙げられる。生合成においては、前駆体ペプチド *AMA1* が転写・翻訳後に修飾される RiPPs (Ribosomally synthesized and Post-translationally modified peptides) に分類される化合物であり、加水分解酵素 *POPB* による環化反応までが明らかにされている。<sup>1,2</sup> その後の酸化反応については、複数の遺伝子の関与が示唆されているものの、詳細については分かっていない。<sup>3,4</sup> 本研究では、異種宿主を用いて生合成遺伝子を発現することで、酸化酵素の機能解析と生合成経路の再構築ができると考え、麹菌発現系を用いた生合成研究を行った。

研究材料となる **1** の生産菌を得るため、菌糸体での生産や遺伝子操作の例が知られている *Galerina* 属の類縁株から生産菌を探索した。HPLC で代謝物を分析した結果、1 株で **1** の生産が確認できた。次世代シーケンサーを用いた生産菌のゲノム解析の結果、既知の *G. marginata* CBS 339.88 にコードされた **1** の生合成遺伝子クラスターと相同性を示す遺伝子群が得られた。並行して、前駆体遺伝子 *AMA1* と加水分解酵素遺伝子 *POPB* を麹菌内で発現した。LC-MS で代謝物を分析した結果、環化ペプチド **2** が確認できた。これまで酵素反応による生産は知られていたが、本研究では麹菌を用いた **2** の生産を初めて達成した。今後は構築した麹菌形質転換体に酸化酵素遺伝子を導入して機能を明らかにし、生合成経路の再構築を進める。

1) H. Hallen *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2007**, *104*, 19097–19101. 2) H. Luo *et al.* *Chem. Biol.* **2014**, *21*, 1610–1617. 3) H. Luo *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2022**, *119*, e2201113119. 4) WO 2018/201050 A1

### Studies on the biosynthesis of $\alpha$ -amanitin employing heterologous expression system.

Toko Negishi, Taro Ozaki, Akihiro Sugawara, Yohei Morishita, Teigo Asai

(Grad. Sch. Pharm. Sci., Tohoku Univ.)

## \*P-9 (O-2)

### 麴菌を宿主とする *in vivo* クローニング法による天然物生合成経路の迅速再構築の検討

青木翔吾, 尾崎太郎, 菅原章公, 森下陽平, 浅井禎吾 (東北大院薬)

糸状菌が生産する天然物は様々な活性を示すため医薬資源として重要であり, 特に非リボソームペプチド (NRP) には, 抗生物質 penicillin や免疫抑制剤 cyclosporine に代表されるように顕著な生物活性を持つ化合物が多い。糸状菌ゲノム上には一株当たり 5 つ程度と多くの非リボソームペプチド合成酵素 (NRPS) 遺伝子が存在するため, 生物活性天然物の資源として有望であるが, ゲノムマイニングと異種発現による探索例は少なく天然物資源として未開拓である。これは, 通常 10 kb を超える NRPS 遺伝子のクローニングや宿主への導入が煩雑であることが一因にあると考えられる, 本研究では糸状菌 NRP 探索法の確立を目的として, 麴菌を宿主とする簡便かつ迅速な異種発現法の構築を検討した。

CRISPR-Cas9 による二本鎖切断の修復機構の一つとして相同組換え (HDR) がある。この際, 外来遺伝子をドナーとして HDR を誘導することで宿主の染色体上に標的遺伝子を組み込むことが可能である。そこで, 標的遺伝子を HDR で再構築可能な断片として PCR で増幅し, 大腸菌等を用いるクローニング操作を回避して, 遺伝子断片を麴菌に直接導入する手法を検討した。初めに機能既知のテルペン合成酵素遺伝子を用いて予備検討を行ったところ, プラスミド DNA をドナーにする従来の手法と遜色ない効率で遺伝子を導入できることが判明した。そこで, テルペンやポリケチド, NRP 等複数の機能既知生合成遺伝子を材料として, 導入する遺伝子の長さや断片数, HDR の際の断片間オーバーラップ長を様々検討し, NRPS を探索するための条件を設定した。続いて, 研究室が保有する糸状菌株から 12 種の NRPS 遺伝子を選別し, 確立した手法を用いて麴菌へ導入した。得られた形質転換体の代謝物を LC-MS で分析したところ, 複数の株で形質転換体に特異的なピークが確認できたため, 現在化合物の単離と構造解析を進めている。

### Rapid reconstitution of the biosynthetic machineries of fungal natural products by *Aspergillus oryzae*-mediated *in vivo* cloning

Shogo Aoki, Taro Ozaki, Akihiro Sugawara, Yohei Morishita, Teigo Asai

(Grad. Sch. Pharm. Sci., Tohoku Univ.)

## \*P-10

### 有用二次代謝産物生産糸状菌 *Humicola nigrescens* におけるゲノム編集系の確立

堀野翔真, 荒添貴之, 鎌倉高志 (東理大院・創域理工)

一部のモデル糸状菌を除く多くの菌種では形質転換効率や相同組換え効率が低いことから, 分子遺伝学的手法を用いた効率的な遺伝子機能解析や育種が困難である。糸状菌 *Humicola nigrescens* は, 有用二次代謝産物のスクリーニングによって見出された非モデル糸状菌であり, これまで形質転換等の分子遺伝学的手法に関する報告はない。本研究では, *H. nigrescens* における有用二次代謝産物産生機構の解析や効率的な分子育種を目的として, CRISPR/Cas9 および CRISPR/Cas12a を用いたゲノム編集系の確立を行なった。

まず本菌ゲノムから抽出した内生プロモーターを CRISPR/Cas9 ベクターに適用し, メラニン生合成遺伝子を標的としてゲノム編集効率を評価した。その結果, gRNA のプロモーターとして内生 U6-1 プロモーターを, Cas9 のプロモーターとして内生 *gpdA* プロモーターを採用することで, 二回相同組換えによる高効率の遺伝子破壊が可能であることが示された。同様に CRISPR/Cas12a についても最適化を行なった結果, Cas9 と比較して同等かそれ以上の効率での遺伝子破壊に成功し, 複数遺伝子の同時破壊も可能であった。続いて, 非相同末端結合修復に関わる *Ku80* を標的として, ハイグロマイシン耐性遺伝子と *GFP* を含むドナー DNA を用いた一回相同組換えによる破壊株を取得し, 分子内相同組換えを介したマーカー除去を試みた。非選択圧下で  $\Delta ku80$  を継代培養したところ, GFP 蛍光の消失したセクターの取得に成功し, PCR によってドナー DNA の離脱が確認できた。本手法によって, 外来の核酸が残らない非遺伝子組換え生物として *H. nigrescens* の遺伝子改変が可能となった。

### Genome editing in *Humicola nigrescens* using CRISPR systems

Shoma Horino, Takayuki Arazoe, Takashi Kamakura

(Grad. Sch. Sci. Tech., Tokyo Univ. of Sci.)

## \*P-11

### 黄麹菌 $\Delta$ AG-GAG 株を宿主としたニゲラン合成遺伝子多コピー導入株の解析

阿部多恵<sup>1</sup>, 平田風子<sup>1</sup>, 與古田佳世<sup>1</sup>, 阿部敬悦<sup>2</sup>, 外山博英<sup>1</sup>, 上地敬子<sup>1</sup>, 水谷治<sup>1</sup> (<sup>1</sup>琉球大院・農,  
<sup>2</sup>東北大院・農)

ニゲランとは, *Aspergillus* 属や *Penicillium* 属の一部の糸状菌が窒素飢餓時に生産する細胞壁多糖である。我々は, 黒麹菌由来のニゲラン合成酵素遺伝子 (*nisA*) や合成に関与する遺伝子 (*agtC*, *gnsA*) を同定, 報告している (Uechi *et al.*, 2021)。加えて, ニゲランのエステル誘導体化合物はバイオマスプラスチックの作成が可能であることも報告している (Togo *et al.*, 2022)。本研究では, ニゲランの高生産を目指して, 黒麹菌及び黄麹菌を宿主としたニゲラン高生産株の造成を試みている。黄麹菌の高発現用プロモーター *PenoA142* に *nisA* 遺伝子を連結した発現カセットを黒麹菌野生株に導入したところ, 親株 (50 mg/g dry cell) の約 2 倍量のニゲランを生産した。黄麹菌においては,  $\alpha$ -1,3-グルカン合成酵素遺伝子群及び, ガラクトサミノガラクトン合成遺伝子群を破壊し, 液体培養で完全に菌糸が分散する  $\Delta$ AG-GAG 株を宿主とし, 黒麹菌と同様に *nisA* 遺伝子を導入したところ最大で約 4 倍のニゲランを生産した。今回は, これらニゲラン高生産株の生産量と導入された *nisA* 遺伝子のコピー数の関係について, また液体培養時に観察された特異的な構造, 及び顕微鏡において観察された菌糸表面に出現した棘状の構造について報告する。

### Analysis of the strain with multicopy nigeran synthase gene (*nisA*) using in *Aspergillus oryzae* $\Delta$ AG-GAG strain as a host

Tae Abe<sup>1</sup>, Fuko Hirata<sup>1</sup>, Kayo Yokoda<sup>1</sup>, Keietsu Abe<sup>2</sup>, Hirohide Toyama<sup>1</sup>, Keiko Uechi<sup>1</sup>, Osamu Mizutani<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Agric., Univ. Ryukyus, <sup>2</sup>Grad. Agric., Univ. Tohoku)

## \*P-12

### 黒麹菌ニゲラン合成酵素遺伝子への部位特異的変異導入がニゲラン合成へ与える影響

平田風子<sup>1,2</sup>, 水谷治<sup>1,2</sup>, 平良東紀<sup>1,2</sup>, 上地敬子<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>鹿児島大・連合農学研究科, <sup>2</sup>琉球大・農学部)

一部の *Aspergillus* 属や *Penicillium* 属糸状菌は, 窒素源飢餓条件下でニゲランという細胞壁多糖を活発に生産する。ニゲランは, D-グルコースが  $\alpha$ -1,3-グリコシド結合と  $\alpha$ -1,4-グリコシド結合を交互に繰り返す直鎖状の多糖である。我々は糸状菌がニゲランを生産する生理学的な意義の解明を目指し, 黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* のニゲラン合成酵素遺伝子 (*AlnisA*) を同定している (Uechi *et al.*, 2021)。ニゲラン合成酵素 NisA は  $\alpha$ -1,3-グルカン合成酵素と同様に複数の機能ドメインを持つ膜タンパク質であり, 細胞質内でアミラーゼ様ドメイン (In ドメイン) の作用により短鎖のニゲラン鎖が生成され, 膜貫通ドメインを通じて細胞質外へと輸送された後, 糖転移酵素様ドメイン (Ex ドメイン) によって短鎖のニゲラン鎖同士が重合され長鎖のニゲランが合成されると推測している。

本研究では, ニゲランの合成過程について知見を得ることを目的としている。まず,  $\alpha$ -1,3-グルカン合成とガラクトサミノガラクトン合成に関する酵素遺伝子群が破壊された *Aspergillus oryzae* AG-GAG  $\Delta$  株を宿主としてプロトプラスト-PEG 法によって *AlnisA* を導入した。続いて *AlnisA* の In ドメインあるいは Ex ドメインの推定触媒残基や基質の結合に関連すると推測されるアミノ酸残基を変異させた各種変異発現株を作製した。現在, これらの株から調製したニゲラン量, ニゲラン分子量について比較するとともに, 培養上清中に蓄積する糖質について分析を進めている。

### Effects of site-directed mutation into the nigeran synthase gene on nigeran synthesis

Fuko Hirata<sup>1,2</sup>, Osamu Mizutani<sup>1,2</sup>, Toki Taira<sup>1,2</sup>, Keiko Uechi<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup> United Gra. Sch. of Agric. Sci., Kagoshima Univ., <sup>2</sup> Faculty of Agriculture, Univ. of Ryukyus)

## \*P-13 (O-3)

### 麹菌における異種天然化合物の生産性に関与する新規制御因子の同定

吉岡弘史<sup>1</sup>, 原中実穂<sup>1</sup>, 齋藤直也<sup>1</sup>, 片山琢也<sup>1,2</sup>, 南篤志<sup>3</sup>, 及川英秋<sup>4</sup>, 丸山潤一<sup>1,2</sup> (東大院・農生科・応生工, <sup>2</sup>東大・微生物連携機構, <sup>3</sup>北大院・理, <sup>4</sup>中国・五邑大)

麹菌 *Aspergillus oryzae* は近年天然化合物の異種生産宿主として生合成研究に用いられており, その生産性向上は産業利用において重要である。酵母においては単一の制御因子の改変による代謝フラックスの改良が報告されているが, 糸状菌では同様のアプローチによる研究は進んでいない。*A. oryzae* において代謝の制御因子を発見できれば, 糸状菌の二次代謝に関連する代謝フラックスの制御機構が解明されるとともに, 遺伝子改変による異種天然化合物の生産性向上につながることを期待される。本研究では, *A. oryzae* を用いた異種天然化合物の生産性に関与する制御因子の同定と代謝における機能解析を目的とした。

担子菌由来の抗生物質であるジテルペン pleuromutilin を異種天然化合物生産のモデルとしたスクリーニング<sup>1)</sup>において, *A. oryzae* での過剰発現により異種天然化合物生産が大幅に抑制された複数の遺伝子に着目し, これらを破壊することで反対に生産性が向上するかを調べた。pleuromutilin 生産株における各遺伝子の破壊の結果, 破壊により 2.7 倍の pleuromutilin 生産量の増加および生育低下を示す遺伝子を見いだした。この遺伝子は転写因子をコードし, 他の糸状菌のオルソログでは植物への病原性の関与が報告されているが代謝における機能は不明である。現在, トランスクリプトーム解析によって, 代謝関連遺伝子の発現への影響を調べている。

1) 原中ら, 日本農芸化学会 2022 年度大会 4B04-01

### Identification of a novel regulator for productivity of heterologous natural compounds in *Aspergillus oryzae*

Hiroshi Yoshioka<sup>1</sup>, Miho Haranaka<sup>1</sup>, Naoya Saito<sup>1</sup>, Takuya Katayama<sup>1,2</sup>, Atsushi Minami<sup>3</sup>, Hideaki Oikawa<sup>4</sup>, Jun-ichi Maruyama<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, <sup>2</sup>CRIIM, UTokyo, <sup>3</sup>Grad. Sch. Sci., Hokkaido Univ., <sup>4</sup>Wuyi Univ., China)

## P-14

### Searching the possible reason of different growth in RIB40 and RIB143 responding to humic acid

Liyun Liu, Kanae Sakai, Takumi Tanaka, Ken-Ichi Kusumoto

(Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

*Aspergillus oryzae* is a domesticated filamentous fungus possibly isolated from soils, while humic acid (HA) is a macromolecule existing in undisturbed soil for centuries. Our previous study showed that HA stimulated the growth of RIB40, however, inhibited the growth of RIB143 on Czapek dox (CD) agar plates (Liu et al., JGAM, 2023); HA also similarly affected the mycelium dry weight of RIB40 and RIB143 in CD liquid medium (Liu et al., 1Fp03, SBJ, 2023). In the current study, transcriptomic profiles of RIB40 and RIB143 will be deeply compared to identify the possible reason of differential response of RIB40 and RIB143 to humic acid in molecular level by RNA-seq analysis. The gene ontology enrichment analysis using different expressed genes (DEGs) (up-regulated genes, HA/control>2; down-regulated genes HA/control<0.5) showed that HA specially 1) upregulated genes for molecular function of FAD (flavin adenine dinucleotide) binding, heme binding, tetrapyrrole binding, iron binding in RIB40; 2) upregulated genes for molecular function of pectate lyase activity and carbon-oxygen lyase activity in RIB143; 3) down-regulated genes for molecular function of heme binding and tetrapyrrole binding in RIB143. Therefore, the up-regulated genes for heme and tetrapyrrole bindings in RIB40, however, down-regulated of these genes in RIB143 may be one of the possible reasons for the differential growth of RIB40 and RIB143 responding to HA. The DEGs in transcriptome data were validated by quantitative RT-PCR.

## P-15

### 麹菌 *Aspergillus oryzae* におけるドロップレット培養とセルソーターを利用した $\alpha$ -アミラーゼ高発現株の取得検討

渡邊夏仁<sup>1</sup>, 戸所健彦<sup>1</sup>, 志田洋介<sup>2</sup>, 小笠原渉<sup>2</sup>, 石田博樹<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>月桂冠・総研, <sup>2</sup>長岡技科大・生物)

近年注目されている技術として、油中の微小な液滴（ドロップレット、本研究では water in oil エマルション）に微生物を封入し、培養・スクリーニングをするという方法がある。マイクロ流路セルソーターを活用することで、ハイスループットなスクリーニングが可能となる。*Aspergillus niger* において、 $\alpha$ -アミラーゼの発現が上昇した株を取得するために、ドロップレット培養を用いたスクリーニングの報告がされており、*Aspergillus oryzae* でも同様に  $\alpha$ -アミラーゼ高発現株が取得できないか、検討を始めた。

*A. oryzae* をドロップレットに封入し、培養すると、旺盛な菌糸生長によりエマルションが崩壊してしまう。一方、培養時間を短くすると、 $\alpha$ -アミラーゼの分泌量が十分ではなく、検出ができないという問題に直面した。そこで、様々な薬剤を培地に添加し、菌糸生長の抑制を試みたところ、微小管重合阻害剤ベノミルを添加することで、エマルションを崩壊させずに長時間培養することが可能になった。次いで、遺伝子組換えにより作成した *amyB* 高発現モデル株をドロップレット培養し、マイクロ流路セルソーターに供したところ、親株と高発現株の判別が可能であった。最後に、食品では非遺伝子組換え体の使用が求められるため、醸造に実用している菌株においてスクリーニングを実施した。取得した候補株で米麴を製麴し、 $\alpha$ -アミラーゼ活性を測定したが、親株と比較して、 $\alpha$ -アミラーゼ活性の上昇した株を取得することはできなかった。

#### Investigation on acquisition of high $\alpha$ -amylase expression strains of *Aspergillus oryzae* using droplet culture and cell sorter

Natsuhito Watanabe<sup>1</sup>, Takehiko Todokoro<sup>1</sup>, Yosuke Shida<sup>2</sup>, Wataru Ogasawara<sup>2</sup>, Hiroki Ishida<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Res. Inst., Gekkeikan Sake Co., Ltd., <sup>2</sup>Nagaoka Univ. of Technology)

## P-16

### *Aspergillus oryzae* の酵素発現への光照射の影響

鈴木聡<sup>1</sup>, 稲岡隆史<sup>1</sup>, 楠本憲一<sup>2</sup> ( <sup>1</sup>農研機構・食品研, <sup>2</sup>阪大院・工)

麹菌 *Aspergillus oryzae* RIB40 株では光により分生子形成が抑制されることが知られている。一方、*A. oryzae* RIB1187 株では光により分生子形成が促進される。我々は分生子形成における光応答が正反対の両菌株を用いて、*A. oryzae* の光応答全般を解明するため研究を進めている。本研究では、醸造上重要な酵素に着目し、光により *A. oryzae* の酵素遺伝子がどのように制御されているのか、また、その結果、酵素活性はどのように変化するのかについていくつかの知見を得たので報告する。

RIB40 株と RIB1187 株の光照射培養と暗培養でのトランスクリプトーム解析を行った。酵素遺伝子の発現を白色光の明暗で比較したところ、アミラーゼ系の遺伝子のいくつかは RIB40 では暗所で発現量が多く、一方 RIB1187 では、若干明所での発現量が多い傾向がみられるが有意差が見られなかった。タンパク質分解酵素は両菌株とも複数の遺伝子が明暗に対して相反する応答をしており、総体としての酵素活性への光照射の影響は考察できなかった。次に、RIB40 株と RIB1187 株の小麦ふすま固体培養の糖化力とタンパク質分解酵素活性における光照射の影響を観察した。RIB40 株では光照射により顕著に糖化力が低下したのに対して、RIB1187 株では、有意差がなかった。タンパク質分解酵素活性は両菌株とも光照射により低下した。

以上により菌株間に程度の差はあるものの、白色光の照射が麹菌の糖化力、及びタンパク質分解酵素活性を増強する効果を持たないことが解った。一方、境 (2017) によれば赤色光はアミラーゼ活性増大効果を持つとのことから、今後は赤色光への麹菌の応答を検証していく。

#### Effects of light on expression of enzymes of *Aspergillus oryzae*.

Satoshi Suzuki<sup>1</sup>, Takashi Inaoka<sup>1</sup>, Ken-Ichi Kusumoto<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Inst. Food Res., NARO, <sup>2</sup>Grad. Sch. Eng., Osaka Univ. )

## P-17

### 麴菌群総合ゲノムデータベース(CAoGDX)の開発について

片岡涼輔<sup>1</sup>, シャロン マリー バヘナ-ガリド<sup>1</sup>, 小林拓嗣<sup>1</sup>, 織田健<sup>1</sup>, 岩下和裕<sup>1,2</sup> (1独立行政法人酒類総合研究所, 2広島大学統合生命科学研究科)

我々はこれまでに、麴菌 (*Aspergillus oryzae*) RIB40 株のゲノムシーケンス情報を中心として、遺伝子のコード領域、タンパク質ドメイン情報、遺伝子発現情報などを実装し、他の主要な糸状菌類と比較可能な麴菌総合ゲノムデータベース (CAoGD) を開発し、公開している。

近年、麴菌についても多くの株がゲノムシーケンスされるようになり、当研究室でもパンゲノム解析を実施している。さらに、ロングリードシーケンサーとの併用により、完全長のゲノムシーケンスを得ることが出来るようになってきている。そこで、我々は、CAoGD をアップデートするとともに、多くの麴菌株のゲノム情報が比較解析可能な、麴菌群総合ゲノムデータベース (CAoGDX) の開発を行っている。現在までに、麴菌 RIB40 株の完全長ゲノムシーケンス情報を更新し、これまで複数のバージョンの RIB40 ゲノム情報に付随していた情報を統合した。さらに、麴菌 218 株の系統解析情報を掲載するとともに、各系統の代表として一株以上の完全長ゲノムシーケンス情報を格納した。つづいて、麴菌パンゲノムデータベースとして、オルソロググループを中心とした全菌株の比較解析をするためのデータベースシステムを構築した。加えて、遺伝子資源分譲についての手続きとの連携を行った。今後は、これらの複数データの連携を念頭に、ビューワーシステムの開発を行うとともに、菌株同士または系統間の比較解析情報の充実を目指す。本 CAoGDX は、令和 6 年 10 月にベータ版の公開を目指す。

### English title Development of CAoGDX (Comprehensive *Aspergillus oryzae* genome database across species)

Ryosuke Kataoka<sup>1</sup>, Sharon Marie Bahena-Garrido<sup>1</sup>, Takuji Kobayashi<sup>1</sup>, Ken Oda<sup>1</sup>, Kazuhiro Iwashita<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>National research institute of brewing, Japan, <sup>2</sup>Hiroshima Univ., Graduate School of Integrated Sciences for Life)

## P-18

### 白麴菌におけるクエン酸排出輸送体 CexA ホモログの機能解析

西谷篤<sup>1,2</sup>, 平松健太郎<sup>3</sup>, 門岡千尋<sup>4</sup>, 廣島杏香<sup>3</sup>, 澤田和敬<sup>5</sup>, 奥津果優<sup>3</sup>, 吉崎由美子<sup>1,3</sup>, 高峯和則<sup>1,3</sup>, 後藤正利<sup>6</sup>, 玉置尚徳<sup>1,3</sup>, 二神泰基<sup>1,3</sup> (1鹿大・連農, 2鹿大・先科セ, 3鹿大・農, 4崇城大, 5佐工技セ, 6佐大・農)

焼酎造りに使用される白麴菌 *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii* は多量のクエン酸を分泌生産する。先行研究により、白麴菌においてクエン酸の細胞外への分泌を担うクエン酸排出輸送体 CexA が同定された。白麴菌のゲノムには少なくとも 11 の CexA ホモログがコードされており、これらの中に何らかの有機酸の排出輸送体が存在するかどうか興味をもった。そこで本研究は、これらの CexA ホモログの機能を解析した。

まず、白麴菌のトランスクリプトームの情報から *cexA* ホモログの遺伝子発現レベルが低いことが示唆された。そこで、白麴菌の *cexA* 遺伝子破壊株を宿主として各 *cexA* ホモログを *tefA* プロモーターにより過剰発現する株を構築し、培養上清に分泌される有機酸の変化を HPLC により分析した。その際、菌体は凍結乾燥して重量を測定し、菌体重量あたりの有機酸生産量として評価した。なお *cexA* 遺伝子破壊株は、クエン酸の分泌生産を防ぐために使用した。その結果、いずれの *cexA* ホモログ過剰発現株もクエン酸生産量に大きな変化は認められず、11 の CexA ホモログはクエン酸排出輸送体ではないことが示唆された。また *cexA* ホモログ過剰発現株のうち AKAW\_00125 過剰発現株の培養上清には 2-オキシグルタル酸とフマル酸が高濃度に蓄積し、AKAW\_03932 過剰発現株の培養上清に 2-オキシグルタル酸、コハク酸、およびリンゴ酸が高濃度に蓄積した。さらに、黄麴菌 *Aspergillus oryzae* において AKAW\_00125 と AKAW\_03932 を *amyB* プロモーターにより過剰発現させた結果、有機酸分泌生産性が同様に变化した。これらの結果から、CexA ホモログである AKAW\_00125 と AKAW\_03932 は 2-オキシグルタル酸等のジカルボン酸の排出輸送体である可能性が示唆された。

### Functional analysis of citric acid exporter CexA homologs in *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii*

Atsushi Nishitani<sup>1,2</sup>, Kentaro Hiramatsu<sup>3</sup>, Chihiro Kadooka<sup>4</sup>, Kyoka Hiroshima<sup>3</sup>, Kazutaka Sawada<sup>5</sup>, Kayu Okutsu<sup>3</sup>, Yumiko Yoshizaki<sup>1,3</sup>, Kazunori Takamine<sup>1,3</sup>, Masatoshi Goto<sup>6</sup>, Hisanori Tamaki<sup>1,3</sup>, Taiki Futagami<sup>1,3</sup>

(<sup>1</sup>Uni. Grad. Sch. Agri. Sci., Kagoshima Univ., <sup>2</sup>Adv. Sci. Res. Pro., Kagoshima Univ., <sup>3</sup> Fac. Agri., Kagoshima Univ.,

<sup>4</sup>Biotech. Life Sci., Sojo Univ., <sup>5</sup>Ind. Tech. Cent., Saga Pref., <sup>6</sup> Fac. Agri., Saga Univ.)

## P-19

### 遊離 DGLA 生産麹菌変異株における *tkl* 過剰発現化と *agsB* ノックアウトによる生産向上

玉野孝一<sup>1,2</sup>, 中井汐里<sup>3</sup>, 高山晴香<sup>1</sup>, 今井泰彦<sup>4</sup> (1産総研・生物プロセス研究部門, 2産総研・CBBD-OIL, 3北海道ハイテク専門学校, 4野田産業科学研究所)

高度不飽和遊離脂肪酸の一つである遊離ジホモ- $\gamma$ -リノレン酸 (DGLA) は、医薬品に利用されているエイコサノイドの一種のプロスタグランジン E1 の前駆体原料物質として利用が期待される。我々はこれまでに、遊離脂肪酸の生産性が野生株の 9.2 倍に強化された *faa4* 欠失株より遊離 DGLA 生産株を構築すると共に、その生合成に働く麹菌が本来有する  $\Delta 9$ -不飽和化酵素や  $\Delta 12$ -不飽和化酵素や伸長酵素の 3 遺伝子を同時に過剰発現化することでその生産性を向上させた DGLA3 株を構築した。DGLA3 株の遊離 DGLA の脂肪酸構成比は、当初の生産株の 8.1%から 14.5%に向上した。生産性も 1.8 倍向上し、生産収量は 284 mg/L となった。

本研究では、これ以上に生産収量を高めることを目的として、DGLA3 株に改変を加えた。脂肪酸合成に必要な NADPH の供給を高める考えでペントースリン酸経路のトランスケトラーゼ遺伝子 *tkl* の過剰発現化を行った結果、生産収量は 1.9 倍の 403 mg/L に向上した。次にそこに  $\alpha$ -1,3 グルカン合成酵素をコードする *agsB* 遺伝子をノックアウトした結果、生産収量はさらに 1.3 倍の 533 mg/L に向上した。生産性と比較して、生産収量はより大きな向上度を示し、合計で 2.5 倍に達した。その理由として、組換えを追加する度に液体培養での菌の形態がペレット状からパルプ状になり、その分培養液中に占める菌体の割合が増加した。すなわち菌体密度が向上したことが、生産性よりも高い生産収量の向上度を示した理由と考えられた。

### Overexpression of *tkl* gene and disruption of *agsB* gene in *Aspergillus oryzae* DGLA3 strain enhances the yield of free dihomogamma-linolenic acid

Koichi Tamano<sup>1,2</sup>, Shiori Nakai<sup>3</sup>, Haruka Takayama<sup>1</sup>, Yasuhiko Imai<sup>4</sup>

(<sup>1</sup>BPRI, AIST, <sup>2</sup>CBBD-OIL, AIST, <sup>3</sup>Hokkaido High-Tech. Col., <sup>4</sup>Noda Inst. Sci. Res.)

## P-20

### シイタケにおける品種間ゲノム比較

坂本裕一, 佐藤志穂, 吉田裕史, 及川香梨, 清水元樹 (岩手生工研)

シイタケの育種の効率化を目的として、これまでにシイタケゲノムの *de novo* アッセムブルを進めるとともに、RAD-seq 法による連鎖地図の作成を行い、ゲノム配列の整備を行っている。シイタケゲノム基準配列が整備できたことで、現行の栽培品種等のゲノムデータの整備を進めた。

ナノポアロングリードと illumina ペアエンドショートリードのハイブリッドアッセムブルによりシイタケ G408PP-4 株の 15 本の scaffold からなる *de novo* アッセムブル配列を得た。得られたゲノムを RAD-seq より得られた 22,000 の連鎖マーカーと照合すると、98%以上のマーカーで 1 本の scaffold 由来のマーカーが同じ連鎖群にマッピングされた。以上のことから、染色体 1 本が大きな矛盾なく 1 本のアッセムブル配列となっていることが示唆された。また、15 本の scaffold のうち長い 10 本がシイタケ染色体 10 本に相当し、残りの短い scaffold の 1 本がミトコンドリアであった。次に実験用菌株として利用している SR-1、及び (株) 北研の栽培品種である H600 についてゲノム解析を行なった。両者については親株由来の異なる核型を持つ脱二核化株 (SR-1pp8,pp40 ; H600PP-1,PP-3) を用いてゲノム解析を行なった。その結果、SR-1pp40 以外は scaffold 数が 20 以下のアッセムブル配列を得た。G408PP-4 との比較において、75%以上の相同性を示す領域が 30~40% と低く、相同性のない領域が 20%程度存在することが明らかになった。以上のことから、育種を行う上でリファレンスゲノム配列として利用する際は、品種ごとにナノポアロングリードを用いたアッセムブル配列を用いることが有効であることが示唆された。

### Comparisons of genome sequence among strains in *Lentinula edodes*

Yuichi Sakamoto, Shiho Sato, Hiroshi Yoshida, Kaori Oikawa, Motoki Shimizu

(IBRC)

## P-21

### 野生型 *Aspergillus section Nigri* 糸状菌を用いた分散株取得法の検討

渡嘉敷直杏, 五味勝也 (東北大院・農)

糸状菌は固体発酵・液体培養共に優れた物質生産ホストである。*Aspergillus* 糸状菌を液体振とう培養すると一般に野生型株では菌糸どうしが絡まり合いマリモ状の大きな菌体を形成する。この形状は液体培養時の培養コントロールを難しくするため、好まれていない。そこで、マリモ状菌体形成の原因の1つである $\alpha$ -1,3-グルカン合成遺伝子などを破壊した分散タイプの糸状菌が高密度培養の面で活躍することが期待されている。本研究では液体培養時にマリモ状の形態をつくるクロコウジカビ *Aspergillus section Nigri* の一種である *Aspergillus japonicus* を供試菌に用いて、種々の方法によって液体培養時にマリモ状になりにくい株の選抜を行った。

はじめにプラスミド導入で利用可能な CRISPR/Cpf1 システムを利用し、*A. japonicus* をプラスミド保持の選択圧存在下で生育させた。目的表現型を有する分生子と野生型状態の分生子を混ざった状態で回収し、選択圧のかからない培地で培養し、Yatalase を用いたポジティブセクションと液体培養時の表現型差を利用した分散株の濃縮を繰り返し、分散株取得方法として適当か検討した。

次に *A. japonicus* のプロトプラストを調製し、Cpf1 タンパク質と gRNA の複合体の直接導入法を用いた一過的な作用によるゲノム編集を行い、分生子から液体培養時の表現型のみを利用して目的の分散株取得が可能か検討した。

### An experimental design for obtaining dispersed strains of the wild-type *Aspergillus section Nigri* filamentous fungus

Jikian Tokashiki, Katsuya Gomi

(Grad. Sch. Agric Sci., Tohoku Univ.)

