

目次

コンファレンスプログラム	2
発表演題及び講演時間	3
特別講演要旨	14
シンポジウム講演要旨	16
一般講演要旨	29
ポスター発表講演要旨	39
代表発表者索引	82
糸状菌分子生物学研究会会則	84
糸状菌分子生物学研究会運営委員名簿	85

第 10 回糸状菌分子生物学コンファレンスプログラム

日時：2010年11月18日(木)-19日(金)

会場：広島大学 東広島キャンパス

サタケメモリアルホール

(東広島市鏡山1丁目2-2)

主催：糸状菌分子生物学研究会

後援：糸状菌遺伝子研究会

11月18日(木)

- 11:00 - 受付開始
- 12:30 - 12:40 開会の辞
- 12:40 - 14:40 口頭発表 O - 1~10
- 14:40 - 15:00 休憩
- 15:00 - 16:30 ポスター発表 (奇数番号)
- 16:30 - 17:30 特別講演 Prof. Michelle Momany
- 17:30 - 17:45 総会
- 18:00 - 懇親会

11月19日(金)

- 9:30 - 12:30 シンポジウム
「産業界で活躍する糸状菌たち」
- 12:30 - 13:30 昼休み
- 13:30 - 15:00 ポスター発表 (偶数番号)
- 15:00 - 15:10 休憩
- 15:10 - 17:10 口頭発表 O - 11~20
- 17:10 - 17:30 表彰式、閉会の辞

発表演題および講演時間

特別講演 11月18日(木) 16:30-17:30

Polarity in *Aspergillus*: *swo* genes, septins and RNA localization

Professor Michelle Momany
(Department of Plant Biology, University of Georgia)

シンポジウム 11月19日(金) 9:30-12:30

「産業界で活躍する糸状菌たち」

9:30 – 9:35

オーガナイザー挨拶

秦 洋二 月桂冠株式会社

9:35 – 10:10

S-1 「バイオテクノロジーの父、高峰譲吉」

新日本化学工業(株) 顧問

NPO法人高峰譲吉博士研究会 理事長 山本 綽

10:10 – 10:45

S-2 「伝統的な麹菌産業 種麹(もやし)の現状と今後」

(株)樋口松之助商店 山下 秀行

10:45 – 11:20

S-3 「糸状菌由来の産業用酵素—食品加工用酵素を例として」

ノボザイムズ ジャパン(株) 応用技術部 中嶋 康之

11:20 – 11:55

S-4 「医薬品開発に活躍する糸状菌—ミカファンギンを中心として」

アステラス製薬(株) 生物工学研究所 日野 資弘

11:55 – 12:30

S-5 「油脂生産性糸状菌 *Mortierella alpina* による機能性脂質生産」

京都大学大学院 農学研究科応用生命科学 小川 順

一般講演 (O-1~O-10) 11月18日(木) 12:40 - 14:40

- 12:40 O-1 担子菌ヒラタケの子実体形成過程における重力応答遺伝子群の解析
宮崎安将¹, 砂川政英¹, 東端晃², 石岡憲昭², 馬場崎勝彦¹, 山崎丘²
(¹森林総研・きのこ・微生物, ²JAXA・宇宙研)
- 12:52 O-2 麹菌マルトースパーミアーゼ mRNA は Ire1ヌクレアーゼにより切断される
田中瑞己, 新谷尚弘, 五味勝也 (東北大院農・生物産業創成)
- 13:04 O-3 Micafungin 処理によりリン酸化される *Neurospora crassa* の 2 種類の MAP kinase
亀井誠之, 山下和宏, 高橋正和, 一石昭彦, 藤村真 (東洋大院・生命科学)
- 13:16 O-4 麹菌 hydrophobin RolA の PBSA 表面における水平方向可動性
大類景子¹, 田邊弘毅¹, 上原健二¹, 高橋徹², 山形洋平^{2,3}, 阿部敬悦^{1,2}
(¹東北大院・生物産業創成, ²東北大・未来研, ³東京農工大院・応生科)
- 13:28 O-5 麹菌の新規 β -グルコシダーゼ (BglA, BglF) の精製と酵素学的諸性質
工藤佳那子, 氏家成隆, 渡部昭, 新谷尚弘, 五味勝也 (東北大院農・生物産業創成)
- 13:40 O-6 比較ゲノム解析に基づく *Trichoderma reesei* BGLII の機能解析
新田美貴子^{1,2}, 山口香織¹, 中澤光¹, 志田洋介¹, 森一樹³, 平川秀樹⁴, 久原哲³,
森川康¹, 小笠原渉¹ (¹長岡技科大・生物, ²JST, ³九大・生物資源, ⁴かずさ DNA 研究所)
- 13:52 O-7 麹菌フェルラ酸エステラーゼを用いたソフトバイオマス糖化の効率改善
久田博元¹, 波部悦子¹, 石田博樹¹, 秦洋二¹, 近藤昭彦², 植田充美³
(¹月桂冠・総研, ²神戸大院・工・応化, ³京大院・農・応生)
- 14:04 O-8 *Aspergillus nidulans* におけるセルラーゼ遺伝子の発現制御機構
山川陽平, 遠藤良知, 金丸京子, *加藤雅士, 小林哲夫
(名大院・生命農学, *名城大・農)
- 14:16 O-9 固体・液体培養における *Trichoderma reesei* の遺伝子発現挙動
雪真弘, 森一樹, 森川康, 小笠原渉 (長岡技科大・生物系)
- 14:28 O-10 転写因子 AmyR が *Aspergillus nidulans* の二次代謝に及ぼす影響の解析
上村曜介, 鳴神寿昭, 榎尾俊介, 高谷直樹 (筑波大院・生命環境)

一般講演 (O-11～O-20) 11月19日(金) 15:10 – 17:10

- 15:10 O-11 *Talaromyces stipitatus* 由来ポリケタイド合成酵素遺伝子の機能解析
橋元誠, 藤井勲 (岩手医大・薬)
- 15:22 O-12 Spatial gene expression analysis of *Aspergillus fumigatus* during polar growth
Ken Oda, Mara Couto-Rodriguez, Susan Cowden, John Kerry, and Michelle Momany
(Dept. of Plant Biology, Univ. of Georgia)
- 15:34 O-13 *Aspergillus nidulans* における α -1,3-glucan 合成酵素遺伝子 *agsB* 発現制御株の解析
吉見啓¹, 佐野元昭², 藤岡智則³, 水谷治⁴, 萩原大祐¹, 國分優子⁵, 藤川貴史⁶,
西村麻里江⁶, 阿部敬悦^{1,5} (1東北大・未来研, 2金沢工大・ゲノム研,
3クミアイ化学工業㈱, 4酒類研, 5東北大院農・応微, 6生物研)
- 15:46 O-14 麹菌の染色体最小化の試み (第2報)
ヘテロ2倍体の造成を介した7番, 8番染色体が共に短い麹菌の育種
原精一, 金鋒杰, 高橋理, 小山泰二 (野田産研)
- 15:58 O-15 ゲノム科学による麹菌代謝に関わる遺伝子同定と高生産化
小池英明¹, 丸井淳一朗¹, 山根倫子¹, 大橋澄子¹, 安藤朋広¹, 寺林靖宜¹, 佐野元昭²,
大箸信一², 大島栄治³, 立花國治³, 比嘉良喬³, 西村麻里江⁴, 町田雅之^{1,2}
(1産総研, 2金沢工大, 3三省製薬, 4生物研)
- 16:10 O-16 麹菌 *A. oryzae* プロテアーゼ遺伝子10重破壊株による異種タンパク質生産
尹載宇, 丸山潤一, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)
- 16:22 O-17 エノキタケのトランスクリプトーム配列情報を用いた全分泌タンパク質解析
石黒真希, 堀千明, 片山映¹, 五十嵐圭日子, 高島幸司², 金子哲³, 鮫島正浩
(東大院・農生科, 1日医大・生化・分生, 2富山森林研, 3食総研)
- 16:34 O-18 イネいもち病菌のDNA組換え修復の役割
曾根輝雄, Ndindeng Sali Atanga, 工藤亮子, 阿部歩 (北大院農・応生科)
- 16:46 O-19 トウモロコシごま葉枯病菌 (*Cochliobolus heterostrophus*) における
MAPK シグナル伝達経路の多重変異株の作出および機能解析
泉津弘佑, 奥野健太, 齋藤禎一, 森田篤, 吉見啓, 田中千尋 (京大・院・農)
- 16:58 O-20 トマトアルターナリア茎枯病菌が保有する
conditionally dispensable chromosome (CDC)の構造
赤木靖典, 播本佳明¹, 柘植尚志¹, 尾谷浩, 児玉基一郎 (鳥取大・農, 1名大院・生農)

ポスター発表

11月18日(木) 15:00 - 16:30 (奇数番号)

11月19日(金) 13:30 - 15:00 (偶数番号)

- P-1** 蛍光ハイブリプローブを用いた *Neurospora crassa* の新規遺伝子マッピング法の構築
石神陽平, 坂野真平, 山下和宏, 一石昭彦, 藤村真 (東洋大院・生命科学)
- P-2** クエン酸生産糸状菌由来 *ku80* 破壊株における相同組換え効率の向上
本田裕樹, 小林慶一, 桐村光太郎 (早大・理工・応化)
- P-3** 担子菌ウシグソヒトヨタケにおける遺伝子ターゲティングの実現
中沢威人¹, 安達志乃芙¹, 佐野広明², 北秋亘平¹, 金子真也³, 坂本裕一⁴,
中堀清¹, 宮崎安将², 鎌田堯¹
(¹岡山大・理, ²森林総研, ³東工大・生命理工, ⁴岩手生工研)
- P-4** セルラーゼ高生産糸状菌 *Acremonium cellulolyticus* の形質転換系の構築
藤井達也¹, 神名麻智¹, 村上克治¹, 澤山茂樹^{1,2}
(¹産総研・バイオマス研セ, ²京大院・農)
- P-5** 菌類における新たな形質転換体選択マーカーの利用
野田知嗣¹, 吉田真澄¹, 藤田将幸¹, 稲富 聡², 田口悟朗¹, 下坂 誠¹
(¹信州大・繊維・応生系, ²ホクトきのこ総合研究所)
- P-6** 味噌用麹菌 *A. oryzae* KBN630 のホスファターゼ遺伝子 *aphA* 破壊株の取得
安田(吉野) 庄子, 森 昭博, 石原 那美, 長谷川 摂, 伊賀 佳美*, 白石 洋平*,
和久 豊*, 北本 則行 (愛知産技研・食工技セ, * 株ビオック)
- P-7** 油糧微生物 *Mortierella alpina* の多重栄養要求性変異株の構築と諸性質の評価
安藤晃規¹, 田中ゆか¹, 奥田知生², 櫻谷英治², 島 純¹, 小川 順², 清水 昌^{2,3}
(¹京大・微生物科学, ²京大院農・応用生命, ³京都学園大・バイオ環境)
- P-8** 新規麹菌バイオリクターによる飲料中のアクリルアミド分解
加座健士郎, 桐藤万裕, 若泉賢功, 佐野元昭, 尾関健二, 大箸信一
(金沢工大・ゲノム研)
- P-9** 糸状菌類で保存される麹菌の機能未知遺伝子の解析
池田優理子², 富川史子¹, 岩下和裕^{1,2} (1 広島大, 2 酒総研)
- P-10** 実用麹菌株の醸造特性に関する網羅的解析
伊藤岳^{1,2}, 妹尾悠平^{1,2}, 岩下和裕^{1,2}, 山田修² (1 広島大院・先端研, 2 酒総研)
- P-11** 醤油用黄麹菌 (*Aspergillus oryzae* RIB915 株) のゲノムシーケンス解析
藤村 友明, 野村 孝典, 伊藤 岳, 岩下 和裕, 山田 修 (広大先端研, 酒類総合研究所)

- P-12** 清酒用麹菌株間の比較ゲノム解析
野村孝典¹、藤村友明¹、小田健太¹、岩下和裕^{1,2}、山田修² (1: 広島大院・先端研 2: 酒総研)
- P-13** ストレス応答 mRNA 変動解析による麹菌 (*Aspergillus oryzae*) の機能的外来性遺伝子探索
小笠原博信¹、高橋砂織¹、五味勝也² (¹秋田県総食研セ、²東北大院農・生物産業創成)
- P-14** 麹菌 *Aspergillus oryzae* 由来プロテアーゼの麹菌での大量生産
坂東 弘樹¹、石田 博樹¹、秦 洋二¹、楠本 憲一²、山形 洋平³、天野 仁⁴、竹内 道雄³
(¹月桂冠総研、²食総研、³東京農工大・院・応生科、⁴天野エンザイム)
- P-15** *Aureobasidium pullulans* 由来キシラナーゼのシグナル・ペプチド：大腸菌による糸状菌
キシラナーゼの細胞外生産への利用
太田一良、田中秀典、山川大輔、浜砂裕則、藤本仁寿 (宮崎大・農・応生科)
- P-16** 麹菌 *A. oryzae* による味覚修飾タンパク質ミラクリンの生産
山田裕史、根本 崇、尹 載宇、丸山潤一、北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)
- P-17** 麹菌 *A. oryzae* α -アミラーゼ遺伝子破壊株を用いた有用タンパク質生産
根本崇、丸山潤一、北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)
- P-18** 麹菌 α -1,3 グルカン合成酵素遺伝子 *agsB* 破壊による細胞壁の分泌タカアミラーゼ吸着能
への影響
佐藤宏樹、新谷尚弘、五味勝也 (東北大院・農・生物産業創成)
- P-19** 麹菌マルトースパーミアーゼ mRNA は Ire1ヌクレアーゼにより切断される
田中瑞己、新谷尚弘、五味勝也 (東北大院農・生物産業創成)
- P-20** Micafungin 処理によりリン酸化される *Neurospora crassa* の 2 種類の MAP kinase
亀井誠之、山下和宏、高橋正和、一石昭彦、藤村真 (東洋大院・生命科学)
- P-21** *Aspergillus nidulans* におけるプロテインキナーゼ C の極性形成に関わる機能解析
片山琢也、高井弘基、堀内裕之、太田明德 (東大院・農生科・応生工)
- P-22** 担子菌ウシグソヒトヨタケの子実体形成開始におけるクロマチンリモデリング
安藤友貴、中沢威人、佐藤剛士、岡邦彦、秦武史、中堀清、鎌田堯 (岡山大・自然科学)
- P-23** アスペルギルス症病原菌 *Aspergillus fumigatus* におけるレクチンの機能解析
酒井香奈江、大荒田素子、五ノ井透 (千葉大・真菌センター)
- P-24** *Aspergillus nidulans* のガラクトマンナン生合成に関与する遺伝子の同定と機能解析
小町裕司¹、浴野圭輔¹、二神泰基²、竹川薫²、後藤正利²、野村善幸¹、岡拓二¹
(¹崇城大・生物生命・応微工、²九大・院・農)

- P-25** *Aspergillus nidulans* におけるパキシリン様タンパク質 PxIA および PxIB の機能解析
二神泰基¹, 梶原康博², 高下秀春², 大森俊郎², 後藤正利¹ (¹九大院・農, ²三和酒類)
- P-26** 麹菌 *A. oryzae* における小胞体品質管理関連タンパク質の生化学的解析
菊間隆志¹, 渡邊泰祐^{1,2}, 丸山潤一³, 北本勝ひこ³, 伊藤幸成^{1,4}
 (¹理研・基幹研, ²琉球大農・亜熱生資, ³東大院・農生科・応生工, ⁴ERATO, JST)
- P-27** 担子菌 *Coprinopsis cinerea* におけるオートファジーの誘導条件の解析
渡邊 彰, 弥生貴裕, 野地裕太, 麻田恭彦 (香川大・農・応生科)
- P-28** *Aspergillus nidulans* のキチン合成酵素 ChsB 及び CsmA の菌糸内局在化部位の比較
對崎真楠, 堀内裕之, 太田明德 (東大院・農生科・応生工)
- P-29** *Aspergillus nidulans* のキチン合成酵素 CsmA、CsmB における DEK C termnal domain の機能解析
前田隼見, 堀内裕之, 太田明德 (東大院・農生科・応生工)
- P-30** Visualization analysis of stress granules and P-bodies in stress conditions in *A. oryzae*
Hsiang-Ting Huang, Kei Saeki, Hiroyuki Nakano, Katsuhiko Kitamoto
 (Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo)
- P-31** 麹菌 *A. oryzae* における MAP キナーゼ AoFus3 上流の分子生物学的解析
佐々木智江美, 丸山潤一, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)
- P-32** 麹菌 *A. oryzae* における Rab GTPase AoSec4 の分泌経路と細胞極性における機能の解析
中野浩幸¹, 早川雄悟¹, 正路淳也^{1,2}, 有岡学¹, 北本勝ひこ¹
 (¹東大院農生科・応生工, ²エジンバラ大・細胞生物学研究所)
- P-33** 麹菌 *A. oryzae* におけるエンドサイトーシス関連 AAA ATPase AipA の機能解析
樋口裕次郎, 有岡 学, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)
- P-34** 麹菌 *A. oryzae* におけるエンドサイトーシス関連遺伝子 *aipC*, *aipD* の解析
松尾賢人, 樋口裕次郎, 有岡 学, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)
- P-35** 麹菌 *A. oryzae* のペルオキシソームにおけるビオチン生合成経路の解析
矢萩大貴, 田鍋康子, 松尾一郎¹, 丸山潤一, 北本勝ひこ
 (東大院・農生科・応生工, ¹群大院工・応生化)
- P-36** *Neurospora crassa* における殺菌剤フルジオキシニル、イプロジオン耐性菌の出現頻度
矢部秀和, 大竹達也, 穴澤初夫, 藤村真, 一石昭彦 (東洋大・生命科学)

- P-37** アカパンカビにおける CDC42 経路に関わる SCD2 タンパク質の局在解析
安齋洋帝, 高橋正和, 藤村真, 一石昭彦 (東洋大院・生命科学)
- P-38** アカパンカビのシアン耐性呼吸誘導に関与する MFS トランスポーター ANT-1 の解析
高橋正和¹, 館野絢香², 山下和宏¹, 亀井誠之¹, 福森文康¹, 藤村真¹
 (¹東洋大院・生命科学, ²東洋大・生命科学)
- P-39** 紫外線ストレスによるアカパンカビ DNA 修復遺伝子の発現誘導の解析
高橋 司, 畠山奈実, 藤村 真, 一石昭彦 (東洋大・生命科)
- P-40** 麹菌 hydrophobin RolA の PBSA 表面における水平方向可動性
 大類景子¹, 田邊弘毅¹, 上原健二¹, 高橋徹², 山形洋平^{2,3}, 阿部敬悦^{1,2}
 (¹東北大院・生物産業創成, ²東北大・未来研, ³東京農工大院・応生科)
- P-41** 麹菌の新規 β -グルコシダーゼ (BglA, BglF) の精製と酵素学的諸性質
工藤佳那子, 氏家成隆, 渡部 昭, 新谷尚弘, 五味勝也 (東北大院農・生物産業創成)
- P-42** 比較ゲノム解析に基づく *Trichoderma reesei* BGLII の機能解析
新田美貴子^{1,2}, 山口香織¹, 中澤光¹, 志田洋介¹, 森一樹³, 平川秀樹⁴, 久原哲³, 森川康¹,
 小笠原渉¹ (¹長岡技科大・生物, ²JST, ³九大・生物資源, ⁴かずさ DNA 研究所)
- P-43** *Aspergillus aculeatus* 由来 β -glucosidase 1 (BGL1) の N 型糖鎖欠損 variants の作製と解析
馬場祐太郎, 谷修治, 炭谷順一, 川口剛司 (阪府大院・生環科)
- P-44** 麹菌酸性プロテアーゼのイントロン
岡本綾子¹, 森田寛人¹, 前田浩¹, 楠本憲一², 天野仁³, 石田博樹⁴, 山形洋平¹, 竹内道雄¹
 (¹東京農工大院・応生科, ²食総研, ³天野エンザイム・研究部, ⁴月桂冠・総研)
- P-45** 黄麹菌 *Aspergillus oryzae* の分泌型ロイシンアミノペプチダーゼの発現と酵素学的機能解析
松下 (森田) 真由美¹, 多田功生¹, 丸井淳一郎¹, 古川育代¹, 鈴木聡¹, 服部領太¹, 天野 仁²,
 石田博樹³, 山形洋平⁴, 竹内道雄⁴, 柏木豊⁵, 楠本憲一¹
 (¹食総研, ²天野エンザイム, ³月桂冠, ⁴東京農工大・院・応生科, ⁵東京農大・応生・醸造)
- P-46** 麹菌グリシン・D-アラニンアミノペプチダーゼ GdaA の解析
丸井淳一郎¹, 松下 (森田) 真由美¹, 多田功生¹, 古川育代¹, 鈴木聡¹, 服部領太¹, 天野仁²,
 石田博樹³, 山形洋平⁴, 竹内道雄⁴, 楠本憲一¹
 (¹食総研, ²天野エンザイム, ³月桂冠, ⁴東京農工大・院・応生科)
- P-47** 麹菌におけるシステイニルジペプチダーゼの生理学的機能についての検討
服部領太¹, 松下 (森田) 真由美¹, 多田功生¹, 丸井淳一郎¹, 古川育代¹, 鈴木聡¹, 天野仁²,
 石田博樹³, 山形洋平⁴, 竹内道雄⁴, 楠本憲一¹
 (¹食総研, ²天野エンザイム, ³月桂冠, ⁴東京農工大・院・応生科)

- P-48** 麹菌 *Aspergillus oryzae* 由来ファミリーM19 に属するジペプチダーゼの性質
 田中良男¹, 大鹿初恵¹, 千田綾乃¹, 小出芳直¹, 天野仁¹, 山形洋平², 楠本憲一³, 石田博樹⁴,
 竹内道雄²(¹天野エンザイム,²東京農工大院・応生科,³食総研,⁴月桂冠・総研)
- P-49** *A. oryzae* 特異的セリントイプカルボキシペプチダーゼの酵素学的性質
 森田寛人¹, 岡本綾子¹, 前田浩¹, 楠本憲一², 天野仁³, 石田博樹⁴, 山形洋平¹, 竹内道雄¹
 (¹東京農工大院・応生科,²食総研,³天野エンザイム・研究部,⁴月桂冠・総研)
- P-50** 麹菌 (*Aspergillus oryzae*) 由来 tripeptidyl-peptidase の酵素学的比較解析
 前田 浩¹, 森田寛人¹, 岡本綾子¹, 楠本憲一², 天野 仁³, 石田博樹⁴, 竹内道雄¹, 山形洋平¹
 (¹東農工大農・応生科,²食総研,³天野エンザイム,⁴月桂冠・総研)
- P-51** 黄麹菌 *Aspergillus oryzae* におけるクチナーゼのホモログのクローニングとその性質
 柏木豊, 渡辺久美子, 股野麻未, 前橋健二 (東京農大・醸造)
- P-52** 麹菌 cutinase CutL1 の分子表面負電荷アミノ酸による hydrophobin RoIA との相互作用
 村垣公英¹, 上原健二², 高橋徹², 山形洋平^{2,3}, 阿部敬悦^{1,2}
 (¹東北大院・農・生物産業創成,²東北大・未来研,³東京農工大院・農・応生科)
- P-53** 麹菌 *Aspergillus oryzae* の細胞表層タンパク質 Hydrophobin の機能解析
 山川 結, 落合夏紀, 高橋李奈, 中島春紫 (明大・農・農化)
- P-54** 麹菌のヒドロフォービン(HypA)融合タンパク質の生産
 大野真尚, 加瀬明日香, 石田千絵, 堂前圭佑, 高橋李奈, 茂木里紗, 中島春紫
 (明治大農・農化)
- P-55** 麹菌 *A. oryzae* による海洋細菌由来 β -1,3-キシラナーゼの生産
 久田博元¹, 岡崎文美², 石田博樹¹, 荻野千秋³, 秦洋二¹, 近藤昭彦³
 (¹月桂冠・総研,²神戸大・自科研究環,³神戸大院・工・応化)
- P-56** 麹菌 *A. oryzae* により生産した海洋細菌由来 β -1,3-キシラナーゼの酵素学的諸性質
 岡崎文美¹, 仲島菜々実¹, 久田博元², 荻野千秋³, 石田博樹², 秦洋二², 近藤昭彦³
 (¹神戸大・自科研究環,²月桂冠・総研,³神戸大院・工・応化)
- P-57** Heterologous expression, purification, and characterization of β -glucosidases from termites
 Cristiane A. Uchima¹, Gaku Tokuda², Hirofumi Watanabe³, Katsuhiko Kitamoto¹, Manabu Arioka¹
 (¹ Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo; ² Center of Mol. Biosci., Univ. of the Ryukyus;
³ National Inst. of Agrobiol. Sci.)