## P-22

### 多様な環境分離菌株を用いた屋内環境の真菌叢解析技術構築

加藤晴朗, 重宗尚文, 矢野剛久 (花王株式会社・安全性科学研究所)

屋内環境に生息する真菌類は皮膚や呼吸器の炎症等の健康課題だけでなく、浴室や衣料品の黒色汚れ等の衛生課題、工場環境等で日用品に混入してその品質劣化を引き起こす品質課題等、多岐にわたる課題を引き起こす。真菌叢解析技術はこうした課題の発現場に存在する DNA の塩基配列の情報から真菌を迅速、高感度、かつ網羅的に検出する技術である。しかし、真菌の遺伝子は細菌と比べて菌種間の配列多様性が非常に高く、どの方法も一部の真菌が極端に検出され難い等、あらゆる現場に存在する真菌類を漏れなく高精度に検出できる解析手法はない。従って、各現場に最適な解析技術を適宜検討する必要があるが、屋内環境に存在する真菌類に対して適切な真菌叢解析技術は不明であった。そこで、我々は屋内環境に生息する真菌類が引き起こす多様な課題にとりくむ過程で分離・保存してきた多様な菌株を利用して、屋内環境菌株を高精度に検出できる解析技術の構築を試みた。はじめに、真菌 rRNA の Internal transcribed spacer (ITS) 領域をターゲットとし、10 菌種の DNA が等量混合された Mock DNA を用いて、解析工程の最適化を試みた。その結果、PCR 増幅領域 (ITS1 1 領域, ITS2 4 領域) と、増幅産物の最大解析長 (300 bp, 600 bp) の違いによって、解析結果が大きく異なった。さらに、ITS2 の 1 領域の 300 bp を解析することで、Mock DNA に含まれる 10 菌種を正確かつ、より正しい割合で検出できた。つづいて、検討した手法を 51 株の多様な分離・保存菌株に適用し、屋内環境に生息する真菌類を高精度かつ網羅的に検出可能かどうかを評価した。検討の結果、Mock DNA において最適であった手法と同じ解析条件で、44 株を正しく検出することができた。また、正しく検出できなかった菌種は、系統的に近い菌種として検出されていた。以上の結果から本解析技術は屋内環境の菌叢理解に適した真菌叢解析技術と判断した。

### Development of indoor mycobiome analysis using a variety of environmental isolates

Haruro Kato, Naofumi Shigemune, Takehisa Yano

(Safety Science Research Laboratory, Kao Corp.)

## \*P-23

### 黄麹菌における *glaA* mRNA の細胞内局在制御

守田湧貴, 竹川薫, 樋口裕次郎 (九大院・生資環・生命機能)

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* は、日本酒や醤油などの発酵醸造産業で利用される有用微生物として知られる。アミラーゼなどの有用酵素の分泌能力に優れることから、タンパク質分泌の分子機構に対する理解を深め、より高分泌生産な黄麹菌株を分子育種することで一層の産業利用が期待できる。しかし、タンパク質の翻訳効率に重要な mRNA 局在化機構について、有用酵素に関する情報はほとんど明らかになっていない。本研究では、黄麹菌が高分泌するグルコアミラーゼ(GlaA)を標的に、*glaA* mRNA の局在化機構の解明を試みた。

これまでの研究による分泌部位近傍(菌糸先端, 隔壁)における *glaA* mRNA の局在化の結果を踏まえ、分泌タンパク質の翻訳箇所である小胞体との共局在解析を行った。その結果、*glaA* mRNA が小胞体近傍で拡散され、高い共局在率( $R=0.841$ )を示すことが明らかになった。また、*glaA* mRNA が高温ストレス(45°C, 10分)でストレス顆粒や processing body(P-body)に局在化することを明らかにした。小胞体近傍の動態について、低い割合で長距離動態( $>3\ \mu\text{m}$ )が見られたことから、その背景に存在する分子機構についても解析を行った。そこで、分子モーター(kinesin-1, kinesin-3)の破壊株を構築し、*glaA* mRNA 動態の定量解析を行った結果、 $\Delta Aokin1$  と  $\Delta Aokin3$  の両株で長距離動態が消失した。さらに、 $\Delta Aokin1$  は基部側に核が後退し、先端部の *glaA* mRNA が有意に減少した。一方で、 $\Delta Aokin3$  は菌糸先端部における *glaA* mRNA の減少が見られなかった。

以上の結果より、分泌部位近傍における時空間的な転写制御と小胞体への局在化機構によって、分泌酵素 mRNA の転写から分泌までのプロセスを空間的に効率化し、高度なタンパク質分泌を維持している可能性が示唆された。さらに、ストレス顆粒や P-body による mRNA 制御が高温培養時やストレス緩和時の酵素分泌に寄与する可能性が考えられた。

#### Subcellular localization regulation of *glaA* mRNA in *Aspergillus oryzae*

Yuki Morita, Kaoru Takegawa, Yujiro Higuchi

(Dept. of Biosci. Biotechnol., Kyushu Univ.)

## \*P-24

### 原子間力顕微鏡による糸状菌 *Aspergillus nidulans* 細胞表面の観察手法の検討

陳博宇<sup>1</sup>, 岩間亮<sup>1,2,4</sup>, Alexis Borowiak<sup>3</sup>, 菊池洋輔<sup>3</sup>, 宮澤佳甫<sup>3,4</sup>, 福間剛士<sup>3</sup>, 堀内裕之<sup>1,2</sup> (1東大院・農生科・応生工, 2東大・微生物連携, 3金沢大・WPI-NanoLSI, 4JST ACT-X)

糸状菌は長い糸状の細胞形態を特徴とする真核微生物である。糸状菌は生活環の中で顕著な形態変化を示すが、細胞壁がこれら形態形成に重要な役割を果たす。細胞壁表面構造を観察する手法として、走査型電子顕微鏡 (SEM), 原子間力顕微鏡 (AFM) が知られる。SEM は細胞固定が必須になるが、AFM は生細胞を観察できる利点がある。AFM 観察においては、探針で細胞表面を走査するため、細胞の動きを物理的に固定することが重要となる。今回、糸状菌の AFM 観察を容易にするための手法を検討したところ、(1) 液中 AFM 観察においては、ポリ-L-リジンでコートされたガラスボトムディッシュに胞子を固定して培養する手法、(2) 気中 AFM 観察においては、液体培地を供給し続けたセロハン上で胞子を培養する手法により、容易に観察することが可能になった。これら手法を用いて、モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* の細胞表面を観察した。野生型株の分生子を液体培養して、液中 AFM 観察により細胞表面構造変化を観察したところ、分生子発芽前に生じる分生子表面のひび割れ付近の詳細な構造が観察されたとともに、分生子表面の経時的な変化も明らかとなった。また、細胞壁形成に関わるキチン合成酵素の1つである CsmA に着目し、CsmA 欠失株 ( $\Delta csmA$  株)、および CsmA の myosin-motor-like domain (MMD) を欠失した株 ( $csmA-\Delta\text{MMD}$  株) の細胞表面構造を気中 AFM 観察した。野生型株の菌糸先端は平坦・平滑な構造である一方で、変異株の菌糸先端では菌糸先端が粗い構造となっていることが観察された。

#### Atomic force microscopy for monitoring *Aspergillus nidulans* cell surface: Techniques and insights

Boyu Chen<sup>1</sup>, Ryo Iwama<sup>1,2,4</sup>, Alexis Borowiak<sup>3</sup>, Yosuke Kikuchi<sup>3</sup>, Keisuke Miyazawa<sup>3,4</sup>, Takeshi Fukuma<sup>3</sup>, Hiroyuki Horiuchi<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo, <sup>2</sup>CRIIM, UTokyo, <sup>3</sup>WPI-NanoLSI, Kanazawa Univ., <sup>4</sup>JST ACT-X)

## \*P-25

### 麹菌における核を丸ごと分解するヌクレオファジーの分子機構の解析

橋本真宇<sup>1</sup>, 山口誉登<sup>1</sup>, 木村聡<sup>2</sup>, 有岡学<sup>1,3</sup> ( <sup>1</sup>東大院・農生科・応生工, <sup>2</sup>東大院農・技術基盤センター, <sup>3</sup>東大・CRIIM, )

オートファジーは真核生物に広く保存された細胞内分解プロセスであり、このうち核を特異的に分解するものをヌクレオファジーと呼ぶ。麹菌 *Aspergillus oryzae* において、核全体がオートファゴソームによって丸ごと取り囲まれ分解されるヌクレオファジーの存在が当研究室で明らかとなった。本研究では麹菌のヌクレオファジーの分子機構の解明を最終的な目標とし、野生株および各遺伝子破壊株を用いてヌクレオファジー活性の定量評価やオートファゴソームの観察を行った。

まず、オートファゴソームと液胞の融合に必須であると推定される *Aoypt7* と、液胞内リパーゼをコードする *AoAtg15* の破壊株をそれぞれ取得し、オートファジーおよびヌクレオファジー活性を定量した。その結果、野生株では6時間の窒素源および炭素源飢餓による誘導で活性の有意な上昇が認められたが、*Aoypt7* 破壊株および *Aoatg15* 破壊株では大きく抑制された。さらに蛍光顕微鏡や透過型電子顕微鏡を用いて観察を行った結果、核全体を取り囲んだオートファゴソームが細胞質や液胞内に蓄積する様子が認められ、麹菌のヌクレオファジーにおいて核は一般的なオートファジー経路に依存して分解されることが明らかとなった。

出芽酵母の選択的オートファジーにおいて分解対象となるオルガネラの膜上には特異的な受容体が存在し、*Atg8* や *Atg11* との相互作用によって分解が誘導されることが知られている。*ATG11* の麹菌オルソログである *Aoatg11* の破壊株におけるヌクレオファジー活性を定量評価したところ、野生株と比較して炭素源飢餓では活性の低下は認められなかったが、6時間の窒素源飢餓で部分的ではあるが有意な低下が観察された。また、ミトコンドリアの分解を行うマイトファジー活性も同様に *Aoatg11* 破壊株において低下が認められた。これらの結果から、*AoAtg11* は麹菌の選択的オートファジーの効率的な進行に役割を果たしており、麹菌のヌクレオファジーにおいても特異的な受容体が関与すると考えられた。

### Analysis of molecular mechanism of nucleophagy in *Aspergillus oryzae*

Mau Hashimoto<sup>1</sup>, Hiroto Yamaguchi<sup>1</sup>, Satoshi Kimura<sup>2</sup>, Manabu Arioka<sup>1,3</sup>

(<sup>1</sup>Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo, <sup>2</sup>Tech. Adv. Ctr. UTokyo, <sup>3</sup>CRIIM, UTokyo)

## \*P-26

### 麹菌における核の増加と菌糸形態および酵素生産性の関連

井谷綾花<sup>1</sup>, 一ノ瀬恵<sup>1</sup>, 細田柗志<sup>1</sup>, 高谷直樹<sup>1</sup>, 織田健<sup>2</sup>, 山下秀行<sup>3</sup>, 酒井香奈江<sup>4</sup>, 田中拓未<sup>4</sup>, 楠本憲一<sup>4</sup>, 竹下典男<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>筑波大・MiCS, <sup>2</sup>酒類研, <sup>3</sup>樋口松之助商店, <sup>4</sup>阪大院・工)

麹菌は糖質・タンパク質などの分解酵素の生産・分泌能が高く、醸造発酵や酵素生産などのバイオ産業で広く利用される。私たちは培養時間の経過に伴って *Aspergillus oryzae* (RIB40) の核の数が著しく増加する現象を発見した (菌糸細胞あたり 20 から 200 以上の核に増加)。核数の増加により転写・翻訳量の増加が予想され、核数と酵素活性との相関が見られた。この表現型は、*Aspergillus sojae* でも見られたが、*Aspergillus nidulans* や *Aspergillus flavus* などでは見られなかった。*A. oryzae* においても株により表現型が異なることが判明したため、同一クレード内で表現型の異なる株のゲノム比較により核増加に関与すると予想される遺伝子を選出した。また、核が増加した菌糸とそうでない菌糸における形態や生長速度を比較した。ライブイメージングにより、分岐により核の増加した菌糸が出現しコロニー周辺で優占することが示された。さらに、レーザーマイクロダイセクションにより核が増加した菌糸とそうでない菌糸を回収し遺伝子発現変化解析を行った。核が増加した菌糸において、細胞骨格や細胞壁などの形態形成、核・細胞の分裂、 $\text{Ca}^{2+}$  イオンの輸送などに関与する遺伝子の発現が特異的に上昇した。今後、これらの結果を網羅的に解析することで、核増加機構の解明を目指す。

### Correlation between nuclear increase, enzyme production and morphogenesis in *Aspergillus oryzae*

Ayaka Itani<sup>1</sup>, Aya Ichinose<sup>1</sup>, Syuuji Hosoda<sup>1</sup>, Naoki Takaya<sup>1</sup>, Ken Oda<sup>2</sup>, Hideyuki Yamashita<sup>3</sup>, Kanae Sakai<sup>4</sup>, Takumi Tanaka<sup>4</sup>, Kenichi Kusumoto<sup>4</sup>, Norio Takeshita<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Univ. of Tsukuba, MiCS, <sup>2</sup>NRIB, <sup>3</sup>Higuchi Moyashi, <sup>4</sup>Univ. of Osaka)

## \*P-27

### マイコウイルスの細胞外膜小胞 (EV) 産生誘導及び EV への内在化

町谷和彦<sup>1</sup>, 浦山俊一<sup>2</sup>, 萩原大祐<sup>2</sup> ( <sup>1</sup>筑波大・生物資源, <sup>2</sup>筑波大・生命環境系)

真菌に感染するウイルス (マイコウイルス) は細胞外感染経路を持たず、宿主の胞子形成・菌糸融合に依存して伝播を行う。とりわけ、菌糸融合は同種宿主間における主要な水平伝播経路として知られている。一方で、異種宿主間の水平伝播 (ホストジャンプ) に関しては、その現象自体は確認されているが経路の発見には至っていない。先行研究では、ノロウイルスや真菌プリオンの伝播に細胞膜由来の脂質粒子である細胞外膜小胞 (extracellular vesicles; EVs) が利用されていることが分かっている。また、真菌-植物間では EV を介した sRNA の受け渡しによる遺伝子抑制が行われている。そこで本研究では、マイコウイルスの水平伝播経路として EV に注目し、ウイルス感染が確認されている *Aspergillus lentulus* 株を用いて、いまだ明らかとなっていない EV を介したマイコウイルスのホストジャンプについて検証する。

はじめに、マイコウイルスが EV に内在していることを検証するために、当該菌株由来の EV から核酸を抽出して電気泳動に供した。その結果、感染するマイコウイルスの dsRNA が検出された。EV を dsRNA 分解酵素処理してもウイルス dsRNA が分解されなかったことから、ウイルス dsRNA は EV に内包され保護されていることが示唆された。本研究により、EV にマイコウイルスが内在する可能性が初めて示された。また、当該菌株からウイルスを除去した株では EV 産生量が大幅に低下したことから、マイコウイルスが宿主の EV 産生増加に関与していることが示唆された。これらの結果から、マイコウイルスが宿主の EV 産生を誘導して効率的に EV に内在化している可能性も考えられる。今後は、マイコウイルスが EV を介してホストジャンプするという仮説を立証するため、*Aspergillus* 属菌をはじめとする真菌、植物等に対してウイルス含有 EV を散布し、マイコウイルスが伝播するのかが検証する予定である。

### Induced production of EVs by mycoviruses and encapsulation of mycoviruses into EVs

Kazuhiko Machiya<sup>1</sup>, Syun-ichi Urayama<sup>2</sup>, Daisuke Hagiwara<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Agro-Bio. Res. Sci., Univ. of Tsukuba, <sup>2</sup> Fac. of Life and Env. Sci., Univ. of Tsukuba)

## \*P-28

### 黄麹菌における $\beta$ -tubulin mRNA の可視化解析

川富溪舟, 守田湧貴, 竹川薫, 樋口裕次郎 (九大院・生資環・生命機能)

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* が多量に生産するアミラーゼ等の有用酵素は、細胞内で微小管を介した輸送経路で分泌されるため、微小管の適切な形成が重要である。しかし、黄麹菌を含む糸状菌における微小管の形成機構に関する研究の多くはタンパク質レベルに留まっており、転写と mRNA レベルでの時空間的な制御機構に関する知見は乏しい。我々はこれまでに、固定細胞を用いた smFISH 法により、微小管を形成する  $\alpha$ -tubulin の mRNA と微小管伸長核を形成する  $\gamma$ -tubulin の mRNA がそれぞれ異なる局在を示すことを明らかにした。こうした結果より、tubulin の局在化は mRNA レベルで制御されていると考えられるが、その詳細な機構は不明である。また、細胞周期によって tubulin の発現はダイナミックに変化すると考えられるため、tubulin の局在化を時空間的に詳細に明らかにするには、生細胞での解析が求められる。そこで本研究では、微小管の形成に必要なもう一つの構成要素である  $\beta$ -tubulin (BtuA) の mRNA をターゲットにして、黄麹菌生細胞にて MS2 システムを導入することにより *btuA* mRNA を可視化した。その結果、*btuA* mRNA は smFISH 法で可視化された  $\alpha$ -tubulin の mRNA と同様に核から離れた部位にも局在し、細胞全体で同様の局在が見られた。また、一部の *btuA* mRNA は微小管に沿った動態を示したことから、微小管やそれに沿って動くモータータンパク質が *btuA* mRNA の輸送に関与している可能性が示唆された。さらに、核分裂の前後では、細胞質の *btuA* mRNA の存在量に変化し、核分裂後に増加したことから、転写レベルで tubulin の合成と微小管の形成を制御していることが示唆された。今後は、*btuA* mRNA の輸送機構の詳細および細胞周期に沿った *btuA* mRNA の局在と微小管形成の関係を明らかにするべく、現在解析を進めている。

### Visualization analysis of $\beta$ -tubulin mRNA in *Aspergillus oryzae*

Keishu Kawatomi, Yuki Morita, Kaoru Takegawa, Yujiro Higuchi

(Dept. of Biosci. Biotechnol., Kyushu Univ.)

## \*P-29

### 糸状菌 *Aspergillus nidulans* における PE 合成酵素遺伝子の欠失によるミトコンドリアの形態変化

楊淳児<sup>1</sup>, 岩間亮<sup>1,2</sup>, 福田良一<sup>1,2</sup>, 堀内裕之<sup>1,2</sup> ( <sup>1</sup>東大院・農生科・応生工, <sup>2</sup>東大・微生物連携)

グリセロリン脂質は生体膜の主要構成成分であり, 頭部構造の種類により, ホスファチジン酸 (PA), ホスファチジルセリン (PS), ホスファチジルエタノールアミン (PE), ホスファチジルコリン (PC), ホスファチジリノシトール (PI)などに分類される。我々はこれまでに, モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* の無性生活環における主要リン脂質の変動を明らかにしており, 分生子が発芽するまでに PE 量が大きく増加することを見出した<sup>1</sup>。また, PE 合成に関わると推定される 4 種の遺伝子のうち, 3 種の遺伝子の転写量が発芽前に大きく増加することをも見出した<sup>1</sup>。しかしながら, 発芽に向けて増加する PE が糸状菌においてどのような生理的意義を持つのかは明らかになっていない。出芽酵母においてミトコンドリアは PE 合成の主要な場であるとともに, PE がミトコンドリアの形態形成と機能に重要な役割を果たすことが知られている。そこで本研究では, *A. nidulans* の PE 合成酵素をコードすると考えられる遺伝子の単独および多重欠失株において分生子発芽と菌糸生長の段階におけるミトコンドリアの形態を観察したところ, 一部の欠失株においてミトコンドリアの形態に変化が認められた。本発表では, 分生子発芽に向けて増加する PE の生理的意義についても議論する。

<sup>1</sup>Iwama et al., *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1868, 159379 (2023).

### Effects of phosphatidylserine decarboxylase-encoding gene deletions on mitochondrial morphogenesis in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*

Chuner Yang<sup>1</sup>, Ryo Iwama<sup>1,2</sup>, Ryouichi Fukuda<sup>1,2</sup>, Hiroyuki Horiuchi<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo, <sup>2</sup>CRIIM, Univ. of Tokyo)

## \*P-30

### 黄麹菌のゲノム編集時に生じる大規模欠失への非相同末端結合修復経路の関与について 山崎鮎奈, 上元優, 森田ひづき, 渡嘉敷直杏, 外山博英, 水谷治 (琉球大院・農)

【目的・方法】従来, 酵母や高等生物では, 非相同末端結合 (nonhomologous end-joining : NHEJ) 修復エラーを介したゲノム編集を行うと, 数 bp の欠失や挿入が起きるのが一般的であるが, 黄麹菌において同様のゲノム編集を行うと, 1 kb 以上の大規模欠失が高頻度で観察された。本研究では, この大規模欠失の原因因子を探究することを目的とし, NHEJ の機能に関連する *ku70*, *ligD* 遺伝子および, 関連があると予想される *polD* 遺伝子をそれぞれ破壊した株 ( $\Delta$ -株) を宿主としてゲノム編集を行い, 大規模欠失の割合を比較し, いずれかの遺伝子が大規模欠失の原因になっているかを調べた。

【結果・考察】 $\Delta ku70$  株および  $\Delta polD$  株のゲノム編集では, 親株 (niaD300) と同程度の割合 (約 40%) で大規模欠失が生じていたため, これらの遺伝子は大規模欠失に関与していないことが示唆された。しかし, *polD* 遺伝子に関しては, 酵母で NHEJ 修復経路に関与する Pol4p のホモログとして選択したため, 実際に黄麹菌の NHEJ に関与しているか, 今後検討する必要がある。 $\Delta ligD$  株のゲノム編集では, 計 8 回のゲノム編集実験のうち, 4 回はゲノム編集候補株を得ることができず, ゲノム編集候補株が得られた場合でも 99 株のうち標的遺伝子領域に変異が生じていたのは 12 株のみであり, その欠失パターンはほぼ同じであった。今後は, 他の NHEJ 修復経路に関与すると思われる遺伝子破壊株を造成し, 同様に大規模欠失が観察されるかを調べ, NHEJ 修復経路に寄与する因子が大規模欠失に関与しているのかを考察していきたい。

### Elucidation of the mechanism of large deletions caused by genome editing via NHEJ repair errors in *A. oryzae*.

Ayuna Yamazaki, Yu Uemoto, Hizuki Morita, Jikian Tokashiki, Hirohide Toyama, Osamu Mizutani

(Grad. Agric., Univ. Ryukyus)

## \*P-31

### 黄麹菌 *Aspergillus oryzae* におけるグルコシルセラミドの機能解析

七反田和<sup>1</sup>, 福原遼一郎<sup>2</sup>, 守田湧貴<sup>2</sup>, 樋口裕次郎<sup>2</sup>, 竹川薫<sup>2</sup> ( <sup>1</sup>九大農・発酵化学, <sup>2</sup>九大院・生資環)

スフィンゴ糖脂質は、親水性の糖類と疎水性のセラミドが結合した多様な分子で、発生、増殖、分化など様々な生命現象に関与しており、脂質マイクロドメインの形成を通じて、細胞間相互作用やシグナル伝達に重要な役割を果たしている。黄麹菌 *Aspergillus oryzae* も、セレブロシドとしてグルコシルセラミド(GlcCer)を有していることがわかっているが、その詳細な機能については明らかにされていない。そこで、本研究では黄麹菌における GlcCer の役割を明らかにするために、Cer → Glc を転移する酵素をコードする遺伝子の破壊株を作成して、野生株と表現型の比較を行った。

黄麹菌ゲノムを検索したところ、動物のグルコース転移酵素と相同性の高い遺伝子が存在することがわかった。そこでまず推定 GlcCer 転移酵素遺伝子 (*gcsA* と命名) の破壊株を作製し、破壊株のスフィンゴ糖脂質について薄層クロマトグラフィー(TLC)により解析を行った。その結果、 $\Delta gcsA$  株では GlcCer を示すバンドが完全に消失していることがわかった。 $\Delta gcsA$  株の表現型について野生株と比較を行ったところ、 $\Delta gcsA$  株では菌の生育が抑制され、分生子数が減少しており、GlcCer は菌の生育などに重要な役割を果たしていることがわかった。次に麹菌において GlcCer が細胞内のどこで合成されているかを明らかにするために、GcsA に mCherry を融合したタンパク質を発現させて局在を観察した。その結果、GcsA-mCherry は主に粗面小胞体に局在していることを明らかにした。以上の結果より、麹菌において GlcCer は動物とは異なり粗面小胞体で合成されることがわかり、GlcCer の欠損は菌の生育などに影響を及ぼすことを明らかにした。

#### Functional analyses of glucosylceramide in *Aspergillus oryzae*

Nanatanda Nagomi<sup>1</sup>, Hukuhara Ryouitiro<sup>2</sup>, Morita Yuki<sup>2</sup>, Yujiro Higuchi<sup>2</sup>, Kaoru Takegawa<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> Dept of Agr, Kyushu Univ. <sup>2</sup>Dept. of Biosci. Biotechnol, Kyushu Univ)

## \*P-32

### 麹菌 *Aspergillus oryzae* における新規オートファジーレセプターの探索

坂根巧, 武田陽一, 菊間隆志 (立命大院・生命科学)

【背景・目的】オートファジーは分解基質の選択性により選択的オートファジーと非選択的オートファジーの二つに分類される。一般的に選択的オートファジーでは、隔離膜上に存在するオートファジーのコアタンパク質 Atg8 が分解基質上に存在するレセプタータンパク質を認識、結合することで分解基質の選択性を生みだしていると考えられている。酵母や哺乳動物においてはいくつかのレセプタータンパク質が同定されているが、麹菌をはじめとする糸状菌では Atg8 と結合するレセプタータンパク質が未だ発見されていない。そこで本研究では、麹菌における選択的オートファジーのレセプタータンパク質およびその関連タンパク質を探索・同定することを目的とした。

【方法・結果】先行研究において、TAP(Tandem Affinity Purification)法により、麹菌における Atg8 のオルソログ、AoAtg8 と相互作用するタンパク質がいくつか獲得されている。そこから抽出した 36 タンパク質の中で、イーストツーハイブリッド法により 3 種類のタンパク質、AO090012000642(AO642), AO090120000103(AO103), AO090102000498(AO498)が AoAtg8 と相互作用すると考えられた。局在観察の結果 AO642 は主に細胞質に局在し、オートファゴソーム前駆体(PAS)と考えられるドット状構造も見られた。AO103 は主に核とみられる構造への局在が観察された。いずれについても窒素源枯渇条件における局在の変化はほとんど見られなかった。AO498 については現在解析中である。また、現在それぞれの遺伝子の破壊株を作製中であり、それらの表現型解析も行う予定である。

#### Search for novel autophagy receptors in *Aspergillus oryzae*

Takumi Sakane, Yoichi Takeda, Takashi Kikuma

(Dept. of Life Sciences, Univ. of Ritsumeikan)

## \*P-33

### 麹菌が産生する細胞外膜小胞の複数の菌株による比較解析

齊藤美緒<sup>1</sup>, 岩橋由佳<sup>1</sup>, 浦山俊一<sup>1,2</sup>, 萩原大祐<sup>1,2</sup> ( <sup>1</sup>筑波大・生命環境系, <sup>2</sup>MiCS)

細胞外膜小胞 (以下 EV) は、細胞が細胞外に放出する脂質二重膜で構成された膜小胞であり、様々な物質の輸送に関わることが細菌や動物細胞の研究から明らかになっている。糸状菌においても、病原菌を中心に EV の産生や機能が研究され始めており、生物学的な重要性が指摘されている。これまでに我々のグループでは、麹菌 *Aspergillus oryzae* において、EV を産生する培養条件や EV 産生能と細胞壁との関連性を発見しており、本研究では糸状菌の EV の産生機構の解明を目指す。

はじめに、麹菌のゲノム解読株である *A. oryzae* RIB40 に加えて、産業利用株 2 株 (RIB128, RIB915) における EV 産生能を経時的に比較した。脂質を除いた YPD 液体培地で *A. oryzae* を 18 日目まで培養し、培養上清から回収した EV 画分の脂質量と TEM 観察によって小胞構造を示す EV の存在を確認した。定常期においては RIB128, RIB915 とともに EV 産生するが、対数増殖期には RIB128 のみが EV 産生し、RIB915 は EV も脂質の分泌も見られなかった。この結果から、株により EV の産生能に違いがあることが明らかになった。両株の菌糸形状を詳細に顕微鏡観察すると、RIB128 は分岐後に伸長が停止したような突起が一定数観察され、RIB915 には見られなかった。続いて、EV 産生機構の手がかりを得るために、EV に内包されるタンパク組成に着目した。RIB128 を対象に対数増殖期と定常期とで産生する EV のタンパク組成を SDS-PAGE により比較した。バンドパターンの比較から、EV の主要なタンパク質が産生時期により異なることが分かった。今後は、発現パターンに違いが見られた主要なタンパク質を同定し、異なるタイミングで産生された EV の産生機構や機能の違いについて考察する。また、さらに多数の *A. oryzae* 株を対象に経時的な EV 産生能を比較し、EV 産生能と細胞壁構造との関連性を調べることで、麹菌 EV の産生機構に迫りたい。

### Comparative analysis of extracellular membrane vesicles produced by *Aspergillus oryzae* strains

Mio Saito<sup>1</sup>, Yuka Iwahashi<sup>1</sup>, Shunichi Urayama<sup>1,2</sup>, Daisuke Hagiwara<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>Univ. of Tsukuba, <sup>2</sup>MiCS)

## \*P-34 (O-8)

### アカパンカビにおける *exo1* 欠損による短寿命表現型の原因の考察

柳澤健斗<sup>1</sup>, 大竹花織<sup>2</sup>, 吉原亮平<sup>1</sup>, 畠山晋<sup>1</sup>, 田中秀逸<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>埼玉大・院理工, <sup>2</sup>埼玉大・理・生体制御学)

5'→3'エキソヌクレアーゼである EXO1 は真核生物に広く保存されており、相同組換えやミスマッチ修復など様々なプロセスに関与することが知られている。子囊菌類に属するモデル糸状菌のアカパンカビにおいては *exo1* (NCU06089) にコードされている。我々は *exo1* 欠損株 ( $\Delta$ *exo1* 株) が 2 週間程度で菌糸生長を終止する短寿命表現型を示すことを発見し、その短寿命化メカニズムを解析している。EXO1 のゲノム維持に関する一般的な知見より、EXO1 の関わる何らかのプロセスが妨げられ、野生株よりもハイペースに変異が蓄積した結果、 $\Delta$ *exo1* 株では早期に菌糸生長を終止すると考えられるが、その具体的なメカニズムは明らかとなっていない。本発表では、 $\Delta$ *exo1* 株の示す短寿命表現型の原因は複数存在し、少なくとも一つは体細胞分裂時の相同組換えの異常であることを報告する。さらに、減数分裂時の組換えイベントにおいても何らかの異常が生じており、その異常に起因する変異によって、短寿命表現型が相加的に現れている可能性も示す。相同組換えにおける EXO1 の役割と、この遺伝子の欠損の結果の一つとして生じる短寿命表現型との関係について、分子メカニズムを考察したい。

### Discussions on occurrence factors of short lifespan which are caused by disruption of *exo1* gene in *Neurospora*

Kento Yanagisawa<sup>1</sup>, Kaori Otake<sup>2</sup>, Ryouhei Yoshihara<sup>1</sup>, Shin Hatakeyama<sup>1</sup>, Shuuitsu Tanaka<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Grad. Sch. of Sci. & Eng., Saitama Univ., <sup>2</sup>Dep. of Regulatory. Biol., Fac. of Sci., Saitama Univ.)

## \*P-35

### 麹菌における GPCR-G $\alpha$ 間相互作用の解析

坂元勇月<sup>1</sup>, 有岡学<sup>1,2</sup> ( <sup>1</sup>東大院・農生科・応生工, <sup>2</sup>東大・CRIIM)

G タンパク質共役型受容体 (GPCR) は、特異的なリガンドが結合すると細胞質内の G タンパク質を活性化してシグナルを伝達する細胞膜上の受容体ファミリーの1つである。G タンパク質は $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ サブユニットからなるヘテロ三量体タンパク質であり、そのうち $\alpha$ サブユニット (G $\alpha$ ) が GPCR との結合能を持っている。通常、GPCR は1種類の G $\alpha$ と選択的に結合するが、麹菌 *Aspergillus oryzae* においてその組み合わせは未解明である。本研究では、麹菌において活性を持つと予想した9種類の GPCR と3種類の G $\alpha$ における GPCR-G $\alpha$ 間相互作用の網羅的な解析を行った。また、当研究室の先行研究において、G $\alpha$ によるシグナル伝達が糸状菌における耐久構造と考えられる菌核の形成を促進することが示唆された。そこで G $\alpha$ によるシグナル伝達と菌核形成の関連に注目し、解析を行った。

GPCR-G $\alpha$ 間相互作用を *in vivo* で捉えるために、本研究では Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) アッセイを使用した。EGFP を N 末端側と C 末端側に分割し、それぞれを G $\alpha$ と GPCR に結合して発現させた。この株では、GPCR と G $\alpha$ が相互作用した際に分割された EGFP 同士が接近して再構築するため、GPCR-G $\alpha$ 間相互作用を緑の蛍光として観察できる。これを利用して、GPCR-G $\alpha$ 間相互作用を網羅的に解析した。その結果、全9種類の GPCR に対して、計12種類の GPCR-G $\alpha$ 間相互作用が示唆された。また、G $\alpha$ によるシグナル伝達と菌核形成の関連性を調べるために、G $\alpha$ 破壊株および恒常的 G $\alpha$ シグナル活性株 (G $\alpha$  mut 株) を作製し、表現型を観察した。その結果、全ての G $\alpha$ 破壊株で菌核形成が抑制され、G $\alpha$ と菌核形成の関連が示唆された。また、G $\alpha$  mut 株の表現型から特に AoGpaB が菌核の成熟に重要であることが示唆された。

#### Analysis of interaction between GPCR and G $\alpha$ in *Aspergillus oryzae*

Itsuki Sakamoto<sup>1</sup>, Manabu Arioka<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo; <sup>2</sup>CRIIM, UTokyo)

## \*P-36

### 担子菌 *Coprinopsis cinerea* における栄養飢餓とオートファジーの関係

北原昂希<sup>1</sup>, 麻田恭彦<sup>2</sup>, 渡邊彰<sup>2</sup> ( <sup>1</sup>香川大院・農, <sup>2</sup>香川大・農)

オートファジーとは、真核生物に保存されている細胞内の大規模な分解系である。その分解系では、細胞質成分を脂質二重膜によって隔離した構造体 (オートファゴソーム) が形成され、内容物は液胞 (菌類) との融合により分解される。一般に、オートファジーは栄養飢餓によって誘導されるが、近年、飢餓応答だけでなく細胞内の恒常性維持や分化・発生といった様々な生命現象に関与していることが示唆されている。当研究室では、これまで担子菌 *Coprinopsis cinerea* の子実体形成誘導条件について解析を進めてきており、*C. cinerea* の成長過程にはオートファジーが密接に関わることを示唆してきている。本研究では、ウェスタンブロットティング (WB) 法を適用することにより、栄養飢餓 (特に窒素源および糖源) が担子菌 *C. cinerea* のオートファジーに与える影響について検討を行った。WB 法を用いるオートファジー検出には、*C. cinerea* におけるオートファゴソーム構成タンパク質 Atg8 (CcAtg8) のプロモーター制御下で CcAtg8 と AcGFP1 の融合タンパク質を発現するベクターを導入した株を用いた。AcGFP1-CcAtg8 融合タンパク質はオートファゴソームが液胞に移行後分解されることから、オートファジー進行の評価には AcGFP1-CcAtg8 の分解により生成した AcGFP1 を、抗 GFP 抗体を用いることにより行った。また、*C. cinerea* は栄養培地で生育した菌糸体を窒素源飢餓培地または糖源飢餓培地に移行させることで子実体形成を促すが、それらの条件下において、それぞれ特徴的な成長を示すことが観察された。現在、両条件下におけるオートファジーの誘導レベルについて解析を進めている。

#### Relationship between nutrient starvation and autophagy in the basidiomycete *Coprinopsis cinerea*

Koki Kitahara<sup>1</sup>, Yasuhiko Asada<sup>2</sup>, Akira Watanabe<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Grad. Sch. of Agr., Kagawa Univ., <sup>2</sup>Fac. of Agr., Kagawa Univ.)

## P-37

### *Aspergillus oryzae* の生育に対しリグニンが及ぼす影響の解析

田中拓未<sup>1</sup>, 劉利雲<sup>1</sup>, 酒井香奈江<sup>1</sup>, Sharon Marie Bahena-Garrido<sup>2</sup>, 山下秀行<sup>3</sup>, 岩下和裕<sup>2</sup>, 楠本憲一<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>阪大院・工, <sup>2</sup>樋口松之助商店, <sup>3</sup>酒総研)

麹菌 *Aspergillus oryzae* は土壌有機物であるフミン酸に応答して生育や表現型を変化させる(Liu L et al, J Gen Appl Microbiol, 2023)。本研究では、フミン酸の前駆物質の一種であるリグニンに着目した。リグニンは植物由来の難分解性高分子であり、多くの微生物の生育を阻害する。リグニンの完全分解は担子菌によってのみ達成されるが、近年、子囊菌である *A. oryzae* もリグニンを部分的に分解することが報告された(Zhang Z et al, Biotechnol Biofuels, 2015)。しかしリグニンが *A. oryzae* の生育に与える影響については殆ど研究されていない。

本研究ではまず、リグニンを含む最少寒天培地で *A. oryzae* RIB40 株を培養した。リグニン濃度依存的にコロニー径が変化し、濃度 0.01~0.1%(w/v)ではコロニーが拡大した。分生子着生などの表現型にも変化が見られた。*A. oryzae* は 17 クレードに分類されるが(Bahena-Garrido S, JSBBA2023), そのうち 6 クレードから計約 30 株について同様にリグニンへの応答を解析した。コロニー径は「拡大・縮小・変化なし」のいずれも観測され、1 つのクレードを除いて同じクレードの株同士では類似の応答を示した。ここから、各 *A. oryzae* 株が選抜される過程でリグニン応答に関わる遺伝子が増加した可能性が推察された。現在、リグニンの元素分析や分子量分画などにより、リグニン応答に関するリグニン側の要素を解析中である。

### The effect of lignin on the growth of *Aspergillus oryzae*

Takumi Tanaka<sup>1</sup>, Liyun Liu<sup>1</sup>, Kanae Sakai<sup>1</sup>, Sharon Marie Bahena-Garrido<sup>2</sup>, Hideyuki Yamashita<sup>3</sup>, Kazuhiro Iwashita<sup>2</sup>, Ken-Ichi Kusumoto<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Osaka Univ, <sup>2</sup>NRIB, <sup>3</sup>Higuchi Matsunosuke Shoten Co., Ltd.)

## P-38 (O-10)

### *Aspergillus fumigatus* における GPI アンカー糖鎖の生理的意義

門岡千尋<sup>1</sup>, 田中大<sup>2</sup>, 藤田盛久<sup>3</sup>, 岡拓二<sup>1</sup> (崇城大・生物生命, <sup>2</sup>東北医薬大・薬, <sup>3</sup>岐阜大・iGCORE)

グリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) アンカーは、全ての真核生物において保存されたタンパク質の細胞表面提示システムである。酵母や哺乳類において、GPI アンカーの生合成に関与する遺伝子の欠損は、細胞表面で働くタンパク質を細胞膜に繋ぎ止めることができなくなるため致死となることが知られている。本研究では、糸状菌における GPI アンカーの生理的な役割を明らかにすることを目的とした。

まず、*A. fumigatus* において、GPI アンカーの 3 つ目のマンノース (Man) 残基へのエタノールアミンリン酸 (EtNP) の転移に関わる *pigO* と *pigF* および、EtNP ヘタンパク質を転移するトランスアミダーゼ複合体の構成因子をコードする *pigK*, *gaaA*, *pigT*, *pigS*, *pigU* の各遺伝子破壊株の構築を試みた結果、いずれの破壊株も取得できたため、糸状菌において GPI アンカーを介したタンパク質の係留は生育に必須ではないことが示された。これらの GPI 生合成関連遺伝子の破壊株は生育が顕著に遅延し、菌糸の一部がいびつに膨らむバルーン構造を示した。次に GPI アンカーの 2 つ目、3 つ目の Man 残基の転移に関与する *pigV* と *pigB* 遺伝子の破壊株の構築を試みたものの、ヘテロカリオン破壊株のみ取得されたため、GPI アンカーのコア糖鎖は糸状菌においても生育に必須であることが示唆された。興味深いことに、4 つ目の Man 残基の転移に関与する *smpC* 遺伝子の破壊株は、取得できた全 GPI 生合成関連遺伝子破壊株の中で最も深刻な生育遅延を示した。また、*smpC* 破壊株は菌糸をほとんど形成できず、細胞全体が大きく膨らむ異常な細胞形態を示した。そこで、*smpC* 破壊株の細胞壁可溶性画分を抽出し、<sup>1</sup>H-NMR 解析を行った結果、真菌型ガラクトマンナン (FTGM) の存在を示す固有のケミカルシフトが消失していることが示されたため、これまで謎であった FTGM のキャリア分子は GPI アンカー糖鎖であることが確定した。以上の結果より、糸状菌において GPI アンカーは菌糸の形成に必須であり、タンパク質を細胞表面に係留する機能よりも、FTGM を含めたその糖鎖構造自体に重要な役割が存在することが示唆された。

### Analysis of the physiological role of GPI glycans in *Aspergillus fumigatus*.

Chihiro Kadooka<sup>1</sup>, Yutaka Tanaka<sup>2</sup>, Morihisa Fujita<sup>3</sup>, Takuji Oka<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Fac. Biotech. Life Sci., Sojo Univ., <sup>2</sup>Div. Pham., TMPU., <sup>3</sup>iGCORE., Gifu Univ.)

## P-39 (O-9)

### 麹菌 *Aspergillus oryzae* の細胞融合を制御する新規因子の同定

片山琢也, 丸山潤一 (東大院・農生科・応生工, 東大・微生物連携機構)

糸状菌では菌糸を伸長している栄養生長中でも細胞どうしが融合し, この過程は接合型には依存しないことから酵母で見られる接合とは異なっている。アカパンカビ *Neurospora crassa* では細胞融合の制御に関与する多くの因子が同定されているが, 糸状菌特有の制御機構には未解明な部分が残されている。最近, ほかの糸状菌において, *N. crassa* で未同定だった新規の糸状菌特異的な制御因子が見いだされた<sup>1,2)</sup>。そのため, 糸状菌特有の細胞融合の制御機構に未同定の因子が存在する可能性が考えられた。そこで本研究では, 我々が細胞融合の解析系を確立している麹菌 *Aspergillus oryzae* において新規の細胞融合制御因子を探索し, その解析を行った。

RNA-seq 解析から既知の細胞融合関連遺伝子と同様の発現パターンを示し, 糸状菌特異的に存在する遺伝子を絞り込んだ。代謝関連遺伝子を除いた 65 個の遺伝子破壊株を作製・解析したところ, 細胞融合効率が顕著に低下した株が取得された。その原因遺伝子は Rho ファミリー GTPase に対する Guanine nucleotide exchange factor をコードすると推定され, このタンパク質を FdmA (Fusion-Defective Mutant A) と命名した。FdmA は子囊菌門の糸状菌に保存されていた一方で, 分裂酵母の Gef1 と系統的に近くに位置したものの, Gef1 には保存されていない領域を N 末端側と C 末端側に有していた。FdmA は融合しようとしている菌糸部位に数分おきに局在するという特徴的なパターンを示し, 細胞融合部位において機能することが示唆された。さらに, FdmA の C 末端領域の欠損によりその局在が見られなくなり, 細胞融合効率が低下した。これらのことから, FdmA はその C 末端領域を介して糸状菌特有の細胞融合の制御に関与する可能性が考えられた。

<sup>1)</sup>Tanaka et al., *Mol. Microbiol.*, 2020; <sup>2)</sup>Katayama et al., *Mol. Microbiol.*, 2021

### Identification of a novel factor involved in cell fusion of *Aspergillus oryzae*

Takuya Katayama, Jun-ichi Maruyama

(Dept. of Biotechnol. and CRIIM, The Univ. of Tokyo)

## P-40

### 黄麹菌 *Aspergillus oryzae* ハイドロフォビン RolA と HypB 破壊株の表現型の解析

寺内裕貴<sup>1,2,4</sup>, 辻健也<sup>2</sup>, 星田尚司<sup>1,3</sup>, 赤田倫治<sup>1,3</sup>, 吉見啓<sup>2,4</sup>, 田中千尋<sup>2,4</sup>, 本田与一<sup>2</sup>, 河内護之<sup>2</sup> (1 山口大・中高温研, 2 京大院・農, 3 山口大院・創成科学, 4 京大院・地環学)

糸状菌の固体基質への接着には界面活性蛋白質ハイドロフォビン (HP) が関与していることが知られている。黄麹菌 *Aspergillus oryzae* も他の多くの糸状菌と同様に複数の HP を有しているが, それら HP の機能の違いについてはいまだ不明な点が多く残されている。そこで本研究では, *A. oryzae* の有する HP のうち, 特に発現量が高い RolA と HypB に着目し, それぞれの遺伝子破壊株の表現型を比較することで二つの HP の機能の違いについて調査した。まず, PDA 培地での表現型を観察したところ,  $\Delta rolA$  株の分生子は野生型株と比較し黒褐色化する傾向が認められた。一方,  $\Delta hypB$  株は顕著な表現型の変化を示さなかった。また, 各種細胞ストレス耐性を調べたところ, 両破壊株とも高濃度 NaCl 条件下において, コロニー及び分生子形成に変化が生じた。そこでより詳細な細胞表層変化を解析するため, 走査型電子顕微鏡を用いて分生子と気中菌糸表面を観察した結果,  $\Delta rolA$  株は分生子表面の HP 自己組織化構造が消失し,  $\Delta hypB$  株は気中菌糸表面の突起構造が消失した。また, 分生子の親水性度合いを評価した結果,  $\Delta rolA$  株のみ親水性への変化が認められた。以上の結果から, RolA は主に分生子表面で機能し, 分生子の表面疎水性およびメラニン着生に影響を及ぼすこと, HypB は気中菌糸表面で機能しているが, その機能の一部は RolA と重複していることが明らかになった。すなわち, 複数の HP は機能の重複がありつつ発現器官によっては独自の機能も有すると考えられた。

### Phenotypic analysis of hydrophobin RolA and HypB disruptant strains in *Aspergillus oryzae*

Yuki Terauchi<sup>1,2,4</sup>, Kenya Tsuji<sup>2</sup>, Hisashi Honda<sup>1,3</sup>, Rinji Akada<sup>1,3</sup>, Akira Yoshimi<sup>2,4</sup>, Chihiro Tanaka<sup>2,4</sup>, Yoichi Honda<sup>2</sup>, Moriyuki Kawauchi<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>RC-TMR, Yamaguchi Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Agri., Kyoto Univ., <sup>3</sup>Grad. Sch. Sci. Tech. Innov., Yamaguchi Univ., <sup>4</sup>Grad. Sch. Glob. Env. Stud., Kyoto Univ.)

## \*P-41

### Influence of fermentation parameter to production of isoprimeverose-producing enzyme in genetically engineered *Aspergillus oryzae*

Baihaqqi Fahmi<sup>1</sup>, Suzuki Tomohiro<sup>1</sup>, Wakai Satoshi<sup>2,3</sup>, Kahar Prihardi<sup>1</sup>, Kondo Akihiko<sup>1,2</sup>, Ogino Chiaki<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng, Kobe Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., <sup>3</sup>JAMSTEC)

Filamentous fungus *Aspergillus oryzae* has high ability of secreting extracellular enzymes. It is generally recognized as safe and have long history of industrial used for fermentation food and beverage. This makes them an excellent candidate for bioprocess development platform. Previously, we constructed *A. oryzae* strains that produces isoprimeverose-producing enzyme (IPase) and endoglucanase. These enzymes are essential to release isoprimeverose ( $\alpha$ -D-xylopyranose-(1-6)-D-glucopyranose), which is a rare disaccharide, from Tamarind xyloglucan. We have been successful in producing enzyme cocktail, but have not yet to examine enzyme productivity. Evaluation of enzyme production in *A. oryzae* is important since this fungus has diverse response during fermentation. In this study, we investigated several fermentation parameters including carbon concentration, different carbon feedstocks, and agitation speed in order to enhance IPase production. Despite pairs of strong *P-sodM/T-glaB* were used on our expression system, we observed that protein production started after glucose was fully consumed, indicating carbon catabolite repression still involved. Reducing carbon limitation is crucial to achieve cost-effectiveness and reduce enzyme production time. CreA protein is characterized as general repressor for cellulase and amylase enzymes on *Aspergillus* spp. in the present of glucose. In current work, we are attempting to modify by deleting phosphorylation domain on CreA. In addition, neither direct nor indirect action of CreA toward *PsodM* is understood, we expect the results of this work give us a positive insight for optimizing our system.

## \*P-42

### *Aspergillus nidulans* が生産する主要なラムノガラクトツロナンリアーゼの構造と生理学的役割の解明

鈴木裕満<sup>1</sup>, 亀山綾音<sup>1</sup>, 高須賀太一<sup>2</sup>, 堀千明<sup>3</sup>, 加藤雅士<sup>1</sup>, 志水元亨<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>名城大・農, <sup>2</sup>北大・農, <sup>3</sup>北大・地球環境科学)

*Aspergillus nidulans* などの糸状菌は細胞外に様々な多糖分解酵素を分泌することが知られている。ペクチンのみを炭素源にして *A. nidulans* を培養後、セクレトーム解析したところ、機能既知のタンパク質とアミノ酸配列レベルで全く相同性がない機能未知タンパク質 (HP) が多数同定された。その一つが現存するいずれの Polysaccharide Lyase (PL) ファミリーに属さない新規のラムノガラクトツロナンリアーゼ (AnRGL) であった。AnRGL はペクチンの構成多糖であるラムノガラクトツロナン (RG) を脱離分解し、不飽和結合を含む RG オリゴ糖を生成する。また、X 線結晶構造解析から AnRGL は  $\beta$ -helix 型の構造を有することが示された。AnRGL は新規の PL であることから、基質結合部位を推定することは困難であった。そこで、得られた構造データを用いて、ドッキングシミュレーションを行い、基質結合部位を探索した。また、PL の反応は塩基性アミノ酸残基が触媒することが知られているため、推定された基質結合部位近傍の Arg 残基を Ala に置換した変異型酵素を作製し、野生型との活性を比較した。その結果、R261 が活性部位であることが明らかになった。さらに、*A. nidulans* における AnRGL の生理学的役割を明らかにするため、AnRGL の遺伝子破壊株 ( $\Delta$ AnRGL 株) を作製し、RG を唯一の炭素源にした培地で野生株および  $\Delta$ AnRGL 株を培養した。その結果、野生株と比較して  $\Delta$ AnRGL 株の生育が鈍化した。AnRGL は、*A. nidulans* における主要なエンド型のラムノガラクトツロナン分解酵素であることが明らかになった。

### Novel rhamnogalacturonan lyase from *Aspergillus nidulans*: Structure and physiological roles

Hirimitsu Suzuki<sup>1</sup>, Ayane Kameyama<sup>1</sup>, Taichi Takasuka<sup>2</sup>, Chiaki Hori<sup>3</sup>, Masashi Kato<sup>1</sup>, Motoyuki Shimizu<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Fac. of Agri., Univ. of Meijo, <sup>2</sup>Fac. of Agri., Univ. of Hokkaido, <sup>3</sup>Fac. of Env. Earth Sci., Univ. of Hokkaido)

## \*P-43

### 白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* 由来カフェ酸ジオキシゲナーゼの機能解析

加藤大志<sup>1</sup>, 三浦大典<sup>2</sup>, 加藤雅士<sup>1</sup>, 志水元亨<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>名城大・農, <sup>2</sup>産総研・バイオメディカル研究部門)

白色腐朽担子菌が生産するリグニンペルオキシダーゼおよびマンガンペルオキシダーゼ等のリグニン分解酵素によるリグニンポリマーの断片化機構については研究が進んでいる。一方、断片化によって生じる多様なリグニン断片の変換経路は、完全には明らかになっていない。

植物、一部の細菌や真菌に見出される L-DOPA ジオキシゲナーゼ (DODA) は L-DOPA の環開裂を引き起こすことで、植物色素ベタレインの基本共通骨格であるベタラミン酸を生成する。しかしながら、白色腐朽担子菌の DODA の機能については報告されていない。DODA は、リグニン断片に特徴的である隣接した水酸基を有する芳香族環を開裂できることから、リグニン断片の変換に関与することを予想した。本研究では、白色腐朽担子菌の DODA の機能を詳細に解析した。

白色腐朽担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* 由来の DODA (PcDODA) を大腸菌に異種発現させ、リコンビナントタンパク質を調製した。PcDODA と L-DOPA や種々のリグニン断片を反応させたところ、カフェ酸、プロトカテキ酸、カテコール、クロロゲン酸、チコリ酸を基質にした際に反応液の色および紫外可視吸収スペクトルが変化した。LC-MS/MS 分析により、これらの開裂産物が検出できたことから PcDODA は上記の基質の芳香環開裂を触媒することが示された。PcDODA の酵素学的パラメーターを算出すると、これまで基質として知られている L-DOPA と比べて、カフェ酸を基質にした際に 20 倍高い  $k_{cat}/K_m$  値が示された。以上のことから、PcDODA は新規カフェ酸ジオキシゲナーゼ (PcCADA) であることが明らかとなった。PcCADA の発見により、白色腐朽担子菌 *P. chrysosporium* の新しいリグニン断片変換経路が示された。

### Characterization of caffeic acid dioxygenase from white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*

Hiroyuki Kato<sup>1</sup>, Daisuke Miura<sup>2</sup>, Masashi Kato<sup>1</sup>, Motoyuki Shimizu<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Fac. of Agri., Univ. of Meijo, <sup>2</sup>Biomedical Dept., AIST)

## \*P-44

### 麹菌ハイドロフォビン RolA の親水-疎水界面特異的な自己組織化現象の機構解明

高橋尚央<sup>1</sup>, 寺内裕貴<sup>2</sup>, 田中拓未<sup>3</sup>, 吉見啓<sup>4</sup>, 藪浩<sup>5</sup>, 阿部敬悦<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>東北大院・農, <sup>2</sup>山口大・中高温研, <sup>3</sup>阪大院・工, <sup>4</sup>京大院・地環学, <sup>5</sup>東北大・AIMR)

糸状菌の分生子表面はハイドロフォビン(HP)と呼ばれる両親媒性タンパク質で覆われて疎水化されている。この HP の機能によって分生子の気中分散性が向上している。HP の中には細胞壁表層のような親水-疎水界面上でのみ自己組織化して“Rodlet”と呼ばれる棒状多量体構造を形成するものが存在する。HP はモノマー状態よりも rodlet 状態で細胞壁表層をより疎水化するため、HP の自己組織化は生物学的に重要であると考えられる。しかし、HP の界面特異的な自己組織化制御機構はほとんど不明であるため、自己組織化現象の生物学的意義の全容解明には至っていない。そこで我々は麹菌由来の HP である RolA の自己組織化について、rodlet 特異的蛍光プローブを用いた解析を通じてその反応経路を検討した。

蛍光プローブは Thioflavin T(ThT)を選択した。ThT は rodlet に結合すると強い蛍光を発する。96 穴プレート内で精製 RolA と ThT を混合・攪拌して RolA の自己組織化を促したときの蛍光強度を継時測定することで、経時的に自己組織化の進行度合いを評価した。その結果、ThT は rodlet とその前駆体であるオリゴマーの両方を検出しており、RolA の自己組織化はモノマー→オリゴマー→rodlet という過程を経ることが明らかになった。また、オリゴマー形成過程は親水-疎水界面の存在下でのみ進行した。RolA が液中親水環境では自己組織化せず気液界面や分生子表面などの親水-疎水界面でのみ自己組織化するという性質は、オリゴマー形成段階での制御によって実現していると考えられる。

### Hydrophilic-hydrophobic interface specific self-assembly of hydrophobin RolA from *Aspergillus oryzae*

Nao Takahashi<sup>1</sup>, Yuki Terauchi<sup>2</sup>, Takumi Tanaka<sup>3</sup>, Akira Yoshimi<sup>4</sup>, Hiroshi Yabu<sup>5</sup>, Keietsu Abe<sup>1</sup>

( <sup>1</sup>Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., <sup>2</sup>RCTMR, Yamaguchi Univ., <sup>3</sup>Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., <sup>4</sup>Grad. Sch. Glob. Env. Stud., Kyoto Univ., <sup>5</sup>WPI-AIMR, Tohoku Univ.)

## \*P-45

### *Aspergillus nidulans* における新規 $\beta$ -D-ガラクトフラノシダーゼの同定と機能解析

関口仁<sup>1</sup>, 山田久恵<sup>1</sup>, 豊田早紀<sup>1</sup>, 松永恵美子<sup>1</sup>, 渡邊真宏<sup>2</sup>, 樋口裕次郎<sup>1</sup>, 竹川薫<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>九大院・生資環・生命機能, <sup>2</sup>産業技術総合研究所)

*Aspergillus* 属糸状菌には細胞壁構成成分として糖鎖末端にガラクトフラノース(Galf)が存在する。Galfは、アスペルギルス症の原因菌である *A. fumigatus* の病原性に関与することが知られている。 $\beta$ -D-ガラクトフラノシダーゼ(Galf-ase)は Galf 含有糖鎖の代謝に重要な酵素である。本酵素は、アスペルギルス症の治療や Galf 含有糖鎖の有用な分析手段としての利用が期待できる。当研究室では Galf-ase のスクリーニングを行い、これまでに *A. nidulans* において *gfgA*, *gfgB* が GH2 ファミリーに属する Galf 特異的な Galf-ase であることを報告している。しかし、両遺伝子二重破壊株において、培養液で Galf-ase 活性がわずかに残存していた。そこで本研究では、両遺伝子以外の Galf-ase 遺伝子の同定を試みた。Galf に構造が類似した *Araf* に着目し、 $\alpha$ -L-アラビノフラノシダーゼ(*Araf-ase*)候補遺伝子の Galf-ase 活性について解析を行った。

大腸菌内で候補遺伝子を発現させ活性測定を行った結果、GH43-34 ファミリーに属する AN1870 が Galf 特異的な Galf-ase であることが明らかになったため、本遺伝子を *gfgC* と名付けた。GfgC について立体構造解析及び点変異体の解析を行った。その結果、GfgC には小さな基質結合ポケットが存在し、ポケット周辺の残基が Galf-ase 活性および基質特異性に重要であることが明らかになった。さらに、*A. nidulans* の Galf-ase の各遺伝子破壊株および三重破壊株を作製し、培養液上清の酵素活性測定を行った結果、*gfgC* 遺伝子破壊株で Galf-ase 活性が減少していた。以上の結果より、*A. nidulans* において、GfgC は細胞外で Galf 含有糖鎖の代謝に関与している可能性が示唆された。

### Identification and functional analysis of a novel $\beta$ -D-Galactofuranosidase from *Aspergillus nidulans*

Jin Sekiguchi<sup>1</sup>, Hisae Yamada<sup>1</sup>, Saki Toyota<sup>1</sup>, Emiko Matunaga<sup>1</sup>, Masahiro Watanabe<sup>2</sup>, Yujiro Higuchi<sup>1</sup>, Kaoru Takegawa<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Dept. of Biosci. Biotechnol., Kyushu Univ, <sup>2</sup>National Institute of AIST)

## \*P-46

### 麹菌 *Aspergillus oryzae* 由来パラベンヒドロラーゼ *AoPrbA* の触媒ポケット近傍のアミノ酸置換によるタンナーゼ活性の獲得

箱田倫子, 加藤智江, 塩野義人, 小関卓也 (山形大院・農)

タンナーゼはタンニンやカテキンガレートなどに存在する没食子酸 (3,4,5-トリヒドロキシ安息香酸) のエステル結合を加水分解することから、茶飲料やワインの清涼化、紅茶のクリームダウンの抑制、生理機能を有する没食子酸の回収等に利用されている。ESTHER database における糸状菌タンナーゼファミリーでは、*A. oryzae* 由来フェルラ酸エステラーゼ *FaeB*, *A. niger* 由来のタンナーゼ *Tan-An* の立体構造が解析されている一方で、*A. oryzae* 由来のタンナーゼの基質認識に関しては明らかになっていない。そこで、本研究では *A. oryzae* 由来タンナーゼの基質認識の解明を目的とし、*Tan-An* の基質結合部位を参考に作製したタンナーゼファミリーに属する *A. oryzae* 由来パラベンヒドロラーゼ *PrbA* 変異体を用いて、タンナーゼ活性に及ぼす影響を検討した。

*AoPrbA* は、先行研究により 4-ヒドロキシ安息香酸エステルに特異的でタンナーゼ活性をもたないことが判明しているが、*Tan-An* の基質結合に関与するアミノ酸に変異させた *AoPrbA* T200E, L232Q, L428S ではタンナーゼ活性が付与された。この結果を *Tan-An* の構造と比較して検討したところ、タンナーゼの基質認識にはベンゼン環に結合したヒドロキシ基とカルボキシル基側の O 原子に水素結合するアミノ酸残基が関与している可能性が示唆された。

### Acquisition of tannase activity by amino acid substitution near the catalytic pocket of paraben hydrolase *AoPrbA* from *Aspergillus oryzae*.

Michiko Hakoda, Tomoe Kato, Yoshihito Shiono, Takuya Koseki

(Faculty of Agriculture, Yamagata Univ)

## \*P-47 (O-11)

### 黄麹菌 *Aspergillus oryzae* の菌体内メタロエンドペプチダーゼ oryzalysin の局在解析

井上実希, 小川翠, 北浦健太郎, 森山裕充, 佐々木信光, 田中瑞己, 山形洋平 (農工大院・応生化)

Oryzalysin は黄麹菌 *Aspergillus oryzae* の有する菌体内メタロエンドペプチダーゼであり, *A. oryzae* には 3 つの oryzalysin 遺伝子が存在する (以下 *olsA*, *olsB*, *olsC*)。Oryzalysin は *Saccharomyces cerevisiae* が有する saccharolysin の *A. oryzae* におけるホモログである。Saccharolysin はミトコンドリアでミスフォールディングタンパク質の分解により生じたペプチドの分解に関与することが明らかとなっている。*A. oryzae* においても同様の機能を持つ可能性が考えられた。しかし, 各 oryzalysin の欠損株が 2,4-dinitrophenol 存在下で control 株とは異なる表現型を示す一方, *OlsA*, *OlsB*, *OlsC* にはミトコンドリア・ターゲティングシグナルに相当する配列は見られなかった。よって, *A. oryzae* の oryzalysin はミトコンドリア以外に局在し, 特異的な機能を有する可能性も考えられた。

本研究では *OlsA*, *OlsB*, *OlsC* の機能を解析するにあたり, *OlsA*, *OlsB*, *OlsC* と HA tag, tdTomato の融合タンパク質発現株を用い, 蛍光観察による局在解析を行った。その結果, *OlsA* が細胞質に局在する可能性が示唆された。*OlsB*, *OlsC* に関しては, 36 時間培養後の菌体でミトコンドリアへの局在の可能性が示唆された一方で, 48 時間培養後の菌体では局在が細胞質に移る可能性が示唆された。*OlsA*, *OlsB*, *OlsC* のより詳細な局在決定のために, 細胞分画とウエスタンブロット解析を用いた生化学的解析によりミトコンドリア, リソソーム, ペルオキシソームの分離を行った。ショ糖密度勾配を用いた細胞分画とマーカー酵素の活性測定による各 oryzalysin の局在解析について報告する。

#### Localization analysis of intracellular metalloendopeptidase oryzalysin in *Aspergillus oryzae*.

Miki Inoue, Midori Ogawa, Kentarou Kitaura, Hiromitsu Moriyama, Nobumitsu Sasaki, Mizuki Tanaka, Youhei Yamagata

(Dept. of Applied Biological Science, Tokyo Univ. of Agriculture and Technology)

## \*P-48

### アカパンカビ PNGase におけるアミノ酸置換が脱糖鎖機能に与える影響の検討

山中晴加<sup>1</sup>, 鈴木匡<sup>2</sup>, 畠山晋<sup>1</sup> (<sup>1</sup>埼玉大・院, <sup>2</sup>糖鎖代謝生化学研・理研和光)

ペプチド: N-グリカナナーゼ (PNGase) は, 誤った折りたたみが生じた糖タンパク質から糖鎖を脱離する酵素であり, 真核細胞に広く存在している。この活性にはシステイン, ヒスチジン, アスパラギン酸からなる触媒 3 残基 (以下 CHD) が活性中心領域に必要であると *in vitro* の解析により示されていた。多くの生物で保存されているこの 3 残基は, アカパンカビ (*Neurospora crassa*) を始め一部の糸状菌類では AYD, VHD などとなっていることが見出されている。アカパンカビにおいて PNGase をコードする NCU00651 (以下 *ngII* 遺伝子) は, 生存に必須であるが, *un-7* (unknown-7) 株と *png-1* (Peptide N-Glycanase-1) 株が単離されており, これらの変異は上記の CHD (AYD) が含まれる活性中心領域には含まれず, C 末端側に存在する。

本研究において, アカパンカビの野生株の AYD を CHD に置換したところ, 温度および薬剤感受性が変化しないことを確認した。さらに, CHD に置換した株に *un-7* 変異, *png-1* 変異を重ねた株の作出を試みたところ, 致死性もしくは成長の増悪が認められた。AlphaFold2 を用いた構造予測を行ったところ, アカパンカビ PNGase における AYD→CHD 置換は, 立体構造の変化が認められなかったものの, CHD 置換に *un-7* 変異を重ねることで劇的に構造が変化することが予想され, 糸状菌 PNGase の構造安定化における AYD の意義が示唆された。

今後, 作製株の実際の脱糖鎖活性について HPLC による遊離糖鎖の解析を行う予定である。

#### Effect of amino acid substitutions on the de-glycosylation in *Neurospora crassa*

Haruka Yamanaka<sup>1</sup>, Tadashi Suzuki<sup>2</sup>, Shin Hatakeyama<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Grad. School Sci. & Eng., Saitama Univ., <sup>2</sup>Glycometabolic Biochem. Lab., RIKEN)

## \*P-49

### *Aspergillus nidulans* 由来新規 P450 還元酵素の機能解析

小島才卓, 鈴木康太, 勝木希, 榎尾俊介, 志水元亨, 高谷直樹 (筑波大院・生命環境/MiCS)

Cytochrome P450 (P450) は生物界に広く分布するヘムタンパク質であり、還元・一酸化炭素結合型が 450 nm 付近に吸収極大を示すモノオキシゲナーゼである。この活性の発現には、電子伝達タンパク質が P450 へ電子を伝達し、ヘムの還元とヘムに配位した酸素分子の活性化を伴う。Cytochrome  $b_5$  (Cyt  $b_5$ ) を用いた P450 への電子伝達においては、NAD(P)H の電子は Cyt  $b_5$  還元酵素 ( $b_5R$ )、Cyt  $b_5$  の順に伝達される。我々は、*Aspergillus nidulans* において、通常は単独で存在する Cyt  $b_5$  と  $b_5R$  がリンカー領域を介して融合した融合型の  $b_5/b_5R$  が NADH の電子を P450 (CYP540A2) に伝達することを見出した。本研究では、 $b_5/b_5R$  の反応速度論的解析を行い、その電子伝達とリンカー領域の機能を解析した。

$b_5/b_5R$  及びリンカー領域を欠損させた変異タンパク質 ( $b_5/b_5R \Delta L$ ) について、NADH を電子供与体とした dichloroindophenol と CYP540A2 の還元反応の定常状態における反応速度論的解析を行った。 $b_5/b_5R \Delta L$  の NADH 依存的な電子受容体の還元活性の  $k_{cat}/K_m$  は、いずれの電子受容体を用いた場合にも、 $b_5/b_5R$  のそれよりも 1.5~5.7 倍大きかった。さらに、ストップフロー分光法を用いて、 $b_5R$  ドメインと Cyt  $b_5$  ドメインのそれぞれを有するタンパク質の前定常状態における還元反応速度論的解析を行った。両ドメインが独立して存在する場合、 $b_5R$  と Cyt  $b_5$  ( $4 \mu M$ ) が NADH ( $20 \mu M$ ) により順に還元される反応の反応速度定数は、それぞれ  $>100 s^{-1}$ ,  $57 s^{-1}$  であった。 $b_5/b_5R$  のこれらの値はそれぞれ  $4.5 s^{-1}$ ,  $4.0 s^{-1}$  であった。以上の結果から、 $b_5/b_5R$  のリンカー領域は、各還元段階の電子伝達速度及び基質の還元速度を低下させることが示された。