- P-58** 麹菌 *A. oryzae* を用いたシロアリ腸内原生生物由来グルクロン酸エステラーゼの生産とその性質の検討
 松井真¹, 木原久美子², 小田切正人², 守屋繁春², 坂本康治², 伊藤幸成², 北本勝ひこ¹, 有岡学¹ (¹東大院・農生科, ²理研基幹研)
- P-59** 麹菌 *A. oryzae* によるシロアリ腸内共生原生生物由来マンナーゼの生産
 塚越光¹, 松井真¹, 小田切正人², 守屋繁春², 本郷裕一^{3,4}, 西田有一郎^{2,5}, 北本勝ひこ¹, 有岡学¹ (¹東大院・農生科, ²理研基幹研, ³理研バイオリソース, ⁴東工大, ⁵東北大)
- P-60** *Aspergillus nidulans* におけるセルラーゼ遺伝子の発現制御機構
 山川陽平、遠藤良知、金丸京子、*加藤雅士、小林哲夫 (名大院・生命農学、*名城大・農)
- P-61** *Aspergillus aculeatus* 由来転写因子 AceI の機能解析
 小西宏和, 谷修治, 炭谷順一, 川口剛司 (阪府大院・生環科)
- P-62** 遺伝子タギング法を利用した *Aspergillus aculeatus* cellobiohydrolase I 遺伝子発現制御因子の探索
 國武絵美, 谷修治, 炭谷順一, 川口剛司 (阪府大院・生環科)
- P-63** 麹菌のリン酸獲得系遺伝子制御機構における転写因子
 多田 功生¹, 鈴木 聡¹, 福岡 真里¹, 大口 ひかる¹, 北本 則行², 安田 (吉野) 庄子², 和久 豊³, 白石 洋平³, 伊賀 佳美³, 杉本 達哉⁴, 函師 境子⁴, 楠本 憲一¹
 (¹食総研,²愛知産技研・食工技セ,³ビオック,⁴ナカモ)
- P-64** 麹菌 pal 経路の解析
 佐野元昭, 北川治恵, 堂本光子, 大箸信一 (金沢工大・ゲノム研)
- P-65** *Aspergillus niger* におけるフィターゼ遺伝子 (*PhyA*) プロモーターの解析
 手島沙織¹, 梅原亮介¹, 平光優議¹, 田中隆志¹, 山本 綽², 浅野行蔵¹, 曾根輝雄¹
 (¹北大・院農・応生科,²新日本化学工業)
- P-66** Expressions of genes for fatty acid metabolism and the hydrophobin production in the *farA* disruptants of *A.oryzae*.
 Sharon Marie Garrido¹, Noriyuki Kitamoto², Akira Watanabe¹, Takahiro Shintani¹, and Katsuya Gomi¹(¹Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, Japan; ²Food Research Center, Aichi Industrial Technology Institute, Japan.)
- P-67** 麹菌の転写制御因子 AtrR はアゾール系薬剤により活性化する
 大場歩, 新谷尚弘, 五味勝也 (東北大院・生物産業創成)
- P-68** アカパンカビのストレス応答 MAP キナーゼ下流で制御される転写因子 RCO-1 の同定
 山下和宏, 高橋正和, 亀井誠之, 藤村真 (東洋大院・生命科)

- P-69 赤かび病菌の CREB 型転写因子 *FgATF1* 破壊株の単離とその解析**
齋須秀昭¹, 山下和宏¹, 高橋正和¹, 亀井誠之¹, 木村真², 藤村真¹
(¹東洋大院・生命科学, ²理研・微生物代謝制御)
- P-70 His-Asp リン酸リレー情報伝達系阻害剤のリン酸基転移に与える影響**
野田真奈美, 小暮篤史*, 藤岡智則*, 金丸京子, 加藤雅士**, 小林哲夫
(名大院・生命農学, *クミアイ化学, **名城大・農)
- P-71 転写因子 AmyR が *Aspergillus nidulans* の二次代謝に及ぼす影響の解析**
上村曜介, 鳴神寿昭, 梶尾俊介, 高谷直樹 (筑波大院・生命環境)
- P-72 *Aspergillus niger* 由来 III 型ポリケタイド合成酵素遺伝子の機能解析**
宮井希実, 本田裕樹, 服部貴澄, 桐村光太郎 (早大・理工・応化)
- P-73 麹菌 *Aspergillus oryzae* を宿主とするテレキノン A 異種生産系の構築**
木下 浩, 酒井香奈絵, 仁平卓也 (阪大・生物工学国際交流セ)
- P-74 糸状菌 *Chaunopycnis alba* が生産する M 期キネシン Eg5 阻害剤テルペンドール E は
マイコトキシン生合成の中間体である**
本山高幸, 林敏明, 廣田洋, 植木雅志, 長田裕之 (理研・ケミカルバイオロジー)
- P-75 *Gibberella sacchari* 形質転換体交配後代に生じるハイグロマイシン B 耐性遺伝子の変異
について**
波田野未由来, 寺岡 徹, 有江 力 (農工大院農)
- P-76 イネいもち病菌 Mps1 MAP キナーゼ経路と Pmk1 MAP キナーゼ経路は拮抗しない**
藤川貴史^{1,2}・阿部敬悦³・西村麻里江¹
(¹生物研・²現 農研機構 花き研・³東北大院農)
- P-77 イネいもち病菌における体細胞相同組換えの検出とその特色**
荒添貴之, 大里修一, 有江力*, 倉橋良雄, 米山勝美 (明大農・*農工大農)
- P-78 Yeast Two Hybrid assay によるイネいもち病菌の非病原性遺伝子 *AVR-Pia* のタンパク質
相互作用の解析**
佐藤 佑樹¹, 三木 慎介¹, 尾瀬 農之², 奥山 雄大³, 神崎 洋之³, 寺内 良平³, 曾根 輝雄¹
(¹北大院農・応生科, ²北大院薬・創薬, ³岩手生工研)
- P-79 イネいもち病菌の非病原性遺伝子 *AVR-Pia* の変異機構の解明**
三木慎介, 竹内紗央里, 大塚圭輔, 曾根輝雄 (北大院農・応生科)

- P-80** *Cryphonectria parasitica* RAS3 の変異導入による機能解析
高橋 拓也, 笠原 紳 (宮城大・食産業・環境)
- P-81** 灰色かび病菌における *Sec4* 遺伝子の機能解析
木村駿二, 泉津弘佑、齋藤禎一、小林甫、森田篤、田中千尋 (京大・微生物環境制御学分野)
- P-82** メロンつる割病菌から作出した病原性遺伝子変異株の生物防除活性
神田紘輝^{1,2}, 緒方綾³, 寺見文宏¹, 柘植尚志³, 飯田祐一郎¹
(野菜茶研¹・近畿大農²・名大院生命農³)
- P-83** トマトアルターナリア茎枯病菌のドラフトシーケンス解析により見出された
G タンパク質共役型受容体遺伝子
高尾和美, 赤木靖典, 柘植尚志¹, 尾谷 浩, 児玉基一郎 (鳥取大・農,¹名大院・生農)
- P-84** 近紫外線照射が数種植物病原糸状菌のメラニン生合成遺伝子の発現に及ぼす影響
池島裕輔, 上野誠, 荒瀬栄, 木原淳一 (島根大・生物資源)
- P-85** 米麴プロテオーム解析結果に基づく *Aspergillus oryzae* 遺伝子の網羅的機能解析
北村洋朗^{1,2}, 福原真一郎^{1,2}, 花田照明^{1,2}, 河野美乃里², 山田修², 岩下和裕²
(¹広島大・先端研, ²酒総研)

特別講演

Polarity in *Aspergillus*: *swo* genes, septins and RNA localization

Ken Oda, Thanyanuch Kriangkripipat, Susan Cowden, Yainitza Rodriguez, Mara Couto, John Kerry and **Michelle Momany**; Department of Plant Biology, University of Georgia, Athens, GA 30602 USA; momany@plantbio.uga.edu

The generation of asymmetry, or polarity, is important for organisms ranging from unicellular yeasts to multicellular plants and animals. But, perhaps the most extreme examples of polar growth are found within the filamentous fungi which grow exclusively by tip extension of hyphae. Over the last 15 years we have undertaken several approaches using *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus fumigatus* to better understand the polar growth of filamentous fungi.

In both *A. nidulans* and *A. fumigatus*, dormant conidia are arrested in interphase. When inoculated to medium containing a carbon source, conidia synchronously break dormancy and begin nuclear division and morphological development. This synchrony has allowed us to characterize early development and polarity. When the uninucleate conidia of *A. nidulans* germinate, they first grow isotropically. Soon after the first round of mitosis the cell establishes an axis of polarity and the primary germ tube emerges [1]. The third mitotic division triggers formation of the first septum near the basal end of the germ tube. Only the polarly extending tip cell, remains mitotically active. Mitosis is followed by a wave of septation that partitions the tip cell proceeding from tip to base. Subapical compartments are arrested in interphase. This subapical interphase arrest is only released when a branch forms from the compartment, establishing a new axis of polarity.

swo genes and Pmts. In a screen of an *A. nidulans* temperature-sensitive collection, we identified eight genes whose mutation led to defects in polarity, and designated them *swo* (swollen) genes [2]. One of these genes, *swoA*, was shown to encode a protein mannosyl-transferase (Pmt) [3]. (Pmts) catalyze the transfer a mannosyl residue to the hydroxyl group of serine or threonine within target proteins [4]. In *S. cerevisiae* many secreted and cell wall proteins are modified by Pmts. Our group and the group of Masatoshi Goto have shown that *A. nidulans* contains three Pmts and that disruption of the Pmts in *A. nidulans* leads to a variety of phenotypes in addition to temperature-sensitivity and loss of polarity [5,6]. We have recently further explored the ability of Pmts to modify specific substrates, but have not yet identified which substrate(s) are responsible for maintaining proper polar growth.

Septins. Septins, GTPases first observed at the yeast septum between the mother cell and daughter bud, are increasingly considered to be novel cytoskeletal elements with roles as diverse as those of actin and tubulin. Found in animals, fungi and microsporidia, septins have been shown to be important for cell division, preventing diffusion of cellular materials, coordination of nuclear division, vesicle trafficking and organization of actin filaments and microtubules [7,8]. There are five septins in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans* [9]. In previous work, we used polyclonal antibodies to show that the most-highly expressed septin, AspB/Cdc3, localizes to septa, emerging secondary germ tubes and branches, and

developing conidiophores [10]. We have recently shown that deletion of *A. nidulans* septins *aspA* and *aspC* perturbs polarity establishment as seen by hyperbranching in deletion mutants [11].

RNA localization. Transcription of key mRNAs is often limited to certain times in the life cycle or cell cycle. We analyzed RNA levels during the isotropic to polar switch in *A. fumigatus*, a pathogen of the immunocompromised. Surprisingly, microarray experiments did not show an increase in the transcription of polarity genes during the switch from isotropic to polar growth. To investigate asymmetric mRNA localization, we used laser microdissection with pressure catapulting (LMPC) to harvest conidium, base and tip regions from hyphae. RNA isolated from these hyphal samples was then deep sequenced using 454. Preliminary results suggest that many RNAs are asymmetrically localized in hyphae.

References Cited

1. Momany M, Taylor I (2000) Landmarks in the early duplication cycles of *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus nidulans*: polarity, germ tube emergence and septation. *Microbiology* 146: 3279-3284.
2. Momany M, Westfall PJ, Abramowsky G (1999) *Aspergillus nidulans swo* mutants show defects in polarity establishment, polarity maintenance and hyphal morphogenesis. *Genetics* 151: 557-567.
3. Shaw BD, Momany M (2002) *Aspergillus nidulans* polarity mutant *swoA* is complemented by protein O-mannosyltransferase *pmtA*. *Fungal Genet Biol* 37: 263-270.
4. Strahl-Bolsinger S, Gentzsch M, Tanner W (1999) Protein O-mannosylation. *Biochim Biophys Acta* 1426: 297-307.
5. Kriangkripiat T, Momany M (2009) *Aspergillus nidulans* protein O-mannosyltransferases play roles in cell wall integrity and developmental patterning. *Eukaryot Cell* 8: 1475-1485.
6. Goto M, Harada Y, Oka T, Matsumoto S, Takegawa K, et al. (2009) Protein O-mannosyltransferases B and C support hyphal development and differentiation in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* 8: 1465-1474.
7. Gladfelter AS (2006) Control of filamentous fungal cell shape by septins and formins. *Nat Rev Microbiol* 4: 223-229.
8. Kinoshita M (2006) Diversity of septin scaffolds. *Curr Opin Cell Biol* 18: 54-60.
9. Momany M, Zhao J, Lindsey R, Westfall PJ (2001) Characterization of the *Aspergillus nidulans* septin (*asp*) gene family. *Genetics* 157: 969-977.
10. Westfall PJ, Momany M (2002) *Aspergillus nidulans* septin *AspB* plays pre- and postmitotic roles in septum, branch, and conidiophore development. *Mol Biol Cell* 13: 110-118.
11. Lindsey R, Cowden S, Hernandez-Rodriguez Y, Momany M (2010) Septins *AspA* and *AspC* are important for normal development and limit the emergence of new growth foci in the multicellular fungus *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* 9: 155-163.

シンポジウム

S-1

「バイオテクノロジーの父、高峰譲吉」

山本 緯

(新日本化学工業(株) 顧問)

(NPO法人 高峰譲吉博士研究会 理事長)

はじめに

タカジアスターゼの成功で一躍有名になった高峰譲吉は晩年日本への帰国願いもむなし、くわが国政財界の強い要望で米国に留まり日本のため、日本人のために日米親善に尽くし彼の地に骨を埋めた。ニューヨークのブルックスにあるウッドローン墓地の案内書には、デンプン消化酵素の企業化とアドレナリンの結晶化により、「近代バイオテクノロジーの父」(Father of Modern Biotechnology)として紹介されており、またワシントン市への桜の寄贈についても紹介されている。高峰博士が生涯通じて精魂傾けた仕事は日米親善であり、酵素の研究開発・企業化であった。ニッポン・クラブ、ジャパン・ソサイエティー、日本人協会、日米協会などの日米親善事業、理化学研究所創立のきっかけとなった国民科学研究所構想などはさておいてここでは酵素、特に高峰博士の成し遂げた麴菌の酵素についてご紹介させていただく。

日本酒醸造からウイスキーへ

高峰博士が日本酒の醸造や麴に関心を抱くようになったのは工部大学校(現東京大学工学部)の学生時代からであろう。明治初期にはいわゆる“お雇い外人教師”が多数明治政府に寄り招聘され、中にはパスツールのお弟子さんでもあったアトキンソンなど日本酒の高度な醸造技術に強い関心を抱き日本酒醸造の研究に情熱を傾けた化学者もいた。英国留学から帰国して農商務省の役人となり日本の近代化・工業化のために欧米の技術導入が強く求められた時代であっても高峰は欧米の先進技術の導入であれば欧米からそれぞれ専門の技術者を招聘すれば良いという持論を持っていた。そして高峰は日本古来の伝統的な産業、それも日本酒や醤油などの発酵食品のみならず、藍や和紙などまで発酵と関連する日本の伝統的産業に関心を抱いて、役人時代でも研究を続けていた。

農商務省の役人時代には高橋是清を補佐して我が国の特許・商標制度の確立に勤めた。これはその後高峰が生涯において世界各国で100余りの特許、および「タカジアスターゼ」や「アドレナリン」などの商標を確立することに繋がった。しかもその多くは酵素とその利用に関するものである。渋沢栄一に偶然あって化学肥料製造の必要性を説いたのもこの頃で、灘の日本酒醸造の指導をしていた時である。農商務省を辞して東京人造肥料の立ち上げに専念している時でも日本酒醸造など発酵についての研究を続けて「麴を利用してアルコールを作る」という特許を1887年には英国で、翌年にはフランスとベルギーで特許を成立させ、1889年には米国でも成立させた。この特許がシカゴのウイスキー・トラストに目をつけられ、1990年には一家を上げて、また麴つくりのために丹波杜氏の藤木幸助を連れて米国へ移住することになった。しかしウイスキー製造は技術的には成功するのだが、それまでの酵素の給原であった麦芽製造業者などの大反対にあい、新設の工場も放火と思われる火災で焼失してしまい、本人も肝臓病を再発して入院手術となる。

酵素の宝庫タカジアスターゼの誕生

そのような苦しみの中から生まれたのが世界初の微生物酵素製品、タカジアスターゼである。この成功は工部大学の後輩で農商務省や特許局の後輩でもあった清水鉄吉という秀才の存在なしでは考えられない。高峰が病床にあっても研究が出来たのは清水を 1892 年に米国に招いて研究に従事させていた。一連のタカジアスターゼ関連の特許が 2 年後の 1894 年に米国で成立するが、当時の米国の大手製薬メーカー、パーク・デービス社との交渉はその前年 1893 年から始まる。その交渉の過程で高峰は消化剤としての利用は同社にお任せするが、製パンなど他の用途に関しては新会社を設立するなり、別途事業化したいと言ったようだ。それに対して同社の社長は驚いて全ての用途に対して同社で実施させてもらいたいと申し入れるのである。今から 100 年以上も前に高峰は酵素の多様な用途の可能性を理解していたのである。

第一次世界大戦勃発直前に、高峰は長男を学位取得のため、パリのパスツール研究所に送っている。研究テーマもなかなか決まらない息子に高峰が薦めた研究テーマは醤油麴の研究である。高峰自身が学生時代からやりたかった仕事である。醤油麴はたんぱく質分解力が強く、いいプロテアーゼの給源になるかもしれない。それが出来ればチーズを始め、ブロメラインに変わる消化剤までいろいろな用途に使えるのではないかと盛んに薦めるのである。この高峰親子はアスペルギルス、ペニシリウム、ムコール属などのカビから、アミラーゼ、プロテアーゼ、リパーゼ、レンネットなどの酵素を作るという米国特許を取得している。

おわりに

麴とその酵素を基に今求められている研究開発にもとづくベンチャー・ビジネスを 100 年以上も前に米国に乗り込んで成功させたのが高峰譲吉である。今世紀はバイオの時代といわれている。地球環境保全のために酵素は必須であり今後一層の進展を期待したい。

Dr. Jokichi Takamine, Father of Modern Biotechnology

Yutaka Yamamoto

Advisor, Shin Nihon Chemical Co., Ltd.