### Characterization of a novel cytochrome P450 reductase from *Aspergillus nidulans*

Saito Kojima, Kota Suzuki, Nozomi Katsuki, Shunsuke Masuo, Motoyuki Shimizu, Naoki Takaya

(Faculty of Life Env. Sci./ MiCS, Univ. Tsukuba)

## \*P-50

### キシログルカンの分解に関与する麹菌 *Aspergillus oryzae* 由来 $\alpha$ -フコシダーゼの同定

島田尚季<sup>1</sup>, 亀山昭彦<sup>2</sup>, 松沢智彦<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>香川大・農, <sup>2</sup>産総研・細胞分子工学)

キシログルカンは陸上植物の細胞壁や種子に含まれている多糖類であり、構造多糖類あるいは貯蔵多糖類として重要な役割を担っている。キシログルカンは複雑な側鎖構造を有しており、麹菌は複数の酵素を協調的に作用させることでキシログルカンを分解している。しかし、キシログルカン側鎖を切断する酵素について未解明な点が多い。

キシログルカンオリゴ糖存在下におけるトランスクリプトーム解析を行った結果、発現量が上がった遺伝子が複数見つかり、その中で Glycoside hydrolase family 95 に属する推定酵素をコードする遺伝子に注目した。当該遺伝子を *Pichia pastoris* において異種宿主発現させ、精製酵素を調製した。また、酵素反応の基質として、フコースを側鎖に持つキシログルカンオリゴ糖を緑豆胚軸から調製し、酵素反応を行った結果、当該酵素によってキシログルカンオリゴ糖からフコースが遊離されることが明らかになった。さらに、結合様式の異なる基質を用いて酵素反応を行った結果、当該酵素は  $\alpha$ -1,2 特異的にフコースを遊離することが示唆された。

### Identification and characterization of xyloglucan-degradation related $\alpha$ -fucosidase in *Aspergillus oryzae*.

Naoki Shimada<sup>1</sup>, Akihiko Kameyama<sup>2</sup>, Tomohiko Matsuzawa<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Univ. of Kagawa, <sup>2</sup>AIST)

## P-51

### 麹菌のエンド・プロセッシブ型キシログルカナーゼ

松沢智彦<sup>1</sup>, 中道優介<sup>2</sup>, 島田尚季<sup>1</sup>, 渡邊真宏<sup>2</sup> ( <sup>1</sup>香川大・農, <sup>2</sup>産総研・機能化学)

植物は多種多様な構造の多糖類を合成しており、糸状菌は様々な作用機序の酵素を組み合わせることで多糖類を分解・利用している。多糖類の分解には、多糖類の主鎖を内部から切断するエンド型酵素と、末端から分解するエキソ型酵素が存在すること、また、これらの酵素が協調的に多糖類を分解していることが古くから知られている。エンド型多糖類分解酵素の中にはエンド・プロセッシブ型と呼ばれる酵素が存在することが近年明らかになっており、エンド・プロセッシブ型酵素は多糖類を内部から切断後、基質上をスライドしながら連続的に分解を進めると考えられている。

キシログルカンは陸上植物の細胞壁や種子に含まれている多糖類であり、 $\beta$ -1,4-グルカン主鎖に規則的にキシロース側鎖が枝分かれした構造を基本としている。我々は麹菌が生産する2つのキシログルカナーゼ(キシログルカン特異的 $\beta$ -グルカナーゼ)を同定した。1つは典型的なエンド型酵素であったのに対し、もう一方はエンド・プロセッシブ型であることが明らかになった。また、両酵素はキシログルカン主鎖の切断部位にも違いが見られ、一方はキシロース側鎖が付加していない部位のみを切断するのに対し、もう一方はキシロース側鎖が付加した部位も切断することが明らかになった。

我々はエンド・プロセッシブ型キシログルカナーゼのX線結晶構造解析から、当該エンド・プロセッシブ型キシログルカナーゼには触媒ドメインに加えて機能未知ドメインが存在していることを明らかにした。本発表では、この機能未知ドメインの役割について、また、これまで「エンド型」と十把一絡げにされていた多糖類分解酵素の糸状菌における機能分化とその意義について議論したい。

### Endo-processive-type xyloglucanase in *Aspergillus oryzae*

Tomohiko Matsuzawa<sup>1</sup>, Yusuke Nakamichi<sup>2</sup>, Naoki Shimada<sup>1</sup>, Masahiro Watanabe<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Kagawa Univ., <sup>2</sup>AIST)

## P-52

### 黒麹菌細胞壁多糖ニゲランの分子量制御に関わる $\alpha$ -グルカノトランスフェラーゼの解析

上地敬子, 島袋雛, 平田風子, 水谷治, 平良東紀 (琉球大・農)

黒麹菌など *Nigri* 節に属する *Aspergillus* 属糸状菌は窒素源飢餓時にニゲランという細胞壁多糖を生産する。我々は黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* のニゲラン合成酵素遺伝子クラスターを同定するとともに、ニゲラン合成酵素遺伝子 (*nisA*) に隣接する $\alpha$ -グルカノトランスフェラーゼ (GPI-アンカー型アミラーゼ様タンパク質) 遺伝子 (*agtC*) がニゲランの分子量に影響を及ぼすことを報告した (Uechi *et al.*, 2021)。

本研究では *AgtC* の反応特性について検証することを目的とした。*agtC* 遺伝子をクローニングし、GPI-アンカー部位を欠失させた組換え酵素 (*rAgtC*) として発現させた。*rAgtC* とニゲラン ( $\alpha$ -1,3/ $\alpha$ -1,4-グルカン),  $\alpha$ -1,3-グルカン, デンプン ( $\alpha$ -1,4-グルカン) を基質としてそれぞれ反応させた結果、*rAgtC* はニゲランのみを低分子化させた。次にニゲランを部分酸加水分解し、ゲルろ過クロマトグラフィーに供して分画したニゲランオリゴ糖混合液を基質として *rAgtC* と反応させた。その結果、*rAgtC* は重合度 10 程度以上のニゲランオリゴ糖に作用することが明らかとなった。続いて *rAgtC* がニゲランの $\alpha$ -1,3-と $\alpha$ -1,4-グルコシド結合のどちらかを加水分解しているか検討することにした。部分酸加水分解して得た *rAgtC* の基質となり得る鎖長のニゲランオリゴ糖の還元末端を 4-アミノ安息香酸エチル (ABEE) で蛍光標識した。ABEE 化ニゲランオリゴ糖と *rAgtC* と反応させ、新たに生じた短鎖の ABEE 化ニゲランオリゴ糖の非還元末端の結合様式についてグルコアミラーゼと $\alpha$ -1,3-グルコシダーゼを用いて解析した。その結果、*rAgtC* は主に $\alpha$ -1,4-グルコシド結合を加水分解することが明らかとなった。

### Investigation of $\alpha$ -glucanotransferase involved in controlling the molecular weight of Nigeran

Keiko Uechi, Hina Shimabukuro, Fuko Hirata, Osamu Mizutani, Toki Taira

(Fac. of Agriculture, Univ. of Ryukyus)

## P-53 (O-12)

### 核酸系うまみ成分分解能の低下した麹菌株における酸性ホスファターゼの特性解析

酒井香奈江<sup>1</sup>, 鈴木忠宏<sup>2</sup>, 堀井悠一郎<sup>3</sup>, 和久豊<sup>4</sup>, 楠本憲一<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>阪大院・工, <sup>2</sup>農研機構, <sup>3</sup>新潟食品研, <sup>4</sup>(株)バイオック)

だし入り味噌の製造過程ではだしの添加前に、核酸系うまみ成分の分解活性を持つ麹菌由来の酵素、酸性ホスファターゼ(AP)を失活させるための加熱処理が必要である。我々は加熱処理の工程を回避するため、AP活性の大きく低下した麹菌 KBN8048 株(KBN)をスクリーニングしてきた。これまでの研究で、13 個ある麹菌の推定 AP 遺伝子のうち 5 つに KBN 特異的なアミノ酸置換が存在すること [R4 本学会発表], AP 遺伝子がリン酸による発現制御を受けていることなどが分かっている [1, 2]。しかし、KBN で AP 活性が大きく低下した原因はまだ明らかになっていない。そこで、本研究では KBN の AP の特性を解析し、活性が大きく低下した原因を詳しく調べることにした。リン酸による発現制御パターンと KBN の AP 活性低下の様子から、5 つの変異 AP のうち AphB と AphC が AP 活性低下の原因ではないかと考えられたため、KBN を含む 3 種類の菌株由来の配列を持つ AphB と AphC をそれぞれ *tefl* プロモーターの制御化で高発現させたところ、KBN 型の配列を持つコンストラクトのみ液体培養の培養上清や菌体破砕物中にほとんど活性が確認できなかった。更に KBN 株において AP 活性低下の一番の原因と考えられる AphC については破壊株を作製したところ、寒天プレートのコロニー上では KBN 型の配列を持っていても AP 活性が確認できることが分かった。コロニー上での各 AphC 活性を調べてみると、KBN 型の配列を持つものは温度や pH に対する安定性などが他とは異なるといった特性が明らかになった。

[1: Marui *et al.*, 2013, Int J Food Microbiol., 2: Yasuda *et al.*, 2014, Food Sci. Technol. Res.]

### Characterization of acid phosphatases in *Aspergillus oryzae* strain with reduced “umami” degradation activity.

Kanae Sakai<sup>1</sup>, Tadahiro Suzuki<sup>2</sup>, Yuichiro Horii<sup>3</sup>, Yutaka Wagu<sup>4</sup>, Ken-Ichi Kusumoto<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., <sup>2</sup>NARO, <sup>3</sup>Niigata Food Res. Center, <sup>4</sup>Bio'c)

## \*P-54

### 固体培養特異的に発現する麹菌 *glaB* 遺伝子プロモーターの AmyR のシスエレメント

青西洋平, 大沼司, 渡部昭, 新谷尚弘, 五味勝也 (東北大学院・農)

麹菌 *Aspergillus oryzae* では、米などの固体を基質として培養（固体培養）することで酵素生産量が格段に高くなることに加え、固体培養特異的に生産される酵素が存在する。固体培養特異的な発現を示すグルコアミラーゼ遺伝子 *glaB* では転写因子 AmyR が発現を制御しており、先行研究では *glaB* プロモーターの -253 bp から -236 bp (Region R) の領域に AmyR が結合すると報告されている。一方、-332 bp から -313 bp (Region S) は重要な未同定転写因子のシスエレメントとして報告されている。本研究では、配列の特徴 (CGGN<sub>8</sub>CGG) から Region S に AmyR が結合し発現を制御しているのではないかと仮説を立て、Region S, Region R の *glaB* 発現制御への関与および AmyR との結合性を調べることを目的として実験を行った。まず Region S, Region R に変異を加えた *glaB* プロモーターを用いた GUS レポーターアッセイ、および Region S, Region R 変異株を用いたグルコアミラーゼ活性測定を行った。その結果、Region R を変異させても活性はわずかにしか下がらなかった一方で、Region S の変異によって GUS 活性、グルコアミラーゼ活性ともに大幅に減少した。次に麹菌由来 AmyR の Zinc finger motif を含む N 末端 131 アミノ酸残基を GST 融合タンパク質として大腸菌で生産し、Region S, Region R の配列を含む DNA 断片をプローブおよびコンペティターに用いてゲルシフトアッセイを行ったところ、Region S は Region R よりも AmyR と強く結合することが示された。これらの結果から、*glaB* プロモーターにおいて Region S が AmyR のシスエレメントとして中心的に働いていることが示唆された。さらに、N 末端 408 アミノ酸残基からなる AmyR を用いてゲルシフトアッセイを行うことも試みており、その結果も含めて発表予定である。

### Elucidation of *cis*-elements for AmyR in the solid-state culture-specific *glaB* gene promoter of *Aspergillus oryzae*.

Yohei Aonishi, Tsukasa Ohnuma, Akira Watanabe, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi

(Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ)

## \*P-55 (O-15)

### *Aspergillus aculeatus* において形態形成制御因子はセロビオースに応答した遺伝子発現誘導を制御する

志賀結衣<sup>1</sup>, 菊矢咲季<sup>1</sup>, 川口剛司<sup>1,2</sup>, 谷修治<sup>1,2</sup> (阪府大・生環科<sup>1</sup>, 阪公大院・農<sup>2</sup>)

【目的】*Aspergillus aculeatus* におけるマンノビオースとセロビオースに応答した酵素遺伝子の発現は、転写因子 ManR を介して誘導される。当研究グループはこれまでに、UDP-glucose 4-epimerase がマンノビオースに応答した遺伝子発現誘導に必須であること、隔壁形成因子の SepM が、セロビオースに応答した遺伝子発現制御に関与していること、また SepM は、隔壁形成を促進するキナーゼ様タンパク質 (SepL) と相互作用することを見出した。そこで本研究は、形態形成に関わる因子の機能を解析し、ManR が異なる誘導物質からのシグナルを受けて遺伝子発現を誘導する分子機構を解明することを目的とした。

【方法・結果】*A. aculeatus* *sepL* 破壊株 ( $\Delta sepL$ ) および *sepL* 相補株 (*CsepL*) を用いた解析により、 $\Delta sepL$  では隔壁形成能が約 1/10 に低下すること、セロビオースに応答した遺伝子発現誘導能が消失する一方で、マンノビオースに応答した遺伝子発現誘導能は低下するのみであることを見出した。次に、隔壁は細胞壁と同じ成分から構成されていることから、cell wall integrity (CWI) 経路の関与を解析した。CWI 経路からのシグナルを受ける転写因子 *rlmA* 単独破壊は遺伝子発現誘導に影響しなかったものの、*sepM* および *rlmA* 二重破壊によりセロビオースに応答した酵素遺伝子発現誘導能は消失した。なお、マンノビオース応答した遺伝子発現誘導能は低下したのみであった。これらの結果より、ManR を介したセロビオースに応答する遺伝子発現誘導経路に、隔壁形成因子と CWI 経路の転写因子が特異的に関わっていることが遺伝学的に示された。

### Regulators involved in morphogenesis in *Aspergillus aculeatus* control the cellobiose-responsive induction of cellulolytic enzyme genes

Yui Shiga<sup>1</sup>, Saki Kikuya<sup>1</sup>, Takashi Kawaguchi<sup>1,2</sup>, Shuji Tani<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>Osaka Pref. Univ., <sup>2</sup>Osaka Metropolitan Univ.)

## \*P-56

### 真菌における dipeptidyl peptidase を介した酸化ストレス応答機構の解析

中谷早希<sup>1</sup>, 遊亀翔太<sup>2</sup>, 川口剛司<sup>1,2</sup>, 谷修治<sup>1,2</sup> (1大阪公大院・農, 2阪府大院・生環科)

【目的】セルラーゼ生産菌 *Aspergillus aculeatus* における糖質加水分解酵素遺伝子群の正の制御因子として、dipeptidyl peptidase IV (DppIV) が同定された。また DppIV の機能を多面的に解析する過程で、*dppIV* 高発現株 (*dppIV*-OE) が酸化ストレス耐性を獲得することを見出した。そこで本研究では、真菌における dipeptidyl peptidase を介した酸化ストレス応答機構を解明することを目的とした。

【方法および結果】糸状菌 *A. aculeatus* の宿主株、*dppIV* 破壊株 ( $\Delta dppIV$ )、*dppIV*-OE、および DppIV の触媒アミノ酸の 3 残基を改変した DppIV-SDH を高発現する株 (*dppIV*-SDH-OE) を用いて、糸状菌における DppIV を介した酸化ストレス応答機構を解析した。まず、*dppIV*-OE における Dipeptidyl peptidase (Dpp) 活性は、宿主株に比べて約 4 倍増加したが、*dppIV*-OE と同程度改変 *dppIV* 遺伝子を発現する *dppIV*-SDH-OE における Dpp 活性に変化はなかった。次に、4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> または 40  $\mu$ M menadione を含む最少培地上での各株の生育を比較したところ、*dppIV*-OE 株のみ酸化剤を含む最少培地上で生育した。また、各株における酸化ストレス応答関連遺伝子の発現を定量した結果、catalase C と two component system の response regulator である *ssrA* の発現が *dppIV*-OE において亢進されたが、*dppIV*-SDH-OE では酸化ストレスによる遺伝子発現誘導が起きなかった。以上より、糸状菌における DppIV を介した酸化ストレス応答に、Dpp 活性が関与していることが示唆された。現在、酵母においても Dpp を介した酸化ストレス応答機構が保存されているか解析している段階である。

### Oxidative stress response by dipeptidyl peptidase IV in fungi

Saki Nakatani<sup>1</sup>, Shota Yuki<sup>2</sup>, Takashi Kawaguchi<sup>1,2</sup>, Shuji Tani<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>Grad Sch Agri, Osaka Metro Univ., <sup>2</sup>Grad Sch Life Env. Sci., Osaka Pref Univ.)

## \*P-57 (O-13)

### 細菌-糸状菌間相互作用におけるトランスクリプトームの比較解析

戸田征宏<sup>1</sup>, Gayan Abeysinghe<sup>1</sup>, 菅澤威仁<sup>2</sup>, 高谷直樹<sup>1,3</sup>, 竹下典男<sup>1,3</sup> ( <sup>1</sup>筑波大・生命環境, <sup>2</sup>筑波大・医学医療, <sup>3</sup>筑波大・MiCS)

細菌-糸状菌間相互作用 (bacterial-fungal interactions, BFIs) は生態系の機能に大きな影響を及ぼしているが、その機序はほとんど明らかにされていない。糸状菌 *Aspergillus nidulans* と枯草菌 *Bacillus subtilis* を共培養することで、*B. subtilis* が菌糸上を移動して拡散・増殖することや、*B. subtilis* が分泌するビタミン B1 (チアミン) が菌糸生長を促進することが示されている (Life Sci Alliance 2020)。さらに、多様な系統の糸状菌と細菌を組み合わせた共培養の解析から、相互作用の選択性・特異性が示されている。本研究では、系統の異なる複数の細菌 (*B. subtilis*, *Kluyvera intermedia*, *Pseudomonas aeruginosa*) と糸状菌 (*Alternaria alternata*, *A. nidulans*, *Aspergillus niger*, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium oxysporum*) からそれぞれ 1 株ずつ、計 9 通りの組み合わせで共培養し、共培養の組み合わせによる生育の変化を評価した。続いて双方のトランスクリプトームを取得し、細菌と糸状菌の組み合わせによって共通あるいは特異的な相互作用に着目して解析を行った。糸状菌のトランスクリプトームの解析により、BFI の特異性は二次代謝産物、毒素、抗生物質の生合成および酸化活性化などの糸状菌の防御機構と直接的な相関があることが示された。オミクス解析により、*A. niger* の *B. subtilis* に対する抑制作用は、二次代謝産物である pyranonigrin A の生産増加に起因していることが示された。さらに、細菌と糸状菌のそれぞれについてビタミンやアミノ酸の生合成に関わる遺伝子の発現に変化がみられたことから、細菌と糸状菌の間でこれらの物質の受け渡しが行われている可能性にも着目した。

#### Comparative analysis of transcriptomes in bacterial-fungal interactions

Mahiro Toda<sup>1</sup>, Gayan Abeysinghe<sup>1</sup>, Takehito Sugasawa<sup>2</sup>, Naoki Takaya<sup>1,3</sup>, Norio Takeshita<sup>1,3</sup>

(<sup>1</sup>Inst. of Life and Env. Sci., Univ. of Tsukuba, <sup>2</sup>Inst. of Med., Univ. of Tsukuba, <sup>3</sup>MiCS, Univ. of Tsukuba)

## \*P-58

### 糸状菌における鉄代謝制御機構：転写制御因子 HapX と相互作用するタンパク質の機能解析

三浦綾夏, 原崎茜蓮, 吾妻友貴, 小林吉生, 兒島孝明, 志水元亨, 加藤雅士 (名城大・農)

【緒言】HapX は HapB/C/E 複合体と相互作用し、鉄欠乏時に鉄含有タンパク質を生産抑制する一方で鉄取込みを促進する真菌類特有の転写因子である。HapX は、TCA 回路、電子伝達系、酸化ストレス応答、アミノ酸合成、病原性など、糸状菌の重要な生命活動に関与するため、その機能の解明は、基礎微生物学、食品、医療、農業の分野に大きく貢献することが期待される。本研究では、HapX と相互作用するタンパク質を探索し、その機能解析を行った。

【方法・結果】糸状菌 *Aspergillus nidulans* を対象として、鉄欠乏条件下で HapX と相互作用するタンパク質を LC-MS/MS を用いて網羅的に探索した。その結果、HapC, HapE の他に、これまで HapX との相互作用が未報告のタンパク質を 10 種類同定した。その中で SodA に着目しさらに研究を進めた。リコンビナント SodA タンパク質を調製し、Nitroblue Tetrazolium 法 (NBT 法) により、スーパーオキシドジスムターゼ活性を有する酵素タンパク質であることを確認した。次に *sodA* の遺伝子破壊株 ( $\Delta sodA$  株) を作製し、種々の条件下で  $\Delta sodA$  株の表現型を解析した。*hapX* 遺伝子破壊株 ( $\Delta hapX$  株) は鉄欠乏条件下で生育が著しく低下するという表現型が既に知られているため、野生株、 $\Delta sodA$  株、 $\Delta hapX$  株を鉄の含有量を変化させ寒天培地上で培養したところ、 $\Delta sodA$  株は鉄欠乏条件下で  $\Delta hapX$  株と同様に、野生株に比べて著しい生育の低下が見られた。以上の結果より、SodA は HapX に相互作用することで鉄の代謝制御に関与することが示唆された。SodA の鉄代謝制御機構における働きについて考察する。

#### Regulatory mechanism of the fungal iron metabolism: Functional analysis of proteins interacting with the transcriptional regulator HapX

Ayaka Miura, Seren Harasaki, Yuuki Azuma, Yoshio Kobayashi, Takaaki Kojima, Motoyuki Shimizu, Masashi Kato

(Fac of Agric, Univ. of Meiji)

## \*P-59 (O-14)

### 麹菌における同株のコロニー間で生じる増殖抑制に関与する遺伝子の同定

浜中祐弥<sup>1</sup>, 片山琢也<sup>1,2</sup>, 黒田裕樹<sup>3</sup>, 丸山潤一<sup>1,2</sup> (1 東大院・農生科・応生工, 2 東大・微生物連携機構, 3 慶應大・環境情報)

糸状菌では異種または同種異株どうしを寒天培地上で対峙培養した際に、向かい合った 2 つのコロニーの増殖が抑制される拮抗作用 antagonistic effect が生じることが知られている。一方、我々は麹菌 *Aspergillus oryzae* の野生株 RIB40 を対峙培養した際に同種同株どうしにもかかわらず、コロニー間で増殖抑制が生じることを糸状菌で初めて見いだした<sup>1)</sup>。本研究では *A. oryzae* でこの現象が生じるメカニズムを解明するため、対峙培養におけるコロニー間の増殖抑制に関与する遺伝子の探索を行った。

これまでに RIB40 株を用いた RNA-seq 解析の結果から、コロニー間の増殖抑制時に二次代謝関連遺伝子の発現が上昇していることを明らかにした<sup>1)</sup>。この結果にもとづき、糸状菌の二次代謝の制御因子 LacA をコードする遺伝子を破壊したところ、増殖抑制が生じなくなった。また、*A. oryzae* の転写制御遺伝子破壊株ライブラリを用いたスクリーニングを行い、G タンパク質シグナル伝達の調節因子 RGS タンパク質をコードする *flbA* 遺伝子の破壊株で増殖抑制が生じないことを見いだした。以上の結果から、対峙培養のコロニー間の増殖抑制に関与する遺伝子を初めて発見し、これらがコードする LacA と FlbA は糸状菌において広範な遺伝子発現調節への関与が報告されていることから、遺伝子発現調節を介して増殖抑制を制御する可能性が考えられた。現在、LacA や FlbA と協調して機能するタンパク質、RNA-seq 解析において *laeA* および *flbA* の破壊株で発現変動を示した遺伝子を対象として、コロニー間の増殖抑制を制御する遺伝子群を探索している。

1) 浜中ら, 第 20 回糸状菌分子生物学コンファレンス, P-48 (2021)

### Identification of genes involved in growth inhibition between colonies of the same strain in *Aspergillus oryzae*

Yuya Hamanaka<sup>1</sup>, Takuya Katayama<sup>1,2</sup>, Hiroki Kuroda<sup>3</sup>, Jun-ichi Maruyama<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, <sup>2</sup>CRIIM, The Univ. of Tokyo, <sup>3</sup>Fac. of Env. and Info. Stud., Keio Univ.)

## \*P-60

### *Aspergillus nidulans* におけるセルラーゼ遺伝子特異的転写因子 ClrB の機能ドメイン解析

深田文香, 内田祐衣, 木村哲哉, 國武絵美 (三重大院・生資)

糸状菌 *Aspergillus nidulans* の Zn(II)<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub> 型転写因子 ClrB はセルロースやその分解産物であるセロビオースに応答してセルラーゼ遺伝子群の転写を活性化する。本研究では ClrB の機能制御機構を明らかにすることを目的として、ClrB の細胞内局在を解析した。また、核局在性や転写活性化に重要な領域を同定するため、各種変異体についても解析した。

ClrB に蛍光緑色タンパク質(GFP)を融合した GFP-ClrB を発現する株を作出し、セロビオース、グルコース、グリセロールを単一炭素源として培養した。蛍光顕微鏡観察により GFP-ClrB の細胞内局在を解析した結果、グリセロールやグルコースを用いた培養では GFP-ClrB は細胞全体に局在したが、セロビオース含有培地に移行後約 10 分で核に蓄積した。セロビオースとグルコースの共存下でも同様に核に局在したことから、ClrB はセロビオースに応答した核移行制御を受けることが明らかとなった。N 末端側の DNA 結合モチーフ内に存在する推定核局在化シグナル(NLS)の変異体は核内蓄積が見られなかったことから、NLS としての機能が示された。次に、ClrB の機能ドメインを調べるため C 末端から順次欠失、あるいは内部欠失させた変異体を作製し、セルラーゼ生産性と局在性を調べた。その結果、DNA 結合ドメインのみを含む GFP-ClrB<sub>1-120</sub> ではセルラーゼ生産が確認されず、また核局在性も部分的であった。C 末端を切除した GFP-ClrB<sub>1-705</sub> は恒常的に核に局在したがセルラーゼは生産されなかった。C 末端側の一部を欠失した GFP-ClrB<sub>Δ649-705</sub> は恒常的に核に局在した一方で、セルラーゼ生産は誘導条件でのみ起こった。以上より、ClrB の 706-773aa 領域がセルラーゼ遺伝子の転写活性化に、649-773aa 領域が核移行制御に関与していることが示唆された。

### Domain analysis of ClrB, a transcriptional activator of cellulase genes in *Aspergillus nidulans*.

Fumika Fukata, Yui Uchida, Tetsuya Kimura, Emi Kunitake

(Grad. Sch. of Biores, Mie Univ.,)

## \*P-61

### *Trichoderma reesei* における窒素制御とセルラーゼ生産の関係

藤本健志<sup>1</sup>, 平沢大樹<sup>2</sup>, 志田洋介<sup>1</sup>, 小笠原渉<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>長岡技大・物質生物, <sup>2</sup>都城高専・物質)

糸状菌 *Trichoderma reesei* は木質系バイオマスを分解するために多量のセルラーゼやヘミセルラーゼを生産・分泌する。セルラーゼ生産は炭素源や pH などの環境因子に応答し、転写調節因子によって転写レベルで厳密に制御される。窒素源においては、窒素源代謝を制御する転写調節因子 *Are1* が転写レベルでセルラーゼ生産に関与することが示唆されている。先行研究では標準株 QM9414 と *are1* 破壊株を用いて比較培養を行い、培地内の窒素源濃度が *Are1* を介してセルラーゼ生産を制御することが報告されている。しかし、その培養条件は検討が不十分であり、窒素源濃度とセルラーゼ生産の関係が不明瞭である。本研究では培地条件を検討し、セルラーゼ生産に対して与える窒素源の影響を解析した。

窒素源として硫酸アンモニウム、グルタミン、グルタミン酸、アルギニン、尿素を 0.5M ずつ添加した 1% 結晶性セルロース培地での培養では、グルタミン、アルギニン、尿素を添加した培地で著しいセルラーゼ活性の低下を示した。セルラーゼ活性の低下を示した三条件の内、アルギニンと尿素条件は培地が高 pH であり、それが起因した結果だと示唆される。また、誘導試験ではセルラーゼ遺伝子 *egl1*, *cbh1*, セルラーゼの主要転写活性化因子 *xyl1* の転写レベルの増加をグルタミンが阻害することが示された。これらの結果から、*T. reesei* QM9414 においても高濃度のグルタミンによってセルラーゼ活性が低下し、転写レベルで制御されていることが示唆される。今後は、窒素制御関与因子と推定される *are2*, *are3*, *nmr1* の破壊株を構築し、窒素源とセルラーゼ生産制御の関連を解析する予定である。

### Relationship between nitrogen regulation and cellulase production in *Trichoderma reesei*

Takeshi Fujimoto<sup>1</sup>, Hiroki Hirasawa<sup>2</sup>, Yosuke Shida<sup>1</sup>, Wataru Ogasawara<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Dept. of Materials Science and Bioengineering, Nagaoka Univ. of technology, <sup>2</sup>Dept. of materials engineering, National Institute of Technology, Miyakonojo college)

## \*P-62

### アカパンカビの交配に関わる遺伝子の探索

吉野航, 一石昭彦 (東洋大院・生命科学)

DNA 損傷耐性機構の 1 つである損傷乗り越え複製 (TLS: translesion DNA synthesis) 活性を持つ特異的な DNA ポリメラーゼの 1 つに DNA ポリメラーゼ ζ (POL ζ) が知られている。本研究で扱うアカパンカビの *upr-1* 遺伝子は、POL ζ の触媒サブユニットをコードしており、出芽酵母 Rev3 のホモログ遺伝子である。

アカパンカビ KO ライブラリーの *upr-1* 欠損株 (FGSC#15992 株) はヘテロカリオンとして登録されていたため、ホモカリオン株を取得するために *upr-1* ヘテロカリオン株を野生株と掛け合わせ、ホモカリオン化を試みた。交配後、取得できたホモカリオン株を調べたところ、交配能が正常な株 (YW 株) と交配ができない株 (UK 株) の 2 種類の形質が異なる *upr-1* 完全欠損株を取得した。そこで、この 2 種類の *upr-1* 欠損株の交配能の違いの原因を特定するために全ゲノムシーケンス法による解析によって、UK 株に特異的に存在する変異遺伝子を調べたところ、交配能に関与することが考えられている *add-6* 遺伝子をはじめ、47 遺伝子に一塩基または、複数の塩基が欠失、挿入されていた。現在、これらの遺伝子の欠損株の交配能を調べ、UK 株が交配できない原因遺伝子を特定することを試みている。

### Identification of genes that involved in sexual development in *Neurospora crassa*

Wataru Yoshino, Akihiko Ichiishi

(Grad. School of Life Sciences, Toyo Univ.)

## \*P-63

### 黄麹菌 *PrtR* の窒素源応答と活性化機構の解明

沼澤里佳<sup>1</sup>, 田中優花子<sup>2</sup>, 西岡佐和子<sup>2</sup>, 辻遼太郎<sup>2</sup>, 伊藤喜之<sup>3</sup>, 田中瑞己<sup>1,2</sup>, 山形洋平<sup>1,2</sup> ( <sup>1</sup>農工大院・連農, <sup>2</sup>農工大院・応生化, <sup>3</sup>農工大・スマートコアファシリティ推進機構)

黄麹菌の有する転写因子 *PrtR* は、広範な分泌型ペプチダーゼ遺伝子の転写を環境中の窒素源に応答して制御する。そこで、*PrtR* の mRNA 量・存在量・局在と、窒素源の関係を調査した。まず、*PthiA*-GFP-*PrtR* 発現株を NaNO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>Cl, グルタミン, タンパク質のいずれかを唯一の窒素源として CD 液体培地で培養した。*PthiA* によって同程度の発現が誘導されているにも関わらず、*prtR* mRNA 量はタンパク質>NaNO<sub>3</sub>>グルタミン>NH<sub>4</sub>Cl の順に高く、核における GFP-*PrtR* の蛍光強度もこれに一致していた。さらに、*PthiA*-3×FLAG-*PrtR* 発現株を上記の培地で培養し、抗 FLAG 抗体を用いたウエスタンブロットを行った結果、NaNO<sub>3</sub> あるいはタンパク質を窒素源とした場合に目的の 80 kDa 付近に 2 本のバンドが検出された。これらの結果より、*PrtR* は窒素源にに応答して転写レベルで厳密に制御され、翻訳後は核移行してペプチダーゼ遺伝子の転写を制御していることが示唆された。一方、翻訳後修飾により *PrtR* の核移行が制御されていると考え、*PrtR* のリン酸化を調べた。アルカリフォスファターゼ処理により、上記のバンドのうち移動度の小さいバンドが移動度の大きいバンドに収束したことから、*PrtR* のリン酸化が示唆された。さらに、PMF により N 末端側のいくつかの Ser, Thr 残基がリン酸化のターゲットであることが示された。リン酸化模倣変異体とリン酸化されない変異体を用いた解析により、これらアミノ酸のリン酸化と *PrtR* の活性化・核移行について議論する。

### Nitrogen source response and activation mechanism in *Aspergillus oryzae* *PrtR*

Rika Numazawa<sup>1</sup>, Yukako Tanaka<sup>2</sup>, Sawako Nishioka<sup>2</sup>, Ryotaro Tsuji<sup>2</sup>, Yoshiyuki Itoh<sup>3</sup>, Mizuki Tanaka<sup>1,2</sup>, Youhei Yamagata<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>United Graduate School of Agricultural Science, Tokyo Univ. of Agriculture and Technology (TUAT), <sup>2</sup>Dept. of Applied Biological Science, TUAT, <sup>3</sup>Smart-Core-Facility Promotion Organization, TUAT)

## \*P-64

### アカパンカビ *rad-7*, *rad-16* 遺伝子の発現解析

呂慧, 椎崎一宏, 一石昭彦 (東洋大院・生命科学)

アカパンカビ *rad-7*, *rad-16* 遺伝子は、出芽酵母 *RAD7*, *RAD16* 遺伝子のホモログである。出芽酵母の *RAD7* と *RAD16* の遺伝子産物はヌクレオチド除去修復 (NER) において複合体を形成し、NER 初期過程である DNA 損傷認識で機能することが報告されている。我々の研究室では野生株と *Δmus-18* 株をバックグラウンドとした感受性試験により、アカパンカビ *rad-7* と *rad-16* も NER で機能していることを明らかにしてきた。また、*rad-7* と *rad-16* 遺伝子からの発現量が紫外線照射により増加することを見つけた。

アカパンカビの *rad-7* 遺伝子と *rad-16* 遺伝子は、第 5 染色体に隣り合わせに位置しており、両遺伝子の転写開始部位の間は 225 bp しかなく、転写調節領域の一部を共有していることが考えられた。野生株の *rad-7* と *rad-16* 遺伝子の発現量を調べると、両遺伝子とも紫外線照射 30~60 分後に約 30~60 倍の発現量の増加が見られた。次に、*Δrad-7* 株、*Δrad-16* 株での遺伝子発現量を野生株と比較した。その結果、紫外線照射による *rad-16* と *rad-7* 遺伝子の発現誘導が見られた。また、紫外線非照射時の発現量が増加していた。現在、薬剤や培養条件を変え、*rad-7*, *rad-16* の発現量の変化を調べている。

### Expression analysis of the *rad-7* and *rad-16* genes in *Neurospora crassa*

HUI LYU, Kazuhiro Shiizaki, Akihiko Ichiishi

(Graduate School of Life Sciences, Toyo Univ.)

## \*P-65

### 鯉節カビ *Aspergillus chevalieri* の生活環に関する遺伝子の解析

平松健太郎<sup>1</sup>, 森一樹<sup>2</sup>, 門岡千尋<sup>3</sup>, 奥津果優<sup>1</sup>, 吉崎由美子<sup>1</sup>, 高峯和則<sup>1</sup>, 田代康介<sup>2</sup>, 玉置尚徳<sup>1</sup>, 二神泰基<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>鹿兒島大院・農林水産, <sup>2</sup>九大院・農, <sup>3</sup>崇城大・生物生命)

先行研究において本枯節の菌叢が解析され、好乾性糸状菌 *Aspergillus chevalieri* が優占種として分離された。分離された *A. chevalieri* にはコロニーの見た目が異なる 2 タイプの菌株が存在しており、その孢子形成器官の形態から子嚢胞子を形成する有性世代株と分生子を形成する無性世代株であると考えられた。無性世代株は有性世代株が有性生殖の能力を失ったことで出現したのではないかと推測し、本研究では有性世代株と無性世代株のゲノムとトランスクリプトームを比較し、それらの生活環の違いに関与する遺伝子を探索した。

まず、有性世代株の染色体レベルのゲノム情報を取得し、これに無性世代株のショートリードをマッピングすることで無性世代株における変異を見出した。その中でも破壊的な変異が示唆された遺伝子 (*ACHE\_40145A*, *ACHE\_40420A*, *ACHE\_50514S*, *ACHE\_70660A*) を生活環に関与する候補遺伝子とした。次に、有性世代株において候補遺伝子の破壊、あるいは無性世代株において正常遺伝子の相補を行ったが、いずれも生活環の変化は観察されなかった。そこで、無性世代株において染色体レベルのゲノム情報を取得し、より詳細な比較ゲノム解析を進めている。また、その過程で取得した有性世代株と無性世代株の RNA-seq のデータを用いて比較トランスクリプトーム解析を行った結果、無性世代株において *fluG* の発現が有性世代株の約 1/16 程度まで減少していることが示唆された。現在、発現変動のあった既知の生活環関連遺伝子について破壊株を取得し、表現型の観察を行っている。

### Analysis of the genes involved in life cycle in the katsuobushi fungus *Aspergillus chevalieri*

Kentaro Hiramatsu<sup>1</sup>, Kazuki Mori<sup>2</sup>, Chihiro Kadooka<sup>3</sup>, Kayu Okutsu<sup>1</sup>, Yumiko Yoshizaki<sup>1</sup>, Kazunori Takamine<sup>1</sup>, Kosuke Tashiro<sup>2</sup>, Hisanori Tamaki<sup>1</sup>, Taiki Futagami<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Kagoshima Univ., <sup>2</sup>Kyushu Univ., <sup>3</sup>Sojo Univ.)

## \*P-66

### 一酸化窒素特異的な転写誘導を担う *Aspergillus nidulans* の転写因子の発見

天久まどか, 榊尾俊介, 高谷直樹 (筑波大・生命環境・MiCS)

一酸化窒素 (NO) は様々な細胞成分と反応し、強い細胞毒性を示す。真菌は NO に対する耐性機構を有するが、その詳細は未解明である。我々はこれまでに、*Aspergillus nidulans* が NO により特異的に発現誘導される cytochrome P450 (P450) である CYP540A2 が NO 耐性に関与することを見出した。P450, 推定転写因子 (TF), 電子伝達タンパク質, 推定脂肪酸分解酵素の共通した 4 遺伝子からなる遺伝子クラスターは、*A. nidulans* のゲノム上に 2 つ存在し、これらの遺伝子は NO 存在下で転写量が増加した。この転写は、CYP540A2 の推定 TF である AN8918 の遺伝子破壊株 ( $\Delta$ AN8918 株) で抑制され、もう一方のクラスターの推定 TF である AN3863 遺伝子破壊株 ( $\Delta$ AN3863 株) で活性化された。これらの遺伝子破壊株は、野生株と比べて生育の NO 耐性が低下した。また、CYP540A2 のプロモーターの下流で *uidA* を発現させた株では、NO 存在下で  $\beta$ -glucuronidase 活性が 50 倍上昇した。 $\Delta$ AN8918 株はこの活性を発現しなかったことから、AN8918 が NO 存在下での CYP540A2 の発現を誘導することが示された。上記の遺伝子クラスターは、*Aspergillus* 属、*Penicillium* 属等の糸状菌に保存されていた。*A. oryzae* の多くは TF 遺伝子をクラスター内に持たなかったが、脂肪酸高生産株である *A. oryzae* BCC7051 株は唯一クラスター内に TF を有していた。様々な脂肪酸を含む培地上での生育を比較した結果、C9~C12 の飽和脂肪酸を含む培地では野生株と  $\Delta$ AN8918 株は大幅に、 $\Delta$ AN3863 株は中程度に生育が抑制され、二重遺伝子破壊株は抑制されなかった。また、この培地に NO を加えると生育の差は見られなくなった。以上の結果から、AN8918 が NO に応答して本クラスター内の遺伝子の転写を活性化すること、AN3863 は AN8918 と拮抗した機能を有しており両者が異なる役割を持つことが示唆された。

### Discovery of a transcription factor in *Aspergillus nidulans* that induces nitric oxide specific transcription.

Madoka Amahsia, Shunsuke Masuo, Naoki Takaya

(Fac. Life & Env. Sci./ MiCS, Univ. of Tsukuba)

## P-67

### 担子菌ヒラタケの高セルロース分解活性変異株における原因遺伝子 *roc1* の同定

中沢威人, 本田与一 (京大院・農)

担子菌に属する白色腐朽菌は、木材中の全ての主要成分(リグニンおよび多糖)を単独で分解できる。しかし、多様な分解酵素遺伝子群の発現調節機構は、あまり解明が進んでいない。本研究では、セルロースの分解制御に重要な遺伝子を同定する目的で、ヒラタケを用いた順遺伝学研究を行った。野生モノカリオン株 PC9 からプロトプラストを調製し、致死率が約 90%になるように UV を照射することで変異を誘発した。UV 照射後に再生した株を、それぞれ 0.1% (w/w) AZCL-HE-Cellulose を含む YMG (0.4%酵母エキス・1%麦芽・0.4%グルコース) 寒天培地で培養した。AZCL-HE-Cellulose の分解が進むと、培地が青色を呈する。このスクリーニングの結果、PC9 株と比較して強く呈色する変異株を 1 株分離し、AZp1 株と名付けた。この変異株と野生モノカリオン株 PC15 を交配したダイカリオン株は、この変異表現型を示さなかったため、劣性的に遺伝することが示唆された。F<sub>1</sub> 子孫集団より、野生型 7 株及び変異表現型 4 株をランダムに選び、Nakazawa *et al.* (2017) *Environ. Microbiol.* で考案した簡易連鎖解析を行ったところ、組換え価 0 で連鎖するマーカーを同定した。続いて、ゲノムリシーケンスを行い、このマーカー付近に存在する変異を検索した。すると、Marian *et al.* (2022) *mBio* において担子菌スエヒロタケで報告された、真正担子菌に特異的な DNA 結合性転写因子 Roc1 相当のタンパク質をコードする遺伝子において、転写終結点から 3' 下流約 300 bp に一塩基変異が存在した。そこで、PC9 由来の *roc1* 正常遺伝子の PCR 増幅産物を、AZp1 株に導入したところ、27 株のカルボキシン耐性形質転換体のうち 14 株で変異表現型が消失した。また、AZp1 を 1.3%小麦ふすま添加の脱脂ブナ木粉培地で培養すると、菌体外セルロース分解酵素活性が、親株と比較して 10~100 倍程度高かった。以上の結果より、AZp1 における高セルロース分解活性の原因変異遺伝子は *roc1* であることが示唆された。

### A mutation in *Pleurotus ostreatus roc1* is responsible for high production of cellulose-degrading enzymes

Takehito Nakazawa, Yoichi Honda

(Grad. Sch. of Agr., Kyoto Univ.)

## P-68

### ウシグソヒトヨタケ *Coprinopsis cinerea* がもつ光受容体の特性

伏見圭司<sup>1</sup>, 深澤茉愛<sup>2</sup>, 星野宏季<sup>2</sup>, 村口元<sup>3</sup>, 坂本裕一<sup>4</sup>, 成川礼<sup>2</sup> ( <sup>1</sup>神戸大・イノベ, <sup>2</sup>都立大・理学, <sup>3</sup>秋田県大・生物資源, <sup>4</sup>岩手生工研・生物資源)

光は生物の生存に重要な要素の 1 つである。生物は光受容体の働きによって光の色(波長)や量(強度)を感知することができ、特定の光を感知することが生命現象を制御する分子機構の引き金となる。光受容体の遺伝子は藍藻や植物等の光合成生物だけでなく細菌や真菌類等の非光合成生物にまで広く存在することが知られている。

キノコは孢子、菌糸体、子実体(いわゆるキノコ)の形態を繰り返す生活環をもち、子実体の形成には光が必須とされている。キノコには短波長光感知型と長波長光感知型の光受容体が存在し、遺伝学的な研究によって青色光が子実体形成に重要であることが知られている。しかし、キノコの光受容体の分子機能は確認されておらず、決定的な分化誘導制御分子は未だ特定されていない。本研究ではキノコの光受容体の特性を明らかにし、子実体形成の謎を紐解くための糸口を掴むことを目的とした。

モデルキノコのウシグソヒトヨタケ・一核性子実体形成株(#326 株)のゲノム情報から短波長光感知型(CcDst-1, CcDst-2, CcWC-2)と長波長光感知型(CcFphA)の光受容体の配列情報を取得し、これらを基に設計した合成遺伝子を大腸菌発現用ベクターに導入した。現在、これらの異種発現、精製を行い、生化学的解析を進めている。また、*in silico* 解析を行い、#326 株の菌体内における光受容体の動態を考察した。

### Characterization of photoreceptors conserved in *Coprinopsis cinerea*

Keiji Fushimi<sup>1</sup>, Mana Fukazawa<sup>2</sup>, Hiroki Hoshino<sup>2</sup>, Hajime Muraguchi<sup>3</sup>, Yuichi Sakamoto<sup>4</sup>, Rei Narikawa<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Kobe Univ., <sup>2</sup>Tokyo Metropolitan Univ., <sup>3</sup>Akita Pref. Univ., <sup>4</sup>IBRC)

## P-69

### *Aspergillus* 糸状菌におけるアミラーゼ遺伝子発現を誘導する糖アナログの効果

沼本穂<sup>1</sup>, 森山貴博<sup>2</sup>, 田邊理子<sup>2</sup>, 寄立麻琴<sup>2</sup>, 平井剛<sup>2</sup>, 加藤直樹<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>摂南大・農, <sup>2</sup>九大院・薬)

*Aspergillus* 属糸状菌におけるアミラーゼはデンプンの分解過程で生産されるイソマルトースにより生産誘導される。アミラーゼ遺伝子群の転写活性化因子である AmyR は通常は細胞質に局在しているが、イソマルトースの刺激を受けて核に移行し、転写を活性化する。モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* では、マルトースからイソマルトースへの糖転移は細胞外で行われ、細胞外のイソマルトースを感知することでアミラーゼ遺伝子の発現が誘導される。一方、麹菌 *Aspergillus oryzae* では、デンプン分解によって生産されるマルトースは、トランスポーターMalP によって取り込まれ、転写因子 MalR の活性化を介して *malP* およびマルターゼ遺伝子 *malT* の発現を誘導する。細胞内に取り込まれたマルトースは MalT の糖転移活性によってイソマルトースに変換され、細胞内のイソマルトースがアミラーゼ遺伝子の発現を誘導する。我々は、誘導物質依存的な転写因子の活性化を制御する分子メカニズムを解明するため、代謝されない糖アナログを合成し、その有効性について検討してきた。これまでイソマルトースのグリコシド結合を C-グリコシド結合に変えたイソマルトースアナログ (CH<sub>2</sub>-IM) が、*A. nidulans* において持続したアミラーゼ生産を誘導する優れた誘導物質として機能することを見出した。今回は、さらに高い誘導活性をもつアナログの取得を目指していくつかのイソマルトースアナログを新たに合成し、*A. nidulans* および *A. oryzae* におけるアミラーゼ生産誘導能の評価を行ったので、それらの結果について報告する。

### Effect of sugar analogues on induction of amylase gene expression in *Aspergillus* fungi

Minori Numamoto<sup>1</sup>, Takahiro Moriyama<sup>2</sup>, Riko Tanabe<sup>2</sup>, Makoto Yoritate<sup>2</sup>, Go Hirai<sup>2</sup>, Naoki Kato<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Fac. of Agric., Setsunan Univ., <sup>2</sup>Grad. School of Pharm. Sci., Kyushu Univ.)

## P-70

### Pan-genome analyses to elucidate genomic diversity and evolution of *Aspergillus oryzae*

Sharon Marie Bahena-Garrido<sup>1</sup>, Masahiro Ezaki<sup>2</sup>, Akito Nishizawa<sup>2</sup>, Yuko Komatsu<sup>1</sup>, Ryouyuke Kataoka<sup>1</sup>, Kazuhiro

Iwashita<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>NRIB, <sup>2</sup>GeneBay, Inc.)

A comprehensive study of the *A. oryzae* genomic diversity and evolution has been limited and how this contributes to the differences of *A. oryzae* characteristics on fermentation, such as enzymes and flavor production remains unclear. Recently, we performed a pan-genome approach employing a huge historical *A. oryzae* isolates within Japan including those collected overseas and publicly available sequences. We assembled a total of 218 *A. oryzae* genomes, performed OrthoFinder analysis and constructed a high-resolution *A. oryzae* phylogenomic tree based on the 8,806 single copy core genes (SCGs)<sup>1)</sup> that led to the development of known and new clades. In this study, with pan-genome approach, we combined genome wide-SNPs and short indels analysis to obtain a more comprehensive genomic diversity and further investigated its implication in fermentation-related traits of *A. oryzae*. We further linked the high-resolution *A. oryzae* phylogeny to isolation sources, geographic location, mating-type, aflatoxin gene cluster and other genomic features. We also analyzed clade-specific and copy number variations, including presence/absence of genes across clades, in fermentation-related and InterPro-annotated (i.e. coding for protein kinase, glycoside hydrolase) genes. From SNP and short indel analysis, we identified about 821,960 variants in all *A. oryzae* isolates compared to RIB40 (*in-house high quality*). While most of the variation had modifier effects only, there were variants with high impact due to nonsense and frameshift mutations in core and accessory genome. Furthermore, these mutations were frequently found in the intra-chromosomal and sub-telomeric regions. With these, *A. oryzae* pan-genome analyses reveal a more comprehensive genomic variation across clades that will lead us to deeply understand the evolution and adaptation of *A. oryzae* to respective fermentation conditions and its link to their genotype.

#### Reference:

<sup>1)</sup> Bahena-Garrido SM, Ezaki M, Nishizawa A, Komatsu Y, Kataoka R and Iwashita K. Pan-genome study among *Aspergillus oryzae* species, its clade evolution and genomic variation. [Conference presentation]. *The Japan Society for Bioscience, Biotechnology and Agrochemistry*, March 14-17, 2023.

## P-71

### 高発現による生育阻害を利用したスクリーニング法の XlnR 機能制御因子探索への適用

五味勝也, 新谷智子 (東北大・院農)

コウジカビが生産するアミラーゼやキシラナーゼなどの多糖類分解酵素の誘導生産には AmyR や XlnR などの転写因子が関与している一方で、これらの転写因子の機能制御に関与する補因子群は未解明である。そこで、はじめに AmyR の機能制御に関わる未知因子探索のためのスクリーニング系を考案したり。麴菌  $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子プロモーターの下流に分生子形成の開始を司る転写因子遺伝子 *brlA* を連結した高発現カセットを *Aspergillus nidulans* に導入し、イソマルトース存在下で生育抑制された株を作製した。変異処理せずにイソマルトース存在下で生育が回復した株を単離し、次世代シーケンスによって変異遺伝子の特定した結果、AmyR の転写活性化に関わるイソマルトースセンサー/輸送体と考えられる新規膜タンパク質遺伝子が見出された<sup>2,3)</sup>。この手法は誘導・非誘導条件が明らかになっていればどのような系にも適用可能なことから、本研究ではキシラナーゼ遺伝子の発現に関わる未知制御因子の探索に適用できるか調べた。

*A. nidulans* WG355 を宿主に、*brlA* 遺伝子をキシロースで誘導発現するキシラナーゼ遺伝子 *xlnC*<sup>4)</sup> のプロモーターに連結したカセットを 2 コピー、さらに転写因子 XlnR の遺伝子を追加導入した。この株をキシロース単一炭素源培地で培養したところ、*amyB* プロモーターによる *brlA* 高発現カセット導入株のイソマルトース培地における生育に比べて程度は低いものの顕著な生育阻害が認められた。現在この株を用いてキシロース培地で生育が回復した株の取得を試みている。

1) 五味ら, 2023 年度日本農芸化学会大会, 3B04-11, 2) Jeong ら, 第 75 回日本生物工学会大会, 1Jp15, 3) Jeong ら, 本コンファレンス, 4) Ballmann et al., *Microb. Cell Fact.*, **18**, 193 (2019).

### Application of the screening procedure based on growth defect due to high expression to isolate unidentified genes involved in XlnR activation

Katsuya Gomi, Tomoko Shintani

(Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ.)

## \*P-72

### 糸状菌間相互作用に関与する糸状菌の揮発性化合物 (fVOC) の探索

中村洗<sup>1</sup>, 浦山俊一<sup>1,2</sup>, 萩原大祐<sup>1,2</sup> (1 筑波大・生命環境, 2 筑波大・MiCS)

植物や細菌, 菌類は多種多様な揮発性化合物 (volatile organic compound ; VOC) を生産する。VOC は、同種間や異種間において、受け手の生育等に影響を与えることが報告されており、自然界における競争や協働といった生物間相互作用に用いられていると考えられている。しかし、植物や細菌が生産する VOC と比較し、糸状菌が産生する揮発性化合物 (fungal volatile organic compound ; fVOC) は、探索例が少ないことに加え、相互作用解析の事例も少なく、その機能について未解明な部分が多い。そこで本研究では、特に糸状菌間の相互作用に寄与する fVOC を探索し、生理的および生態的な機能の解明を目指す。

まず、fVOC 解析を効率良く行うことができるスクリーニング方法を検討した。先行研究では、9 cm dish を用いた double dish set method (DDS 法) がよく用いられているが、多量検体をスクリーニングする方法としては効率性に欠ける。そこで本研究では、同時に 6 菌種を植菌することができる 6 well plate を用いた DDS 法 (6well DDS 法) を確立しスクリーニングに用いた。6well DDS 法により、PDA 培地上で 10 菌種を用いた相互作用のスクリーニングを行った結果、*Trichoderma reesei* と対峙した場合、*Aspergillus fumigatus*, *Penicillium expansum* など複数の菌種で菌糸成長が抑制された。また *Magnaporthe oryzae* と対峙した場合に *Fusarium graminearum* の菌糸成長が促進された。これらの結果は 9 cm dish を用いた DDS 法においても確認することができ、fVOC を介した糸状菌間の相互作用が示唆された。今後、PDA 以外の培地を使用した探索を続けると共に、GCMS により *T. reesei* や *M. oryzae* が産生する fVOC を明らかにすることで、fVOC を介した糸状菌間の生育抑制、成長促進のメカニズム解明を目指す。

### Exploring fungal volatile organic compounds related to fungal-fungal interactions

Kou Nakamura<sup>1</sup>, Shun-ichi Urayama<sup>1,2</sup>, Daisuke Hagiwara<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>Fac. of Life and Env. Sci., Univ. of Tsukuba, <sup>2</sup>MiCS, Univ. of Tsukuba)

## \*P-73

### 分散型麴菌の酵素高生産メカニズム解明に向けた菌糸先端のミトコンドリア分布解析

鈴木智大<sup>1</sup>, 松本琴音<sup>1</sup>, 若井暁<sup>2,3</sup>, 近藤昭彦<sup>2</sup>, 荻野千秋<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>神戸大院・工, <sup>2</sup>神戸大院・イノベ, <sup>3</sup>海洋機構)

麴菌は、液体培養において菌糸が絡まることで菌糸塊を形成する。この菌糸塊の形態制御が難しく、物質生産能の低下を招くため麴菌の産業利用は限られていた。先行研究により、菌糸塊形成に関わる菌糸接着因子を破壊した分散型麴菌が構築され、酵素生産性の向上が報告されている。加えて分散型麴菌では、従来型麴菌より菌体増殖量が多く、糖代謝フラックスがスムーズになっており、菌体重量当たりの酸素消費量も大きいことが明らかになっている。一方で、菌糸形態の変化と酵素高生産性の関係が明らかにできていない。したがって、本研究では、高い呼吸活性および TCA 回路のスムーズな代謝から、ミトコンドリアに着目して従来型麴菌と分散型麴菌の細胞内小器官分布を比較した。赤色蛍光タンパク質 mCherry の N 末端にクエン酸合成酵素 *Aocit1* のミトコンドリア局在シグナルを融合して従来型株と分散型株の双方に発現させた。これを 3%GPY 培地で 24 時間培養して菌糸を採取後、蛍光顕微鏡を用いて菌糸先端の細胞を観察した。加えて、局在の確認のために、生細胞用蛍光プローブ (Mito-Tracker) を用いた染色による観察も行った。生細胞用蛍光プローブを用いた観察およびミトコンドリア局在 mCherry を発現させた分散型株の観察の双方において、球状のシグナルが多数観察された。また、同様に実施した従来型株では、球状のシグナルは観察されたが分散型株と比較すると少なかった。以上の結果より、分散型株の菌糸先端においてミトコンドリアが発達していることが確認された。これは、分散型麴菌が従来型より高い呼吸活性を持つ特徴と一致する。分散型麴菌の発達したミトコンドリアは、高いタンパク質生産に必要な活発なエネルギー代謝に貢献していると考えられ、この特性はタンパク質生産以外の物質生産においても有用であると予想される。

#### Mitochondrial distribution analysis of mycelial tips in hyphae dispersed type of *A. oryzae*

Tomohiro Suzuki<sup>1</sup>, Kotone Matsumoto<sup>1</sup>, Satoshi Wakai<sup>2,3</sup>, Akihiko Kondo<sup>2</sup>, Chiaki Ogino<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Kobe Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., <sup>3</sup>JAMSTEC)

## \*P-74 (O-7)

### *Phanerochaete chrysosporium* におけるヘムによる解糖系、TCA 回路の制御機構の解明

釣上竜河<sup>1</sup>, 三浦大典<sup>2</sup>, 加藤雅士<sup>1</sup>, 志水元亨<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>名城大・農, <sup>2</sup>産総研・バイオメディカル研究部門)

白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* はリグニン分解酵素であるリグニンペルオキシダーゼやマンガンペルオキシダーゼ、多様なシトクロム P450 といったヘムタンパク質を細胞外に大量に生産することが知られており、非常に優れたヘムおよびヘムタンパク質の合成能を有している。しかし、ヘム自身は光増感作用を有し強い細胞毒性を持つ化合物である。そのため、*P. chrysosporium* を含むいくつかの担子菌はヘムの毒性に対処する独自のヘム管理・高度利用機構を有すると考えられる。リグニンフラグメントであるバニリンを含む培地で *P. chrysosporium* を培養後、無細胞抽出液中のヘム結合性タンパク質をアフィニティー精製により網羅的に解析した結果、クエン酸シンターゼ (CS)、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) が同定された。CS と GAPDH を異種発現させ、ヘミンを加えてアッセイすると酵素活性が阻害された。さらに、紫外可視分光法とラマン分光法で得られたスペクトルから、CS の His 残基がヘムと直接結合することが示された。以上の結果から、*P. chrysosporium* は、遊離のヘムと CS 及び GAPDH が直接相互作用することで、解糖系及び TCA 回路のカーボンフラックスを制御し、ヘムの合成を抑制するダイナミックなヘム管理機構を有していることを明らかにした。

#### Pathway Crosstalk between the Central Metabolic and Heme Biosynthetic Pathways in the Basidiomycete

#### *Phanerochaete chrysosporium*

Ryoga Tsurigami<sup>1</sup>, Daisuke Miura<sup>2</sup>, Masashi Kato<sup>1</sup>, Motoyuki Shimizu<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Fac. of Agri., Univ. of Meijo, <sup>2</sup>Biomedical Dept., AIST)

## \*P-75

### 糸状菌由来新規ステロールアミノ酸誘導体の機能解析および相互作用タンパク質の探索

今井誠<sup>1</sup>, 横川大祐<sup>1</sup>, 立松俊祐<sup>1</sup>, 佐賀裕亮<sup>1</sup>, Frédéric Fischer<sup>2</sup>, Hubert D. Becker<sup>2</sup>, 久城哲夫<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>明治大・院農・農芸化学, <sup>2</sup>ストラスブール大)

アミノアシル tRNA 合成酵素は、20 種類の標準アミノ酸を対応する tRNA に結合させるアミノアシル化反応を触媒するタンパク質合成に必須の酵素である。近年、哺乳類を中心にタンパク質合成とは関係のない二次機能が多数報告されている。当研究室では糸状菌由来アスパルチル tRNA 合成酵素 (AspRS) の C 末端側に機能未知のドメイン (DUF2156) が付加した遺伝子 (*erdS*) を見出した。本酵素 (ErdS) は、エルゴステロールにアスパラギン酸を転移させ 1-ergosteryl-L-aspartate (Erg-Asp) を生成することが明らかとなった (Yakovov, *et al.*, *PNAS*, 2020)。この酵素は *Aspergillus* 属糸状菌だけでなく、真菌に幅広く保存されていた。このようなステロールアミノ酸誘導体は全生物を通して初めての発見であり、その生理作用は不明である。麹菌 *A. oryzae* において、Erg-Asp 無添加の培地で生育させた条件と比較し、0.1 mM の Erg-Asp を添加した培地で生育させた場合、分生子の形成量が 40%増加した。一方で、モデル糸状菌である *A. nidulans* においては 0.1 mM の Erg-Asp を添加した培地で生育させた場合、Erg-Asp 無添加の培地で生育させたものと比較し分生子の形成量が 37%減少した。これにより、Erg-Asp は分生子形成に影響を及ぼすことが示唆された。また、Erg-Asp をセファロースビーズと結合させた担体を合成し、アフィニティークロマトグラフィーを試みた。*A. oryzae* から得たタンパク質画分をカラムに添加し溶出したところ、30 kDa 付近に溶出画分にのみ見られるバンドが得られた。現在、このバンドのゲルからの切り出しを行い質量分析によるタンパク質の同定を試みている。

#### Physiological analysis and search for interacting proteins of novel aminoacylated sterols in filamentous fungi.

Makoto Imai<sup>1</sup>, Daisuke Yokokawa<sup>1</sup>, Shunsuke Tataematsu<sup>1</sup>, Yusuke Saga<sup>1</sup>, Frédéric Fischer<sup>2</sup>, Hubert D. Becker<sup>2</sup>, Tetsuo Kushiro<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Dept. of Agri. Chem., Sch. of Agri. Univ. of Meiji, <sup>2</sup>Univ. of Strasbourg)

## \*P-76

### 糸状菌由来新規エルゴステロールアミノ酸誘導体の生理機能解析

横川大祐<sup>1</sup>, 佐賀裕亮<sup>1</sup>, Frédéric Fischer<sup>2</sup>, Hubert D. Becker<sup>2</sup>, 久城哲夫<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>明治大・院農・農芸化学, <sup>2</sup>ストラスブール大)

アミノアシル tRNA 合成酵素 (aaRS) は、アミノ酸を対応する tRNA に結合させるアミノアシル化反応を触媒するタンパク質合成に必須の酵素である。近年、哺乳類を中心にタンパク質合成とは関係のない二次機能の存在が明らかとなってきた。そこで我々は、aaRS の二次機能の報告がほとんどない糸状菌を対象に、糸状菌特異的なドメインを有する aaRS 遺伝子の探索を行ったところ、*Aspergillus* 属糸状菌のアスパルチル tRNA 合成酵素の C 末端側に機能未知のドメイン (DUF2156) の付随した遺伝子 *erdS* を発見した。本酵素 (ErdS) は、エルゴステロールにアスパラギン酸を転移させ 1-ergosteryl-L-aspartate (Erg-Asp) を生成することを明らかにした (Yakovov, *et al.*, *PNAS*, 2020)。さらに、Erg-Asp の特異的な加水分解酵素 ErdH も発見した。また、DUF2156 ドメインのみで構成される遺伝子 *ergS* も見出し、ErgS はエルゴステロールにグリシンを転移させ 1-ergosteryl-glycine (Erg-Gly) を生成することを明らかにした (Yakovov, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2022)。これらの酵素は *Aspergillus* 属糸状菌だけでなく、真菌に幅広く保存されていた。このようなステロールのアミノ酸誘導体は全生物を通して初めての発見である。その生理機能を探るべく、麹菌 *A. oryzae* を用いて *erdS* 破壊株および *ergS* 破壊株を作製し、表現型観察を行った。その結果、*erdS* 破壊株および *ergS* 破壊株では野生株と比較して分生子の形成量がそれぞれ 20%, 50%まで減少し、糸状菌の防御組織である菌核の形成が促進された。また、メラニンと思われる色素の培地への蓄積も見られた。分生子および菌核形成に関連する遺伝子の発現量解析を行ったところ、分生子形成に必須な *brlA* などの遺伝子の発現量の低下が確認された。

#### Physiological analysis of novel aminoacylated sterols in filamentous fungi

Daisuke Yokokawa<sup>1</sup>, Yusuke Saga<sup>1</sup>, Frédéric Fischer<sup>2</sup>, Hubert D. Becker<sup>2</sup>, Tetsuo Kushiro<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Dept. of Agri. Chem., Sch. of Agri. Univ. of Meiji, <sup>2</sup>Univ. of Strasbourg)

## \*P-77

### 微生物菌叢との共培養特異的な白麹菌の二次代謝物質生産能

前田空<sup>1</sup>, 永野幸生<sup>2</sup>, Myat Htoo San<sup>2</sup>, 二神泰基<sup>3</sup>, 小林元太<sup>1</sup>, 後藤正利<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>佐賀大院・農, <sup>2</sup>総合分析センター, <sup>3</sup>鹿児島大院・農林水産)

【目的】焼酎醸造に広く利用される白麹菌 *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii* は、75 の推定二次代謝物生合成遺伝子クラスターを持つと推定されるが、それらの機能についての報告は少ない。自然界で、微生物は常に他の微生物と共存し、微生物同士の共培養では、共培養特異的な代謝活性が報告されている。本研究は、白麹菌の二次代謝能に着目し、他の微生物と共培養を行うことにより白麹菌が特異的に二次代謝を変化させるのかという点に加え、その場合の関与遺伝子や起因する他微生物について明らかにすることを目的とした。

【方法及び結果】白麹菌を PD 液体培地にて先に 2 日間、30°C、160rpm の条件で振盪培養後、別途純粋培養した微生物生菌体を接種し、共培養を開始した。引き続き 30°C、160rpm の条件で 7 日間共培養を行った後、その培養液を遠心・濾過し、ODS カラムを備えた逆相 HPLC に供与して、代謝物分析を行った。まず、乳酸菌や酵母を用いて白麹菌との共培養実験を行ったが、共培養特異的な HPLC ピークは見られなかった。そこで、研究室保有の純粋分離菌ではなく、土壌サンプル由来の微生物菌叢による共培養実験を行った。佐賀県内計 50 地点から土壌サンプルを採取し、細菌増殖用ブイヨン培地で生育した微生物菌叢を用いて白麹菌との共培養を行った。その結果、50 サンプル中、5 つの土壌サンプル由来の微生物叢と白麹菌との共培養において、HPLC で特異的なピークがそれぞれ検出された。複数ピークが検出された組み合わせもあり、その中には疎水性が強く二次代謝物と推定されるピークも存在した。以上の結果から、白麹菌は微生物菌叢と共培養することで白麹菌の二次代謝物と推定される物質を特異的に生産することが示唆された。

### Search for secondary metabolites produced specifically by *Aspergillus kawachii* in coculture with microbial flora

Sora Maeda<sup>1</sup>, Yukio Nagano<sup>2</sup>, Myat Htoo San<sup>1</sup>, Taiki Futagami<sup>3</sup>, Genta Kobayashi<sup>1</sup>, Masatoshi Goto<sup>1</sup>

(Grad. Sch. Agri.<sup>1</sup>, Anal. Res. Cen.<sup>2</sup>, Saga Univ., Grad. Sch. Agri. Forest. Fish., Kagoshima Univ.<sup>3</sup>)

## \*P-78

### 紅麹菌 *Monascus pilosus* の生物機能活性を示す新規二次代謝産物の探索と同定

古瀬結萌<sup>1</sup>, 川添嘉徳<sup>2</sup>, 小林元太<sup>1</sup>, 後藤正利<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>佐賀大院・農, <sup>2</sup>先進健康)

【目的】紅麹菌は、モノコリン K や紅麹色素等多様な二次代謝産物を生産する特徴がある。しかし、紅麹菌の新規二次代謝産物の発見に関する報告は少なく、未同定の生物機能活性を示す二次代謝産物が存在すると考えられる。そこで本研究では、一般的な米麹ではなく培養事例の少ない大麦麹において紅麹菌が特異的に生産するヒトの健康改善に役立つ新規二次代謝産物の探索と同定を行うことを目的とした。

【方法および結果】紅麹菌 *Monascus pilosus* NBRC4520 を大麦 (ニシノホシ) に接種して 30°C で 10 日間培養した。得られた紅麹を破碎し、70% エタノールで抽出して、粗抽出液を得た。粗抽出液を、水溶性画分、脂質画分、有機層画分の 3 つに分画し、3 つの画分について ACE 阻害活性 (AI)、HeLa 細胞増殖阻害活性 (HI)、グルコース取り込み活性 (GU)、lipase 阻害活性 (LI)、抗炎症活性の 5 つの活性を評価した。その結果、AI、HI、GU、LI の 4 つで活性があり、特に有機層画分で強い HI が認められた。そこで、HI に注目して活性物質の精製を進めた。HI 活性の強かった有機層画分を ODS オープンカラムで分画したところ、60% メタノール画分に強い活性を認めた。そこでこの画分について分取 TLC によって分画と活性評価を繰り返し、活性画分の絞り込みを行った。そして、最終的に RP-HPLC で分取し、強い HI を示す化合物 2 種類の精製に成功した。以上の結果より、紅麦麹にはヒトの健康改善に関与する物質が多く含まれていることが示唆され、特に子宮頸がん細胞である HeLa 細胞の増殖を阻害する物質の活性が強いことが示唆された。

### Search and identification of secondary metabolites exhibiting biological function from of *Monascus pilosus*

Yume Kose<sup>1</sup>, Yoshinori Kawazoe<sup>2</sup>, Genta Kobayashi<sup>1</sup>, Masatoshi Goto<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Grad. Sch. Agri., <sup>2</sup>Adv. Health Sci., Saga Univ.)