Director, NPO of The Jokichi Takamine Research Foundation

伝統的な麹菌産業 種麹(もやし)の現状と今後

山下 秀行

(株式会社 樋口松之助商店)

1. はじめに

カビは黴菌などと呼ばれ一般にはイメージが悪いが、我々日本人は、古来よりカビの仲間である麹菌の有用性を見出し、日本独自の醗酵食品の製造に利用してきた。麹菌を用い米・麦・大豆などの穀物を用いて造られる麹は、長寿国日本の食生活の基礎を支えてきた味噌や醤油などの調味料の製造に必須のものである。また、人々の交流の場や晴れの日に欠かすことの出来ない嗜好品である清酒や本格焼酎においては、酵母が造るアルコールや華やかなかおりに目を奪われがちであるが、麹無くしてはその風味は形成されない。これら以外に、麹は、酢・みりん・甘酒・漬物などの製造にも用いられており、我々の食生活に幅を広げてくれている。これらの製品に「麹カビ」そのものの姿を感じることはないが、麹が生産する多種多様な酵素の働きによる生成物や、麹の代謝成分がその根幹を成しており、まさに麹は「縁の下の力持ち」なのである。糸状菌を利用した産業は数多くあるが、ここでは、日本における麹文化の発展に貢献してきた種麹にスポットをあて、その現状についてお話しし、今後についても考えてみる。

2. 種麹製造業について

麹菌が単離され命名された明治9年(1876年)を機に、種麹に関する記録が多く見られるようになり、明治初期には、自然種・友種・自生種で麹造りが行われていたことが伺える。その後、種麹の販売を目的とした種麹業者が生まれ、本格的な供給が始まった。現在、日本で種麹の製造を行っているのは15社ほどあるが、その中で全国展開している会社は8社であり、各社特徴のある種麹を販売している。

3. 現在の種麹

販売の形態

大きく分けて、培地である穀物に孢子が着生した粒状品(粉碎品)と、それから孢子のみ篩い分けたものに α 化でんぷんで増量した粉状品とがある。弊社の場合、味噌・醤油に関してはほぼ100%粉状品であり、清酒や本格焼酎においてもその約80%を占める。

種麹の育種

販売初期は、清酒用としての醗・醪用の2種類しかなく使用菌株も限られたものであったが、明治時代後半における、清酒用種麹からの3株の変異種や、清酒や醤油麹などからの14株の分離に端を発し、古典的なスクリーニング法による選択が主としてなされてきた。その間、自然変異による取得も行われ、各社の保有する菌株数は飛躍的に増加し、現在では数百株を保有している。その後、菌株の育種において明確な目標を掲げ、人工変異による菌株の開発が醸造試験所などの研究機関を中心に行われ、有用株も上市されている。

菌株

現在、醸造用としては、黄麹菌:*Aspergillus (A.) oryzae*, *A. soja* と、黒麹菌:*A. awamori*, *A. luchuensis* (var. *kawachii*), *A. tubingensis*, *A. saitoi* などが用いられている。醤油・本格焼酎・みりん・酢に関しては、主に原料の分解率を重視しており、醤油の場合はプロテアーゼ系の酵素を、

本格焼酎ではクエン酸およびアミラーゼ系の酵素産生能が高い菌株を中心に選択するなど、菌株への要求が比較的はつきりしているため、単一菌株での育種が行い易い。一方、清酒においては、原料の溶解度が微量の香気成分に影響することや、原料を溶かし過ぎると雑味成分が増えることなどから、酵素産生量よりそのバランスが重視されるため、複菌による調整が必要な場合が多く、その留型も多様である。味噌は、半固形状の半分解物であり、その度合いが各メーカーの特長となっており、原料の違いや配合比など製法の違いも反映し、地域色の強いものとなっていることから、種麴の選択肢は幅広い。このように、酵素産生能の多寡や現場における適応度を指標に、菌株の選定や混合比などの微調整が行われている。

4. 今後の種麴

今後も麴製造用のスターターとしての役割を担って行くことに変わりはないが、変わりつつある日本人の食習慣や好みの多様化に伴い、種麴の面からの対応も望まれている。種麴は、食品への使用であるという点が最重視され、また、嗜好品であることから極端な性質の変化は好まれないことや、発酵食品の製法も画一化されたものではないことなどから、現場における菌株の育種は緩やかなものにならざるを得ない。しかし、解決すべき課題点や、育種の目的が明確である場合には、以前のような力仕事による育種ではなく、近年の育種技術の進歩などを利用した開発速度の短縮が期待される。一方、麴菌の遺伝子配列が決定し、ポストゲノム時代における研究が本格化した今、醸造において不要なアフラトキシンの生合成遺伝子や、清酒製造における黒粕発生の原因となるチロシナーゼの遺伝子破壊などの技術は確立し、各種高発現ベクターの開発なども進んでいることから、麴菌への応用にも期待が高まるが、遺伝子操作を行った麴菌を食品の製造に使用することに関しては、消費者の容認が得られておらずその技術は応用の面で滞っているという現実がある。

今後は、種麴としての利用だけではなく、麴菌の長年の利用歴が物語るように、我々が保有する麴菌株は、異種蛋白・有用物質・微量物質生産のための安全な宿主として利用出来るものであり、異分野への展開も望まれる。

5. おわりに

種麴の育種・利用に関しては、今後もこれまでの知見や経験を基に試行錯誤を繰り返しながら緩やかにそして連綿と続いて行くであろう。近年、「麴菌」の利用において最大の懸案であった安全性が遺伝的に証明されたことは、麴菌を販売する我々にとって本当に心強い。また、これまで現場で経験的に伝えられてきた現象や操作の妥当性が、次々と科学的に解明されてきており、今後の展開がますます期待される。技術的には遺伝子組み換えによる有用麴菌の育種法は確立しているといっても過言ではないが、それらの食品への応用には消費者の拒絶という高いハードルがあり、現状は、麴菌の研究者にとっては、技術の進歩との狭間でジレンマを感じることであろう。今、そしてこれからも蓄積されるであろう大量で有益な情報を現実の範囲内で生かせることを模索することも必要であり、遺伝学的な解明とともに実用化を視野に入れた研究の進展を期待する。

Traditional Koji-Mold Industry , Koji Starter (MOYASHI) : Now and the Future

Hideyuki Yamashita

Higuchi-Matsunosuke-shoten Co., Ltd.

S-3

糸状菌由来の産業用酵素—食品加工用酵素を例として

中嶋康之

(ノボザイムズ ジャパン株式会社 応用技術部)

糸状菌由来の産業用酵素は、現在さまざまな食品分野で使用されている。たとえば、パンのボリューム増大に寄与するアミラーゼ、リパーゼならびにキシラナーゼ、エキス調味料分野でタンパク質を分解してアミノ酸を生成し、うまみを増強するプロテアーゼ、油脂加工に用いられるリパーゼ、果汁搾汁用のペクチナーゼなどが挙げられる。

油脂加工の分野では、近年、マーガリンなどに含まれるトランス脂肪酸を低減する技術として、糸状菌由来の固定化リパーゼを用いた、酵素エステル交換法が注目されている。

マーガリンなどに含まれるトランス脂肪酸については、最近の研究から動脈硬化など健康に悪影響を引き起こすとされる結果が出ており、米国やカナダ、韓国、アルゼンチンなどの国では、栄養成分表示の一環として、食品への含有量表示を義務付けている。日本においても、消費者庁がトランス脂肪酸の健康への影響を評価するとともに、食品への表示義務化を検討しているところである。

油脂のエステル交換によるトランス脂肪酸低減の技術としては、他に化学触媒を用いた化学エステル交換法が存在するが、最近では、化学法と比べて副生成物が少なく、エネルギー消費量の削減などが可能な酵素法が、世界的に使用されるようになってきた。固定化リパーゼを用いた酵素エステル交換法によるトランス脂肪酸低減技術を、ノボザイムズ社の最近の知見をもとにご紹介する。

糸状菌由来食品用酵素例

分野	酵素	応用例
澱粉加工	α -アミラーゼ、グルコアミラーゼ	澱粉分解、澱粉糖製造
蛋白質加工	プロテアーゼ、ペプチダーゼ	エキス、調味料製造、機能性ペプチド
ワイン・果汁	ペクチナーゼ	果汁清澄、ワイン搾汁収量向上
油脂加工	リパーゼ	油脂エステル交換、高度不飽和脂肪酸製造、機能性油脂製造
	ホスホリパーゼ	精油（脱ガム）
製パン	α -アミラーゼ	製パン(ふくらみ効果)、老化防止
	ヘミセルラーゼ	製パン(ふくらみ効果)
乳製品	リパーゼ	チーズ製造、フレーバー製造

Table 1. 油脂のエステル交換における酵素法と化学法による副生成物の比較

	Main By products	Source
CIE (化学法)	Soaps, Methyl esters, Diglycerides, Tocopherol esters, Sterol esters, dialkyl ketones, colour bodies	Non specific nature of the catalyst resulting in intermediate reaction products
EIE (酵素法)	FFA, DAG	Initial water in granule, eliminated after 2-3 bed volumes if not by conditioning

Table 2. 油脂中性化の酵素エステル交換法への影響

Treatment	PV	pH	V1/2
Nil	0.6-1.2	4.2	909
Neutralized	0.6-1.2	6.4-6.7	2214
Nil	8.1	4.8	316
Neutralized	7.9	6.2	481

Two oil samples 70% PS 30% CNO of low and high PV, tested in standard MBA set up

PV:過酸化値、V1/2:固定化酵素半減期

Industrial enzymes from *Aspergillus sp.* – Application examples in food industries

Noriyuki Nakashima

Application technology, Novozymes Japan Ltd.

医薬品開発に活躍する糸状菌－ミカファンギンを中心として

日野資弘

(アステラス製薬(株) 生物工学研究所)

【はじめに】

深在性真菌症は、癌患者、AIDS 患者や免疫抑制剤を投薬中の患者など、免疫能が低下した患者に見られる感染症である。近年、患者の増加と重篤化が見られるようになり、有効性と安全性の両面で満足できる治療薬のニーズが高くなってきている。真菌は動物細胞と異なり、細胞壁を有している。

我々は、抗真菌剤の選択的な標的として、真菌細胞壁の主要構成成分であるグルカンに注目し、1, 3- β -D-グルカン合成阻害剤を探索した。その結果、福島県いわき市の土壌より分離された糸状菌 *Coleophoma empetri* F-11899 の培養液中より、構造中に硫酸エステル基を有する新規環状リポペプチド化合物 FR901379 を発見した。

ミカファンギンは FR901379 の脱アシル体に最適化された合成側鎖を導入して創生された新規キャンディン系抗真菌剤である。ミカファンギンは 1, 3- β -D-グルカンの生合成を特異的に阻害し、深在性真菌症の主要起因菌である *Candida* 属及び *Aspergillus* 属に対し抗真菌作用を示す。臨床開発の結果、日本、アメリカ、ヨーロッパ、アジアの医療現場で *Candida* 属及び *Aspergillus* 属を起因菌とする真菌血症、呼吸器真菌症、消化管真菌症に対する優れた治療効果と高い安全性を有す真菌感染症治療薬として用いられている。

【FR901379 の発見】

抗真菌活性を示す物質は醗酵ブロス中に数多く認められる。しかし、ほとんどのものが非特異的な作用を示すものであり、また病態モデルで薬効を示さないものである。そこで、このようなノイズの中から効率的に目的の 1, 3- β -D-グルカンの合成阻害剤を探索するために、*Candida albicans* や *Aspergillus fumigatus* への抗真菌作用と共に細胞変形をスクリーニングの指標とした。長年の抗細菌剤の探索研究を通じ、細胞壁合成阻害剤の与える形態的特徴を抗真菌剤の探索研究にも応用し、真菌細胞壁合成阻害物質による真菌細胞の膨化誘導作用を観察した。更に、病態での有効性はマウスを用いた *Candida albicans* の消化管感染モデルを用いて調べた。

その結果、福島県いわき市の土壌より分離された糸状菌 *Coleophoma empetri* F-11899 の培養液中より、*Candida albicans* や *Aspergillus fumigatus* 細胞の膨化を誘発し、1,3- β -D-グルカン合成酵素を特異的に阻害し、マウスの感染モデルに有効性を示す WF11899 物質群を発見した。WF11899 物質群は環状リポペプチド化合物の Echinocandin 群に属すが、構造中に硫酸エステル基を有するというユニークな新規化合物群であった。他の Echinocandin 群の化合物が水に難溶性であるのに対して、WF11899A 物質 (FR901379) は水に易溶であり、医薬品のシードとして大きな優位性を有していた。しかし、FR901379 は溶血活性を有し、副作用が懸念されたことから、より安全な化合物を創出するために、構造変換をする必要があった。Lilly 社の研究者の報告を参考に側鎖を変換した FR131535 が、抗真菌活性は若干低下するものの、溶血活性が大きく改善したことから、アシル側鎖の変換の可能性が示唆された。アシル側鎖の最適化を進めるに当たり、WF11899 物質群の中から、抗真菌

活性、感染モデルにおける有効性などを評価し、WF11899A(FR901379)をシード化合物として選択した。

リポペプチド抗真菌剤の探索を継続する中で図1に示したように、4種類の糸状菌から環状ペプチド部分やアシル側鎖に構造の多様性を有する化合物群を得ることができた。また、FR901379生産菌と分類学的には同じ*Coleophoma empetri*から、スルホン酸基のエステル化部位がFR901379とは異なる化合物も取得したが、活性が大きく改善した化合物は得られなかった。

合成研究の結果、図2に示したミカファンギンが取得された。ミカファンギンはFR901379の脱アシル体に最適化された合成アシル側鎖を付加することで得られる新規抗真菌剤で、*Candida albicans* や *Aspergillus fumigatus* の臨床分離株に対して広く抗真菌活性を示し、マウスを用いた感染防御実験においても高い有効性を示した。

開発を進める中でFR901379の脱アシル体を大量に得るために、新規な脱アシル酵素の取得が必要となったが、詳細は工業化研究の項に記載する。

【ミカファンギン中間体の工業化研究】

Coleophoma empetri F-11899の培養液中には多くの類縁物質が生産されるので、主成分の生産量や脱アシル体の酵素反応収率および精製純度を上げることが、最終製品としての医薬品に求められる品質を保証するために必要である。

まず、醗酵原体FR901379物質の生産性向上を目的に、野生株F-11899株を用い8世代にわたる育種改良を行い、約50倍に生産性が向上した工業用生産菌株を得た。

FR901379醗酵は培養液の粘性が極めて高く、生産量がばらつくこと、発泡性があることなどが課題であった。そこで、培地成分として、粘性抑制効果のある硫酸アンモニウム水を選択し、発泡の抑制には油の添加と消泡剤を増量した。更に、アンモニウムと糖の連続添加のフェドバッチ法を採用し、粘度の低減と約2倍の生産性の向上を実現した。しかし、ロット間のばらつきは解消しなかったことから、更なる低粘性化・安定化検討を実施し、醗酵槽内の培養液を完全に混合する時間を短縮できる攪拌翼として神鋼環境ソリューション社製のフルゾーン翼を導入した。その結果、より一層の粘性の低下、生産性の安定化、発泡抑制効果が得られ、ロット間のばらつきも大幅に減少した。

合成中間体である脱アシル体を高反応収率かつ高精製純度で製造するために、アシラーゼ生産菌の簡便かつ効率的なスクリーニング法を確立し、環境分離の野生株をスクリーニングした結果、新規なアシラーゼ生産菌として*Streptomyces* sp. No. 6907株を取得した。本株の醗酵によるアシラーゼの生産においては、菌糸が断片化するような菌株への育種改良と低粘性の培養液となる培地成分を組み合わせ、かつ攪拌によるボルテックス効果で物理的に消泡させる培養法の開発に成功した。

FR901379醗酵液には母核が同じで側鎖の長さが異なる類縁物質も数多く併産されている。また、FR901379は水溶液中ではミセルを形成するので、定量することは難しい。そこで、Brij-35を希釈液として用いた、簡便で高感度なHPLC分析系を開発することにより、生産物の正確な定量化が可能になり、製造ノウハウ開発に大きく寄与した。

粗精製工程にはハイポラス型吸着樹脂を用い、粗FR901379を取得した後、*Streptomyces* sp. No. 6907株の酵素を用いた脱アシル酵素反応を実施した。脱アシル体FR179642は極性が高くなり、通常の吸着樹脂への吸着力が極端に弱くなる。そこで、FR179642に対する保持力が強い樹脂を選択し、クロマト溶出を行い、純度95%以上のFR179642を得た。更に

結晶化検討を行い、結晶の粒度分布をコントロールするために「温度スウィング法」を、結晶水分をコントロールするために「真空度制御乾燥法」を導入し、最終的に 99%以上の高純度中間体を生産スケールで製造するノウハウを確立した。

【まとめ】

糸状菌 *Coleophoma empetri* F-11899 株の生産する新規リポペプチド化合物の FR901379 を原体として、放線菌の脱アシル酵素を用いた微生物変換反応と有機合成によるアシル側鎖の付加反応により創製したミカファンギンは、深在性真菌症の主要起因菌である *Candida* 属及び *Aspergillus* 属に対し抗真菌作用を示し、世界の医療現場で真菌血症、呼吸器真菌症、消化管真菌症に対する優れた治療効果と高い安全性を有す治療薬として用いられている。

【参考文献】

- 1) Iwamoto, T. *et.al.* J.Antibiotic, 47, 1084-1091 (1994)
- 2) Iwamoto, T. *et.al.* Abstr.33rd ICAAC, No.F37, New Orleans, USA, 1993
- 3) Yamashita, M., *et al.* Seibutsu-kogaku, 83,123-131 (2005)
- 4) Hino, M. *et.al.* J.Ind. Microbiol Biotechnol, 27, 147-162 (2001)
- 5) Hashimoto, S. J Antibiot 62:27-35 (2009)
- 6) Kanda, M. *et.al* J. Bioscience and Bioengineering, 107,530-534 (2009)
- 7) Ueda, S. *et. al.* J. Antibiotics, 63, 65-70 (2010)

Fungi as a Rich Source of New Drugs -

- Development of Micafungin -

Motohiro Hino Ph.D.

Vice President

Fermentation and Biotechnology Labs.

Technology

Astellas Pharma Inc.

図 1. リポペプチド系抗真菌剤の化学的多様性と生産菌の多様性

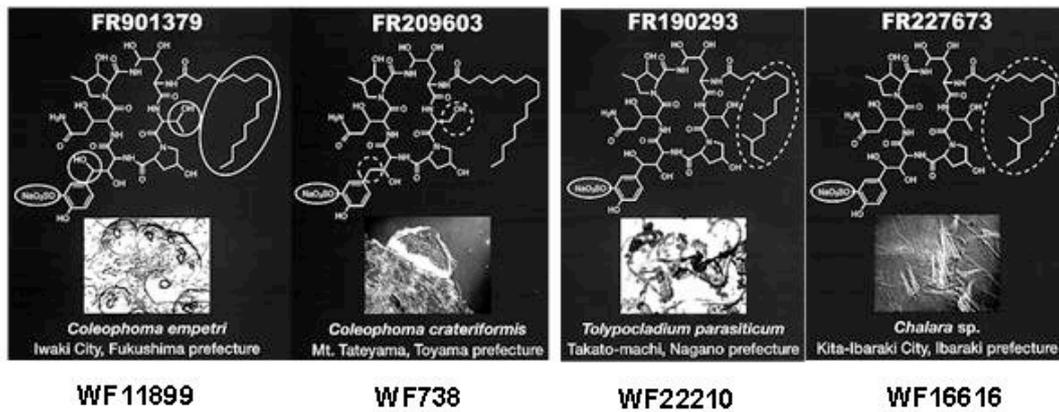
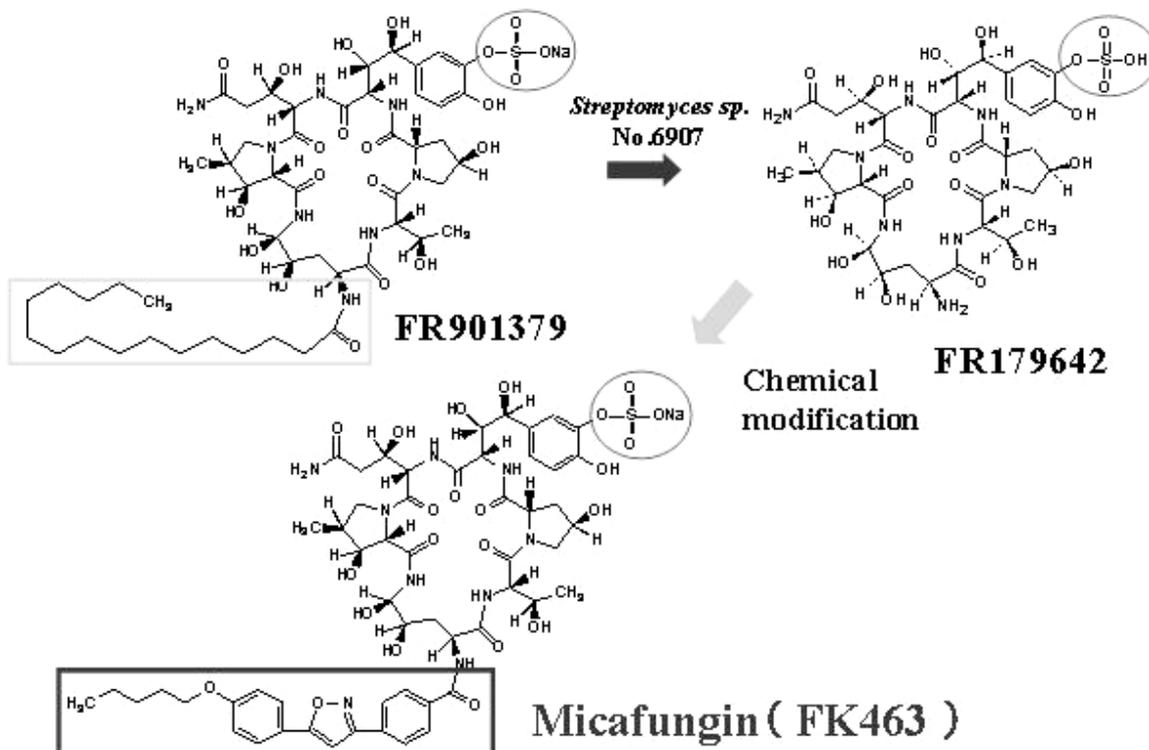


図 2. ミカファンギンの製造プロセス

Micafungin 製造プロセス



油脂生産性糸状菌 *Mortierella alpina* による機能性脂質生産櫻谷英治¹、安藤晃規²、小川 順^{1,2}、清水昌^{1,3}(1京大院農・応用生命、²京大・微生物科学、³京都学園大・バイオ環境)

1980 年頃までは、微生物が大量に生成・蓄積することができる脂肪酸は、炭素数が 18 以下で不飽和結合数が 1 か 2 のものしか知られておらず、特徴的な脂肪酸を生産するとは認識されていなかった。その後、*Mucor* 属や *Mortierella* 属糸状菌が γ -リノレン酸 (18:3n-6) やアラキドン酸 (AA; 20:4n-6) を著量含有する油脂の生産菌株として見いだされた。これを契機に、微生物を用いて油糧植物や動物油脂からは得がたいユニークな機能性脂質を生産する試みが多方面からなされるようになり、いわゆる「発酵油脂 (Single Cell Oils)」の実用生産への道が拓かれた。以来、発酵油脂の研究を筆頭に、機能性脂質生産に微生物機能を活用する研究が最近の脂質工学研究における主要な分野となっており、新規な高機能性脂質を供給する手段として食品・医薬品分野から高い注目を集めている。

本講演では、我々が取り組んでいる微生物機能を活用する機能性脂質生産研究の中から、アラキドン酸生産性糸状菌 *Mortierella alpina* を用いる様々な高度不飽和脂肪酸 (PUFA) 含有油脂の生産研究を紹介する。