## \*P-79

### 麹菌 *Aspergillus oryzae* のオートファジー欠損株におけるコウジ酸高生産の分子機構の解析

松下天斗<sup>1</sup>, 陳俊林<sup>2</sup>, 有岡学<sup>1,2</sup> ( <sup>1</sup>東大院・農生科・応生工, <sup>2</sup>東大・CRIIM)

コウジ酸は麹菌 *Aspergillus oryzae* を含むいくつかの糸状菌によってグルコースから合成される二次代謝産物である。その生合成には *kojA*, *kojR*, *kojT* の3つの遺伝子が主に関わっており、それらがクラスターを形成し、培地の栄養条件、特に窒素源の有無がその発現とコウジ酸生産量に強い影響を与えること明らかになっている。以前、当研究室で行われたマイクロアレイを解析したところ、オートファジーに必須な *Aoatg8* 遺伝子を欠損した株ではこれらコウジ酸関連遺伝子の発現が野生株と比較して大きく上昇していることがわかった。そこで本研究ではオートファジーの欠損がコウジ酸生産を促進する分子機構の解明を目指した。

コウジ酸定量の結果、 $\Delta Aoatg8$  株は野生株より多くのコウジ酸を生産し、オートファジー欠損株ではコウジ酸生産が促進されることが示された。コウジ酸生産を正に制御する転写因子である *KojR* と EGFP を融合した EGFP-*KojR* を  $\Delta kojR$  株と  $\Delta Aoatg8 \Delta kojR$  株で発現させ *KojR* の局在を調べたところ、 $\Delta Aoatg8$  株では野生株より多くの菌糸で *KojR* の核局在が観察され、 $\Delta Aoatg8$  株でのコウジ酸高生産は *KojR* の核局在化を介していると考えられた。核外移行シグナル (NES) 予測サイトで NES として予測された *KojR* 内の2つの配列に変異を加えて同様に局在を調べた結果、1つの NES 変異株で *KojR* の核局在率が上昇し、*KojR* が核外移行の制御を受ける可能性が示唆された。現在、NES 変異株のコウジ酸生産について解析を行っている。一方、マイクロアレイ解析により  $\Delta Aoatg8$  株で発現上昇の見られたコウジ酸以外の二次代謝関連遺伝子について、その制御機構もコウジ酸と比較しつつ解析する予定である。

### Analysis on the molecular mechanism of hyper production of kojic acid in autophagy-deficient mutant of *Aspergillus oryzae*

Takato Matushita<sup>1</sup>, Junlin Chen<sup>2</sup>, Manabu Arioka<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>Dept. of Biotechnol, Univ. of Tokyo; <sup>2</sup>CRIIM, UTokyo)

## \*P-80

### 麹菌のピルビン酸代謝フラックス制御が及ぼすタンパク質生産への影響

松本琴音<sup>1</sup>, 鈴木智大<sup>1</sup>, 若井暁<sup>2,3</sup>, 近藤昭彦<sup>2</sup>, 荻野千秋<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>神戸大院・工, <sup>2</sup>神戸大院・イノベ, <sup>3</sup>海洋機構)

麹菌は微生物の工業利用において、タンパク質大量生産系のプラットフォームとして期待されている。麹菌の高いタンパク質生産能を支えるためには、十分なエネルギー供給が必要である。エネルギー供給を担う糖代謝の鍵となる細胞内代謝産物としてピルビン酸が挙げられる。ピルビン酸は、解糖系の最終産物であり、TCA 回路、乳酸生産、およびエタノール生産に分岐するハブ代謝産物である。先行研究において、乳酸生産およびエタノール生産経路の欠損に加えて、TCA 回路の反応が進むミトコンドリアへのピルビン酸輸送に関するタンパク質 (MPC) 遺伝子の欠損により極めて高い乳酸生産能を得られた結果が報告されている。このことから、MPC によるピルビン酸代謝フラックス制御は麹菌での物質生産において重要な戦略と考えられる。本研究では、MPC の欠損および過剰発現によるピルビン酸代謝フラックスの制御がタンパク質の分泌生産能へ与える影響について解析した。まず、MPC を欠損させた麹菌と従来の麹菌を比較し、液体培養中での生育特性とその物質生産能を評価した。麹菌の野生株と MPC 欠損株を3%の GYP 培地で5日間液体培養した。次に、培養上清のグルコース濃度、タンパク質濃度、乾燥菌体重量を測定し、SDS-PAGE を実施した。その結果、MPC 欠損株は野生株よりもグルコース消費速度が遅く、タンパク質生産量も低いことが明らかとなった。これらの結果から、MPC 欠損は、麹菌のタンパク質生産能には負の影響を与えると言える。現在、MPC 過剰発現株の構築を進めており、今後はタンパク質生産能などへの影響を調べる予定である。

### Effect of pyruvate flux engineering on protein production in *Aspergillus oryzae*

Kotone Matsumoto<sup>1</sup>, Tomohiro Suzuki<sup>1</sup>, Satoshi Wakai<sup>2,3</sup>, Akihiko Kondo<sup>2</sup>, Chiaki Ogino<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Kobe Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., <sup>3</sup>JAMSTEC)

## \*P-81

### 糸状菌の異物代謝に関わる酵素遺伝子の同定と解析

柴田眞也<sup>1</sup>, 小泉慶明<sup>2</sup>, 長坂実咲<sup>1</sup>, 松井宏介<sup>1</sup>, 前田一行<sup>1</sup>, 中嶋佑一<sup>1</sup>, 安藤直子<sup>2</sup>, 木村真<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>名大院・生命農, <sup>2</sup>東洋大院・理工)

【目的】 トリコテセンは真核リボソームに作用して毒性を発揮するかび毒である。t-type トリコテセン生産菌である *Fusarium* では TRI101 による C-3 位アセチル化を行うことで不活性化を行い、自己耐性を獲得している。また近年、*Fusarium graminearum* (Fg) に C-3 位が酸素付加を受けていない d-type トリコテセンである trichodermol (TDmol) を添加すると C-4 位水酸基がグルコース付加された TDmol-4-glc に変換することが報告されている。これら反応は薬物代謝の第II相反応に該当するが、配糖体化に関してはその後の機構を含め詳細は明らかになっていない。そこで本研究では C-4 位配糖体化と異物代謝に関わる遺伝子の同定と解析を行い、糸状菌の異物代謝機構を解明することを目的とした。

【方法・結果】 *Tri5* を破壊した Fg JCM9873 株 (FgJΔ*Tri5*) を天然培地 YG で培養し、TDmol のフィーディング実験を行った。TDmol 添加、未添加で RNA-seq 解析を行った結果、配糖体化遺伝子 (*TGT1*) が1つ見出された。FgJΔ*Tri5* を親株に破壊株を作成し、TDmol の代謝を経時的に調べた。破壊株の培養液を LC-MS/MS で解析したところ TDmol-4-glc は検出されず、新たな代謝物として C-10 位グルタチオン抱合代謝物である TDmol-10-mercapturic acid と思われる MSMS が確認された。精製組換えタンパク質を用いた実験では、Tgt1 は UDP-glucose を基質とする糖転移酵素であることが明らかとなった。*TGT1* 発現分裂酵母を用いた TDmol 感受性試験を行った結果、*TGT1* は C-4 位水酸基を有したトリコテセンに対する耐性を付与する遺伝子であると考えられた。現在は、他の第II, III相反応に関与すると思われる遺伝子の解析を行っている。

### Identification and analysis of enzyme genes involved in xenobiotic metabolism in filamentous fungi

Masaya Shibata<sup>1</sup>, Yoshiaki Koizumi<sup>2</sup>, Misaki Nagasaka<sup>1</sup>, Kosuke Matsui<sup>1</sup>, Kazuyuki Maeda<sup>1</sup>, Yuichi Nakajima<sup>1</sup>, Naoko Ando<sup>2</sup>, Makoto Kimura<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Grad. Sch. Bioagriculture, Nagoya Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. science and engineering, Toyo Univ.)

## \*P-82 (O-5)

### 制限酵素により誘導されるゲノム再編成を利用した糸状菌休眠遺伝子活性化法の開発

天井涼太<sup>1</sup>, 森下陽平<sup>1</sup>, 河野宏光<sup>2</sup>, 尾崎太郎<sup>1</sup>, 菅原章公<sup>1</sup>, 太田邦史<sup>2</sup>, 浅井禎吾<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>東北大院・薬, <sup>2</sup>東大院・総合文化)

【目的】 糸状菌のゲノム上に存在する膨大な数の生合成遺伝子クラスター (BGC) は、ほとんどが通常の培養条件下では発現しない休眠 BGC であり、新規天然物の探索源として注目されている。それら休眠 BGC 由来の新規活性化化合物の獲得を目的として様々な二次代謝活性化法が開発されてきた。しかし、既存の手法で活性化できる休眠 BGC は一菌株当たり一割以下であり、糸状菌が保有する豊富な遺伝子資源を十分に活用するに至っていない。そのため従来法で獲得できなかった新規天然物にアクセスできる新しい手法の開発が望まれている。これまでに酵母と植物を対象として、核内への制限酵素の導入による DNA 二本鎖切断が修復される際に大規模ゲノム再編成が誘導され、多様な形質変化株が生じる事が報告された (*Nat Commun* 9, 1995 (2018))。これを糸状菌に適用すれば、位置効果による二次代謝の変化が起こると考えた。また、DNA 上に制限酵素サイトが高頻度に出現する四塩基認識の制限酵素を用いる事で多様な組換えパターンを誘導できるため、従来法より多くの形質が得られると期待した。

【方法・結果】 高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 由来の制限酵素 *taqI* 遺伝子を、*amyB* または *enoA* のプロモータの下流に組み込んだベクターを作製し、モデル糸状菌 *Aspergillus niger* に導入した。得られた形質転換株を *TaqI* の DNA 切断活性が認められる温度で継代を続けた結果、野生株と比較して菌糸生長速度や胞子形成能の低下したものなど、形質が変化した株を多数得ることに成功した。HPLC を用いた代謝分析の結果、いくつかの形質変化株で二次代謝の活性化が確認され、その二次代謝プロファイルは様々なパターンを示していた。また野生株と形質変化株の比較ゲノム解析により、制限酵素による切断に起因する DNA の欠損などの再編成が生じた事が示唆された。

### Activation of fungal cryptic biosynthetic gene clusters using genome rearrangement induced by endonuclease

Ryota Amai<sup>1</sup>, Yohei Morishita<sup>1</sup>, Hiromitsu Kono<sup>2</sup>, Taro Ozaki<sup>1</sup>, Akihiro Sugawara<sup>1</sup>, Kunihiro Ohta<sup>2</sup>, Teigo Asai<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Grad. School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku Univ., <sup>2</sup>Grad. School of Arts and Sciences, The Univ. of Tokyo)

## \*P-83

### ***Bipolaris maydis* の CRZ1 破壊による菌糸生育抑制とオフィオボリン A 過剰分泌**

藪田翔<sup>1</sup>, 尾上魁<sup>1</sup>, 辻健也<sup>1</sup>, Diana Cecilia Ruiz-Nava<sup>2</sup>, 中道隆哉<sup>1</sup>, 義本祐介<sup>1</sup>, 吉見啓<sup>1,2</sup>, 宮下正弘<sup>1</sup>, 宮川恒<sup>1</sup>, 田中千尋<sup>1,2</sup> (1京大院・農, 2京大院・地環学)

これまでの我々の先行研究から, *Bipolaris maydis* の CRZ1 破壊株 ( $\Delta crz1$ ) では菌糸生育の抑制と二次代謝産物であるオフィオボリン A (OA) の過剰分泌という現象が認められている。本研究では, 遺伝学及び化学的手法を用いて,  $\Delta crz1$  における菌糸生育抑制が OA 過剰分泌によって引き起こされることを明らかにした。初めに, OA 生合成に関与していると考えられる遺伝子を探索, 同定し, テルペン合成酵素とシトクロム P450 をそれぞれ OPH1, OPH2 と名付けた。 $\Delta crz1$  において OPH1 と OPH2 の発現量解析を行った結果, 両遺伝子の発現量は野生株に比べ有意に増加していたことから, CRZ1 破壊によって OA 生合成関連遺伝子の発現上昇が引き起こされることが示唆された。続いて,  $\Delta crz1$  において OPH1 と OPH2 をそれぞれ破壊し, CRZ1 との二重破壊株である  $\Delta crz1\Delta oph1$  と  $\Delta crz1\Delta oph2$  を作出した。LC/MS による OA 定量解析の結果,  $\Delta crz1\Delta oph1$  と  $\Delta crz1\Delta oph2$  では OA が未検出であったことから, OPH1 及び OPH2 は共に OA 生合成に必須であることが示唆された。さらに,  $\Delta crz1\Delta oph1$  と  $\Delta crz1\Delta oph2$  の形態観察を行ったところ, 両株共に野生株と同等の菌糸生育に回復していた。以上から, CRZ1 の破壊によって OA 合成関連遺伝子の発現が上昇し, OA が過剰分泌されることで *B. maydis* 自らの菌糸生育が抑制されることが強く示唆された。

### **Mycelial growth inhibition and ophiobolin A over-secretion after CRZ1 disruption in *Bipolaris maydis***

Kakeru Yabuta<sup>1</sup>, Kai Onoe<sup>1</sup>, Kenya Tsuji<sup>1</sup>, Diana Cecilia Ruiz-Nava<sup>2</sup>, Ryusuke Nakamichi<sup>1</sup>, Yusuke Yoshimoto<sup>1</sup>, Akira Yoshimi<sup>1,2</sup>, Masahiro Miyashita<sup>1</sup>, Hisashi Miyagawa<sup>1</sup>, Chihiro Tanaka<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Glob. Env. Stud., Kyoto Univ.)

## \*P-84

### ***Trichoderma harzianum* THIF08 株による気体状硫化カルボニルを利用した硫黄同化**

飯塚瑠翔<sup>1</sup>, 服部祥平<sup>2</sup>, 大津巖生<sup>3</sup>, 片山葉子<sup>4</sup>, 吉田誠<sup>1</sup> (1農工大院・農, 2南京大, 3筑波大院・生命環境, 4東文研)

糸状菌は高い硫黄同化能力を有し, 無機や有機といった多様な形態の硫黄化合物を硫黄源として利用することができるが, これまでの知見は主に水溶性の硫黄化合物に関するものに限られている。一方で, 硫化カルボニル (COS) は大気中に最も豊富に存在する気体状の硫黄分子であり, 対流圏に約 500 pptv の濃度で普遍的に存在する。近年, いくつかの細菌や糸状菌が気体状 COS を分解する能力を有することが報告されているものの, それらの微生物が COS を分解する生理学的な意義について明らかにされていない。そこで本研究では, 糸状菌には気体状 COS を分解するだけでなく, 硫黄源として取り込んで利用する同化プロセスが存在するのではないかと仮説を立てた。この仮説を立証するために土壌から分離した COS 高分解性の糸状菌 *Trichoderma harzianum* THIF08 株を対象に以下の実験を行なった。

COS を唯一の硫黄源とした生育実験の結果, 本菌が気体状 COS を硫黄源として生育できることが示された。さらに, 同異体 <sup>34</sup>S で標識した <sup>34</sup>S-COS を硫黄源とした代謝物解析の結果, COS 由来の硫黄原子が細胞内代謝産物に取り込まれていることが確認された。また, 培地から分離した菌体の COS 分解活性を測定した結果, 気体状 COS が細胞内に直接取り込まれたことが示された。さらに, COS 加水分解酵素 (COSase) 遺伝子を導入した組換え大腸菌の生育実験の結果, COSase がこの硫黄同化に関与していることを示された。そして, 硫黄のメタボローム解析の結果, COS の同化は効率的な硫黄獲得経路である可能性が示唆された。

### **Sulfur assimilation using gaseous carbonyl sulfide by *Trichoderma harzianum* strain THIF08**

Ryuka Iizuka<sup>1</sup>, Shohei Hattori<sup>2</sup>, Iwao Ohtsu<sup>3</sup>, Yoko Katayama<sup>4</sup>, Makoto Yoshida<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Tokyo Univ. of Agric. and Technol., <sup>2</sup>Nanjing Univ., <sup>3</sup>Univ. of Tsukuba, <sup>4</sup>Tokyo Natl. Res. Inst. for Cultural Properties)

## P-85 (O-6)

### 糸状菌 *Aspergillus nidulans* の菌糸生長時における脂質動態の解析

岩間亮<sup>1,2,6</sup>, 岡橋伸幸<sup>3,6</sup>, 加藤遼<sup>4,5,6</sup>, 奥崎紗矢<sup>4,5</sup>, 楊淳児<sup>1</sup>, 矢野隆章<sup>4,5</sup>, 田中拓男<sup>4,5</sup>, 松田史生<sup>3</sup>, 堀内裕之<sup>1,2</sup> ( <sup>1</sup>東大院・農生科・応生工, <sup>2</sup>東大・微生物連携, <sup>3</sup>阪大・院情報, <sup>4</sup>徳島大・pLED, <sup>5</sup>理研, <sup>6</sup>JST ACT-X)

脂質分子には極めて多様な分子種が存在し、生体膜の主要構成成分になる分子種や細胞内でエネルギー源として使用される分子種がある。我々は、糸状菌 *Aspergillus nidulans* を液体培養した際に、生体膜の主要構成成分であるリン脂質の組成が経時的にダイナミックに変動し、特に発芽時に不飽和度の高い脂質が増加することを明らかにしてきた。今回、我々は *A. nidulans* を寒天培地で培養して形成されるコロニーの局所的なリン脂質解析を行い、コロニー中心部と比較してコロニー辺縁部では、ホスファチジルエタノールアミン含量が高く、不飽和度の高いリン脂質の含量も高いことを示した。さらに、リン脂質以外の脂質成分にも着目し、*A. nidulans* を液体培養した際のノンターゲットリピドミクスを行った。その結果、主要なリン脂質成分以外の多様な脂質成分においても、発芽時に不飽和度の高い脂質が増加することが明らかとなった (1)。これらの解析において、脂肪滴 (lipid droplet, LD) の主成分であるトリアシルグリセロールにおいて多様な分子種が検出されたことに着目し、菌糸内の LD をライン照明型ラマン顕微鏡で観察したところ、菌糸先端から後方にかけて部位に応じて LD の脂質成分が異なる可能性が示唆された。本発表では、これら LD 組成の菌糸内での空間的不均一性の要因・生理的意義についても議論する。

1) Iwama et al., *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids*, 1868, 159379 (2023)

### Lipid dynamics during filamentous growth in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*.

Ryo Iwama<sup>1,2,6</sup>, Nobuyuki Okahashi<sup>3,6</sup>, Ryo Kato<sup>4,5,6</sup>, Saya Okuzaki<sup>4,5</sup>, Chuner Yang<sup>1</sup>, Taka-aki Yano<sup>4,5</sup>, Takuo Tanaka<sup>4,5</sup>, Fumio Matsuda<sup>3</sup>, Hiroyuki Horiuchi<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo, <sup>2</sup>CRIIM, UTokyo, <sup>3</sup>Grad. Sch. Info. Sci. Tech., Osaka Univ., <sup>4</sup>pLED, Tokushima Univ., <sup>5</sup>RIKEN, <sup>6</sup>JST ACT-X)

## P-86

### *cis*-デカリン含有テトラミン酸は昆虫エクジステロイド生合成に関わるグルタチオン *S*-転移酵素 Noppera-bo を阻害する

加藤直樹<sup>1,2</sup>, 海老原佳奈<sup>3</sup>, 野川俊彦<sup>2</sup>, 二村友史<sup>2</sup>, 松田一彦<sup>4</sup>, 長田裕之<sup>2</sup>, 丹羽隆介<sup>3</sup>, 高橋俊二<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>摂南大, <sup>2</sup>理研 CSRS, <sup>3</sup>筑波大, <sup>4</sup>近畿大)

糸状菌の生産するデカリン含有テトラミン酸化合物群は、その構造多様性に付随した多様な生物活性が報告されているものの、その収集や合成の困難さから、デカリンの立体配置に関する構造活性相関研究はこれまでにほとんどなされていない。私たちはこれまで、エキセチンやフォマセチン生産糸状菌の遺伝子改変株を利用することで、本来の生合成産物とはデカリンの立体配置が異なった複数の誘導体の取得に成功している。本発表では、これらのデカリン化合物の生物活性評価を行った結果を報告する。

エキセチンおよびフォマセチンは黄色ブドウ球菌に対する強い抗菌活性を示すことが知られているが、これらの *cis*-デカリン誘導体は弱い抗菌活性を示した。エクジステロイド生合成に関わるグルタチオン *S*-転移酵素 Noppera-bo (Nobo) に対する阻害活性を調べた結果、*cis*-デカリン誘導体において阻害活性が検出された。一方で、上述の抗菌活性とは異なり、*trans*-デカリンの Nobo 阻害活性は弱かった。以上より、デカリンの立体配置に応じて生物活性が変化することを明らかにした。それに加え、デカリン含有テトラミン酸骨格に Nobo 阻害活性があることを新たに見出した。

### *cis*-Decalin-containing tetramic acids inhibit insect steroidogenic glutathione *S*-transferase, Noppera-bo

Naoki Kato<sup>1,2</sup>, Kana Ebihara<sup>3</sup>, Toshihiko Nogawa<sup>2</sup>, Yushi Futamura<sup>2</sup>, Kazuhiko Matsuda<sup>4</sup>, Hiroyuki Osada<sup>2</sup>, Ryusuke Niwa<sup>3</sup>, Shunji Takahashi<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Setunan Univ., <sup>2</sup>RIKEN CSRS, <sup>3</sup>Univ. of Tsukuba, <sup>4</sup>Kindai Univ.)

## \*P-87

### シコクビエいもち病菌 (*Pyricularia oryzae* pathotype *Eleusine*) の3つの非病原力遺伝子を認識するコムギの新規抵抗性遺伝子の単離

土屋玲奈<sup>1</sup>, 加納裕康<sup>1</sup>, 岩川瑞希<sup>1</sup>, 安倍史高<sup>2</sup>, 足助聡一郎<sup>1</sup>, 土佐幸雄<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>神戸大院農, <sup>2</sup>農研機構作物研)

シコクビエいもち病菌の普通系コムギに対する非親和性には、5つの非病原力遺伝子が関与することが示唆されている。本研究では、そのうち3つの非病原力遺伝子 (*PWT3*, *PWT6*, *PWT8*) それぞれに対応する抵抗性遺伝子 (*Rwt3*, *Rwt6*, *Rwt8*) の単離を試みた。抵抗性コムギ品種農林4号×感受性品種 Hope F<sub>3</sub> 93 系統を用いた分子マッピングを行ったところ、*Rwt3*, *Rwt6*, *Rwt8* は、いずれも1D染色体短腕上の同一の座にマップされた。さらに詳細マッピングを進めたところ、*Rwt3*, *Rwt6*, *Rwt8* 候補遺伝子は NBS-LRR コード遺伝子と Receptor-like kinase コード遺伝子の2つに絞りこまれた。そこで各候補遺伝子をコムギ系統 (*rwt3 rwt6 rwt8*) に導入した T<sub>1</sub> を作出した。さらに各 T<sub>1</sub> 系統の交配によって、両候補遺伝子を保有する F<sub>1</sub> を作出した。これに、コムギいもち病菌 Br48 に各非病原力遺伝子を導入した形質転換体 Br48+*PWT3*, Br48+*PWT6*, Br48+*PWT8* を接種したところ、いずれかの候補遺伝子を持つ F<sub>1</sub> 個体は感受性である一方、両候補遺伝子を保有する F<sub>1</sub> 個体は、全ての形質転換体に対して抵抗性を示した。このことから、*Rwt3*, *Rwt6*, *Rwt8* は同一遺伝子であること、NBS-LRR コード遺伝子と Receptor-like kinase コード遺伝子の2つから構成されること、さらにこの2遺伝子がともに作用することにより異なる3つの非病原力遺伝子を認識することが明らかになった。

### Cloning of wheat resistance gene(s) corresponding to three avirulence genes of an *Eleusine* pathotype of *Pyricularia oryzae*

Reina Tsuchiya<sup>1</sup>, Hiroyasu Kano<sup>1</sup>, Mizuki Iwakawa<sup>1</sup>, Fumitaka Abe<sup>2</sup>, Soichiro Asuke<sup>1</sup>, Yukio Tosa<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Graduate school of Agricultural Science, Kobe Univ., <sup>2</sup>Institute of Crop Science, NARO)

## \*P-88

### 果樹炭疽病菌 *Colletotrichum fioriniae* GCA6 における糖誘導型形態分化の制御機構に関する研究

佐々木優<sup>1</sup>, 和泉尚登<sup>1</sup>, 坂本茉由<sup>1</sup>, 入枝泰樹<sup>2</sup> ( <sup>1</sup>信大・農, <sup>2</sup>信大・大学院農)

植物表面に接着した炭疽病菌 (*Colletotrichum* 属菌) の分生胞子は周囲の水と植物シグナルにより発芽し、感染特異的形態分化を開始する。その後、メラニン化した付着器を形成して植物に侵入するのが一般的である (MAE 型侵入)。今回、30 菌株以上の炭疽病菌に対して胞子の発芽スクリーニングを実施したところ、発芽に糖を要求する果樹炭疽病菌 *Colletotrichum fioriniae* GCA6 株を同定した。GCA6 株の胞子は未熟果上で発芽せず、糖含量の高い成熟果特異的に発芽し、病徴を発現することを見出した。また、周囲に糖が存在する場合に、発芽後の付着器形成が抑制されて発芽管様の伸長した菌糸の先端から直接侵入する HTE 型侵入が一部の炭疽病菌で報告されている。GCA6 株を含む 10 菌株の炭疽病菌を調査した結果、GCA6 株は HTE 型であり、胞子発芽誘導のチェックポイントの後に MAE 型と HTE 型を選択するチェックポイントが別に存在することが示唆された。現在、GCA6 株の糖誘導型形態分化の制御因子を探索しており、糖シグナルに関連すると推定される 16 候補遺伝子を選抜し、標的遺伝子破壊を試みている。現在までに、解糖系でグルコースをリン酸化する役割をもつ 5 つの *HXK* ホモログ遺伝子についてそれぞれの破壊株作出に成功し、そのうち 1 つの破壊株において糖誘導型胞子発芽の低下が認められた。一方で、糖による MAE/HTE の選択に影響する *HXX* 破壊株はなく、それぞれの形態分化誘導で異なる制御機構が働いていると推定された。

### Studies on the regulation mechanism of sugar-induced infection-related morphogenesis in fruit anthracnose fungus *Colletotrichum fioriniae* GCA6

Yu Sasaki<sup>1</sup>, Naoto Izumi<sup>1</sup>, Mayu Sakamoto<sup>1</sup>, Hiroki Irieda<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Fac. Agric., Shinshu Univ., <sup>2</sup>Acad. Assembly, Inst. Agric., Shinshu Univ.)

## \*P-89

### 炭疽病菌の付着器機能にメラニン化が果たす役割の再考

大澤武留<sup>1</sup>, 武末和穂<sup>2</sup>, 工藤健央<sup>1</sup>, 入枝泰樹<sup>3</sup> ( <sup>1</sup>信大・院総合理工, <sup>2</sup>信大・農, <sup>3</sup>信大・学術院農)

植物病原糸状菌である炭疽病菌 (*Colletotrichum* 属菌) はイネいもち病菌と同様に付着器と呼ばれるメラニン化した感染器官を形成し、メラニン化依存的に付着器内部の膨圧発生や細胞壁分解酵素への耐性など様々な付着器の機能を発揮させることで植物に侵入し壊死斑を形成する。モデル菌であるウリ類炭疽病菌やイネいもち病菌の先行研究により、付着器のメラニン化が植物への侵入と病原性の発揮に必須であることが長年の定説として受け入れられている。しかし、当研究室では、メラニン生成阻害剤処理区やメラニン生成欠損株の非メラニン化付着器からも植物に侵入して壊死斑を形成できるコスモス炭疽病菌を、従来の定説を覆す菌として同定している。本菌の付着器は、非メラニン化条件でも膨圧、人工膜 (セロファン) 侵入能、細胞壁分解酵素耐性、植物上における形態維持能力が損なわれず、既報のモデル菌と特性が大きく異なる。興味深い点として、本菌は多犯性のためコスモス以外の植物にも侵入し壊死斑を形成するが、一部のイネ科植物に対しては非メラニン化条件で壊死斑形成能が消失する。ケイ酸を葉に蓄積して葉を強靱にするイネ科植物の特性を考慮し、ケイ酸非存在下で解析したが、アルビノ変異体の壊死斑形成能は回復しなかった。一方で、葉を高温処理するとアルビノ変異体の壊死斑形成能が回復することから、高温で低下する免疫応答が関与することが示唆された。さらに、コスモス炭疽病菌と同様に植物侵入に付着器のメラニン化を必須としないサクラ炭疽病菌も追加で同定している。本発表では、比較対象としてウリ類炭疽病菌、アブラナ科炭疽病菌、リンゴ炭疽病菌のアルビノ変異体も作出し、合計 5 種の炭疽病菌における様々な付着器機能のメラニン化依存性について議論すると同時に、付着器の機能にメラニン化が果たす役割の普遍性を再考する。

#### Reconsideration of the role of melanization for appressorium function in *Colletotrichum* fungi.

Takeru Ohzawa<sup>1</sup>, Kazuho Takesue<sup>2</sup>, Takehiro Kudo<sup>1</sup>, Hiroki Irieda<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>Grad. Sch. Sci. Tech., Shinshu Univ., <sup>2</sup>Fac. Agric., Shinshu Univ., <sup>3</sup>Acad. Assembly, Inst. Agric., Shinshu Univ.)

## \*P-90 (O-18)

### 植物病原性糸状菌 *Fusarium oxysporum* の微小空間における伸長と病原性の関連

酒造ひなた<sup>1</sup>, 井谷綾花<sup>1</sup>, 山本里穂<sup>1</sup>, 高谷直樹<sup>1</sup>, 佐藤良勝<sup>2</sup>, Antonio Di Pietro<sup>3</sup>, 竹下典男<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>筑波大・MiCS, <sup>2</sup>名古屋大・ITbM, <sup>3</sup>コルドバ大)

糸状菌は基質や宿主に吸着し菌糸を侵入させて生長する。土壌を通じて感染・共生する糸状菌 *Fusarium oxysporum* は、根表面から菌糸を侵入させ、植物細胞間を伸長し内生する。菌糸が維管束組織まで到達すると、植物の細胞死や通水障害を誘導し病原性を示す。このとき菌糸は微小な植物細胞間を伸長し生長するため、菌糸が自身よりも狭い空間で伸長する能力は病原性にも関わることが予想される。これまでに、菌糸直径より細い 1  $\mu$ m 幅の流路を持つマイクロ流体デバイス内で 7 種の糸状菌を培養しライブイメージングで解析することで、菌糸の伸長速度と微小流路の通過能のトレードオフが示された。(Fukuda et al., mBio 2021)。

本研究では菌糸の微小空間における伸長と病原性の関連を明らかにするため、*F. oxysporum* の病原性が低下する遺伝子破壊株 18 株 (3 つの MAPK 経路、感染分化 Fmk1・高浸透圧適応 Hog1・細胞壁再構築 Mpk1 経路の遺伝子など) を同デバイス内で生育させ、微小流路の通過率と病原性の程度を比較した。結果、細胞壁の完全性に欠陥のある欠損株 (Mpk1, キチン合成酵素, グルカン合成酵素など) で通過率が低下した。それらは病原性も低下することから、細胞壁の再構築による微小空間への伸長能力が病原性に重要であることが示唆された。一方、感染時の分化に必須な Fmk1 経路因子の破壊株では病原性が低下するものの、通過率は低下しなかった。以上より、菌糸の微小空間における伸長能力と感染時の分化の 2 つの経路がそれぞれ独立に病原性に関わることが示唆された。

#### Relationship between elongation in microspace and virulence of plant pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*

Hinata Miki<sup>1</sup>, Ayaka Itani<sup>1</sup>, Riho Yamamoto<sup>1</sup>, Naoki Takaya<sup>1</sup>, Yoshikatu Sato<sup>2</sup>, Antonio Di Pietro<sup>3</sup>, Norio Takeshita<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Univ. of Tsukuba, MiCS, <sup>2</sup>Univ. of Nagoya, ITbM, <sup>3</sup>Univ. of Córdoba)

## \*P-91

### *Colletotrichum fioriniae* GCA6 に由来する植物の胚軸伸長を促進する物質の単離と同定

本田莉夏子<sup>1</sup>, 桐山寛生<sup>1</sup>, 大神田淳子<sup>2,3</sup>, 真壁秀文<sup>2,3</sup>, 河村篤<sup>3</sup>, 入枝泰樹<sup>2,3</sup> (1信大・農, 2信大・学術院農, 3信大・バイオメディカル研)

植物病原菌は植物に病害を引き起こすが, 病原菌由来の化合物が植物に正の生理活性を示す例も報告されている。本研究では, 約 50 菌株の炭疽病菌 (*Colletotrichum* 属菌) のコロニー抽出液に対し, ベンサミアナタバコへの影響を指標にスクリーニングを実施した。その結果, *C. fioriniae* GCA6 由来物質を含む抽出液に胚軸伸長活性を見出した。当該の生理活性物質を同定するため HPLC を用いて単離したところ, 活性を有する複数の化合物のピークを取得した。そのうち 2 つの化合物 a, b について一次元および二次元の各種 NMR スペクトルを解析した結果, 化合物 a をオーキシンの一種であるインドール-3-酢酸と決定した。一方で, 化合物 b はインドール-3-酢酸のカルボニル基の  $\alpha$  位にメチル基を有し, インドール-3-酢酸の骨格にペンチトールがエステル結合した化合物であると推定された。D-アラビノースの糖アルコール (D-アラビニトール) がエステル結合した化合物 *acremoauxin* A が既に報告されているが, 他の五炭糖の糖アルコール (キシリトール, リビトール) がエステル結合した化合物は未報告であり, 加えて化合物 b と *acremoauxin* A の <sup>1</sup>H NMR スペクトルが一致しなかったことから, 化合物 b は新規化合物であることが明らかになった。今後, a, b 以外の取得化合物についても構造決定を進める予定である。また, インドール-3-酢酸およびその類縁体が *C. fioriniae* GCA6 の宿主に対する病原性へ与える影響を解析するため, 生合成遺伝子の破壊株作出も並行して実施する。

### Isolation and identification of *Colletotrichum fioriniae* GCA6-derived compounds that promote plant hypocotyl elongation.

Rikako Honda<sup>1</sup>, Hironaru Kiriyama<sup>1</sup>, Junko Ohkanda<sup>2,3</sup>, Hidefumi Makabe<sup>2,3</sup>, Atsushi Kawamura<sup>3</sup>, Hiroki Irieda<sup>2,3</sup>

(<sup>1</sup>Fac. Agric., Shinshu Univ., <sup>2</sup>Acad. Assembly, Inst. Agric., Shinshu Univ., <sup>3</sup>IBS, ICCER, Shinshu Univ.)

## \*P-92

### 卵菌 *Phytophthora infestans* の形態変化におけるアネキシン様タンパク質の機能解析

藤島里佐子<sup>1</sup>, 川口剛司<sup>1,2</sup>, 谷修治<sup>1,2</sup> (1阪府大・生環科, 2大阪公大院・農)

【目的】植物病原卵菌 *Phytophthora infestans* による疫病の蔓延は, 15°C 以下の低温条件下で雨露に濡れた遊走子嚢から放出された遊走子が拡散することに起因する。植物表層に付着した遊走子は, シスト形成後, 発芽し付着器を形成する。この低温環境下での形態変化を伴った植物感染にカルシウム (Ca<sup>2+</sup>) シグナルが関与していることは知られているが, 分子機構の詳細は未解明である。そこで本研究では, 我々がシスト発芽阻害剤として同定した  $\beta$ -rubromycin を用いたケミカルジェネティクスにより, *P. infestans* の形態形成機構を分子レベルで解明することを目的としている。

【方法及び結果】qRT-PCR 解析により,  $\beta$ -rubromycin 存在下で発現量が低下する遺伝子として, Ca<sup>2+</sup> 結合ドメインを有すアネキシン様タンパク質をコードする遺伝子 (PITG\_12158) を同定した。CRISPR-Cas12a システムを用いた遺伝子破壊により PITG\_12158 の機能を解析するために gRNA を 2 種類デザインした。各 gRNA を Cas12a と共発現するための発現ベクターを構築し, *P. infestans* にそれぞれ導入した。得られた形質転換体をシークエンス解析した結果, 対立遺伝子の片方が 3 塩基欠失したことにより Arg124 または Ser125 を欠失したアネキシン様タンパク質を発現する株が 1 株ずつ同定された。この 2 株のゲノム編集株と, コントロールとして野生株および Cas12a のみを発現する株の遊走子嚢を 10°C に静置後の形態変化を観察した。コントロール株と比べてゲノム編集株では, 遊走子放出率が約 30%低下するとともに, サイズの大きな遊走子が多数観察されその運動性が低下していた。また, シスト形成率が 60%以上低下した。18°C の培養条件下では, ゲノム編集株ではコントロール株と比較して菌糸伸長が約 20%低下した。今後は, アネキシン様タンパク質の低温に応答した Ca<sup>2+</sup>シグナル伝達における機能を解析する計画である。

### Functional analysis of an annexin-like protein in the morphogenesis of *Phytophthora infestans*

Risako Fujishima<sup>1</sup>, Takashi Kawaguchi<sup>1,2</sup>, Shuji Tani<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>Dept. Life & Env. Sci, Osaka Pref. Univ., <sup>2</sup> Grad Sch Agri., Osaka Metro. Univ)

## \*P-93

### ***Bipolaris maydis* におけるポリオキシシン耐性の原因遺伝子の探索**

玉木裕<sup>1</sup>, 辻健也<sup>1</sup>, 吉見啓<sup>1,2</sup>, 田中千尋<sup>1,2</sup> ( <sup>1</sup>京大院・農, <sup>2</sup>京大院・地環学)

ポリオキシシンは細胞壁多糖類キチンの合成を阻害する殺菌剤である。ポリオキシシンに対する耐性株はいくつかの真菌で出現しているが、未だポリオキシシン耐性機構の本質は明らかにされていない。

本研究では、*Bipolaris maydis* を用い、化学的突然変異剤 NQO による変異導入と変異株のスクリーニングから、2 種のポリオキシシン耐性株 (PR2027 株および PR2029 株) を得たので、その解析結果について報告する。まず、野生株との交配試験により、これらの菌株のポリオキシシン耐性は単一の遺伝子座の変化に起因することが明らかになった。続いて、リファレンスゲノムとの全ゲノム比較及び連鎖解析により、それぞれの株の原因変異候補を選抜した。PR2027 株の原因変異候補は翻訳開始因子 3 サブユニット h (eIF-3h) をコードする遺伝子中にあり、PR2029 株の原因変異候補は RNA ポリメラーゼ III 第 2 サブユニットをコードする遺伝子中に見出された。次に、選抜した変異がポリオキシシン耐性の原因であるか否かを確認するため、変異型 eIF-3h 遺伝子を野生株に異所的に導入した。得られた株 (eIF-3h<sup>WM</sup> 株) はポリオキシシン耐性を示さなかったが、eIF-3h<sup>WM</sup> 株においてオリジナルの野生型 eIF-3h の遺伝子を破壊すると、コロニーはポリオキシシン耐性を示した。さらに、PR2027 株に野生型 eIF-3h 遺伝子を異所的に導入すると、その表現型はポリオキシシン耐性から感受性に変化した。これらの結果から、eIF-3h をコードする遺伝子中の変異が PR2027 株のポリオキシシン耐性に関与していること、ならびにこの変異によるポリオキシシン耐性が潜性形質であることが示唆された。現在、PR2029 株における原因遺伝子の特定も進めており、その結果についても議論したい。

### **Search for genes responsible for polyoxin resistance in *Bipolaris maydis***

Yu Tamaki<sup>1</sup>, Kenya Tsuji<sup>1</sup>, Akira Yoshimi<sup>1,2</sup>, Chihiro Tanaka<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Glob. Env. Stud, Kyoto Univ.)

## \*P-94

### **ヒストン H3 の K9 および K27 トリメチル化は牧草共生糸状菌 *Epichloë festucae* の共生関連遺伝子の宿主感染時特異的な発現に関与する**

三浦敦士, 一柳健司, 佐藤育男, 千葉壮太郎, 田中愛子, 竹本大吾 (名大院・生命農学)

イネ科牧草に共生する糸状菌エンドファイトである *E. festucae* は、耐虫性物質であるペラミン、マイコトキシンであるロリトレム B やエルゴバリンなど、植物を守る生理活性物質を植物感染時にのみ産生する。これらの生合成酵素遺伝子の感染時特異的な発現には、非感染時の負の制御と感染後の正の制御があると推定されるが、その機構は殆ど解明されていない。本研究では、培養時の発現抑制へのエピジェネティックな制御の関与を調査するため、H3K9me3 と H3K27me3 を標的とした培養時の ChIP 解析を行った。ロリトレム B 生合成酵素遺伝子 *ltmM*, *ltmE*, エルゴバリン生合成酵素遺伝子 *EasG* や感染時に高発現するその他の遺伝子群のプロモーター領域において H3K9me3 化と H3K27me3 化が確認された一方で、ペラミン生合成酵素遺伝子 *perA* プロモーターではこれらのメチル化が認められなかった。以上の結果から、感染時特異的に発現する *E. festucae* の遺伝子には、ヒストンメチル化による制御を受けている遺伝子と、正の制御のみで誘導されている遺伝子が存在することが示唆された。

### **Histone K9 and K27 trimethylation are involved in the regulation of genes for the production of bioactive compounds in *Epichloë festucae***

Atsushi Miura, Kenji Ichiyonagi, Ikuo Sato, Sotaro Chiba, Aiko Tanaka, Daigo Takemoto

(Grad. School Bioagr. Sci., Nagoya Univ.)

## \*P-95

### 菌類ウイルスによる宿主表現型への影響は株レベルで特異性を示す

渡邊青陽<sup>1</sup>, 浦山俊一<sup>2,3</sup>, 萩原大祐<sup>2,3</sup> ( <sup>1</sup>筑波大院・生命地球環境, <sup>2</sup>筑波大・生命環境系, <sup>3</sup>筑波大・MiCS)

菌類ウイルスは真菌の主要な分類群に存在し、宿主菌の表現型にさまざまな影響を及ぼす。しかし、これらの表現型への影響を明らかにした研究のほとんどが単独の宿主菌株とウイルス株を解析対象としており、宿主-ウイルス間相互作用の特異性についての理解は未だ限定的である。つまり、ウイルスが宿主菌の表現型に及ぼす影響が、宿主菌株とウイルス株の全ての組み合わせで共通する種レベルの普遍的なものなのか、株の組み合わせにより異なる株レベルの応答なのかは理解が進んでいない。そこで本研究では、同じ種で異なる2株の宿主菌 (*Aspergillus fumigatus*) と、同様に同種で異なる2株のウイルス (*Aspergillus fumigatus* narnavirus 2 (AfuNV2)) を用いてこの特異性の検証を試みた。

はじめに、宿主株に元々感染しているウイルスを 2'-C-Methylcytidine により脱離させ、さらにウイルス感染株と治癒株の共培養によりウイルス導入を実施し、宿主菌株とウイルス株の全ての組み合わせ (感染株4通り+治癒株2株) を作出した。これらの株を用いてポリコナゾールなど8種類の薬剤による薬剤感受性試験を実施したところ、ウイルス治癒株と比較して、一部の薬剤に対して感受性の低下や上昇を示す感染株が存在した。しかし、同じ宿主菌株に異なる AfuNV2 株が感染した株間で比較した場合、共通した薬剤応答への影響は観察されなかった。同様に、異なる宿主菌株に同じ AfuNV2 株が感染した株間でも、薬剤感受性に対する共通の影響は見られなかった。以上の結果から、ウイルスによる宿主表現型への影響は宿主菌株-ウイルス株の組み合わせに特異的で、宿主菌とウイルスの関係は株レベルで異なる多様性に富んだ複雑なものであることが示唆された。したがって、すでに報告のあるウイルスの機能についても、使用した菌・ウイルス株に特異的である可能性を留意し、その生物学的理解や応用可能性を検討していく必要がある。

### Exploring factors affecting the phenotype of filamentous fungi infected by mycovirus.

Seiyo Watanabe<sup>1</sup>, Syun-ichi Urayama<sup>2,3</sup>, Daisuke Hagiwara<sup>2,3</sup>

(<sup>1</sup>Fac.of Life&Earth Sci. Univ. of Tsukuba, <sup>2</sup>Fac.of Life&Env., <sup>3</sup>MiCS, Univ. of Tsukuba)

## \*P-96

### *Bipolaris maydis* における菌糸徒長を伴う付着器形成不全の原因遺伝子の同定

安本駿作<sup>1</sup>, 佐波雅史<sup>1</sup>, 辻健也<sup>1</sup>, 吉見啓<sup>1,2</sup>, 泉津弘佑<sup>3</sup>, 河内護之<sup>1</sup>, 本田与一<sup>1</sup>, 田中千尋<sup>1,2</sup> ( <sup>1</sup>京大院・農, <sup>2</sup>京大院・地環学, <sup>3</sup>滋賀県大院・環境)

*Bipolaris maydis* を含む多くの植物病原菌はその感染段階において、宿主への侵入のために付着器と呼ばれる感染構造を形成する。付着器形成は表面疎水性および宿主由来物質の認識によって誘導されると考えられている。*B. maydis* における  $\Delta$ opy2 株は疎水面認識能を欠損しており、疎水面上で付着器を形成しないが、宿主由来物質 (ペクチン) を添加することで付着器形成が誘導される。しかし、このペクチン認識が付着器形成を誘導するメカニズムは未だ解明されていない。本研究では、このメカニズムの解明を目的として、*B. maydis* の  $\Delta$ opy2 株に突然変異を誘引し、ペクチンによる付着器形成誘導が生じない変異株 (D296 株) を得た。D296 株では付着器形成誘導が認められないことに加え、 $\Delta$ opy2 株と比較して、分生子発芽後に直線的で分枝の少ない菌糸が観察された。D296 株と野生株との交配により、本形質は1遺伝子に支配されることが示唆された。次に、野生型子孫株と変異型子孫株の全ゲノム比較を行い、ORF 上の SNP を抽出した。候補 SNP 周辺のシーケンスの結果、 $\alpha\beta$  hydrolase をコードする遺伝子中の SNP が本形質と連鎖していた。本遺伝子を *Lag1* と命名、野生型遺伝子 (*LAG1*) を D296 株 ( $\Delta$ opy2 *lag1*) に導入し、*lag1* の形質が相補されることを確認した。さらに、同遺伝子破壊株 ( $\Delta$ lag1) を作出したところ、同株は D296 株と同様の菌糸生長を示すとともに、疎水面上での付着器形成率が有意に低下し、ペクチンによる付着器形成誘導も生じなかった。以上の結果から、*LAG1* は付着器形成経路そのものに関与しているとして解析を進めている。

### Identification of causal gene of defective appressorium and leggy hyphal growth in *Bipolaris maydis*

Shunsaku Yasumoto<sup>1</sup>, Masafumi Saba<sup>1</sup>, Kenya Tsuji<sup>1</sup>, Akira Yoshimi<sup>1,2</sup>, Kosuke Izumitsu<sup>3</sup>, Moriyuki Kawauchi<sup>1</sup>, Yoichi Honda<sup>1</sup>, Chihiro Tanaka<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Glob. Env. Stud., Kyoto Univ., <sup>3</sup>Grad. Sch. Env. Sci., Univ of Shiga Pref.)

## \*P-97

### コムギ赤カビ病菌における新規ステロール誘導体加水分解酵素の機能解析

関澤大地<sup>1</sup>, 金子雅弘<sup>1</sup>, 横川大祐<sup>1</sup>, Frédéric Fischer<sup>2</sup>, Hubert D. Becker<sup>2</sup>, 久城哲夫<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>明治大・院農・農芸化学, <sup>2</sup>ストラスブール大)

糸状菌 *Fusarium graminearum* は、コムギ赤カビ病の原因菌であり、収量低下・収穫物汚染など農業上大きな被害をもたらしている。菌糸伸長能や毒素産生能といった、その病原性を決定する因子については未だ明らかになっていない。当研究室と仏ストラスブール大の共同研究において、tRNA 依存的にエルゴステロールとアスパラギン酸とのエステル化反応を触媒し、糸状菌に特有な新規脂質成分であるエルゴステリルアスパラギン酸 (Erg-Asp) を生合成する酵素, ErdS の存在が判明した (Yakobov, *et al.*, *PNAS*, 2020)。さらに, Erg-Asp を特異的に加水分解する酵素 ErdH の存在も明らかとなり, ErdS と ErdH によって Erg-Asp の内生量が制御されていることが示唆された。

動物病原菌 *Aspergillus fumigatus* においては, ErdS の欠損が病原性に影響を与えることが報告されている。*F. graminearum* にも ErdS が存在するため, Erg-Asp が本菌においても病原性に関与している可能性が示唆された。*F. graminearum* の ErdS 欠損株については既に作製され, 植物感染実験の結果, 病原性の低下をもたらすことが明らかとなった。そこで, 本研究では *F. graminearum* における Erg-Asp の生理機能と病原性決定因子の解明を目的として ErdH 欠損株を作成し, 形態観察, 薬剤添加培地を用いたストレス感受性試験, コムギ子葉鞘を用いた植物感染実験を行った。その結果, ErdH 欠損株においては, 病原性に大きな変化はみられなかったものの, 菌糸の形態変化, アゾール系抗真菌薬に対する耐性の上昇が確認された。

#### Physiological analysis of novel sterol-derivative hydrolase in *Fusarium graminearum*

Daichi Sekizawa<sup>1</sup>, Masahiro Kaneko<sup>1</sup>, Daisuke Yokokawa<sup>1</sup>, Frédéric Fischer<sup>2</sup>, Hubert D. Becker<sup>2</sup>, Tetsuo Kushiro<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Dept. of Agri. Chem. Sch. of Agri. Univ. of Meiji, <sup>2</sup>Univ. of Strasbourg)

## \*P-98

### *Bipolaris maydis* における Kre6 様タンパク質の機能解析

山田夕月<sup>1</sup>, 辻健也<sup>1</sup>, 吉見啓<sup>1,2</sup>, 河内護之<sup>1</sup>, 本田与一<sup>1</sup>, 田中千尋<sup>1,2</sup> ( <sup>1</sup>京大院・農, <sup>2</sup>京大院・地環学)

Glycoside Hydrolase Family 16 (GH16) は、細胞壁多糖の分解やリモデリングに関与する β-グルカナーゼなど多様な活性を持つ酵素を含むファミリーである。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* では、GH16 に属する *Kre6* およびその機能的ホモログ *Skn1* 遺伝子を破壊すると β-1,6-グルカン合成が抑制され、致死性を示すことが明らかになっている。また、糸状菌 *Colletotrichum graminicola* でも *Kre6* 遺伝子が同定されており、*Kre6* 遺伝子の発現抑制は β-1,6-グルカン合成だけでなく菌糸生育や付着器形成にも影響を及ぼすことが報告されている。しかし、他の植物病原菌における *Kre6* の機能に関する知見は限られている。そこで本研究では、植物病原菌 *Bipolaris maydis* の GH16 に属する *Kre6* を同定し、本菌における形態形成に関する役割について調査することを目的とした。まず、*B. maydis* の *Kre6* を同定するため、*S. cerevisiae* の *Kre6* (ScKre6) と *C. graminicola* の *Kre6* (CgKre6) をクエリーとして *B. maydis* のゲノムデータベースに対してブラスト検索を行い、系統解析を行った。その結果、クエリーとした両菌の *Kre6* は異なるクレードを形成し、*B. maydis* は 3 つの候補タンパク質 (ScKre6 クレード 2 種, CgKre6 クレード 1 種) を保持することが明らかになった。次に、これらの遺伝子をそれぞれ *Kre6*, *Skn1* および *Kre61* とし、各遺伝子の単独破壊株を作成したところ、野生株と比較して菌糸生育に顕著な差は見られなかった。現在、これら遺伝子の多重破壊株の作出を試みており、各遺伝子間の機能重複の可能性について解析を進めている。また、各種細胞壁ストレス試験による機能推定を試みるとともに、*B. maydis* において *Kre5*, *Knh1* 遺伝子 (出芽酵母では β-1,6-グルカン合成に関与) のホモログについても破壊株を作出しているので、それらの解析結果についても報告したい。

#### Functional analysis of Kre6-like proteins in *Bipolaris maydis*

Yuzuki Yamada<sup>1</sup>, Kenya Tsuji<sup>1</sup>, Akira Yoshimi<sup>1,2</sup>, Moriyuki Kawauchi<sup>1</sup>, Yoichi Honda<sup>1</sup>, Chihiro Tanaka<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Glob. Env. Stud., Kyoto Univ.)

## \*P-99

### ***In vitro* 試験による Tolnifanide の作用点解明への試み**

長根悠介<sup>1</sup>, 田代英里香<sup>1</sup>, 松原佳耶<sup>1</sup>, 泉津弘佑<sup>2</sup>, 寺内裕貴<sup>3</sup>, 辻健也<sup>1</sup>, 吉見啓<sup>1,4</sup>, 宮川恒<sup>1</sup>, 田中千尋<sup>1,4</sup>  
(<sup>1</sup>京大院・農, <sup>2</sup>滋賀県大院・環境, <sup>3</sup>山口大・中高温研, <sup>4</sup>京大院・地環学)

Tolnifanide (TF) はプレオスポラ目の真菌に高い選択毒性を示す抗真菌性物質である。先行研究による *Bipolaris maydis* の TF 耐性株の解析から, geranylgeranyltransferase type I (GGTase-I) をコードする遺伝子内の変異が TF 耐性化の主因であり, GGTase-I 自身が TF の作用点であることが分子遺伝学的に示されている (第 16 回糸状菌コンファレンス)。しかし, 現在までに TF と GGTase-I の生化学的な相互作用は解析されていない。そこで本研究では, GGTase-I が TF のターゲットであることを *in vitro* で実証するため, 大腸菌発現系による組換え GGTase-I を用いた酵素活性測定系の確立を試みた。まず, GGTase-I は 2 つのサブユニットから成るため, それぞれについて大腸菌発現用プラスミドを構築した。同一宿主細胞で両サブユニットを同時発現することにより, 精製タンパク質としての野生型および変異型 GGTase-I を得ることができた。GGTase-I の活性測定にはダンシル化ペプチド (dansyl-GCVLL) ならびにゲラニルゲラニルピロリン酸を基質として用い, ゲラニルゲラニル基の付加による蛍光強度の変化から GGTase-I 活性の測定を試みた。その結果, 野生型 GGTase-I について活性を認めることはできたが, 活性測定法の感度が比較的低く, 酵素反応速度を論ずるに必要な最大反応速度を決定するには至らなかった。そこで基質・酵素濃度の調整により GGTase-I 活性測定系の最適化を進めた後, 野生型と変異型の酵素活性阻害レベルを比較する予定である。

### **Attempting to clarify the mode of action of Tolnifanide through *in vitro* assays**

Yusuke Nagane<sup>1</sup>, Erika Tashiro<sup>1</sup>, Kaya Matsubara<sup>1</sup>, Kosuke Izumitsu<sup>2</sup>, Yuki Terauchi<sup>3</sup>, Kenya Tsuji<sup>1</sup>, Akira Yoshimi<sup>1,4</sup>, Hisashi Miyagawa<sup>1</sup>, Chihiro Tanaka<sup>1,4</sup>

(<sup>1</sup>Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Env. Sci., Univ. of Shiga Pref., <sup>3</sup>RC-TMR, Yamaguchi Univ., <sup>4</sup>Grad. Sch. Glob. Env. Stud., Kyoto Univ.)

## \*P-100

### **染色体喪失実験により見出された, ミツバ株枯病菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cripti* の病原性アクセサリー染色体**

戸畑幸治, 加藤有紀子, 小寺俊丞, 齊藤大幹, 小松健, 有江力 (農工大院・農学府)

*Fusarium oxysporum* (Fo) は 120 種以上の植物に感染する土壌伝染性植物病原菌である。個々の菌株の宿主範囲は狭く, 宿主に応じた分化型 (forma specialis; f. sp.) が種内に置かれている。Fo の病原性や宿主範囲には, 菌の生存に必須でないアクセサリー染色体 (AC) が関与するとされる (Ma et al., 2010)。AC 上には菌と植物の相互作用に関わるエフェクター遺伝子や転移因子が多数見出され, 転移因子によるエフェクター遺伝子の水平伝播等が Fo の病原性分化のドライビングフォースであるとされる (Schmidt et al., 2013)。ミツバ (*Cryptotaenia canadensis* subsp. *japonica*) は株枯病菌 *F. oxysporum* f. sp. *cripti* (Focr) の感染で, 葉脈白化, 維管束褐変, 萎凋, 枯死等の症状を呈する。ゲノム比較等によって, Focr 860926a-1 株が 2 つアクセサリー染色体 AC1 と AC2 を持つことが推定されている。AC1 には, Fo のエフェクターとして知られる Six やキャベツ萎黄病菌 (f. sp. *conglutinans*) で見出されたエフェクターペア *SIX8-PSE1* (Ayukawa et al., 2021) が不完全ながら座乗していた。Focr 860926a-1 を有糸分裂阻害剤ベノミル (15 µg/ml) で処理し, 染色体喪失候補株 B1, B2, B5, B6 を得た。各株の染色体を CHEF 法で分離, さらにサザンハイブリダイゼーションによって, これらが, AC1 および AC2, AC2, AC1, AC1 をそれぞれ喪失していることを見出した。B1, B5, B6 は, 860926a-1 と比べてミツバに対する病原性が低下したが, B2 では病原性は低下しなかった。以上から, Focr において, エフェクターが多く座乗する AC1 がミツバに対する病原性を司るアクセサリー染色体であることが示された。

### **The chromosome-loss experiment identified a pathogenicity-related accessory chromosome of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cripti* infecting Japanese honeywort .**

Koji Tobata, Yukiko Kato, Shunsuke Kotera, Hiroki Saito, Ken Komatsu, Tsutomu Arie

(Grad. Sch. of Agri., Tokyo Univ. of Agri. & Tech)

## \*P-101 (O-16)

### 灰色かび病菌 *Botrytis cinerea* が植物由来の抗菌物質を代謝・排出する機構に関する研究

芦田晃<sup>1</sup>, 黒柳輝彦<sup>1</sup>, パラサグ サラリア アブリエル<sup>1</sup>, 福島啓太<sup>1</sup>, 鈴木孝征<sup>2</sup>, 田中愛子<sup>1</sup>, 佐藤育男<sup>1</sup>, 千葉壮太郎<sup>1</sup>, 小鹿一<sup>1</sup>, 竹本大吾<sup>1</sup> (1名大院・生命農学, 2中部大・応用生物)

灰色かび病菌 *B. cinerea* は、1,400 種以上の植物に感染する多犯性の病原性糸状菌であり、様々な植物種が生産する多様な抗菌物質（ファイトアレキシン）に対して概して高い耐性を持つ。ナス科植物のファイトアレキシンであるカプシジオールやリシチン、ブドウなどの生産するレスベラトロール、アブラナ科植物のブラシニン、マメ科植物のグリセオリンを処理した灰色かび病菌の RNAseq 解析を行ったところ、それぞれのファイトアレキシン処理によって顕著に発現誘導される 20-100 程度の遺伝子が見出され、異なる処理区それぞれで比較的特異的な遺伝子が誘導されていた。特定のファイトアレキシン処理によって誘導される遺伝子群には、処理したファイトアレキシンの解毒化酵素や排出トランスポーターの遺伝子が含まれていたことから、灰色かび病菌は多様なファイトアレキシンの構造あるいは毒性を識別して、適切な耐性機構を活性化できることが示された。本発表では、灰色かび病菌の特殊なファイトアレキシン代謝機構および認識機構の解明のための実験系の確立についても報告する。

### Metabolism and efflux mechanism of *Botrytis cinerea* to a diverse phytoalexins from various plant families

Akira Ashida<sup>1</sup>, Teruhiko Kuroyanagi<sup>1</sup>, Abriel Salaria Bulasag<sup>1</sup>, Keita Fukushima<sup>1</sup>, Takamasa Suzuki<sup>2</sup>, Aiko Tanaka<sup>1</sup>, Ikuo Sato<sup>1</sup>, Sotaro Chiba<sup>1</sup>, Makoto Ojika<sup>1</sup>, Daigo Takemoto<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Grad. Sch. Bioagr. Sci., Nagoya Univ., <sup>2</sup> Coll. Biosci. Biotech., Chubu Univ.)

## P-102

### 我が国におけるアスペルギルスフミガタスの遺伝系統の分布と薬剤耐性に関する研究

Xiaohui He<sup>1</sup>, 楠屋陽子<sup>2</sup>, 萩原大祐<sup>1,3,4</sup>, 豊留孝仁<sup>1,5</sup>, 新居鉄平<sup>1</sup>, Bian Cai<sup>6</sup>, 永山聖樹<sup>7</sup>, 柴田紗帆<sup>1</sup>, 渡邊哲<sup>1</sup>, 高橋弘喜<sup>1,8,9</sup> (1千葉大・真菌, 2NITE・NBRC, 3筑波大・生命環境, 4筑波大・MiCS, 5帯畜大・獣医, 6BGI, 7千葉大・医学薬学府, 8千葉大・分子キラル, 9千葉大・植物科学)

アスペルギルスフミガタスは、難治性感染症肺アスペルギルス症の主要な原因菌である。近年、唯一の経口薬であるアゾール薬に対する耐性株 (AR<sub>Af</sub>) の臨床現場や自然環境での検出率は世界的に増加傾向にあり、深刻な問題となっている。我々は、我が国のアスペルギルスフミガタスの薬剤耐性化の現状を調査するために、日本で分離された 171 株を収集し、それらの性状解析とゲノム解析を進めた。アゾール薬感受性試験の結果、22 株の AR<sub>Af</sub> を確認した。その内 20 株では、薬剤耐性の原因遺伝子である *cyp51A*, *hmg1* の変異を認めた。残りの 2 株については、未知の耐性機構を持った株であることが示唆された。次に、これまで世界で報告されている株のデータを統合して、計 583 株について、その集団構造解析を行い、我が国の分離株の集団構造を特定することを試みた。その結果、5 つの集団に分かれること、さらに我が国の分離株は、3 つの集団に主に属することが明らかとなった。最後に、ゲノムワイド関連解析や回帰分析によって、薬剤耐性化に貢献する遺伝子座の特定を行った。本発表では、これらの成果について議論したい。

### Genomic diversity of the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus* in Japan

He Xiaohui<sup>1</sup>, Yoko Kusuya<sup>2</sup>, Daisuke Hagiwara<sup>1,3,4</sup>, Takahito Toyotome<sup>1,5</sup>, Teppei Arai<sup>1</sup>, Cai Bian<sup>6</sup>, Masaki Nagayama<sup>7</sup>, Saho Shibata<sup>1</sup>, Akira Watanabe<sup>1</sup>, Hiroki Takahashi<sup>1,8,9</sup>

(<sup>1</sup>MMRC, Chiba Univ., <sup>2</sup>NBRC, NITE, <sup>3</sup>Life Env. Sci., Univ. of Tsukuba, <sup>4</sup>MiCS, Univ. of Tsukuba, <sup>5</sup>Dept. Vet. Med., Obihiro Univ. A.V.M., <sup>6</sup>BGI, <sup>7</sup>Med. Pharm. Sci., Chiba Univ., <sup>8</sup>MCRC, Chiba Univ., <sup>9</sup>PMSC, Chiba Univ.)