1. *Mortierella alpina* 1S-4 株の育種

アラキドン酸はプロスタグランジンなどの前駆体として重要であるだけでなく、乳児の発育に必須であることも注目されている。野生株 *M. alpina* 1S-4 は著量のアラキドン酸を蓄積することからアラキドン酸の工業生産菌として利用されている。本研究では、*M. alpina* 1S-4 から様々な脂肪酸不飽和化酵素 (DS) 活性欠損変異株ならびに鎖長延長酵素 (EL) 活性欠損変異株を化学的変異剤処理により取得し、代謝工学的手法を駆使して、図 1 に示すような多岐にわたる C20 PUFA を選択的あるいは同時に大量に生産できることを初めて示した。例えば、 $\Delta 5$ DS ならびに $\Delta 12$ DS 活性欠損変異株は、それぞれ、これまで適当な供給源が知られていなかったジホモ- γ -リノレン酸 (DGLA; 20:3n-6)、ならびにミード酸 (MA; 20:3n-9) の実用生産株としてそれぞれ利用できることを示した。ジホモ- γ -リノレン酸はアトピー性皮膚炎に、ミード酸は関節炎に有効であることが報告され注目されている。また、 $\Delta 6$ DS 活性欠損変異株ならびに鎖長延長酵素活性欠損変異株においては、それぞれ、天然には希少であるメチレン非挿入型 PUFA 含有油脂、ならびに、n-7 および n-4 系の PUFA を生産することが可能であった。

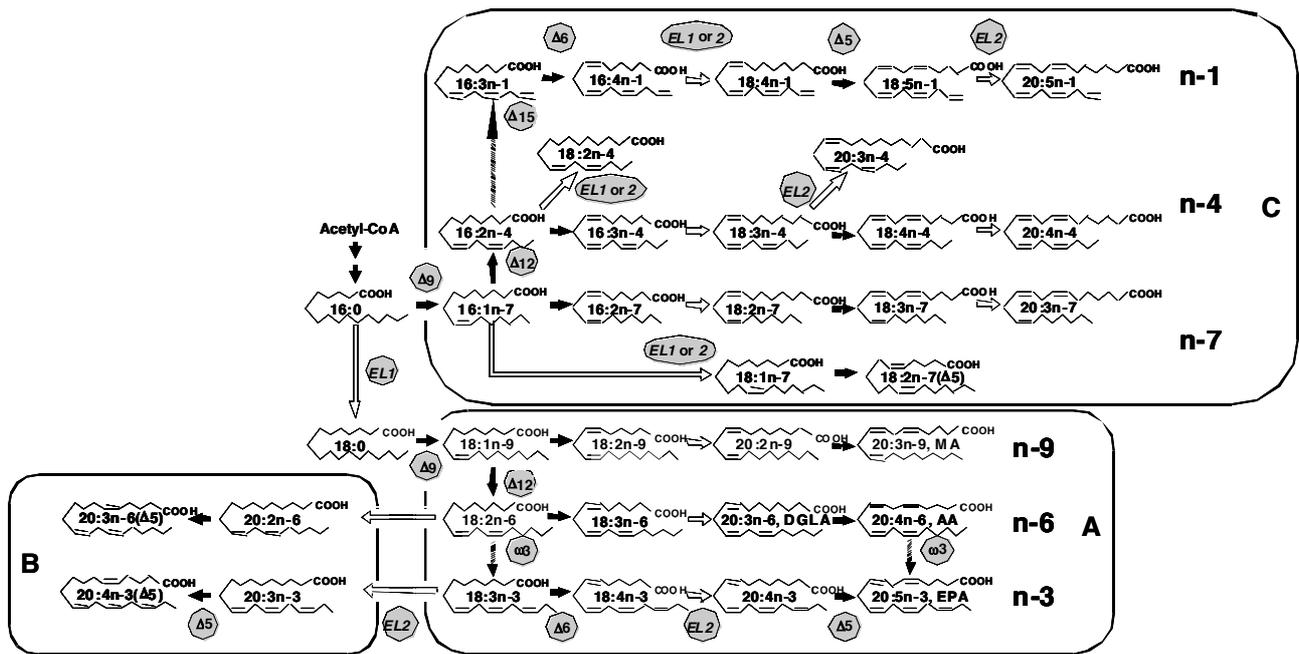


図 1. 糸状菌 *M. alpina* 1S-4 およびその変異株における PUFA の生合成経路
 図中の $\Delta 9$ 、 $\omega 3$ などは脂肪酸のそれぞれの番号の位置に二重結合を挿入する不飽和化酵素 (DS) を、EL は鎖長延長酵素を表す。

さらに、培養液中にトリアシルグリセロールを総脂質の 10~40%漏出する変異株を取得し、連続培養による総生産量の向上や脂質精製の簡便さにつながることを期待できる菌体外脂質生産の可能性を示した。様々な不飽和化酵素活性欠損変異株から脂質漏出変異株を誘導し、アラキドン酸だけでなくジホモ- γ -リノレン酸やミード酸の菌体外生産も可能とした。また、漏出脂質が培養液中に均一に分散することに寄与していると考えられる膜構成成分として、セレブロシドを同定した。脂質の菌体外漏出機構解明が今後の課題である。

2. PUFA 生合成に関与する酵素遺伝子の構造と機能の解明

図 1 で示した PUFA 生合成経路を分子レベルで解明するために、*M. alpina* 1S-4 の脂肪酸不飽和化反応に必要な電子伝達に関与するタンパク質及び図 1 に示したすべての不飽和化酵素と鎖長延長酵素をコードする遺伝子の構造と機能を網羅的に解明した。同時に、 $\Delta 9$ DS、 $\Delta 6$ DS にはそれぞれアイソザイムがあり、個々の転写量が異なることを明らかにした。また、これまでに取得した様々な不飽和化酵素活性低下変異株の変異部位を同定し、不飽和化酵素活性に必須なアミノ酸残基を明らかにした。

3. 宿主ベクター系の開発と分子育種株による PUFA 生産

薬剤耐性とウラシル要求性を指標とし、*M. alpina* 1S-4 の胞子に対してパーティクルガン法やアグロバクテリウム法により遺伝子を導入する形質転換系

を確立した。この技術を用いて、表 1 で示すように不飽和化酵素や鎖長延長酵素の過剰発現あるいは RNAi により様々な C20 PUFA の生産性を向上させることに成功した。さらに、これまでに取得した有用変異株の形質転換系も構築し、変異株がもつ特性を利用した分子育種による PUFA 生産を可能とした。すなわち、アラキドン酸、ジホモ- γ -リノレン酸、ミード酸だけでなくエイコサペンタエン酸 (EPA; 20:5n-3) やエイコサテトラエン酸 (20:4n-3) といった n-3 PUFA の生産性向上に成功した。

表 1 *M. alpina* の分子育種による PUFA 生産

PUFA	宿主	ターゲット 遺伝子	方法	生産技術の特徴
AA	JT-180 (Δ 12DS 欠損株)	Δ 12DS	過剰 発現	JT-180 は Δ 12DS 活性が欠損し、 Δ 5DS と Δ 6DS 活性が高まった変異株である。 Δ 12DS 活性を復帰させることで AA 生産性が高くなる。
AA	野生株	EL2	過剰 発現	AA 生合成の律速と考えられている EL2 活性を高めることで AA 生産性が高くなる (4.4 g/l)。
20:3n-6(Δ 5), 20:2n-6	野生株	Δ 6DS	RNAi	Δ 6DS 活性低下により 20:3n-6(Δ 5), 20:2n-6 が蓄積する。
EPA	野生株	ω 3DS	過剰 発現	EPA の生産性が高くなる(0.8 g/l, 30%)。
20:4n-3	S14 (Δ 5DS 欠損株)	ω 3DS	過剰 発現	20:4n-3 の生産性が高くなる(1.8 g/l, 35%)。
MA	野生株	Δ 12DS	RNAi	Δ 12DS 活性低下により 20:3n-6(Δ 5), 20:2n-6 が蓄積する。
16:0, 16:1n-7	野生株	EL1	RNAi	EL1 活性低下により 16:0 が蓄積し、さらに Δ 9DS により 16:1n-7 が蓄積する。
n-4/n-7 PUFA	M1 (EL1 活性低下株)	MAELO	RNAi	AA などの n-6 PUFA の割合が減少し、n-4/n-7 PUFA の生産性が高くなる。
n-7 PUFA	M1	Δ 12DS	RNAi	n-4 PUFA の割合が減少し、n-7 PUFA の生産性が高くなる。
18:0, PUFA	野生株	MAELO	RNAi	22:0, 24:0 が生合成されなくなり、18:0 とそれに続く PUFA の生産性が高くなる。
22:4n-6, 22:5n-3	野生株	<i>PavELO</i> , ω 3DS	過剰 発現	C20 PUFA を C22 PUFA へ変換する微細藻類 <i>Pavlova</i> sp. の <i>elongase</i> (<i>PavELO</i>) と <i>M. alpina</i> の ω 3DS 遺伝子の共発現により、22:4n-6 と 22:5n-3 が生合成される。

- [1] E. Sakuradani, A. Ando, J. Ogawa, and S. Shimizu. Improved production of various polyunsaturated fatty acids through filamentous fungus *Mortierella alpina* breeding. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 84, 1-10 (2009).
- [2] 櫻谷英治, 安藤晃規, 小川 順, 清水 昌. 機能性脂質の微生物による生産 -アラキドン酸に関連する油脂の発酵生産を中心として-. 蛋白質 核酸 酵素, 54, 725-734 (2009).

Functional lipid production by an oil-accumulating fungus *Mortierella alpina*

Jun Ogawa (Professor, Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto University)

O-1

担子菌ヒラタケの子実体形成過程における重力応答遺伝子群の解析

宮崎安将¹, 砂川政英¹, 東端晃², 石岡憲昭², 馬場崎勝彦¹, 山崎丘² (¹ 森林総研・きのこ・微生物, ² JAXA・宇宙研)

きのこの子実体はその形成過程において、顕著な重力屈性(重力に逆らうこと)を示す。そこで微小重力環境を模倣する装置 3D-クリノスタットを用いて、宇宙環境を想定した担子菌ヒラタケの子実体の発生を試みた。その結果、得られた子実体は地上の重力とは関係なく培地面と常に反対方向へと向かう表現型を示した。また、かさの厚さが薄くなるとともに柄(茎)の長さが短くなるという現象も観察された。

この重力応答を引き起こす分子機構を同定するため、微少重力下で形成された子実体由来の遺伝子発現産物のサブトラクション(差し引き)を行い、重力に応答する遺伝子プールを作製した。それら遺伝子群の塩基配列解析の結果、重力に応答する遺伝子として計 36 種類(微少重力下で発現が上昇するもの 17 種、発現が減少するもの 19 種)の遺伝子が得られた。発現が上昇する遺伝子として、RNA ヘリカーゼ、各種プロテアーゼ、チューブリン、チアゾール合成酵素、分子シャペロン、脂肪酸脱飽和酵素、脱リン酸化酵素、ファイトトキシンなどが、発現が減少する遺伝子として、細胞外レクチン、フィブリラリン、ヘモリン、ヒストン、アルギニン合成酵素、グリコーゲン合成酵素、転写因子 TFIIA γ などの遺伝子が存在していた。これらの結果は、微少重力下における子実体形成が「抑制されている」さまをうかがわせる。きのこの子実体形成にとって重力はストレスの一つであり、重力が弱い方がより生体活動に負担が少ないのかもしれない。

担子菌細胞は分化が進んだ全ての細胞からいつでも個体の再生が可能ないわゆる「幹細胞(stem cell)」であり、また重力に対して明らかな多細胞的形態変化をあらわす「最も単純な真核生物」でもあると言える。本結果は、生物の重力応答解析モデル生物としてのきのこの有用性を示す一例である。

Molecular cloning of gravity-responsive genes during fruiting body development in the basidiomycete *Pleurotus ostreatus*.

Yasumasa Miyazaki¹, Masahide Sunagawa¹, Akira Higashibata², Noriaki Ishioka², Katsuhiko Babasaki¹, Takashi Yamazaki². (¹Dept. Appl. Microbiol., FFPRI, ²Inst. Space Astronaut. Sci., JAXA)

O-2 (P-19)

麴菌マルトースパーミアーゼ mRNA は Ire1ヌクレアーゼにより切断される

田中瑞己, 新谷尚弘, 五味勝也 (東北大院農・生物産業創成)

真核生物において mRNA は Xrn1 による 5'-3' 分解経路と Ski 複合体-エキソソームによる 3'-5' 分解経路によって分解される。一方、近年、小胞体に局在する mRNA が小胞体膜貫通型エンドヌクレアーゼ Ire1 によって切断されることが報告されている。麴菌において Xrn1 および Ski 複合体構成因子である Ski2 と Ski3 の遺伝子破壊株をそれぞれ作成した結果、興味深いことに ski2 および ski3 破壊株はマルトースやデンプンを単一炭素源とする培地において特異的に著しく生育が抑制された。

生育が抑制される原因について解析する過程で、それぞれの遺伝子破壊株においてマルトースパーミアーゼ (*malP*) 全長をプローブとしてノーザンブロッティングを行った結果、ski2 および ski3 破壊株において特異的に低分子のシグナルが観察された。*malP* の coding region 配列内に Ire1 による切断を受けると考えられる配列が存在したことから、*malP* の前半部分をプローブとしてノーザンブロッティングを行った結果、ski2 および ski3 破壊株において低分子のシグナルが観察された。このことから、ski2 および ski3 破壊株においては、Ire1 によって切断を受けた *malP* mRNA の前半部分がエキソソームによる分解を受けずに蓄積していることが示唆された。さらに、ストップコドンを持たない mRNA からリボソームを解離すると予想される HbsA の遺伝子破壊株でも、ski2 および ski3 破壊株と同様に *malP* mRNA 前半部分が蓄積していた。hbsA 破壊株はマルトースやデンプン培地において生育が抑制されなかったことから、ski2 および ski3 破壊株では蓄積した *malP* mRNA 前半部分が翻訳されることにより生育が抑制される可能性が示された。

mRNA encoding maltose permease could be cleaved by Ire1 endonuclease in *Aspergillus oryzae*.

Mizuki Tanaka, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi

(Div. Biosci. Biotechnol. Future Bioind., Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ.)

O-3 (P-20)

Micafungin 処理によりリン酸化される *Neurospora crassa* の 2 種類の MAP kinase

亀井誠之, 山下和宏, 高橋正和, 一石昭彦, 藤村真 (東洋大院・生命科学)

出芽酵母では、形態形成や細胞壁の損傷に応答した細胞壁の再構築(Cell Wall Integrity:CWI)が Slt2 MAP kinase を中心に厳密に制御されている。モデル糸状菌 *Neurospora crassa* には 2 つの MAP kinase, MAK-1(出芽酵母 Slt2 オルソログ)と MAK-2(出芽酵母 Pheromone 応答経路 Fus3 オルソログ)が存在するが、これらの機能については不明な点が多い。*N. crassa* の MAK-1 及び MAK-2 の CWI への関連性を明らかにするため、まず、 $\Delta mak-1$ と $\Delta mak-2$ の表現型を調べた。いずれの破壊株においても、野生株よりも顕著な生育遅延や子嚢胞子形成能に異常が見られた。beta-1,3-glucan 合成酵素阻害剤 micafungin に対する感受性は、 $\Delta mak-1$ が野生株よりもやや高い感受性を示し、 $\Delta mak-2$ はさらに高い感受性を示した。Western blotting によるリン酸化解析により、MAK-1 は胞子発芽から菌糸生育における恒常的リン酸化を示す一方、MAK-2 が micafungin 処理により顕著にリン酸化された。さらに興味深いことに、 $\Delta mak-2$ では MAK-1 の恒常的リン酸化が消失し、MAK-1 は micafungin 特異的にリン酸化された。また、 $\Delta mak-1$ においては MAK-2 のリン酸化に変化は認められなかった。これらのことから、CWI には MAK-1 と MAK-2 が協調的に機能することが推定された。*mak-1* 及び *mak-2* の発現量を real-time RT-PCR により定量化したところ、菌糸生育時における基礎発現量は *mak-2* の方が高く、micafungin 処理時に両遺伝子発現量は変動しなかった。現在、micafungin により誘導される細胞壁合成酵素遺伝子群と、それら遺伝子群の MAK-1 及び MAK-2 MAP kinase 依存性について解析を行っている。

Two MAP kinases, MAK-1 and MAK-2, were phosphorylated by micafungin treatment in *Neurospora crassa*.

Masayuki Kameji, Kazuhiro Yamashita, Masakazu Takahashi, Akihiko Ichiishi and Makoto Fujimura

(Grad. Sch. of Life Sci., Toyo Univ.)

O-4 (P-40)

麹菌 hydrophobin RolA の PBSA 表面における水平方向可動性

大類景子¹, 田邊弘毅¹, 上原健二¹, 高橋徹², 山形洋平^{2,3}, 阿部敬悦^{1,2}

(¹ 東北大院・生物産業創成, ² 東北大・未来研, ³ 東京農工大院・応生科)

麹菌は生分解性プラスチックである PBSA (Polybutylene succinate-co-adipate) を唯一の炭素源として培養すると、PBSA 分解酵素の cutinase CutL1 と共に、hydrophobin RolA を発現する。RolA は PBSA に吸着することにより初めて CutL1 をリクルートすることができる。その結果 PBSA 表面上に CutL1 が濃縮され、PBSA 分解効率を上昇させる。一方、hydrophobin は一般的に固体表面を完全に被膜した状態で強固に結合し、タンパク質を変性させない限り、剥がれない特徴を持つ。にもかかわらず、CutL1 の PBSA 分解を阻害していないことから、RolA は吸着後に水平方向へ移動している可能性が示唆された¹⁾。PBSA はぬれ性として中間的な性質を持つため、RolA-PBSA 間の相互作用として、“疎水性相互作用”と“静電的相互作用”が関与すると予想した。RolA には疎水性アミノ酸に富んだ領域 (Cys7-Cys8 ループ) が存在し、C7-C8 ループ中の Leu137 と Leu147 をそれぞれ Ser に置換した変異体の PBSA 吸着量は顕著に低下していたことから、PBSA への吸着に疎水性相互作用が関与することが示唆された。PBSA 分解実験において、C7-C8 ループ中の Lys130 / Asp134 / Asp136 を Ala に置換した変異体の分解能は上昇していたことから、変異体の RolA の吸着量は上昇したと考えられた。一方で、可動性には変化が見られず、より大規模な疎水度の変化が必要と考えられた。さらに、塩濃度依存的に可動性が低下したことから、異なる pH 条件下での可動性が異なることから、疎水性相互作用とともに静電的相互作用も可動性へ関与することが示唆された。

1) Takahashi *et al.*, *Mol Microbiol.* 57: 1780-1798 (2005)

Horizontal mobility of *Aspergillus oryzae* hydrophobin RolA on PBSA surface

Keiko Orui¹, Hiroki Tanabe¹, Kenji Uehara¹, Toru Takahashi², Youhei Yamagata^{2,3}, Keietsu Abe^{1,2}

(¹ Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., ² NICHe., Tohoku Univ., ³ Tokyo Univ. of Agric. and Tech.)

O-5 (P-41)

麴菌の新規 β -グルコシダーゼ (BglA, BglF) の精製と酵素学的諸性質

工藤佳那子, 氏家成隆, 渡部 昭, 新谷尚弘, 五味勝也 (東北大院農・生物産業創成)

我々は麴菌ゲノムデータベースをもとに新規セルロース系バイオマス分解酵素遺伝子の高発現株を網羅的に作製している。今回はセロビオース分解に関わる新規な2種類の β -グルコシダーゼ(BglA, BglF)に着目し, その高発現株を用いて菌体外に分泌された酵素を精製し酵素学的諸性質の解明を試みた。

BglA および BglF 高発現株を液体培養し, その培養上清から酵素を精製した。目的の酵素は硫安分画, 疎水クロマトグラフィー, 陰イオン交換クロマトグラフィー, ゲルろ過クロマトグラフィーによって SDS-PAGE で単一バンドとして検出されるまで精製することができた。SDS-PAGE による推定分子量は BglA が 123 kDa, BglF が 137 kDa となり, 遺伝子から予想される分子量よりも大きく糖鎖付加の可能性が考えられた。精製した酵素について反応至適条件, 安定性, グルコース耐性, 基質特異性, 金属イオンによる阻害作用などの酵素的諸性質を調べた。ゲノムデータベースの情報から両酵素は GH family 3 (Glycoside Hydrolase family 3) に属することがわかっており, 同じ family に属する既知の β -グルコシダーゼと性質を比較した。その結果すでに報告されている β -グルコシダーゼと比べて高 pH 領域での安定性が高いことが明らかとなった。また, 活性測定に用いた合成基質 *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside に対して高い分解活性を示すにもかかわらず, 一般的な β -グルコシダーゼの基質であるセロビオースに対する分解活性をほとんど持たないという特徴的な性質が見出された。

Purification and Characterization of Novel β -Glucosidases (BglA and BglF) from *Aspergillus oryzae*

Kanako Kudo, Seiryu Ujiie, Akira Watanabe, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi

(Div. Biosci. Biotechnol. Future Bioind., Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ.)

O-6 (P-42)

比較ゲノム解析に基づく *Trichoderma reesei* BGLII の機能解析

新田美貴子^{1,2}, 山口香織¹, 中澤光¹, 志田洋介¹, 森一樹³, 平川秀樹⁴, 久原哲³, 森川康¹, 小笠原渉¹ (¹長岡技科大・生物,²JST,³九大・生物資源,⁴かずさDNA研究所)

【目的】糸状菌 *Trichoderma reesei* は, 30 年以上も昔から世界中で UV 照射や NTG 処理等の物理的変異導入法により数多くの変異株が造成され, セルラーゼ生産能が高められてきた。しかしながら, 変異株の変異点とセルラーゼの高生産化との関連付けに係る解析は乏しく, セルラーゼ高生産化の要因の多くは不明のままである。本研究室では, 世界標準株 QM9414 の他, 我が国独自の *T. reesei* 変異株系統樹 N-25, KDG-12, PC-3-7, および CDU-11 等を保有しており, 当該変異株の全ゲノム配列を次世代シーケンサーにより決定し, 一塩基多型 (SNP) を対象とした遺伝子の比較解析を進めている。セルラーゼ高生産変異株では多数の遺伝子に SNP が認められており, これらがセルラーゼの高生産化に寄与しているものと推測されている。

BGLII (CellIA) は細胞内 β -グルコシダーゼであり, *T. reesei* セルラーゼ群の誘導物質である α -ソホロースの生成に関与していると考えられている。PC-3-7 株において, BGLII 遺伝子 (*bgl2*) にも SNP が生じていることが明らかとなった。よって本研究では, *bgl2* での SNP の影響を解析することで, セルラーゼの誘導発現に関する新たな知見を得ることを目的としている。

【結果】種々の条件で培養した PC-3-7 株および $\Delta bgl2$ 株について, セルラーゼ活性, 糖転移活性, およびセルラーゼ遺伝子の発現挙動を解析した。その結果, PC3-7 株および $\Delta bgl2$ 株では α -ソホロース生成能が欠損していることが認められた。更に, $\Delta bgl2$ 株のセルラーゼ遺伝子の誘導発現能が PC-3-7 株と比較して遅くなっていた。現在, *bgl2* の SNP を野生株 (QM6a) の配列に復帰した変異株を作製し, セルラーゼ誘導活性に係る解析を進めている。

Functional analysis of BGLII based on Comparative Genome Analysis of *Trichoderma reesei*

Mikiko Nitta^{1,2}, Kaori Yamaguchi¹, Hikaru Nakazawa¹, Yosuke Shida¹, Kazuki Mori³, Hideki Hirakawa⁴, Satoru Kuhara³, Yashushi Morikawa¹, Wataru Ogasawara¹ (¹ Nagaoka Univ. of Tech., ² JST, ³ Kyushu Univ., ⁴ Kazusa DNA Inst.)