## P-103 (O-17)

### 植物葉圏の非病原性細菌 *Chitinophaga* sp. はアブラナ科炭疽病菌の病原性を促進する

田中香帆<sup>1</sup>, 田中智佳子<sup>1</sup>, 石田史子<sup>1</sup>, 山口美幸<sup>1</sup>, 竹下典男<sup>2</sup>, 田中茂幸<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>摂南大・農, <sup>2</sup>筑波大・MiCS)

植物葉圏には非病原性細菌群が常在するが、これらが植物病原糸状菌の病原性にどのような影響を与えるかはよく知られていない。我々は、シロイヌナズナ(*At*)の葉から培養可能な細菌群を単離し、*At* に感染する糸状菌であるアブラナ科炭疽病菌(*Ch*)の病原性に与える影響を調べた。各細菌を *Ch* の孢子と共に *At* 葉に接種したところ、*Chitinophaga* 属細菌は有意に *Ch* の病斑形成を促進した。*At* 葉における微生物叢解析の結果、*Chitinophaga* 属細菌は植物葉圏の常在細菌であることが示唆された。次に、”*Ch* のみを接種”および”*Chitinophaga* 属細菌と *Ch* を共接種”した *At* 葉間における植物遺伝子の発現変動解析を行ったところ、両者間で大きな違いは見られなかった。このことから、*Chitinophaga* 属細菌は植物にではなく、*Ch* に影響を与えると考えられた。そこで、*Ch* の孢子と *Chitinophaga* 属細菌をスライドガラス上で共培養し、形態形成を顕微鏡観察した。その結果、*Ch* のみの場合では植物侵入に必須の構造物である付着器が1つの孢子から1つ形成されるのに対し、*Chitinophaga* 属細菌存在下では付着器が1つの孢子から2つ形成された。また、この二次付着器の形成は大腸菌との共培養では誘導されなかった。*Chitinophaga* 属細菌存在下における植物葉上での *Ch* の感染行動を観察すると、スライドガラス上と同じく *Ch* は二次付着器を形成し、またこの二次付着器からも植物に侵入していた。さらに、二次付着器の形成は、*Chitinophaga* 属細菌培養上清のみでも誘導された。以上より、*Chitinophaga* 属細菌の分泌物が *Ch* の二次付着器の形成を誘導し、植物侵入効率を向上させていると考えられた。今後、*Chitinophaga* 属細菌が分泌する物質の同定を試みる。

### Phyllospheric nonpathogenic bacterium *Chitinophaga* sp. promotes virulence of *Colletotrichum higginsianum*.

Kaho Tanaka<sup>1</sup>, Chikako Tanaka<sup>1</sup>, Fumiko Ishida<sup>1</sup>, Miyuki Yamaguchi<sup>1</sup>, Norio Takeshita<sup>2</sup>, Shige-yuki Tanaka<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Faculty of Agriculture, Setsunan Univ., <sup>2</sup>Univ. of Tsukuba, MiCS)

## P-104

### *Aspergillus fumigatus* の細胞死誘導因子の機能解析

宮澤拳, 高塚翔吾, 壇辻百合香, 犬飼達也, 梅山隆, 星野泰隆, 村長保憲, 山越智, 宮崎義継 (感染研・真菌部)

*Aspergillus fumigatus* はアスペルギルス症の主要原因菌種で、宿主による微生物排除機構を逃れる特性を有することが知られる。本研究では卵菌 *Phytophthora parasitica* や糸状菌 *Fusarium oxysporum* で植物細胞のネクロシスへの関与が報告された NPP1 (Necrosis-inducing *Phytophthora* Protein 1) domain を持つ分泌型タンパク質に着目した<sup>1,2</sup>)。NPP1 domain タンパク質は、保存された GHRHDWE モチーフを有する<sup>3</sup>)。遺伝子情報検索の結果、*A. fumigatus* には NPP1 domain を持つタンパク質をコードする遺伝子が三種存在した (Cell Death-inducing Factor; *cdf3a*, *cdf3b* および *cdf5*)。各遺伝子破壊株の病原性を免疫抑制マウスモデルで評価したところ、 $\Delta cdf3a$  株接種群で親株に比べて顕著に生存率が改善した一方、 $\Delta cdf3a$ ,  $\Delta cdf5$  株では親株と同等であった。そこで、*Cdf3a* について更なる解析を進めることとした。 $\Delta cdf3a$  株は微好気環境下の最少培地上で分生子形成能が顕著に低下した。 $\Delta cdf3a$  株は分生子径が親株と比べて僅かに増加し、分生子表面の突起が減少した。 $\Delta cdf3a$  株の分生子細胞壁の厚さについては親株と同等であった。最少液体培地・静置培養時の *cdf3a* 発現量は、分生子発芽後に上昇し、培養 24 h がピークとなり、その後減少した。*Cdf3a*-GFP 発現株を作製して蛍光顕微鏡観察したところ、*Cdf3a*-GFP は主に隔壁に局在した。以上のことから、*Cdf3a* は隔壁が形成される時期に発現し、分生子形成に寄与すると示唆された。肺胞上皮由来 A549 細胞に組換え *Cdf3a* タンパク質を添加したところ、非添加時と比べ死細胞が増加した。現在、*Cdf3a* の *A. fumigatus* の生育における機能と病原性への関与の分子機構および両者を繋ぐメカニズムについて、更なる解析を進めている。1) Fellbrich et al. *Plant J.* (2002) 32:375—390; 2) Bae et al. *Plant Physiol.* (2006) 141:1056—1067; 3) Feng et al. *BMC Plant Biol.* (2014) 14:126

### Functional analysis of cell death-inducing factors in *Aspergillus fumigatus*

Ken Miyazawa, Shogo Takatsuka, Yurika Ikeda-Dantsuji, Tatsuya Inukai, Takashi Umeyama, Yasutaka Hoshino, Yasunori Muraosa, Satoshi Yamagoe, Yoshitsugu Miyazaki

(Dep. Fungal Infect., NIID)

## P-105

### 不適合型炭疽病菌群をツールとして活用した重層的植物免疫システムの体系化

入枝泰樹<sup>1</sup>, 平賀さつき<sup>2</sup>, 伊藤研児<sup>2</sup>, 竹内浩美<sup>2</sup> ( <sup>1</sup>信大・大学院農, <sup>2</sup>信大・農)

植物は環境中に存在する大多数の病原糸状菌を不適合型菌として撃退している。これは植物の非宿主抵抗性と呼ばれ、多くの免疫経路（およびその構成因子）により重層的に構築される。しかし、遠縁の病原糸状菌株を対象とするほど有効な植物免疫に差が生じやすく、糸状菌全般に対する植物の非宿主抵抗性構造を体系的に把握することは困難をとまなう課題となっている。そのような状況下で、我々はモデル植物シロイヌナズナの表皮に対する侵入能に差を示す不適合型菌株を多く含む *Colletotrichum* 属菌（炭疽病菌）を本課題解決にむけた最適な解析ツールとして活用し、重層的植物免疫システムの解明と体系化に着手している。

シロイヌナズナを非宿主とする多くの不適合型炭疽病菌は、シロイヌナズナ上で共通して付着器を形成するが、頑強な非宿主抵抗性の要素である侵入抵抗性により表皮侵入を阻止される。また、表皮のバリアである侵入抵抗性を突破した不適合型炭疽病菌も、侵入細胞のプログラム細胞死をとまなう侵入後抵抗性に菌糸の伸展を阻まれ、感染を阻止される。当研究室では、侵入抵抗性および侵入後抵抗性から構築される非宿主抵抗性の解析に適した炭疽病菌有用株の選抜と、既知および未知の植物免疫因子に関する多様なシロイヌナズナ変異体との関係について前例のない大規模同時スクリーニングを実施しており、本発表では各有用菌株とシロイヌナズナ変異体との相互作用と非宿主抵抗性に寄与する植物免疫因子の網羅的同定について進捗状況を報告する。同属糸状菌群に対する植物免疫の水平および垂直方向の重層構造と、炭疽病菌群とシロイヌナズナの生物間相互作用を分子レベルで解明し体系化することを目指す。

### Systematization of multilayered plant immune system against nonadapted fungi in the genus *Colletotrichum*

Hiroki Irieda<sup>1</sup>, Satsuki Hiraga<sup>2</sup>, Kenji Itoh<sup>2</sup>, Hiromi Takeuchi<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Acad. Assembly, Inst. Agric., Shinshu Univ., <sup>2</sup>Fac. Agric., Shinshu Univ.)

## P-106

### イネいもち病菌の転写因子 Pro1 機能変異によるマイコウイルスの治癒現象

内田百岳<sup>1</sup>, 浦山俊一<sup>2</sup>, 藤晋一<sup>3</sup>, 萩原大祐<sup>2</sup>, 森山裕充<sup>4</sup>, 荒添貴之<sup>1</sup>, 鎌倉高志<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>東理大・創域理工, <sup>2</sup>筑波大・生命環境, <sup>3</sup>秋田県大・生物資源, <sup>4</sup>農工大・農)

イネいもち病菌 (*Pyricularia oryzae*) のイネへの感染拡大は無性的なサイクルにより成り立ち、圃場分離株の大半は有性生殖能を失った雌性不稔性を示す。一方、本病原菌の発生源から分離された一部の菌株は有性生殖能を保持しており、*P. oryzae* は感染地域の拡大に伴って不稔化していったものと推測されている。我々は転写因子である Pro1 の機能喪失が自然界で生じた不稔化の原因の 1 つであること、Pro1 の機能喪失により病班上での分生子離脱率が上昇傾向となることを見出しており、不稔化が本菌の生存戦略の一部であるものとの仮説を立てている。クリ胴枯病菌 (*Cryphonectria parasitica*) においては Pro1 の機能がマイコウイルスの保持に関わるといった報告があり、今回 *P. oryzae* における Pro1 とマイコウイルスとの関連性を検証した。

まず種々のマイコウイルスに感染している *P. oryzae* 分離株 (10 株) の Pro1 配列を調査したところ、全ての菌株で機能型の Pro1 配列が保持されていた。これらの菌株において Pro1 欠損株を作出したところ、生育遅延がみられていた AK199-1 株において複数のコロニーで生育速度の回復がみられた。これらの菌株においては一部のウイルス RNA が検出されず、継代培養により生育速度が回復するコロニーの割合が増加した。以上より、*P. oryzae* においても Pro1 の機能とマイコウイルス保持における関連性が見出され、Pro1 機能の喪失はウイルス感染細胞を治癒してフリー化するという点で菌糸成長に有利な形質をもたらす可能性が示された。

### Dysfunctional Pro1 confers a capability to eliminate Mycovirus in the rice blast fungus

Momotaka Uchida<sup>1</sup>, Shunichi Urayama<sup>2</sup>, Shin-ichi Fuji<sup>3</sup>, Daisuke Hagiwara<sup>2</sup>, Hiromitsu Moriyama<sup>4</sup>, Takayuki Arazoe<sup>1</sup>, Takashi Kamakura<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Sci. Tech., TUS, <sup>2</sup>Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, <sup>3</sup>Bioresour. Sci., Akita Prefect. Univ., <sup>4</sup>Agric., TUAT)

## P-107

### ペクチンによる付着器形成の誘導を示さない *Bipolaris maydis* 突然変異株の解析

徳岡柚月<sup>1</sup>, 安本駿作<sup>1</sup>, 佐波雅史<sup>1</sup>, 辻健也<sup>1</sup>, 吉見啓<sup>1,2</sup>, 泉津弘佑<sup>3</sup>, 河内護之<sup>1</sup>, 本田与一<sup>1</sup>, 田中千尋<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>京大院・農, <sup>2</sup>京大院・地環学, <sup>3</sup>滋賀県大院・環境)

植物病原菌が作る付着器は宿主植物に侵入する際の感染器官である。この付着器の形成は疎水性表面および宿主由来成分を認識することで誘導されると考えられている。植物病原菌 *Bipolaris maydis* の  $\Delta\text{opy2}$  株は疎水性表面上で付着器形成が誘導されないが、植物由来成分であるペクチン存在下では付着器を形成する。しかし、このペクチンによる付着器形成の誘導メカニズムは明らかになっていない。そこで、本研究ではこの誘導メカニズムを明らかにするために、 $\Delta\text{opy2}$  株に対して突然変異処理を行いペクチン存在下において付着器形成の誘導が生じない D493 株を得た。野生株と D493 株との交配試験により、本形質は一遺伝子に支配されている可能性が示唆された。次に、本形質の原因遺伝子を明らかにするため、野生型子孫株と変異型子孫株のゲノム比較を行い、ORF 内に存在する変異を抽出した。抽出した候補変異の周辺をシーケンスした結果、G protein  $\beta$  subunit をコードする遺伝子 *Cgb1* 内の変異が本形質と連鎖していた。次に、野生型 *CGBI* 遺伝子を D493 株に導入したところ、ペクチン存在下において  $\Delta\text{opy2}$  株と同様の付着器形成率を示した。この結果は、本形質の原因遺伝子が *Cgb1* であることを示唆している。G protein は細胞膜表層の受容体が受け取ったシグナルを下流に伝達する役割があることから、*Cgb1* は植物由来成分を認識した後の細胞応答に関与していると考えられる。また、興味深いことに *CGBI* 遺伝子の単独破壊株 ( $\Delta\text{cgb1}$ ) は D493 株 ( $\Delta\text{opy2}\text{cgb1}^{\text{mut}}$ ) および *CGBI* 遺伝子の単独変異株 ( $\text{cgb1}^{\text{mut}}$ ) と比較して顕著な分生子数の低下が認められた。現在、これらの株の付着器形成率を調査している。

### Analyses of a *Bipolaris maydis* mutant strain that does not show appressorium formation induction with pectin

Yuzuki Tokuoka<sup>1</sup>, Shunsaku Yasumoto<sup>1</sup>, Masafumi Saba<sup>1</sup>, Kenya Tsuji<sup>1</sup>, Akira Yoshimi<sup>1,2</sup>, Kosuke Izumitsu<sup>3</sup>, Moriyuki Kawauchi<sup>1</sup>, Yoichi Honda<sup>1</sup>, Chihiro Tanaka<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Glob. Env. Stud., Kyoto Univ., <sup>3</sup>Grad. Sch. Env. Sci., Univ. of Shiga Pref.)

# 発表者索引

<p><b>A</b></p> <p>Akito Nishizawa ..... 78</p> <p>Alexis Borowiak ..... 55</p> <p>Antonio Di Pietro. 43, 88</p> <p><b>B</b></p> <p>Baihaqqi Fahmi ..... 64</p> <p>Bian Cai ..... 94</p> <p><b>C</b></p> <p>Chan Lu ..... 47</p> <p><b>D</b></p> <p>Diana Cecilia Ruiz-Nava ..... 85</p> <p><b>F</b></p> <p>Frédéric Fischer ... 81, 92</p> <p><b>G</b></p> <p>Gayan Abeysinghe 41, 72</p> <p><b>H</b></p> <p>Hubert D. Becker . 81, 92</p> <p><b>J</b></p> <p>Jun-ichi Maruyama .... 47</p>	<p><b>K</b></p> <p>Kahar Prihardi ..... 64</p> <p>Kanae Sakai ..... 50</p> <p>Kazuhiro Iwashita 47, 78</p> <p>Ken-Ichi Kusumoto ... 50</p> <p>Kondo Akihiko ..... 64</p> <p><b>L</b></p> <p>Liyun Liu ..... 50</p> <p><b>M</b></p> <p>Masahiro Ezaki ..... 78</p> <p>Minji Oh ..... 36, 44</p> <p>Myat Htoo San ..... 82</p> <p><b>O</b></p> <p>Ogino Chiaki ..... 64</p> <p><b>R</b></p> <p>Ryousuke Kataoka ..... 78</p> <p><b>S</b></p> <p>Sharon Marie Bahena- Garrido .... 52, 62, 78</p> <p>Suzuki Tomohiro ..... 64</p> <p><b>T</b></p> <p>Takumi Tanaka ..... 50</p> <p>Takuya Katayama ..... 47</p>	<p><b>W</b></p> <p>Wakai Satoshi ..... 64</p> <p><b>X</b></p> <p>Xiaohui He ..... 94</p> <p><b>Y</b></p> <p>Yahong Zou ..... 47</p> <p>Yuko Komatsu ..... 78</p> <p><b>あ</b></p> <p>青木翔吾 ..... 35, 48</p> <p>青西洋平 ..... 70</p> <p>赤田倫治 ..... 63</p> <p>浅井禎吾 .... 35, 37, 47, 48, 84</p> <p>麻田恭彦 ..... 61</p> <p>芦田晃 ..... 42, 94</p> <p>足助聡一郎 ..... 87</p> <p>吾妻友貴 ..... 72</p> <p>阿部敬悦 .... 45, 49, 65</p> <p>阿部多恵 ..... 49</p> <p>安倍史高 ..... 87</p> <p>天井涼太 ..... 37, 84</p> <p>天久まどか ..... 76</p> <p>新居鉄平 ..... 94</p> <p>荒添貴之 ..... 48, 96</p> <p>有江力 ..... 20, 93</p> <p>有岡学 ..... 56, 61, 83</p> <p>安藤直子 ..... 84</p> <p><b>い</b></p> <p>飯塚瑠翔 ..... 85</p> <p>石田博樹 ..... 51</p> <p>石田史子 ..... 43, 95</p> <p>岩橋由佳 ..... 60</p> <p>泉津弘佑 ..... 91, 93, 97</p> <p>和泉尚登 ..... 87</p> <p>井谷綾花 ..... 43, 56, 88</p> <p>一石昭彦 ..... 74, 75</p> <p>市川暉 ..... 45</p> <p>一ノ瀬恵 ..... 56</p> <p>一柳健司 ..... 90</p> <p>伊藤研児 ..... 96</p> <p>糸井史朗 ..... 45</p> <p>伊藤喜之 ..... 75</p> <p>稲岡隆史 ..... 51</p> <p>犬飼達也 ..... 95</p> <p>井上慶士 ..... 46</p> <p>井上実希 ..... 40, 67</p> <p>今井誠 ..... 81</p> <p>今井泰彦 ..... 53</p> <p>入枝泰樹 87, 88, 89, 96</p> <p>岩川瑞希 ..... 87</p> <p>岩下和裕 ..... 52, 62</p> <p>岩間亮 ... 37, 55, 58, 86</p> <p><b>う</b></p> <p>上地敬子 ..... 49, 69</p> <p>上元優 ..... 58</p> <p>内田百岳 ..... 96</p> <p>内田祐衣 ..... 73</p> <p>梅山隆 ..... 95</p> <p>浦山俊一 .... 45, 57, 60, 79, 91, 96</p> <p><b>え</b></p> <p>海老原佳奈 ..... 86</p> <p><b>お</b></p> <p>及川香梨 ..... 53</p>
--	--	--

及川英秋 ..... 36, 50  
大神田淳子 ..... 89  
大澤武留 ..... 88  
太田邦史 ..... 37, 84  
大竹花織 ..... 38, 60  
大津巖生 ..... 85  
大沼司 ..... 70  
小笠原涉 ..... 51, 74  
岡拓二 ..... 39, 44, 62  
岡田茂 ..... 45  
岡橋伸幸 ..... 37, 86  
小川翠 ..... 40, 67  
荻野千秋 ..... 80, 83  
奥崎紗矢 ..... 37, 86  
奥津果優 ..... 52, 76  
尾崎太郎 ..... 35, 37, 47,  
48, 84  
長田裕之 ..... 86  
小鹿一 ..... 42, 94  
織田健 ..... 23, 52, 56  
尾上魁 ..... 85

## か

片岡涼輔 ..... 52  
片山琢也 ..... 36, 39, 41,  
50, 63, 73  
片山葉子 ..... 85  
勝木希 ..... 68  
加藤智江 ..... 66  
加藤直樹 ..... 78, 86  
加藤晴朗 ..... 54  
加藤大志 ..... 65  
加藤雅士 ..... 38, 64, 65,  
72, 80  
加藤有紀子 ..... 93  
加藤好一 ..... 45  
加藤遼 ..... 37, 86  
門岡千尋 ..... 39, 44, 52,  
62, 76  
金子雅弘 ..... 92  
加納裕康 ..... 87  
鎌倉高志 ..... 48, 96

亀山昭彦 ..... 68  
亀山綾音 ..... 64  
河内護之 ..... 36, 44, 63,  
91, 92, 97  
川口剛司 ..... 42, 71, 89  
川添嘉徳 ..... 82  
川富溪舟 ..... 57  
河西建輔 ..... 46  
河村篤 ..... 89

## き

菊池洋輔 ..... 55  
菊間隆志 ..... 59  
菊矢咲季 ..... 42, 71  
岸田凜太郎 ..... 44  
北浦健太朗 ..... 40, 67  
北原昂希 ..... 61  
木村聡 ..... 56  
木村哲哉 ..... 73  
木村真 ..... 84  
桐山寛生 ..... 89

## く

久城哲夫 ..... 81, 92  
楠本憲一 ..... 40, 51, 56,  
62, 70  
楠屋陽子 ..... 94  
工藤健央 ..... 88  
國武絵美 ..... 73  
黒田裕樹 ..... 41, 73  
黒柳輝彦 ..... 42, 94

## こ

小泉慶明 ..... 84  
河野宏光 ..... 37, 84  
小島才卓 ..... 68  
兒島孝明 ..... 72  
小関卓也 ..... 66  
古瀬結萌 ..... 82  
小寺俊丞 ..... 93

後藤正利 ..... 26, 52, 82  
小林元太 ..... 82  
小林拓嗣 ..... 52  
小林吉生 ..... 72  
小深田剛士 ..... 36, 44  
小松健 ..... 93  
五味勝也 ..... 35, 46, 54,  
70, 79  
近藤昭彦 ..... 80, 83

## さ

齋藤直也 ..... 36, 50  
齊藤大幹 ..... 93  
齊藤美緒 ..... 60  
坂本裕一 ..... 53, 77  
酒井香奈江 ..... 40, 56, 62,  
70  
坂根巧 ..... 59  
坂元勇月 ..... 61  
坂本正弘 ..... 36, 44  
坂本菜由 ..... 87  
佐賀裕亮 ..... 81  
佐々木信光 ..... 40, 67  
佐々木優 ..... 87  
佐藤育男 ..... 42, 90, 94  
佐藤志穂 ..... 53  
佐藤良勝 ..... 43, 88  
佐波雅史 ..... 91, 97  
澤田和敬 ..... 52

## し

椎崎一宏 ..... 75  
塩野義人 ..... 66  
志賀結衣 ..... 42, 71  
重宗尚文 ..... 54  
志田洋介 ..... 51, 74  
柴田紗帆 ..... 94  
柴田眞也 ..... 84  
島田尚季 ..... 68, 69  
島袋雛 ..... 69  
清水元樹 ..... 53

志水元亨 ..... 38, 64, 65,  
68, 72, 80  
シャロン マリー バヘ  
ナ-ガリド ..... 52  
ジョン ダミン ..... 35, 46  
新谷尚弘 ..... 35, 46, 70  
新谷智子 ..... 35, 46, 79

## す

周防玲 ..... 45  
菅澤威仁 ..... 41, 72  
菅野純子 ..... 36, 44  
菅原章公 ..... 35, 37, 47,  
48, 84  
鈴木康太 ..... 68  
鈴木聡 ..... 51  
鈴木孝征 ..... 42, 94  
薄田隼弥 ..... 45  
鈴木匡 ..... 67  
鈴木忠宏 ..... 40, 70  
鈴木智大 ..... 80, 83  
鈴木裕満 ..... 64

## せ

関口仁 ..... 66  
関澤大地 ..... 92

## た

平良東紀 ..... 49, 69  
高須賀太一 ..... 64  
高塚翔吾 ..... 95  
高橋俊二 ..... 86  
高橋尚央 ..... 65  
高橋弘喜 ..... 94  
高峯和則 ..... 52, 76  
高谷直樹 ..... 41, 43, 56,  
68, 72, 76, 88  
高山晴香 ..... 53  
竹内浩美 ..... 96  
竹川薫 ..... 46, 55, 57, 59,

66  
 竹下典男 .....41, 43, 56,  
 72, 88, 95  
 武末和穂 .....88  
 武田陽一 .....59  
 竹本大吾 .....42, 90, 94  
 田代英里香 .....93  
 田代康介 .....76  
 立松俊祐 .....81  
 田中愛子 .....42, 90, 94  
 田中香帆 .....43, 95  
 田中茂幸 .....43, 95  
 田中秀逸 .....38, 60  
 田中拓男 .....37, 86  
 田中拓未 .....56, 62, 65  
 田中智佳子 .....43, 95  
 田中千尋 .....63, 85, 90,  
 91, 92, 93, 97  
 田中瑞己 .....40, 67, 75  
 田中優花子 .....75  
 田中大 .....39, 44, 62  
 田邊理子 .....78  
 谷修治 .....42, 71, 89  
 玉置尚徳 .....52, 76  
 玉木裕 .....90  
 玉野孝一 .....53  
 壇辻百合香 .....95

ち

千葉壮太郎 ..42, 90, 94  
 陳俊林 .....83  
 陳博宇 .....55

つ

辻健也...63, 85, 90, 91,  
 92, 93, 97  
 辻遼太郎 .....75  
 土屋玲奈 .....87  
 釣上竜河 .....38, 80

て

寺内裕貴 ..... 63, 65, 93

と

渡嘉敷直杏 . 35, 46, 54,  
 58  
 徳岡柚月 ..... 97  
 土佐幸雄 ..... 87  
 戸田征宏 ..... 41, 72  
 戸所健彦 ..... 31, 51  
 戸畑幸治 ..... 93  
 外山博英 ..... 49, 58  
 豊田早紀 ..... 66  
 豊留孝仁 ..... 94

な

中井汐里 ..... 53  
 長坂実咲 ..... 84  
 中沢威人 .... 36, 44, 77  
 中嶋佑一 ..... 84  
 中谷早希 ..... 71  
 長根悠介 ..... 93  
 永野幸生 ..... 82  
 中道優介 ..... 69  
 中道隆哉 ..... 85  
 中村洸 ..... 79  
 永山聖樹 ..... 94  
 七反田和 ..... 59  
 成川礼 ..... 77

に

西岡佐和子 ..... 75  
 西谷篤 ..... 52  
 二宮章洋 ..... 45  
 丹羽隆介 ..... 86

ぬ

沼澤里佳 ..... 75  
 沼本穂 ..... 78

ね

根岸透子 ..... 47

の

野川俊彦 ..... 86

は

萩原大祐 .... 57, 60, 79,  
 91, 94, 96  
 箱田倫子 ..... 66  
 橋本真宇 ..... 56  
 畠山晋 ..... 38, 60, 67  
 服部祥平 ..... 85  
 浜中祐弥 ..... 41, 73  
 バラサグ サラリア ア  
 ブリエル ..... 42, 94  
 原崎茜蓮 ..... 72  
 原中実穂 ..... 36, 50

ひ

樋口裕次郎 . 46, 55, 57,  
 59, 66  
 平井剛 ..... 78  
 平賀さつき ..... 96  
 平沢大樹 ..... 74  
 平大輔 ..... 44  
 平田風子 ..... 49, 69  
 平松健太郎 ..... 52, 76  
 廣島杏香 ..... 52

ふ

深澤茉愛 ..... 77

深田文香 ..... 73  
 福島啓太 ..... 42, 94  
 福田良一 ..... 58  
 福原遼一郎 ..... 46, 59  
 福間剛士 ..... 55  
 藤島里佐子 ..... 89  
 藤晋一 ..... 96  
 藤田盛久 ..... 39, 62  
 伏見圭司 ..... 77  
 藤本健志 ..... 74  
 二神泰基 ..... 52, 76, 82  
 二村友史 ..... 86  
 武馬聖二 ..... 45

ほ

星田尚司 ..... 63  
 星野宏季 ..... 77  
 星野泰隆 ..... 95  
 細田柗志 ..... 56  
 堀井悠一郎 ..... 40, 70  
 堀内裕之 37, 55, 58, 86  
 堀千明 ..... 64  
 堀野翔真 ..... 48  
 本田与一 ..... 36, 44, 63,  
 77, 91, 92, 97  
 本田莉夏子 ..... 89

ま

前田一行 ..... 84  
 前田空 ..... 82  
 真壁秀文 ..... 89  
 眞岸範浩 ..... 33  
 榊尾俊介 ..... 68, 76  
 町田雅之 ..... 28  
 町谷和彦 ..... 57  
 松井宏介 ..... 84  
 松沢智彦 ..... 68, 69  
 松下天斗 ..... 83  
 松田一彦 ..... 86  
 松田史生 ..... 37, 86  
 松永恵美子 ..... 66

松原佳耶 ..... 93  
松本琴音 ..... 80, 83  
丸山潤一 ..... 36, 39, 41,  
50, 63, 73

## み

三浦敦士 ..... 90  
三浦綾夏 ..... 72  
三浦大典 ..... 38, 65, 80  
酒造ひなた ..... 43, 88  
水谷治 ..... 49, 58, 69  
南篤志 ..... 36, 50  
宮川恒 ..... 85, 93  
宮崎義継 ..... 95  
宮澤佳甫 ..... 55  
宮澤拳 ..... 45, 95  
宮下正弘 ..... 85

## む

武藤清明 ..... 45  
村長保憲 ..... 95

村口元 ..... 77

## も

森一樹 ..... 76  
森下陽平 ..... 35, 37, 47,  
48, 84  
森田ひづき ..... 58  
守田湧貴 ..... 55, 57, 59  
森山貴博 ..... 78  
森山裕充 ..... 40, 67, 96

## や

安本駿作 ..... 91, 97  
柳澤健斗 ..... 38, 60  
矢野隆章 ..... 37, 86  
矢野剛久 ..... 54  
藪田翔 ..... 85  
藪浩 ..... 65  
山形洋平 ..... 40, 67, 75  
山口誉登 ..... 56  
山口美幸 ..... 43, 95

山越智 ..... 95  
山崎鮎奈 ..... 58  
山崎風雅 ..... 36, 44  
山下秀行 ..... 56, 62  
山田久恵 ..... 66  
山田夕月 ..... 92  
山中晴加 ..... 67  
山本里穂 ..... 43, 88

## ゆ

遊亀翔太 ..... 71

## よ

楊淳児 ..... 37, 58, 86  
横川大祐 ..... 81, 92  
與古田佳世 ..... 49  
吉岡弘史 ..... 36, 50  
吉崎由美子 ..... 52, 76  
吉田裕史 ..... 53  
吉田誠 ..... 85  
吉野航 ..... 74

吉原亮平 ..... 38, 60  
吉見啓 .. 45, 63, 65, 85,  
90, 91, 92, 93, 97  
義本祐介 ..... 85  
寄立麻琴 ..... 78

## り

呂慧 ..... 75  
劉利雲 ..... 62

## わ

若井暁 ..... 80, 83  
和久豊 ..... 40, 70  
渡部昭 ..... 70  
渡邊彰 ..... 61  
渡邊哲 ..... 94  
渡邊青陽 ..... 91  
渡邊夏仁 ..... 51  
渡邊真宏 ..... 66, 69

## 糸状菌分子生物学研究会 会則

1. 本会を糸状菌分子生物学研究会 (Fungal Molecular Biology Society of Japan) と呼ぶ。また本会が開く研究会を糸状菌分子生物学コンファレンス (Conference on Fungal Genetics and Molecular Biology) と呼ぶ。
2. 本会は糸状菌の分子生物学, 細胞生物学, 生化学, 生理学, 遺伝学などの普及発展を目的とする。
3. 本会はその目的を達成するために次の事業を行う。
  1. 研究会及び総会の開催。
  2. 会報の発行。
  3. 関連研究団体との協力事業。
  4. その他, 必要と思われる事業。
4. 本会はその目的に賛同して入会した個人会員及び総会において承認された名誉会員を持って構成する。
5. 本会入会希望者は所定の入会申込書を提出し, 別に定める入会金を納入するものとする。
6. 本会はその運営のため, 会長, 運営委員若干名および会計監査 1~2 名をおく。任期は 2 年とし, 改選は運営委員の推薦と総会の承認による。
  - (1) 会長は本会を代表し, 会務を統括する。
  - (2) 運営委員は運営委員会を構成し会務を審議する。運営委員には庶務, 会計, 編集担当, 広報担当をおく。
  - (3) 本会の会計事務局は会長が指名する会計担当の運営委員の所属する施設に置く。
  - (4) 会計監査は本会の会計を監査する。
7. 本会は事業運営に必要な実費を年会費として個人会員から徴収する。
8. 本会の事務年度は 7 月 1 日から 6 月 30 日までとする。
9. 前事務年度の庶務, 会計については, これを総会において報告し, 承認を得るものとする。
10. 本会則の改定には総会出席者過半数の賛成を必要とする。

以上

### 補則

- (1) 本会則は 2001 年 7 月 1 日より発効する。
- (2) 本会入会金は 1,000 円とする。
- (3) 年会費は一般会員 2,000 円, 学生会員 1,000 円とする。
- (4) 研究会の通知及び会報は, 当該年度までの会費を納入した会員に送付する。
- (5) 2 年度にわたって会費納入のない会員は, その資格を失うものとする。
- (6) 研究会の発表者は, 会員に限るものとする。新入会員の演題申し込みは会費納入の確認を持って受理する。
- (7) 名誉会員は年会費およびコンファレンス参加費を免除する。

### 附則

本会則は, 平成 28 年 11 月 18 日から発効する。

## 糸状菌分子生物学研究会運営委員会名簿

### 会 長

堀内 裕之 東京大学大学院 農学生命科学研究科

### 運営委員

石田 博樹 月桂冠株式会社  
伊藤 考太郎 キッコーマン株式会社  
小笠原 渉 (編集担当) 長岡技術科学大学大学院 技学研究院  
織田 健 酒類総合研究所  
木村 真 名古屋大学生命農学研究科  
岡 拓二 崇徳大学 生物生命学部  
櫻谷 英治 徳島大学大学院 社会産業理工学研究部  
佐野 元昭 金沢工業大学 ゲノム生物工学研究所  
新谷 尚弘 (庶務担当) 東北大学大学院 農学研究院  
曾根 輝雄 北海道大学大学院 農学研究院  
吉見 啓 京都大学大学院 地球環境学堂  
竹下 典男 筑波大学大学院 生命環境科学研究科  
谷 修治 (広報担当) 大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科  
丸山 潤一 (会計担当) 東京大学大学院 農学生命科学研究科  
山形 洋平 東京農工大学大学院 農学研究院

### 会計監査

加藤 雅士 名城大学 農学部

### 第 22 回糸状菌分子生物学コンファレンス実行委員

櫻谷 英治 徳島大学大学院 社会産業理工学研究部  
浅田 元子 徳島大学大学院 社会産業理工学研究部  
阪本 鷹行 徳島大学大学院 社会産業理工学研究部  
松沢 智彦 香川大学 農学部

## 糸状菌遺伝子研究会賛助会員（50音順）

株式会社秋田今野商店  
天野エンザイム株式会社  
イチビキ株式会社  
大関株式会社  
菊正宗酒造株式会社  
キッコーマン株式会社  
月桂冠株式会社  
合同酒精株式会社  
三和酒類株式会社  
新日本化学工業株式会社  
Spiber 株式会社  
寶酒造株式会社  
公益財団法人日本醸造協会  
公益財団法人野田産業科学研究所  
ノボザイムズ・ジャパン株式会社  
白鶴酒造株式会社  
八海醸造株式会社  
株式会社ビオック  
ヒガシマル醤油株式会社  
株式会社樋口松之助商店  
ヒゲタ醤油株式会社  
株式会社フジワラテクノアート  
マルコメ株式会社  
名糖産業株式会社  
ヤマサ醤油株式会社  
株式会社雪国まいたけ

第 22 回糸状菌分子生物学コンファレンス要旨集

令和 5 年 11 月 1 日 印刷

令和 5 年 11 月 1 日 発行

発行者

糸状菌分子生物学研究会

編集者

小笠原 渉

〒940-2188 新潟県長岡市上富岡町 1603-1

長岡技術科学大学工学研究院