O-7

麴菌フェルラ酸エステラーゼを用いたソフトバイオマス糖化の効率的改善

久田 博元¹, 波部 悦子¹, 石田 博樹¹, 秦 洋二¹, 近藤 昭彦², 植田 充美³ (¹月桂冠・総研, ²神戸大院・工・応化, ³京大院・農・応生)

【目的】 将来的な石油枯渇と世界的な人口増加の問題から、非可食性のセルロース系バイオマスからのカーボンニュートラルな代替エネルギー生産が望まれている。現在、我々は、物理的破碎が容易で、リグニン含量が低く、国内で最も大量に存在する非可食性のセルロース系バイオマスとして、稲わらを原料としてバイオエタノールの生産を試みている。稲わらから β -グルコシダーゼを表層提示させた酵母でエタノール発酵するために、セルロースの立体構造を破壊する水熱処理後、当該稲わら前処理産物を酵素処理により可溶化する必要がある。市販のセルラーゼ剤単独ではその効率が悪く、その一因としてセルロース、ヘミセルロース及びリグニンがフェルラ酸とその類縁体を介して互いに結合していることが考えられた。

【方法と結果】 麴菌(*Aspergillus oryzae*)から3種類のフェルラ酸エステラーゼを *hly* プロモーター下流にサブクローニングし、麴菌ロイシン要求性変異株を宿主として形質転換後、分泌発現させた。このフェルラ酸エステラーゼを含む培養液上清を市販セルラーゼ酵素剤に添加して、原料濃度 11%(W/V)の稲わら前処理産物を分解したところ、*faeA* タンパク質に顕著なカクテル効果(可溶化効率の向上)が観察された。さらに、*faeA* タンパク質は、濃度依存的にカクテル効果(可溶化効率の向上)が高まることが示された。

【謝辞】 本研究は、NEDO バイオマスエネルギー等高効率転換技術開発/セルロースエタノール高効率製造のための環境調和型統プロセス開発の一環として行われたものである

Ferulic acid esterases of *Aspergillus oryzae* promote enzymatic soft-biomass degradation efficiency.

Hiramoto Hisada¹, Etsuko Habe¹, Hiroki Ishida¹, Yoji Hata¹, Akihiko Kondo², Mitsuyoshi Ueda³ (¹Res. Inst., Gekkeikan Sake Co., ²Dept. Chem. Sci. Eng., Grad. Sch. Eng., Kobe Univ., ³Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

O-8 (P-60)

Aspergillus nidulans におけるセルラーゼ遺伝子の発現制御機構

山川陽平、遠藤良知、金丸京子、*加藤雅士、小林哲夫 (名大院・生命農学、*名城大・農)

Aspergillus 属糸状菌において、セルラーゼ遺伝子群の発現は転写因子 XlnR による制御を受けることが知られている。一方、我々は *A. nidulans* のエンドグルカナーゼ *eglA* の誘導発現が XlnR 非依存的であることを示し、詳細なプロモーター解析により転写誘導に関わる *cis*-element (CeRE; Cellulose Responsive Element) を同定した。CeRE には、*Saccharomyces cerevisiae* の広域転写因子 Mcm1p の結合配列が存在する。そこで本研究では、*A. nidulans* の Mcm1p オルソログである McmA について、そのセルラーゼ発現制御への関与を明らかにするため、McmA 変異がセルラーゼ生産に与える影響を解析するとともに、McmA の *eglA* プロモーターへの結合を *in vitro* で解析した。

McmA の破壊は致死的であると予測されたため、MADS box 内の I70 を alanine 置換した McmA_{I70A} 遺伝子を構築し、相同組換えにより野生型 *mcmA* 遺伝子と置換した。本変異株では、親株と比較しセルラーゼ生産性が半減していた。また、大腸菌で発現・精製した His-tagged McmA を用い EMSA により DNA 結合特性を解析したところ、CeRE を含む DNA 断片に結合すること、CeRE への変異導入は McmA の結合能の著しい低下を引き起こすことが明らかとなった。以上から、McmA は *eglA* プロモーター上の CeRE に直接結合し転写を制御すると考えられる。CeRE の類似配列は *eglA* 以外のセルラーゼ遺伝子のプロモーターにも存在する。そこで現在、これらプロモーターへの McmA の結合を調べると共に、real time PCR によりセルラーゼ遺伝子群の発現解析も進めている。

Regulation of cellulase genes in *Aspergillus nidulans*

Yohei Yamakawa, Yoshikazu Endo, Kyoko Kanamaru, Masashi Kato*, Tetsuo Kobayashi
(Graduate Sch. of Bioagric. Sci., Nagoya Univ., *Dept. Agric., Meijo Univ.)

O-9

固体・液体培養における *Trichoderma reesei* の遺伝子発現挙動

雪真弘, 森一樹, 森川康, 小笠原渉 (長岡技科大・生物系)

糸状菌 *Trichoderma reesei* は菌体外に多量の糖質加水分解酵素を分泌することが知られ、それら糖質加水分解酵素の性質解明や遺伝子発現機構の解析が行われてきた。しかし、これらの研究の多くが液体培養で行われたものであり、自然環境下に近い固体培養での *T. reesei* の知見に関しては、ほとんど存在しないのが現状である。本研究では、固体・液体培養条件下での *T. reesei* の網羅的な遺伝子発現を比較することにより、遺伝子発現挙動の差異を明らかにし、新たな知見を得ることを目的とした。

固体培養は、小麦ふすまとアビセルを炭素源とした培地を用いて、湿度飽和条件下で行った。液体培養も同じ炭素源で行った。これらの培養から経時的にサンプリングを行い、Total RNA を調製した後、全遺伝子(9174 遺伝子)からなるマイクロアレイで解析を行った。得られた全シグナル値を用いて階層的クラスタリングを行った結果、培養初期では固体・液体培養でクラスターを形成していた。しかし、培養時間が長くなると固体培養、液体培養ごとにクラスターを形成していた。このことから、培養初期では遺伝子発現挙動は似ているものの、培養時間が長くなるにつれ固体培養、液体培養で発現挙動が異なっていることが明らかになった。本発表では、さらに詳細な解析を行い、固体培養で特異的に発現する遺伝子の存在や糖質加水分解酵素の遺伝子発現比率の違い等についても報告する予定である。

Comparative gene expression analysis of *Trichoderma reesei* grown under solid-state fermentation and submerged fermentation

Masahiro Yuki, Kazuki Mori, Yasushi Morikawa, Wataru Ogasawara

(Dept. of Bioeng., Nagaoka Univ. of Tech.)

O-10 (P-71)

転写因子 AmyR が *Aspergillus nidulans* の二次代謝に及ぼす影響の解析

上村曜介, 鳴神寿昭, 梶尾俊介, 高谷直樹 (筑波大院・生命環境)

AmyR は DNA 結合能を持つ転写因子であり、 α -アミラーゼを含むアミロース分解系酵素遺伝子群の発現誘導に関与することが知られる。我々は、*A. nidulans* の amyR 遺伝子破壊株 (DamyR) を、グルコースを単一の炭素源とした無機固体培地を用いて培養した際に、培地が赤色に呈色することを見出した。また、DamyR は野生型株 (WT) と比べ、培地中に多くのステリグマトシスチン (ST) を生成し、ST 生合成遺伝子群の発現量も大きく増加していたことから、AmyR が ST の生合成を転写レベルで負に調節することが示された。WT と DamyR を無機固体培地で培養した際のトランスクリプトーム解析を行ったところ、DamyR では、ST 以外の多くの二次代謝産物合成系酵素遺伝子の発現量が増加するとともに、転写因子 CreA に依存して発現がカタボライト抑制される遺伝子の発現量が増加していた。*A. nidulans* の CreA は、グルコースやスクロースを炭素源とした際のカタボライト抑制を担う転写因子である。creA 遺伝子破壊株 (DcreA) は、DamyR と同様に培地中に赤色色素を生産したことから、赤色色素の生合成はカタボライト抑制をうけることが示された。また、amyR と creA の二重遺伝子破壊株も同レベルの赤色色素を生産したことから、AmyR は CreA と協調して赤色色素の生合成に関する遺伝子の発現抑制に関与すると考えられた。一方、DcreA および amyR-creA 二重遺伝子破壊株は、それぞれ WT および DamyR と同レベルの ST を生成したことから、AmyR は CreA の機能によらず ST 生合成を抑制することが示された。

以上の結果は、*A. nidulans* の AmyR が、これまで知られていたアミロース分解系の発現誘導 (一次代謝) だけでなく、ST を含む多様な二次代謝系遺伝子の発現の制御に関与することを初めて示したものである。

Role of fungal transcriptional factor AmyR in regulating secondary metabolism

Yosuke Kamimura, Toshiaki Narukami, Shunsuke Masuo, Naoki Takaya (Graduate School of Life and

Environmental Sciences, University of Tsukuba)

O-11

***Talaromyces stipitatus* 由来ポリケタイド合成酵素遺伝子の機能解析**

橋元 誠, 藤井 勲 (岩手医大・薬)

Talaromyces stipitatus はトロポロン骨格を有する stipitatic acid を生産する。本化合物は 3-methylorsellinate もしくはその類縁体の生成、数段階の反応後、六員環から七員環への環拡張段階を経て生合成されと考えられている。この環拡張過程はモノオキシゲナーゼが関与するピナコール転位反応により進行することが示唆されているが、環拡張および各生合成段階の詳細な解析には至っていない。stipitatic acid の生合成に関与する酵素遺伝子の機能を明らかにするため、今回、生合成のはじめの段階に関与するポリケタイド合成酵素 (PKS) 遺伝子について、*A. oryzae* M-2-3 を宿主とした異種発現による解析を試みた。

T. stipitatus ATCC10500 のゲノムデータベース上で、既知の 3-methylorcinaldehyde synthase 遺伝子と相同性を持つ PKS 遺伝子と酸化酵素遺伝子を併せ持つ遺伝子群を指標に検索したところ、2 つの候補遺伝子群を見いだした。そのうちの一つの PKS 遺伝子 (全長 8.0kb) について、PCR で増幅した断片を Gateway 法により糸状菌発現用ベクター pTAex3R へ導入後、プロトプラスト - PEG 法により *A. oryzae* 形質転換体を作成した。現在、誘導培養後の代謝物の HPLC 分析を行うとともに、もう一方の PKS 遺伝子 (全長 7.9kb) についても発現プラスミドの構築を進めている。

Functional analysis of polyketide synthase genes from *Talaromyces stipitatus*

Makoto Hashimoto, Isao Fujii

(School of Pharmacy, Iwate Med. Univ.)

O-12

Spatial gene expression analysis of *Aspergillus fumigatus* during polar growth

Ken Oda, Mara Couto-Rodriguez, Susan Cowden, John Kerry, Michelle Momany

(Dept. of Plant Biology, Univ. of Georgia)

A. fumigatus is the most common airborne pathogen causing fatal mycoses in immunocompromised patients. Polarized growth is one of the critical factors for establishing fungal pathogenesis, but little is known about the genes involved in early polar growth and their regulation. To understand the spatial distribution of polarity related mRNA, we performed spatial gene expression analysis during polar growth. *A. fumigatus* Af293 was cultured in complete medium for 8hr. Tip, base, and conidium regions were captured by Laser Microdissection Pressure Catapulting (LMPC) and germlings were collected as a reference. Total RNA was extracted and a cDNA library was constructed for each region. The quality of each cDNA library was confirmed by performing qRT-PCR for highly expressed genes. Then we performed mRNA sequencing using a Next-Generation Sequencer (454 GS FLX). By comparing of each region, we found that more than 1000 mRNAs are asymmetrically localized. To confirm mRNA localization, we performed Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH) with some of the highly expressed genes in each region and found that their distribution was consistent with sequence results. These data suggest that many mRNAs are asymmetrically localized in tip, base, and conidium region during polar growth.

O-13

Aspergillus nidulans における α -1,3-glucan 合成酵素遺伝子 *agsB* 発現制御株の解析

吉見啓¹, 佐野元昭², 藤岡智則³, 水谷治⁴, 萩原大祐¹, 國分優子⁵, 藤川貴史⁶, 西村麻里江⁶, 阿部敬悦^{1,5} (¹東北大・未来研, ²金沢工大・ゲノム研, ³クミアイ化学工業㈱, ⁴酒類研, ⁵東北大院農・応微, ⁶生物研)

我々は, *Aspergillus nidulans* の細胞壁構築シグナル伝達 (CWIS) 経路について, MAP キナーゼ MpkA 経路を中心に解析を進めてきた。これまでに, 本菌の MpkA 経路は, 出芽酵母の CWIS 経路とは大きく異なり, 出芽酵母には存在しない α -1,3-グルカン合成酵素遺伝子 *agsA*, *agsB* の転写制御に特化していることを明らかにしている。近年, 病原真菌 *Histoplasma capsulatum* や植物病原性のイネいもち病菌において, α -1,3-グルカンが感染過程で重要な役割を担うことが明らかになり, 糸状菌における α -1,3-グルカンの重要性が認識されつつある。これらの背景から, 我々は *A.nidulans* において *agsA*, *agsB* の機能解析を行っており, 昨年の本大会において, *A.nidulans* の α -1,3-グルカン合成には AgsB が主として機能している可能性と *agsB* 遺伝子の発現制御株を取得したことを報告した。今回, *agsB* 発現制御株を用いて細胞壁組成を分析したので報告する。*agsB* の発現誘導, 抑制条件で培養した菌体から細胞壁成分をアルカリ法によって抽出し, 組成変化を比較した。その結果, *agsB* の発現誘導, 抑制に連動して細胞壁中の α -1,3-グルカン量が増減し, α -1,3-グルカン量変化を相補するように β -1,3-グルカン, キチン量が増減することが明らかになった。また, *agsB* 発現制御株を親株とした *agsA* 破壊株を取得したので, その表現型解析結果についても考察した。(本研究は生研センター異分野融合研究事業により支援を受けた。)

Analysis of the conditional-*agsB* strain in *Aspergillus nidulans*

Akira Yoshimi¹, Motoaki Sano², Tomonori Fujioka³, Osamu Mizutani⁴, Daisuke Hagiwara¹, Yuko Kokubun⁵, Takashi Fujikawa⁶, Marie Nishimura⁶, Keietsu Abe¹ (¹Tohoku Univ. NICHe, ²KIT, ³Kumiai Chemical Industry Co., Ltd, ⁴NRIB, ⁵Tohoku Univ. Applied Microb., ⁶NIAS)

O-14

麹菌の染色体最小化の試み (第 2 報)

ヘテロ 2 倍体の造成を介した 7 番, 8 番染色体が共に短い麹菌の育種

原 精一, 金 鋒杰, 高橋 理, 小山泰二 (野田産研)

これまでに, 麹菌 *Aspergillus oryzae* の 7 番染色体について, 大規模欠失の操作を繰り返すことにより縮小化を行ったことを報告した。今回は, これとは別に 8 番染色体が短い麹菌を作製し, それぞれの染色体を保持する麹菌を融合させ, 7 番, 8 番染色体が共に短い麹菌を作製することを試みた。

短い染色体を保持するため, まず, 短い 7 番染色体上に *niaD* 遺伝子を, 短い 8 番染色体上に *pyrG* 遺伝子を導入し, 本来の染色体上にあるこれらマーカー遺伝子をいずれも破壊した 2 つの株を作製した。両株のプロトプラストを融合して最少寒天培地で再生させた後, 培養を繰り返すことにより, 安定で旺盛に生育する株を得た。この株は短い 7 番, 短い 8 番, 通常の 7 番, 通常の 8 番染色体のいずれも持ち, 分子子のフローサイトメトリーによる解析で 2 倍体のパターンを示したことから, 用いた両株の核が融合したヘテロ 2 倍体であると判断した。次に, このヘテロ 2 倍体をベノミル存在下で半数体化させ, 短い 7 番, 短い 8 番染色体を持つが, 通常の 7 番, 通常の 8 番染色体を持たない目的の株を PCR で選抜した。得られた株についてパルスフィールドゲル電気泳動で解析し, 7 番, 8 番染色体は共に短いことを確認した。さらにアレイ CGH で解析し, 融合に用いた株のいずれかで欠失している領域は, 選抜した半数体においても欠失していること, 融合や半数体化の操作による予期せぬ欠失や重複は見られないことを確認した。

麹菌は有性世代を持たないことから交雑による育種は容易ではないが, 今回示した一連の操作により目的とする染色体を一つの株に集めることが可能となった。

Construction of an *Aspergillus oryzae* strain with shorter chromosomes 7 and 8

Seiichi Hara, Feng Jie Jin, Tadashi Takahashi, Yasuji Koyama (Noda Inst. Sci. Res.)

O-15

ゲノム科学による麹菌代謝に関わる遺伝子同定と高生産化

小池英明¹、丸井淳一郎¹、山根倫子¹、大橋澄子¹、安藤朋広¹、寺林靖宜¹、佐野元昭²、大箸信一²、大島栄治³、立花國治³、比嘉良喬³、西村麻里江⁴、町田雅之^{1,2} (¹産総研、²金沢工大、³三省製薬、⁴生物研)

糸状菌の代謝は多様であることが知られており、それらの代謝物は有用物質として様々な分野で利用されている。麹菌 *Aspergillus oryzae* が二次代謝として生産するコウジ酸は、美白成分、抗酸化剤、抗生物質として利用されてきた有用物質である。麹培養中にコウジ酸の生産が同定されたのは1907年と早かったが、100年以上にわたって、その遺伝子および代謝経路やその制御機構は解明されてこなかった。

当研究室では、麹菌のゲノム配列に基づいた、ゲノム科学を応用した方法によって、その生合成遺伝子および制御機構の解明を目指した。その結果、生産状態において発現の高かった遺伝子群の中から、破壊によりその生産が著しく影響されるものを特定し、酵素遺伝子、膜輸送体、転写因子のモチーフをもつ3つの遺伝子のクラスターを特定した。本研究では明らかにした遺伝子群を基にして、コウジ酸の生産に関わる転写制御機構について解析している。解析の現状について発表する。

Reverse genetic analysis reveals genes involved in kojic acid biosynthesis in *Aspergillus oryzae*

Hideaki Koike¹, Junichiro Marui¹, Noriko Yamane¹, Sumiko Ohashi-Kunihiro¹, Tomohiro Ando¹, Yasunobu Terabayashi¹, Motoaki Sano², Shinichi Ohashi², Eiji Ohsima³, Kuniharu Tachibana³, Yoshitaka Higa³, Marie Nishimura⁴, and Masayuki Machida^{1,2} (¹National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, ²Kanazawa Institute of Technology, ³Sansho Seiyaku Co., Ltd, ⁴National Institute of Agrobiological Sciences)

O-16

麹菌 *A. oryzae* プロテアーゼ遺伝子 10 重破壊株による異種タンパク質生産

尹 載宇, 丸山 潤一, 北本 勝ひこ (東大院・農生科・応生工)

【目的】 麹菌 *Aspergillus oryzae* は、異種タンパク質生産の宿主として利用されている。しかし、高等生物由来タンパク質の生産量は一般に低く、その原因のひとつとしてプロテアーゼによる分解があげられる。これまでに、プロテアーゼ遺伝子の 5 重(*tppA*, *pepE*, *nptB*, *dppIV*, *dppV*)破壊および 7 重破壊(*tppA*, *pepE*, *nptB*, *dppIV*, *dppV*, *alpA*, *pepA*)により、異種タンパク質の生産量が上昇することを明らかにしている。^{1),2)} *A. oryzae* は約 130 個のプロテアーゼ遺伝子を有しており、組換えタンパク質の分解に関与する遺伝子を絞り込む必要がある。本研究では、演者らが以前 DNA マイクロアレイ解析で確認した培養後期に高発現する 3 つのプロテアーゼ遺伝子(*AoepAa*, *AoepAd*, *cpI*)を破壊することにより、異種タンパク質の生産量のさらなる増加を目的として育種を行った。

【結果】 非同組換えに関与する高頻度相同組換え宿主($\Delta ligD$)および *pyrG* マーカーリサイクリング法を用いプロテアーゼ遺伝子 10 重(*tppA*, *pepE*, *nptB*, *dppIV*, *dppV*, *alpA*, *pepA*, *AoepAa*, *AoepAd*, *cpI*)破壊株を作製した。その後、AmyB をキャリアーとして、ウシキモシンおよびヒトリゾチーム発現プラスミドを 10 重破壊株に導入した。その結果、5 重(*tppA*, *pepE*, *nptB*, *dppIV*, *dppV*)破壊株に比べウシキモシンの生産量が約 30% 増加することが明らかになった。一方、ヒトリゾチームの生産量は、5 重破壊株に比べて約 34% 上昇していることが明らかになった。カルボキシペプチダーゼ *cpI* 遺伝子破壊で異種タンパク質の生産量がさらに上昇したことから現在、別のカルボキシペプチダーゼ遺伝子の破壊効果について検討している。

1) Yoon et al. (2009) Appl. Microbiol. Biotechnol., 82:691-701. 2) 尹ら、日本農芸化学会 2009 年度大会要旨集 p. 116

Decuple protease gene disruption in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae* highly improves production of heterologous proteins

Jaewoo YOON, Jun-ichi MARUYAMA, Katsuhiko KITAMOTO (Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo)

O-17

エノキタケのトランスクリプトーム配列情報を用いた全分泌タンパク質解析

石黒真希, 堀 千明, 片山 映¹, 五十嵐圭日子, 高島幸司², 金子 哲³, 鮫島正浩
(東大院・農生科,¹日医大・生化・分生,²富山森林研,³食総研)

食用担子菌であるエノキタケは、様々なセルロース系バイオマスを分解して成長することが知られており、バイオマスの変換利用という位置付けにおいても非常に重要であると考えられるが、本菌がセルロース系バイオマスの分解時に生産する菌体外酵素に関する情報はこれまでほとんど得られていない。そこで、エノキタケのセルロース培養系から得た全転写産物（トランスクリプトーム）の配列データベースを構築して、これを利用した全分泌タンパク質（セクレトーム）解析を行い、本菌が生産する菌体外タンパク質の網羅的な同定を試みた。

バイオマスまたは多糖を炭素源とした12種類の培地において培養したエノキタケ由来のトランスクリプトームの配列を、第2世代DNAシーケンサにより決定し、平均長364.9塩基のコンティグ配列20,756個から構成される総塩基数約7.6Mbのトランスクリプトーム配列データベースを得た。このデータベースを利用し、セルロースを炭素源として培養したエノキタケのセクレトーム解析を行った結果、セルロースやヘミセルロースの分解に関わる酵素の他、糖質分解関連酵素の一種と推測される機能未知タンパク質などが同定された。したがって、トランスクリプトーム配列情報をデータベース化することによりエノキタケのようなゲノム配列未解読菌においてもセクレトーム解析が可能となり、その有効性が示された。

Secretome analysis using transcriptomic sequence database of *Flammulina velutipes*

Maki Ishiguro, Chiaki Hori, Akira Katayama¹, Kiyohiko Igarashi, Koji Takabatake², Satoshi Kaneko³, Masahiro Samejima (Dept. Biomat. Sci., Univ. of Tokyo, ¹Dept. Biochem. Mol. Biol., Nippon Med. Sch., ²Toyama Pref. Forest. Res. Inst., ³NFRI)

O-18

イネいもち病菌のDNA組換え修復の役割

曾根輝雄, Ndindeng Sali Atanga, 工藤亮子, 阿部 歩 (北大院農・応生科)

イネの最重要病害いもち病の防除における重要な課題の一つは、イネいもち病菌 *Magnaporthe oryzae* の突然変異によるイネ品種の抵抗性の崩壊である。我々はイネいもち病菌の非病原力遺伝子である *AVR-Pia* が欠失した結果、抵抗性遺伝子 *Pia* を無力化することをつきとめた。また、イネいもち病菌が染色体長多型を示すことから、DNA組換えがイネいもち病菌の変異に関与している可能性が示されている。そこで本研究では、イネいもち病菌のDNA組換え修復遺伝子の解析を行った。

DNA組換え修復の主要な2つの経路である非相同末端結合(NHEJ)に関与する *Khm70*, *Khm80*, *Lig4*, 相同組換え(HR)に関与する *Rhm51*, *Rhm54*, 両方に関与する *Rhm50* について、圃場分離株 Ina86-137 株を用いて欠失変異株を作成した。生育速度、病原力について調べたところ、NHEJに関与する変異株では野生株と同等であったが、HRに関与する遺伝子の変異株では低下が見られ、病原力が低下する原因は付着器の形成率が低下することによって考えられた。付着器形成と細胞周期は密接に関連していることが知られており、中性コメットアッセイによりDNA二重鎖切断(DSB)を定量したところ、 $\Delta rhm51$ 変異株で顕著な蓄積が見られたことから、付着器形成の低下は修復されていないDSBの蓄積による細胞周期の遅延によって考えられた。また、GFP-Rhm51融合タンパク質によりDSBを凝集点(foci)として可視化すると、野生株の全ての生活環においてDSBが検出された。以上のことから、イネいもち病菌は生活環を通してDSBを被っており、それを主としてHRによって修復することで、生育速度と病原力を維持していることが示唆された。

The role of DNA recombinational repair in the life cycle of the rice blast fungus

Teruo Sone, Ndindeng Sali Atanga, Ryoko Kudo and Ayumi Abe

(Dept. Applied Bioscience, Res. Fac. Agriculture, Hokkaido Univ.)

O-19

トウモロコシごま葉枯病菌 (*Cochliobolus heterostrophus*) における MAPK シグナル伝達経路の多重変異株の作出および機能解析

泉津弘佑, 奥野健太, 齋藤禎一, 森田篤, 吉見啓, 田中千尋 (京大・院・農)

全ての細胞は、細胞外の情報を感知し、適切な応答を行うために、さまざまな細胞内シグナル伝達経路を発達させている。特に、MAPK シグナル伝達経路は、真核生物に広く保存されており、形態形成やストレス応答など多様な役割を担っていることが知られている。糸状菌類においては、一般的に3種のMAPK経路(HOG1経路, CHK1経路, SLT2経路)が保存されており、いくつかの糸状菌類においてその機能が調べられてきた。しかし、複数のMAPK経路の多重変異株は、これまでほとんど報告がない。今回、我々は細胞壁修復に関連するSLT2型MAPK(BmSl2)経路を中心に、トウモロコシごま葉枯病菌の複数経路の多重変異株の作出を試みた。まず、BmSl2破壊株は、孢子形成、子のう殻形成、メラニン化に不全を示した。また、低浸透圧ストレスによる菌糸先端の破裂、Calcofluor Whiteに対する感受性、菌叢の撥水性の低下、および宿主植物への病原性の低下が認められた。次に、他の2つのMAPK経路とのダブルミュータント作出を試みた。興味深いことに、いずれのMAPK二重変異株も生存可能であった。さらに、少なくとも、HOG1経路との二重変異株($\Delta BmSl2\Delta BmHog1$)は、高浸透圧感受性および薬剤耐性を、CHK1との二重変異株($\Delta BmSl2\Delta Chk1$)は、付着器形成の不全を併せ持っていた。また、いずれの変異株も病原性の低下がみとめられた。現在、さらに詳細な解析をすすめている。また、HOG1経路とCHK1経路の二重変異株および、3種のMAPK経路の三重変異株の作出を試みている。本発表では、この結果についても報告したい。

Characterization of multipledeficient strains of MAPK signaling pathways in *Cochliobolus heterostrophus*.

Kosuke Izumitsu, Kenta Okuno, Yoshimoto Saitoh, Atsushi Morita, Akira Yoshimi, Chihiro Tanaka.

(Grad. School of Agriculture, Kyoto Univ.)

O-20

トマトアルターナリア茎枯病菌が保有する conditionally dispensable chromosome (CDC)の構造

赤木靖典, 播本佳明¹, 柘植尚志¹, 尾谷 浩, 児玉基一郎 (鳥取大・農, ¹名大院・生農)

トマトアルターナリア茎枯病菌 (*Alternaria alternata* tomato pathotype, 茎枯病菌) は宿主特異的 AAL 毒素を生産し、特定のトマト品種に著しい壊死を引き起こす。本毒素の生産には、1.0 Mb CDC 上の約 100 kb の領域に座乗する AAL 毒素生合成 (*ALT*) 遺伝子クラスターが関与している。本研究では、CDC 上の *ALT* クラスター以外の領域を決定するため、茎枯病菌 As-27 株の CDC のショットガンシークエンスおよび CDC をカバーする BAC クローンのシークエンス解析をもとに、本染色体の塩基配列を決定した。また rare cutting enzyme (*NotI*) で CDC のみを消化し、制限酵素地図とシークエンス情報を比較した。その結果、本 CDC 上には、2 コピーの *ALT* クラスターセットが座乗していることが明らかとなった。さらに CDC 上には、*ALT* クラスター遺伝子の他に、threonine aldolase, acetyltransferase, avenacinase, 6-methylsalicylic acid synthase, GTP-binding protein, transporter, transcription factor 遺伝子ホモログなどが認められた。また、*ALT* クラスターの周辺領域には、transposase 様遺伝子が多数見出された。

Structure of the conditionally dispensable chromosome (CDC) in the tomato pathotype of *Alternaria alternata*.

Yasunori Akagi, Yoshiaki Harimoto¹, Takashi Tsuge¹, Hiroshi Otani, Motoichiro Kodama

(Fac. Agric., Tottori Univ., ¹Grad. Sch. Bioagric. Sci., Nagoya Univ.)

P-1

蛍光ハイブリプローブを用いた *Neurospora crassa* の新規遺伝子マッピング法の構築

石神陽平, 坂野真平, 山下和宏, 一石昭彦, 藤村真 (東洋大院・生命科学)

N. crassa では、全遺伝子のノックアウト(KO)株を作製するプロジェクトが進行しており、すでに約 7000 遺伝子の KO 株が単離されている。しかし、KO 株と点変異株では形質が全く異なるという例が数多く報告されており、特定の形質を示す変異株を単離して解析する順遺伝学的手法が改めて見直されている。順遺伝学では、変異遺伝子を同定するためにマッピングを行う必要がある。そこで、蛍光プローブを用いた新規マッピング法の構築を行った。原理は、*N. crassa* の Oak Ridge(標準株: OR 株)と Mauriceville(MV)株間に存在する SNP を分子マーカーとして、目的変異との連鎖を解析する RFLP マッピングに準じている。ただし、蛍光ハイブリプローブを用いて融解温度曲線解析から SNP 検出することにより、特定集団から調製された DNA 中に存在する SNP の比率を求めることができる。まず、OR 株と MV 株間の各染色体上に散在している SNP を検出する蛍光プローブを作製した。これらの蛍光プローブを用いてマッピングが可能であるかを検証するために、すでに第五染色体および第一染色体にそれぞれマップされている *smco-7* および *os-1* の変異株を Mauriceville(MV)株と交配し、子孫の形態から野生型と変異型の 2 群に分離した。この両群からそれぞれゲノム DNA を抽出し、各染色体の SNP を検出する蛍光ハイブリプローブを用いてリアルタイム PCR 解析を行った。その結果、*smco-7* および *os-1* 変異は、それぞれ、第五染色体および第一染色体の SNP との連鎖が認められ、物理的マッピングと一致した。現在、*os-5* 変異株の浸透圧感受性を抑制するが単独変異では形質を示さない *sup(os-5)*変異のマッピングを行っている。

Rapid genetic mapping using hybridization probes in *Neurospora crassa*

Yohei Ishigami, Shinpei Banno, Kazuhiro Yamashita, Akihiko Ichiishi and Makoto Fujimura

(Grad. Sch. of Life Sci., Toyo Univ)

P-2

クエン酸生産糸状菌由来 *ku80* 破壊株における相同組換え効率の向上

本田裕樹, 小林慶一, 桐村光太郎 (早大・理工・応化)

【目的】クエン酸生産菌としても使用される *Aspergillus niger* はクエン酸をはじめ各種有用代謝産物の工業的生産に利用される。*A. niger* の育種では、ゲノム情報を利用した遺伝子工学的あるいは代謝工学的な改変が期待されるが、遺伝子の相同組換え効率の低さが課題である。一方、*N. crassa* や *A. oryzae* 等の糸状菌において非相同組換えに関与する *ku80* 等の破壊により相同組換え効率が向上することが報告されている。演者らは、クエン酸生産糸状菌 *A. niger* WU-2223L 由来 *ku80* 破壊株を作製し、相同組換え効率の向上について検討した。

【方法および結果】ゲノム情報を利用して約 2.6 kb の *A. niger* WU-2223L 由来 *ku80* 遺伝子をクローニングした。当該遺伝子の 5'末端から約 0.6 kb (断片 A), 約 0.9 kb (断片 B), 約 1.1 kb (断片 C) の 3 断片を PCR で増幅し、マーカー遺伝子 *pyrG* と連結して、*ku80* 破壊用カセット (5'-断片 B-*pyrG*-断片 A-断片 C-3') を作製した。この *ku80* 破壊用カセットは、相同組換えにより染色体上の *ku80* 遺伝子座に導入された際に、断片 A において direct repeat を形成するように設計した。この *ku80* 破壊用カセットを用いて、*A. niger* WU-2223L 由来 *pyrG* 欠損株を宿主として形質転換を実施し、*ku80* 破壊株を取得した。当該 *ku80* 破壊株を用いて、*sC* 遺伝子破壊を指標として取得した形質転換体に占める相同組換え株の比率 (相同組換え効率) を検討した。*A. niger* WU-2223L における相同組換え効率は約 10%であるのに対して、*ku80* 破壊株における相同組換え効率は約 70%に向上した。また、*ku80* 破壊株では、クエン酸生産性が *A. niger* WU-2223L と同等であることを確認した。

Improvement of homologous recombination frequencies in *ku80* disruptants derived from citric acid-producing *Aspergillus niger*

Yuki Honda, Keiichi Kobayashi, Kohtarō Kirimura

(Dept. Appl. Chem., Fac. Sci. Eng., Waseda Univ.)

P-3

担子菌ウシグソヒトヨタケにおける遺伝子ターゲティングの実現

中沢威人¹, 安達志乃芙¹, 佐野広明², 北秋亘平¹, 金子真也³, 坂本裕一⁴, 中堀清¹, 宮崎安将², 鎌田堯¹
(¹岡山大・理, ²森林総研, ³東工大・生命理工, ⁴岩手生工研)

近年, アカパンカビを皮切りとして, 様々な糸状菌で KU70/KU80 や DNA ligase 4 といった非相同末端再結合(NHEJ: non-homologous end joining)に関わるタンパク質をコードする遺伝子を破壊し, NHEJ 経路を不活性化させることで高頻度相同組み換えを実現できることがわかった。

我々が研究対象としている担子菌キノコでは, スエヒロタケを除いて相同組み換えを行った報告例がない。そのため遺伝子破壊・ゲノム改変操作が不可能であり, 基礎・応用両面で研究の発展を妨げる大きな要因となっていた。本発表では, まずはキノコのモデル生物であるウシグソヒトヨタケにおいて, 上記の手法によって相同組み換えによる遺伝子ターゲティングを実現させたことを報告する。

まず, (1) 形質転換に用いる細胞の検討 (2) RNAi による *Cc.ku70* または *Cc.lig4* のノックダウンを行い, 光応答性転写調節因子をコードする *Cc.wc-2* 遺伝子の破壊を試みた。その結果, 従来の形質転換法(野生株を用い, プロトプラストを無性胞子から調整する方法)では *Cc.wc-2* 破壊株が得られなかった(0%の頻度)が, 上記(1)(2)を検討することで最大 20%の頻度で *Cc.wc-2* 破壊株の取得に成功した。次に, その条件の下で *Cc.ku70* 破壊株を取得した。この株を用いると 70-90%の頻度で *Cc.wc-2* 破壊株が得られた。さらに, 他の遺伝子も概ね 60%以上の頻度で相同組み換えをおこした形質転換株を取得できるようになった。以上より, 本菌での遺伝子ターゲティングが可能となった。現在は実験系の汎用化・高度化を行っている。

Establishment of gene targeting in the basidiomycete mushroom *Coprinopsis cinerea*.

Takehito Nakazawa¹, Shinobu Adachi¹, Hiroaki Sano², Shohei Kitaaki¹, Shinya Kaneko³, Yuichi Sakamoto⁴, Kiyoshi Nakahori¹, Yasumasa Miyazaki², Takashi Kamada¹ (¹Okayama Univ., ²FFPRI, ³Tokyo Tech., ⁴IBRC)

P-4

セルラーゼ高生産糸状菌 *Acremonium cellulolyticus* の形質転換系の構築

藤井達也¹, 神名麻智¹, 村上克治¹, 澤山茂樹^{1,2} (1 産総研・バイオマス研セ, 2 京大院・農)

<目的・方法>

糸状菌 *Acremonium cellulolyticus* Y94 株は, セルラーゼを大量に菌体外へ分泌する。紫外線や化学変異剤を用いた処理により, Y94 株由来のセルラーゼ高生産変異株 CF-2612 株が取得されている。本菌の遺伝子工学的な手法の開発が遅れているために, 本菌によるセルラーゼ生産機構の詳細な解析が困難である。そこで本研究では, 本菌の遺伝子組み換え系の構築を試みた。遺伝子の導入にはプロトプラスト・ポリエチレングリコール法を用い, その際のマーカー遺伝子として大腸菌由来の hygromycin phosphatase (hph) 遺伝子を用いた。

<結果>

プロトプラスト化させた Y94 株へ hph 遺伝子を有するプラスミドを導入し, 500 µg/ml のハイグロマイシン B を添加した培地上での生育を観察したところ, ハイグロマイシン B に耐性を示す株 (HRY 株) を取得した。HRY 株および Y94 株の全 DNA を鋳型とし, hph 遺伝子に特異的なプライマーを用いた PCR を試みたところ, HRY 株では DNA の増幅が確認されたのに対し, Y94 株ではこれが確認されなかった。HRY 株の取得効率は $1.1/4 \times 10^6$ cells であった。以上の結果から, hph 遺伝子を用いた Y94 株の形質転換系の構築に成功したと考えられた。同様の検討を CF-2612 株を用いて行ったところ, 形質転換効率は $1/4 \times 10^7$ cells 以下と Y94 株のそれに比べて低かった。現在, 栄養要求性を指標とした CF-2612 株の新たな形質転換系の作製を試みている。

Development of transformation system for the fungus *Acremonium cellulolyticus*

Tatsuya Fujii¹, Machi Kanna¹, Katsuji Murakami¹, Shigeki Sawayama^{1,2}

(1AIST, 2Univ. of Kyoto)

P-5

菌類における新たな形質転換体選択マーカーの利用

野田知嗣¹, 吉田真澄¹, 藤田将幸¹, 稲富 聡², 田口悟朗¹, 下坂 誠¹

(¹信州大・繊維・応生系, ²ホクトきこの総合研究所)

菌類の形質転換では、形質転換体を選抜するための選択マーカーとして、一般に hygromycin B 耐性遺伝子が使用されている。当研究室においても、担子菌エノキタケ (*Flammulina velutipes*) や植物病原性フザリウム菌 (*Fusarium oxysporum*) に対する選択マーカーとして有効であることを示してきた。しかし、複数の遺伝子に対して、RNAi による発現抑制や遺伝子高発現の効果を評価する際には、1つの選択マーカーのみでは不十分である。そこで、エノキタケとフザリウム菌を宿主とする新たな選択マーカーの探索を行った結果、アミノグリコシド系の抗生物質である G-418 が利用可能であったので報告する。

種々の抗生物質存在下でエノキタケとフザリウム菌の増殖試験を行ったところ、いずれも G-418 に対して感受性を示した。トランスポゾン Tn5 由来の G-418 耐性遺伝子 (*npt II*) をエノキタケ由来 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gpd*) 遺伝子プロモーター下流に配置し、細菌 *Agrobacterium tumefaciens* のバイナリーベクターを介してエノキタケおよびフザリウム菌に導入した。その結果、両株ともに G-418 耐性コロニーが得られたことから、*npt II* 遺伝子が選択マーカーとして有効であることが示された。

既に当研究室で作成済みの RNAi および高発現用バイナリーベクターである pFungiway 1 と pFungiway 2 の選択マーカー (hygromycin B 耐性遺伝子) を *npt II* 遺伝子に置換した pFungiway 3 および pFungiway 4 を作出した。高発現ベクター pFungiway 4 を用いて、フザリウム菌に蛍光レポーター遺伝子を導入したところ、菌糸において強い蛍光の発現を確認した。また、pFungiway 2 を用いた蛍光発現株に対して、RNAi 用ベクター pFungiway 3 を用いて、蛍光レポーター遺伝子の一部を導入したところ、蛍光発現の抑制を確認できた。

Exploitation of a new selection marker for genetic transformation in fungi

Tomotsugu Noda¹, Masumi Yoshida¹, Masayuki Fujita¹, Satoshi Inatomi², Goro Taguchi¹, Makoto Shimosaka¹

(¹Division Appl. Biol., Fac. Tex. Sci. Tech., Shinshu Univ.,²Mushroom Lab. Hokuto Co.)

P-6

味噌用麹菌 *A. oryzae* KBN630 のホスファターゼ遺伝子 *aphA* 破壊株の取得

安田 (吉野) 庄子, 森 昭博, 石原 那美, 長谷川 摂, 伊賀 佳美*, 白石 洋平*, 和久 豊*, 北本 則行 (愛知産技研・食工技セ, * ㈱ビオック)

【目的】核酸系調味料を添加した調味味噌は、味噌中の麹菌ホスファターゼ (Aph) による旨味成分の分解防止のため、高温の加熱失活処理が不可欠である。しかし、高温加熱により味噌の品質が低下するため、Aph 低生産麹菌を利用した新規な省エネルギー型味噌製造技術の開発が求められている。本研究では、味噌用麹菌における高頻度相同組換え系の開発と *aph* 遺伝子破壊株の作出を行い、味噌製造における *aph* 遺伝子群の機能解明と Aph 低生産麹菌の育種を目指す。

【方法・結果】味噌用麹菌 *A. oryzae* KBN630 を *pyrG* 遺伝子破壊用ベクターで形質転換し、*pyrG* 遺伝子破壊株 *A. oryzae* KBN630-17 を取得した。さらに *A. oryzae* KBN630-17 を *ku70* 遺伝子削除用ベクター pDelku70-2 で形質転換し、*ku70*・*pyrG* 遺伝子二重破壊株 *A. oryzae* KBN630-17K3 を取得した。*A. oryzae* KBN630-17K3 における遺伝子ターゲティング効率を *amyR* 遺伝子破壊ベクターで測定した結果、90%以上の高頻度相同組換え系であることが確認された。次に *A. niger phyA* 遺伝子と最も相同性が高い *aphA* 遺伝子の破壊用ベクター pDisaphA を構築した。pDisaphA で *A. oryzae* KBN630-17K3 を形質転換し、*aphA* 遺伝子破壊株を取得した。現在、*aphA* 遺伝子破壊株のホスファターゼ活性の測定および味噌用麹菌としての実用性の評価を行っている。なお本研究は「新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業」の一環として実施した。

Disruption of the phosphatase gene, *aphA*, in the miso koji mold, *A. oryzae* KBN630

Shoko YOSHINO-YASUDA, Akihiro MORI, Nami ISHIHARA, Osamu HASEGAWA, Yoshimi IGA*, Yohei

SHIRAIISHI*, Yutaka WAGU*, Noriyuki KITAMOTO (Food Res. Center, Aichi Ind. Tech. Inst., *Bio'c CO.,LTD)

P-7

油糧微生物 *Mortierella alpina* の多重栄養要求性変異株の構築と諸性質の評価

安藤晃規¹, 田中ゆか¹, 奥田知生², 櫻谷英治², 島 純¹, 小川 順², 清水 昌^{2,3} (1 京大・微生物科学, 2 京大院農・応用生命, 3 京都学園大・バイオ環境)

我々の研究室で見いだされた *Mortierella alpina* 1S-4 株はアラキドン酸をはじめとする各種高度不飽和脂肪酸 (PUFA) を菌体内に著量蓄積することから、PUFA 生産ならびに生合成機構解明のためのモデル生物として注目されている。これまでに本菌における PUFA 生合成機構の解明及び生産制御を目的として、ウラシル要求性を指標とした宿主-ベクター系ならびに形質転換法を開発してきた。今回、ウラシル要求性変異株を対象に変異処理を行い、二重栄養要求性変異株の取得を試みた。*M. alpina* 1S-4 株のウラシル要求性変異株の胞子に対し、生存率が 1%以下となる条件にて UV 処理を行い、冷暗所にて変異の定着処理後、限定培地にて培養を行った。その後、フィルター濾過にて生育した菌糸と生育しなかった胞子とを分離することで栄養要求性変異株の濃縮を試みた。さらに、コロニー径を小さくするローズベンガルを含有した GY (グルコース 1%, 酵母エキス 0.5%) 平板培地上にて単コロニーを釣菌し、完全合成培地と最少培地での生育の有無から、栄養要求性株の選抜を行った。結果、ロイシン、メチオニン、リジン、トリプトファン、トレオニン、メチオニン、ヒスチジン、フェニルアラニンの各要求性とウラシル要求性を示す二重栄養要求性変異株の取得に成功した。現在、生育度、脂質生産性、胞子形成能の評価を行っている。

Construction and characterization of double auxotrophs of oleaginous filamentous fungus *Mortierella alpina*

Akinori Ando¹, Yuka Tanaka¹, Tomoyo Okuda², Eiji Sakuradani², Jun Shima¹, Jun Ogawa², Sakayu Shimizu^{2,3} (1 Res. Div. Microb. Sci., Kyoto Univ. 2 Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ. 3 Dep. Biosci. Biotechnol., Fac. Bioenviron. Sci., Kyoto Gakuen Univ.)

P-8

新規麹菌バイオリアクターによる飲料中のアクリルアミド分解

加座健士郎, 桐藤万裕, 若泉賢功, 佐野元昭, 尾関健二, 大箸信一 (金沢工大・ゲノム研)

【目的】アクリルアミド(AA)は食品を加熱することで生じる発がん性が強く懸念される有害物質であり、安全性の観点から低減することが望ましい。これまでの研究で麹菌には分解能のバラエティーがあり、麹菌体を十分に生育させた後、AA を単一炭素源・窒素源のアルカリ培地にシフトすることで、AA 分解能が非常に高まり(AA 分解活性+代謝活性ほとんど持たない)、アルギン酸ゲルを使用した固定化担体での分解利用が可能であることが分かった。さらに飲料の品質変化を極力抑える方法としてヘチマ担体での菌体処理法を考案した。またアルカリ培地の pH の差による AA 分解に直接関与する麹菌アミダーゼ遺伝子の発現量の違いを、リアルタイム PCR にて調査した。今回、短時間菌体処理法でのモデル飲料中の AA の現実的な低減化方法について報告する。

【方法・結果】AA 分解能が高い麹菌 *Aspergillus oryzae* No.100 を用い、ヘチマ担体に予め栄養源を吸着・乾燥処理することにより、胞子の着生が良く、ヘチマ担体中での菌体量が増えることが分かった。このようなヘチマ吸着麹菌胞子を栄養培地で菌体量を最大限に増やした発芽菌体とした後、AA+CD(-C&-N)の最少培地で AA 分解能を誘導処理・洗浄後、AA 添加したモデル飲料(水&ほうじ茶)中の品質変化がなく、AA を特異的に数時間で分解除去できることが分かった(バッチ処理)。またリアクター処理ではアルカリ誘導菌体で、少なくとも 3 回の低減化処理が可能となった。現在、リアルタイム PCR にて、アルカリ培地の pH の差による麹菌アミダーゼ遺伝子の発現量を調査した結果より、更なる AA 分解の効率化と、スケールアップが可能な担体を検討している。

Effect of new *Aspergillus oryzae* bioreactor system on acrylamide degradation in drinks.

Kenshiro Kaza, Kazuhiro Kirifuji, Masanori Wakaizumi, Motoaki Sano, Kenji Ozeki, Shinichi Ohashi (KIT)

P-9

糸状菌類で保存される麴菌の機能未知遺伝子の解析

池田優理子², 富川史子¹, 岩下和裕^{1,2} (1 広島大, 2 酒総研)

【目的】麴菌は、産業上の重要性から、全ゲノムシーケンス解析が実施され 1,2074 遺伝子が予測されるとともに、全予測遺伝子の 50%以上の機能が推定出来ない(機能未知遺伝子)事が明らかとなった。また、当研究室で行った発現解析により、これらの機能未知遺伝子は実際に発現していることが明らかとなっている。さらに、アカパンカビや青カビなど、他の糸状菌についてもゲノム解析がなされ、麴菌と同様に、予測遺伝子の大半が機能未知である事が明らかとなっている。比較ゲノム解析の結果から、これらの機能未知遺伝子の中には、様々な糸状菌間で保存されていることが明らかとなってきた。これらの糸状菌類に保存されている機能未知遺伝子は、糸状菌に特有の生物分子システムに参与している可能性が示唆される。そこで、今回は、これら糸状菌に保存される機能未知遺伝子について解析を行った。

【方法および結果】麴菌は、ACE33ver.2 遺伝子予測では 13,765 遺伝子が予測されており、このうち 9,327 遺伝子が KOG 機能分類により機能未知 (S, R, X) に分類されている。これらの中で、米麴において遺伝子の発現量の高かった上位 2,034 遺伝子に含まれる遺伝子を検索したところ、840 遺伝子が含まれていた。この 840 遺伝子について、ゲノム配列が報告されている 14 菌株の糸状菌、酵母の遺伝子と BLAST による双方向ベストヒット解析により、比較解析を行い、糸状菌類で高保存されている遺伝子を選抜した。さらに Uniplot に対する Blast 解析により、実験により機能解析されたホモログがないことを確認した。これらの遺伝子からランダムに選んだ 147 遺伝子について、*A. oryzae* NSR- Δ IID2 株を宿主として遺伝子破壊を行い、PCR により破壊成功としたものについて、プレート培養や液体培養による生育等のフェノタイプの観察を行った。その結果、必須であることが示唆される遺伝子や、フェノタイプに大きな変化が見られる遺伝子が見いだされた。

Analysis of *A. oryzae* genes, which conserved among filamentous fungi but not annotated the functions.

Yuriko Ikeda², Fumiko Tomikawa¹, Kazuhiro Iwashita^{1,2} (1 Hiroshima Univ., 2 NRIB)

P-10

実用麴菌株の醸造特性に関する網羅的解析

伊藤岳^{1,2}, 妹尾悠平^{1,2}, 岩下和裕^{1,2}, 山田修² (1 広島大院・先端研, 2 酒総研)

【目的】麴菌 (*Aspergillus oryzae*) は古くから清酒、味噌や醤油などの醸造製品の製造に用いられており、各製品生産に適した多様な菌株が使用されている。これまでに、麴菌 DN Achip を用いて様々な用途を持つ実用麴菌株 55 株について遺伝子シグナルに基づくゲノムアレイ解析が行われ、各菌株は 9 つの主なグループに分類され、これらのグループとその産業用途には関連があることが明らかとなっている。しかし、各実用麴菌株の特性については、形態などの分類学的な解析以外は依然十分な解析が行われていない。そこで本研究では、アレイ解析が行われた実用麴菌株 55 株の醸造特性に着目し、各実用麴菌株の清酒醸造における性質について網羅的に解析し、ゲノムアレイ解析の結果との相関性を確認することを目的とした。

【方法・結果】まず、清酒用の主要な系統を代表する 3 株について、 α 米を用いて製麴、小仕込みを行い清酒醸造に関する特性の解析を行った。その結果、米麴の酵素力価ではグルコアミラーゼ活性等に、清酒製造結果では発酵経過、酢酸イソアミル等の香气成分等に有意な違いが見られた。続いて、各実用麴菌を用いて米麴を作製し、清酒製造において重要な役割を果たす 5 つの酵素 (α -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、 α -グルコシダーゼ、酸性カルボキシペプチダーゼ、酸性プロテアーゼ) の活性測定を行い、各ゲノムアレイ解析のグループとの相関性を検討した。その結果、数種の酵素で各グループとその活性に相関が見られた。

今後は、実用麴菌株を用いて製麴した米麴により実際に小仕込み試験を行い、発酵経過、清酒の特性、米麴と生成酒中の代謝物のプロファイル解析などを行い、各実用麴菌株の醸造特性について解析を進めていく予定である。

Comprehensive analysis of brewing quality of industrial *Aspergillus oryzae* strains

Gaku Ito^{1,2}, Yuhei Senoo^{1,2}, Kazuhiro Iwashita^{1,2}, Osamu Yamada²

(1 Dept. of Adv. Sci. Mat, Hiroshima Univ., 2 NRIB)

P-11

醤油用黄麹菌 (*Aspergillus oryzae* RIB915 株) のゲノムシーケンス解析

藤村 友明, 野村 孝典, 伊藤 岳, 岩下 和裕, 山田 修(広大先端研, 酒類総合研究所)

麹菌(*Aspergillus oryzae*)は、醸造産業、酵素産業等において重要な微生物であり、これらの産業では特性の異なる多様な株が使用されている。当研究室では、麹菌 DNACHIP によるゲノムアレイ解析により、各実用麹菌株の系統解析を行ない、9つの主な系統に分かれることを示すと共に、各系統と麹菌株の用途に相関があることを示してきた。また、清酒用麹菌のモデル株である RIB128 株、現在の主要な清酒用麹菌株の1つである RIBOIS01 株について 454 genome sequencer FLX (Roche 社)によりゲノム配列解析を行い、これらのゲノム構造の違いについて、具体的に検討してきている。これまでにシーケンス解析を行った菌株は、清酒用麹菌であるため、今回、醤油用として使用された菌株のゲノムについてシーケンス解析を行い、比較解析をすることとした。

まず、醤油麹株の中から、小麦ふすまでの増殖が旺盛で中性プロテアーゼ、酸性プロテアーゼ活性が高く、RIB128 株に比較的近い RIB915 株をシーケンス株として選抜した。続いて genome DNA を抽出し 454 genome sequencer FLX による pair end 解析を行った。その結果 5,281 個 contig が得られ、contig 総長は 37.0Mbp であった。また、679 個の Scaffold が得られ、最長のものは 4Mbp に達した。これらの配列を RIB40 株と比較したところ 500bp 以上の欠失箇所 (総欠失配列長)、新規配列挿入箇所 (総新規配列長)は 156 (600kb)、142 (761kb)箇所であった。現在、RIB40 株と比較した時の染色体間組換えや総遺伝子数などについて比較解析を進めている。

The genome sequence analysis of *Aspergillus oryzae* RIB915 used for soy sauce making.

Tomoaki Fujimura, Takanori Nomura, Gaku Ito, Kazuhiro Iwashita, Osamu Yamada

(Grad. Sch. Adv. Sci. Mat, Univ. of Hiroshima, NRIB)

P-12

清酒用麹菌株間の比較ゲノム解析

野村孝典¹、藤村友明¹、小田健太¹、岩下和裕^{1, 2}、山田修² (1: 広島大院・先端研 2: 酒総研)

[目的] 麹菌 (*Aspergillus oryzae*) は日本の伝統醸造産業に重要な微生物で、実際の醸造現場では様々な特性を有する多様な菌株が使用されている。我々は、これまでに行った麹菌 DNACHIP を用いた解析から、各種麹は多様なゲノム構造を有し、醸造用途との関連があることを明らかにしている。これらゲノム構造の多様化には染色体の欠失、配列の変化、新規の配列、染色体間組換えなどの関与が示唆される。そこで本研究では、大吟醸麹から単離し、高品質の清酒が醸成可能な RIBOIS01 株と、清酒用麹菌株の標準株考えられる RIB128 株について、次世代シーケンサー 454 Genome Sequencer FLX (Roche 社) によりシーケンス解析を行った。

[方法・結果] RIBOIS01 株と、RIB128 株からゲノム DNA を抽出しシーケンサーに供し、得られたコンティグの配列を用い、Blast, Spaln などのプログラムを使用して、遺伝子を網羅的に予測するとともに、RIB40 株との比較解析を行った。その結果、RIBOIS01 株と RIB128 株のゲノムサイズはそれぞれ約 36.9Mbp と約 37.8Mbp であり、RIB40 株と共通する遺伝子の塩基レベルの平均相同性は各々約 99.42%、約 99.65% と高い一方で、染色体間組換え等の大規模な染色体構造の違いも検出された。また、上述の菌株間では *AmyR* 遺伝子の構造が変化しており、酵素活性に影響を及ぼす可能性が示唆された。

The comparative genome analysis among *Aspergillus oryzae* sake strains

Takanori Nomura¹, Tomoaki Fujimura¹, Kenta Oda¹, Kazuhiro Iwashita^{1, 2}, Osamu Yamada¹

(1:Hiroshima Univ. 2:NRIB)

P-13

ストレス応答 mRNA 変動解析による麹菌 (*Aspergillus oryzae*) の機能的な外来性遺伝子探索

小笠原博信¹、高橋砂織¹、五味勝也² (¹秋田県総食研セ、²東北大院農・生物産業創成)

【目的】麹菌の活性型 DNA トランスポゾン *Crawler* は、分生胞子における高濃度の Cu²⁺ や高温などのストレス処理によって転移活性を発現する。このとき、*Crawler*-mRNA はスプライシングや poly(A) 付加を受けた不完全な分子種が減少し、インタクトな全長 mRNA 比率が増加することが認められ、*Crawler* の機能化 (転移活性化) につながることを明らかにしてきた¹⁾。そこで、本研究ではゲノムの多様化機構の解明を目的にトランスポゾン *Crawler* をストレス条件下で活性化する外来性遺伝子のモデルとし、全 mRNA のスプライシング変動を比較解析することにより、新たに機能化する外来性遺伝子の探索を行った。

【方法】Cu²⁺ ストレス処理後および対照区の分生胞子より total RNA を抽出し、全 cDNA シーケンシングを基に DOGAN のアノテーションデータも加えたストレス応答 cDNA ブラウザーを構築した。アノテーションがなされていない領域を中心に、*Crawler*-mRNA と同様にストレス応答により、強いスプライシング阻害が認められる DNA 配列を抽出し、Blast 検索による解析を行った。

【結果】Chromosome1 の SC009 より *A. niger* の DNA トランスポゾン *Tan1* に相同性の高い配列やレトロトランスポゾンの gag 様配列などが見出された。*Tan1* 様配列は 558 アミノ酸からなる transposase をコードし、42bp の完全な TIR と 2bp (TA) の TSD 配列に囲まれた新規の DNA トランスポゾンであった。*A. oryzae* ゲノム内を検索したところ、7 コピーの完全型、4 コピーの変異型および約 90 コピーの degenerate 型が分布し、多コピーであることから *Crawler* 同様に転移活性化の可能性も示された。1) 農化大会講演要旨集、p284 (2009)

Exploratory survey for potential exogenous genes in *Aspergillus oryzae* by a stress-fluctuation cDNA browser.

Hironobu Ogasawara¹, Saori Takahashi¹, Katsuya Gomi²

(¹Akita Res. Inst. Food & Brewing, ²Div. Biosci. Biotech. Future Bioind., Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ.)

P-14

麹菌 *Aspergillus oryzae* 由来プロテアーゼの麹菌での大量生産

坂東 弘樹¹、石田 博樹¹、秦 洋二¹、楠本 憲一²、山形 洋平³、天野 仁⁴、竹内 道雄³ (¹月桂冠総研、²食総研、³東京農工大・院・応生科、⁴天野エンザイム)

【目的】麹菌 *Aspergillus oryzae* は他の糸状菌に比べて多くのプロテアーゼ遺伝子を有する。我々は、これらのプロテアーゼの中から、ヒトの健康増進に役立つ機能性ペプチドを提供できる産業上有用なプロテアーゼを探索し、これらの高生産麹菌を構築、オーダーメイド酵素剤の開発への利用を目的として、(1) 麹菌が持つ全プロテアーゼの酵素化学的諸性質の解明、(2) プロテアーゼ大量生産麹菌の構築、(3) プロテアーゼを用いた機能性ペプチドの製造試験を行っている。本研究では、機能性ペプチド製造において有用と考えられるプロテアーゼについて、その高生産麹菌の構築を行った。【方法及び結果】麹菌において機能する各種プロモーター制御下で麹菌由来プロテアーゼ遺伝子 9 種類を発現させ、そのプロテアーゼ生産性を評価したところ、すべてのプロテアーゼについてその生産を確認することができた。これらプロテアーゼ生産性評価の結果、(1) プロモーターと発現させるプロテアーゼ遺伝子には相性があること、(2) 培養時間を検討することで菌体内局プロテアーゼでも菌体外にその活性を確認することができることなどが明らかとなった。これらの知見は今後の様々なプロテアーゼ生産株の構築の際に有用なものであると考えられる。

【謝辞】本研究は生研センター基礎研究推進事業の一環として実施した。

Construction of protease high-production system by *Aspergillus oryzae*.

Hiroki Bando¹, Hiroki Ishida¹, Yoji Hata¹, Ken-ichi Kusumoto², Youhei Yamagata³, Hitoshi Amano⁴, Michio Takeuchi³

(¹ Res. Inst., Gekkeikan Sake Co., ² Natl. Food Res. Inst., ³ Dept. Appl. Biol. Sci., Tokyo Univ. Agric. Technol., ⁴ Amano Enzyme Inc.)

P-15

***Aureobasidium pullulans* 由来キシラナーゼのシグナル・ペプチド：大腸菌による糸状菌キシラナーゼの細胞外生産への利用**

太田一良, 田中秀典, 山川大輔, 浜砂裕則, 藤本仁寿 (宮崎大・農・応生科)

【目的】二形性真菌 *A. pullulans* ATCC 20524 株由来キシラナーゼ XynI は 34 個のアミノ酸残基からなるプロセプト配列の分泌シグナルを持つ。この分泌シグナルには、その切断部位より前に大腸菌シグナル・ペプチダーゼの認識部位モチーフ Ala(-3)-X-Ala(-1) が 3 回連続した繰返し配列が存在する。本報では、この分泌シグナルを糸状菌キシラナーゼと融合させ、融合タンパク質を大腸菌で効率よく発現し、分泌させた。

【方法・結果】Overlap extension PCR により、*xynI* 遺伝子のシグナル配列と糸状菌 *Penicillium citrinum* 由来キシラナーゼ遺伝子 *xynA* の成熟酵素コード領域を融合させた。この融合遺伝子 *xynI::A* を大腸菌プラスミド pET-26b(+) に挿入し、pEXP401 を構築した。このプラスミドを大腸菌 BL21(DE3) に導入した形質転換体 *E. coli*(pEXP401) を M9 培地(400 ml) に接種し、30°C で振とう培養 (120 rpm) した。培養液の OD (660 nm) が 0.6 に達した時点で、IPTG を添加し、さらに 12 時間培養した。培養液 1 ml 当たりのキシラナーゼ活性は、細胞抽出液画分で 4.29 U、上清画分では 16.8 U であり、細胞外の酵素活性が 79% を占めた。また、培養液上清から精製した菌体外酵素の N 末端アミノ酸配列から、XynI のシグナル・ペプチドは 4 ヶ所で切断されたことが示唆された。各組換え酵素は 506~652 U/mg の高い比活性を示した。

Signal peptide of *Aureobasidium pullulans* xylanase: use for extracellular production of a fungal xylanase by *Escherichia coli*

Kazuyoshi Ohta, Hidenori Tanaka, Daisuke Yamakawa, Hironori Hamasuna, Hirohisa Fujimoto

(Dept. Biochem. Appl. Biosci., Univ. of Miyazaki)

P-16

麹菌 *A. oryzae* による味覚修飾タンパク質ミラクリンの生産

山田裕史, 根本 崇, 尹 載宇, 丸山潤一, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)

【目的】味覚修飾タンパク質ミラクリンはホモダイマーから成るタンパク質であり、酸味を甘味に感じさせる味覚修飾活性をもつため、食品などへの利用が期待されている。麹菌 *Aspergillus oryzae* は優れたタンパク質分泌能を有し、様々な異種タンパク質生産の宿主として利用されている。現在、*A. oryzae* を宿主に用いた活性のあるミラクリンの生産実験は成功しているが¹⁾、収量が少なく産業レベルでの収量を得るには至っていない。また、一般に多量体からなる異種タンパク質は生産が困難であるが、ホモダイマーであるミラクリンの高生産実験から多量体タンパク質の生産に関する新たな知見や方法が得られる可能性が有る。そこで今回は、当研究室で得られた新規宿主株と選択マーカーの工夫によってミラクリンの生産量の増加を試みた。

【方法と結果】宿主株には AUT1 (*niaD⁻sC⁻ΔtppA ΔpepE aut1⁻*)²⁾、NSID-v10 (*niaD⁻sC⁻ΔligD ΔAovps10*)³⁾、NSID-Δ7 (*niaD⁻sC⁻ΔligD ΔtppA ΔpepE ΔnptB ΔdppIV ΔdppV ΔalpA ΔpepA*) の 3 株を使用した。作製した発現プラスミド (p_{gg142AKMnS}) では、強力な *glaA142* プロモーターを使用し、キャリアとして AmyB を用いて、ミラクリンとの連結部位には Kex2 プロテアーゼ切断配列を挿入した。また、多コピーが導入されるよう選択マーカーには *A. nidulans* *sC* を用いた。これらを用いた形質転換により、ミラクリン発現株を多数得た。現在、ミラクリン生産量を定量することで異なる宿主株間での生産量の比較を試みている。

1) Ito et al. (2007), Biochem Biophys Res Commun., 360, 407-411

2) Nemoto et al. (2009), Appl Microbiol Biotechnol., 82, 1105-1114

3) Yoon et al. (2010), Appl Environ Microbiol., 76, 5718-5727

Production of a taste-modifying protein, miraculin by *Aspergillus oryzae*.

Hirofumi Yamada, Takashi Nemoto, Jaewoo Yoon, Jun-ichi Maruyama, Katsuhiko Kitamoto

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

P-17

麹菌 *A. oryzae* α -アミラーゼ遺伝子破壊株を用いた有用タンパク質生産

根本崇, 丸山潤一, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)

【目的】優れたタンパク質分泌能を有する麹菌 *A. oryzae* は、有用タンパク質生産の宿主として使用されている。*A. oryzae* RIB40 株には3つの α -アミラーゼ遺伝子 (*amyA*, *amyB*, *amyC*) が存在しており、多量に α -アミラーゼを分泌している。これまでに我々は、有用タンパク質生産における α -アミラーゼの影響を調べるため、種々の α -アミラーゼ遺伝子の破壊株を作製している¹⁾。そこで今回は、 α -アミラーゼ遺伝子破壊株による有用タンパク質生産を試みた。

【方法と結果】培養液中の α -アミラーゼの活性がコントロール株の約10%までに減少した α -アミラーゼ遺伝子二重破壊株 ($\Delta amyB \Delta amyC$) 及び α -アミラーゼ活性を示さない α -アミラーゼ遺伝子三重破壊株 ($\Delta amyA \Delta amyB \Delta amyC$) を宿主とし、有用タンパク質のモデルに、*A. oryzae* 由来のヌクレアーゼ S1, 同属である *A. aculeatus* のセロビオヒドロラーゼ、また異種タンパク質としてウシキモシンを用いて、グルコアミラーゼ (*glaA*) プロモーター、または *GlaA* キャリアーを使用して発現させた。その結果、二重破壊株では *GlaA* キャリアーを使用したウシキモシンの生産では、20~30%生産量の改善が認められた。ヌクレアーゼ S1, セロビオヒドロラーゼの生産量はコントロール株と同程度を示したが、夾雑 α -アミラーゼがわずかなので高比活性の酵素生産が期待される。一方、予想外にも三重破壊株では、いずれの有用タンパク質の生産量も減少した。RT-PCR によりプロモーターに用いた *glaA* の転写発現量を確認したところ、三重破壊株では *glaA* の転写発現量の低下がみられ、三重破壊株におけるアミラーゼ系の転写発現量の低下が考えられた。

1) 根本ら, 2009 年度生物工学会大会講演要旨集, p.15

Protein production in α -amylase genes disruptants of *Aspergillus oryzae*

Takashi Nemoto, Jun-ichi Maruyama, Katsuhiko Kitamoto

(Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo)

P-18

麹菌 α -1,3グルカン合成酵素遺伝子 *agsB* 破壊による細胞壁の分泌タカアミラーゼ吸着能への影響

佐藤宏樹, 新谷尚弘, 五味勝也 (東北大院・農・生物産業創成)

麹菌 *Aspergillus oryzae* の液体培養において、培養後期にタカアミラーゼ (TAA) などの分泌されたタンパク質が細胞壁に“吸着”することにより、培養上清中から消失する現象が認められた。麹菌細胞壁を段階的に分画することにより細胞壁構成多糖のキチンが吸着の原因因子であることを見出した一方で、培養前期において吸着を阻害する因子の存在が示唆された。培養前期の細胞壁を弱アルカリ処理することによって吸着現象が認められるようになったことから、アルカリ可溶性多糖の α -1,3グルカンが吸着阻害因子である可能性が考えられた。そこで本研究では、 α -1,3グルカンの吸着現象への影響について解析した。

麹菌のゲノムデータベースより近縁種との相同性の高い α -1,3グルカン合成酵素3種類 (*AgsA*, *AgsB*, *AgsC*) を見出し、それぞれの遺伝子破壊株を作製した。各破壊株における TAA の分泌動態を経時的に調べたところ、*agsB* 破壊株では液体培養でペレット状の生育を示さず、培養上清中の TAA 量は培養前期から著しく少なくなっていた。タンパク質の吸着を阻害するような 0.1 M リン酸塩存在下で培養すると、上清中の TAA 量は野生株と同程度に回復したことから、*agsB* 破壊株では培養前期においても吸着が阻害されず、TAA が細胞壁に吸着したために上清中の TAA 量が著しく減少したと考えられる。

Adsorption of Taka-amylase onto cell wall by disruption of alpha-1,3-glucan synthase gene, *agsB*, in *Aspergillus oryzae*

Hiroki Sato, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi

(Div. Biosci. Biotechnol. Future Bioind., Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ.)

P-19 (O-2)

麴菌マルトースパーミアーゼ mRNA は Ire1 ヌクレアーゼにより切断される

田中瑞己, 新谷尚弘, 五味勝也 (東北大院農・生物産業創成)

真核生物において mRNA は Xrn1 による 5'-3' 分解経路と Ski 複合体-エキソソームによる 3'-5' 分解経路によって分解される。一方、近年、小胞体に局在する mRNA が小胞体膜貫通型エンドヌクレアーゼ Ire1 によって切断されることが報告されている。麴菌において Xrn1 および Ski 複合体構成因子である Ski2 と Ski3 の遺伝子破壊株をそれぞれ作成した結果、興味深いことに *ski2* および *ski3* 破壊株はマルトースやデンプンを単一炭素源とする培地において特異的に著しく生育が抑制された。

生育が抑制される原因について解析する過程で、それぞれの遺伝子破壊株においてマルトースパーミアーゼ (*malP*) 全長をプローブとしてノーザンブロッティングを行った結果、*ski2* および *ski3* 破壊株において特異的に低分子のシグナルが観察された。*malP* の coding region 配列内に Ire1 による切断を受けると考えられる配列が存在したことから、*malP* の前半部分をプローブとしてノーザンブロッティングを行った結果、*ski2* および *ski3* 破壊株において低分子のシグナルが観察された。このことから、*ski2* および *ski3* 破壊株においては、Ire1 によって切断を受けた *malP* mRNA の前半部分がエキソソームによる分解を受けずに蓄積していることが示唆された。さらに、ストップコドンを持たない mRNA からリボソームを解離すると予想される HbsA の遺伝子破壊株でも、*ski2* および *ski3* 破壊株と同様に *malP* mRNA 前半部分が蓄積していた。*hbsA* 破壊株はマルトースやデンプン培地において生育が抑制されなかったことから、*ski2* および *ski3* 破壊株では蓄積した *malP* mRNA 前半部分が翻訳されることにより生育が抑制される可能性が示された。

mRNA encoding maltose permease could be cleaved by Ire1 endonuclease in *Aspergillus oryzae*.

Mizuki Tanaka, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi

(Div. Biosci. Biotechnol. Future Bioind., Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ.)

P-20 (O-3)

Micafungin 処理によりリン酸化される *Neurospora crassa* の 2 種類の MAP kinase

亀井誠之, 山下和宏, 高橋正和, 一石昭彦, 藤村真 (東洋大院・生命科学)

出芽酵母では、形態形成や細胞壁の損傷に応答した細胞壁の再構築(Cell Wall Integrity:CWI)が Slt2 MAP kinase を中心に厳密に制御されている。モデル糸状菌 *Neurospora crassa* には 2 つの MAP kinase, MAK-1(出芽酵母 Slt2 オルソログ)と MAK-2(出芽酵母 Pheromone 応答経路 Fus3 オルソログ)が存在するが、これらの機能については不明な点が多い。*N. crassa* の MAK-1 及び MAK-2 の CWI への関連性を明らかにするため、まず、 $\Delta mak-1$ と $\Delta mak-2$ の表現型を調べた。いずれの破壊株においても、野生株よりも顕著な生育遅延や子嚢胞子形成能に異常が見られた。beta-1,3-glucan 合成酵素阻害剤 micafungin に対する感受性は、 $\Delta mak-1$ が野生株よりもやや高い感受性を示し、 $\Delta mak-2$ はさらに高い感受性を示した。Western blotting によるリン酸化解析により、MAK-1 は胞子発芽から菌糸生育における恒常的リン酸化を示す一方、MAK-2 が micafungin 処理により顕著にリン酸化された。さらに興味深いことに、 $\Delta mak-2$ では MAK-1 の恒常的リン酸化が消失し、MAK-1 は micafungin 特異的にリン酸化された。また、 $\Delta mak-1$ においては MAK-2 のリン酸化に変化は認められなかった。これらのことから、CWI には MAK-1 と MAK-2 が協調的に機能することが推定された。*mak-1* 及び *mak-2* の発現量を real-time RT-PCR により定量化したところ、菌糸生育時における基礎発現量は *mak-2* の方が高く、micafungin 処理時に両遺伝子発現量は変動しなかった。現在、micafungin により誘導される細胞壁合成酵素遺伝子群と、それら遺伝子群の MAK-1 及び MAK-2 MAP kinase 依存性について解析を行っている。

Two MAP kinases, MAK-1 and MAK-2, were phosphorylated by micafungin treatment in *Neurospora crassa*.

Masayuki Kameji, Kazuhiro Yamashita, Masakazu Takahashi, Akihiko Ichiishi and Makoto Fujimura

(Grad. Sch. of Life Sci., Toyo Univ.)

P-21

Aspergillus nidulans におけるプロテインキナーゼ C の極性形成に関わる機能解析

片山琢也, 高井弘基, 堀内裕之, 太田明德 (東大院・農生科・応生工)

プロテインキナーゼ C (PKC) は真核生物に高度に保存されたセリン/スレオニンキナーゼである。*Saccharomyces cerevisiae* の PKC をコードする *PKC1* 遺伝子は生育に必須な遺伝子ではないが, *Aspergillus nidulans* の PKC をコードする *pkcA* 遺伝子は生育に必須な遺伝子であることが示されている¹⁾。これまで当研究室では, *pkcA* 温度感受性株が作製され, その性質の解析が行われている。この *pkcA* 温度感受性株は 30°C では野生型株と同様の表現型を示すが, 42°C では生育することができない。42°C における *pkcA* 温度感受性株の分生子発芽時の表現型を観察したところ, 通常に分生子発芽時に見られる無極性生長が途中で停止し, その後菌数が急激に低下した²⁾。培地に浸透圧安定化剤を加えて同様の解析を行ったところ, 発芽管が形成されず異常に膨張した胞子や形態が異常な発芽管を形成した胞子が観察された。これらの細胞の核を染色して観察したところ, 一つの分生子内に複数の核が観察されたことから, 核分裂は正常に起こることが示唆された。また生長中の菌糸に対して培養温度を 42°C にシフトした場合のアクチンの動態を間接蛍光抗体法を用いて解析したところ, 野生型株では菌糸の極性の指標となるアクチンパッチが温度シフト後一時的に菌糸先端から消失するが, 一定時間後再び先端に出現するのに対し, *pkcA* 温度感受性株ではアクチンパッチの先端からの消失は起こるが再出現が起こらないことを示唆する結果を得た。これらのことから PkcA が少なくとも 42°C においては分生子発芽時, 菌糸生長時の極性形成に重要な役割を持つことが示唆された。

1) Ichinomiya, M., et al., (2007) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 2787-2799

2) 片山ら, 日本農芸化学会 2010 年度大会講演要旨集, p.213

The functional analysis of PkcA in the polarity establishment of *Aspergillus nidulans*

Takuya Katayama, Hiroki Takai, Hiroyuki Horiuchi, and Akinori Ohta (Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo)

P-22

担子菌ウシグソヒトヨタケの子実体形成開始におけるクロマチンリモデリング

安藤友貴, 中沢威人, 佐藤剛士, 岡邦彦, 秦武史, 中堀清, 鎌田堯 (岡山大・自然科学)

担子菌ウシグソヒトヨタケ (*Coprinopsis cinerea*) は, 有性生殖過程において子実体形成を行う。この過程ではまず, 一核菌糸同士の交配により, 二核菌糸が形成される。二核菌糸は栄養成長してコロニーを形成し, 光などの環境刺激にตอบสนองして子実体を形成する。子実体形成は, 細胞分化や組織・器官形成など多くの過程からなるが, 本研究では未分化の二核菌糸から子実体形成が開始する過程に的を絞った。

まず, 交配することなく子実体を形成する #326 (*AmutBmut*) 株を親株とし, restruction enzyme-mediated integration (REMI) により子実体形成開始が阻止された挿入突然変異株を多数単離した。遺伝分析の結果, 得られた株の内 12 株で, 変異がプラスミドの挿入によることが示された。そこで, それらの株についてプラスミドレスキューを行い, 原因遺伝子を推定した。さらに, 推定原因遺伝子をそれぞれの変異株に形質転換することによって, 変異形質が相補されることを確認した。その結果, 相補した株の内 5 株の原因遺伝子がクロマチンリモデリングに関わるタンパク質 (SNF5, Arp9, Rmt) をコードしていることが明らかとなり, 子実体形成開始において, クロマチンリモデリングが密接に関わっていることが示唆された。5 株の内 3 つ, Xba43 と Spe20 及び Apa63 の原因遺伝子は Arp9 及び SNF5 をそれぞれコードしており, これら二つのタンパク質はいずれもクロマチンリモデリング複合体 SWI/SNF の主要な構成要素である。今後, 子実体形成開始時に SWI/SNF 複合体が結合するターゲットを同定したい。現在, SNF5 に HA タグを融合したタンパク質をコードする遺伝子を Spe20 に導入し, 変異が相補された形質転換体を得た段階である。この後, この株を用い, クロマチン免疫沈降 (ChIP) および ChIP-seq を行う予定である。

Chromatin remodeling in the initiation of fruiting of the basidiomycete *Coprinopsis cinerea*.

Yuki Ando, Takehito Nakazawa, Takeshi Sato, Kunihiko Oka, Takeshi Hata, Kiyoshi Nakahori, Takashi Kamada (Graduate School of Nat. Sci. & Tech., Univ. of Okayama)

P-23

アスペルギルス症病原菌 *Aspergillus fumigatus* におけるレクチンの機能解析

酒井香奈江, 大荒田素子, 五ノ井透 (千葉大・真菌センター)

アスペルギルス症はアスペルギルス属の真菌によって引き起こされる日和見感染症であり、特に免疫に障害のある人や動物に重大な感染をもたらす。その原因菌の主なものが *Aspergillus fumigatus* であり、治療が遅れた場合その致死率が高い。その治療薬としていくつかの抗生物質が用いられているが、近年では耐性菌の報告がなされており、新規機能を持つ薬の開発が求められている。これまでの研究で病原性に関わる因子がいくつか見つかっており、それらの病原性因子が複合的に働いているものと考えられている。有効な抗生物質の作用点を見つけるためにも *A. fumigatus* における病原性因子・機構の解明が必要である。

本研究では *A. fumigatus* の持つレクチンに注目した。レクチンは糖鎖への結合活性を持つタンパク質の総称であり糖タンパク質のフォールディングや、細胞内輸送に関わるなど生命に重要な働きを担っている。これまでに *A. fumigatus* の感染相手であるヒト細胞やマウス等において、*A. fumigatus* の細胞表面の糖鎖を認識するレクチンが見つかっており、それが免疫反応において重要な役割を果たしていることが分かっている。しかし *A. fumigatus* の持つレクチンについての研究はほとんど行われていない。そこで、*A. fumigatus* の持つレクチンを解析し、その機能と病原性との関わりを調べることを目的とした。

A. fumigatus のゲノムデータベース上にレクチン合成に関わると思われるいくつかの遺伝子が見つかったのでそれらの破壊株を作製し、大腸菌におけるレクチンタンパクの発現を試みた。現在、破壊株とタンパクの両面から *A. fumigatus* レクチンの解析を進めているところである。

Functional analysis of lectins in opportunistic pathogen, *Aspergillus fumigatus*.

Kanae Sakai, Motoko Ooarada, Toru Gono

(MMRC, Univ. of Chiba)

P-24

Aspergillus nidulans のガラクトマンナン生合成に関与する遺伝子の同定と機能解析

小町裕司¹, 浴野圭輔¹, 二神泰基², 竹川薫², 後藤正利², 野村善幸¹, 岡拓二¹ (¹崇城大・生物生命・応微工、²九大・院・農)

Aspergillus 属の細胞壁糖鎖には、 β -グルカン、キチン、 α -グルカン、マンナンおよびガラクトマンナンが含まれる。近年、これら細胞壁構成糖鎖の生合成に関わる遺伝子が明らかにされつつある。しかしながら、ガラクトマンナンの生合成に関する知見は、ほとんどない。そこで、ガラクトマンナンの生合成に関与する遺伝子を同定すると共に、ガラクトマンナンの生理的機能に関する知見を得ることを目的とした。

生物情報からガラクトマンナン生合成に関与すると推定される遺伝子を17個選抜し、それら全ての遺伝子破壊株を作製した。作製した破壊株より抽出した細胞壁タンパク質に対し、抗- β 1,5-Galf 抗体を用いたスクリーニングを行った結果、シグナルが完全に消失する遺伝子破壊株が見出された。そこで、その責任遺伝子を *gfsA*、2つのホモログを *gfsB* 及び *gfsC* と名付けた。これら3つの遺伝子はアミノ酸レベルで相互に26.0-33.2%の相同性を有しており、糸状菌類に特有の遺伝子であった。また、3つの遺伝子は全てN-末端に1つの推定膜貫通領域を有していることから、タイプIIの膜タンパク質であることが示唆された。

gfsA 遺伝子破壊株は、親株に比べて菌糸の成長速度が66%に減少し、分生子形成数が11%に減少した。さらに、細胞壁の単糖組成分析より、*gfsA* 遺伝子破壊株の細胞壁中のガラクトース量は親株の66%に減少していることが示された。以上の結果から、この3つの遺伝子がガラクトマンナン合成に関与していることが強く示唆され、且つ、糸状菌の正常な成長に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

Characterization of the genes involved in the biosynthesis of galactomannan in *Aspergillus nidulans*

Yuji Komachi¹, Keisuke Ekino¹, Taiki Futagami², Kaoru Takegawa², Masatoshi Goto², Yoshiyuki Nomura¹, Takuji Oka¹ (¹Dept. of Applied Microbial Technology, Sojo Univ., ² Dept. of Bioscience and Biotechnology, Kyushu Univ.)

P-25

Aspergillus nidulans におけるパキシリン様タンパク質 PxlA および PxlB の機能解析

二神泰基¹, 梶原康博², 高下秀春², 大森俊郎², 後藤正利¹ (¹ 九大院・農, ² 三和酒類)

パキシリンは細胞間接着因子やシグナル伝達経路の足場として機能するタンパク質の一種で、真核生物において広く保存されている。*Aspergillus nidulans* のゲノム中には、2種類のパキシリンホモログ ANID_03659.1 (PxlA) および ANID_07626.1 (PxlB) が存在する。PxlA は、タンパク質認識や細胞骨格相互作用に関わる LIM ドメインを2つもつ。一方、PxlB は3つの LIM ドメインと1つの RhoGAP (GTPase Activating Protein) ドメインをもつ。本研究では、*A. nidulans* におけるパキシリン様タンパク質の機能解明を目的とした。

各培養条件下における野生株と *pxlA* および *pxlB* 遺伝子破壊株 (*pxlAΔ* および *pxlBΔ*) の生育を比較した。*pxlAΔ* は、野生株に比べ、MM 培地において生育が抑制され、孢子形成率も約 17% に低下した。また、*pxlAΔ* はハイグロマイシン B や過酸化水素に対して高感受性を示さなかったが、Cell Wall Integrity 経路に作用するカフェイン、Congo red, およびミカファンギンに対して高感受性を示した。また、浸透圧の低い YG 培地において、*pxlAΔ* のコロニーサイズは 30 °C では野生株と同程度であったが、高温条件下 (37 °C) では小さくなった。この高温感受性は、浸透圧調節剤として KCl を添加した培地では見られなかった。一方、*pxlBΔ* は、MM 培地において生育抑制を受けたが、上記薬剤に対する高感受性を示さなかった。また、YG 培地においても、*pxlBΔ* は野生株と同様のサイズのコロニーを形成した。以上より、*A. nidulans* のもつ 2 つのパキシリンホモログ遺伝子破壊株は異なる表現型を示した。また、PxlA は Cell Wall Integrity に関与する可能性が示された。

Characterization of two paxillin like proteins, PxlA and PxlB, in *Aspergillus nidulans*

Taiki Futagami¹, Yasuhiro Kajiwara², Hideharu Takashita², Toshiro Omori², Masatoshi Goto¹

(¹ Faculty of Agriculture, Kyushu Univ., ² Sanwa Shurui, Co. Ltd.)

P-26

麹菌 *A. oryzae* における小胞体品質管理関連タンパク質の生化学的解析

菊間隆志¹, 渡邊泰祐^{1,2}, 丸山潤一³, 北本勝ひこ³, 伊藤幸成^{1,4} (¹ 理研・基幹研, ² 琉球大農・亜熱生資, ³ 東大院・農生科・応生工, ⁴ ERATO, JST)

【目的】我々は、麹菌の小胞体における N 結合型糖鎖を介した糖タンパク質品質管理機構の研究を行っている。酵母 Htm1p およびヒト EDEM1 はマンノシダーゼ活性によって N 結合型糖鎖のトリミングを行うと考えられているが、実際にマンノシダーゼ活性を有しているか活発に議論されている。本研究は、麹菌の精製 AoHtm1 および microsome 画分を用いた *in vitro* アッセイによる AoHtm1 の機能解析を目的としている。また、カルネキシンサイクルにおける糖タンパク質のフォールディングセンサーである UGGT の機能解析もあわせて行った。

【方法及び結果】AoHtm1-EGFP および UGGT-EGFP を、EGFP をタグとして磁気ビーズにより精製し、Man₉GlcNAc₂-PA を基質として *in vitro* アッセイを行ったところ、AoHtm1 に関してマンノシダーゼ活性は検出できなかった。一方、UGGT-EGFP においては、Man₉GlcNAc₂ にグルコースが1つ付加したと考えられる Glc₁Man₉GlcNAc₂ が検出された。また、野生株、UGGT-EGFP 発現株、UGGT 欠損株より microsome 画分を抽出し、同様のアッセイを行ったところ、破壊株では活性が見られなかったが、野生株、UGGT-EGFP 発現株では UGGT 活性が見られ、UGGT-EGFP 発現株においてはより高い活性が検出された。現在、AoHtm1-EGFP の精製条件の検討および野生株、AoHtm1-EGFP 発現株、*Aohtml* 破壊株の microsome 画分によるアッセイを行っている。

Biochemical analysis of ER quality control-related proteins in *Aspergillus oryzae*

Takashi Kikuma¹, Taisuke Watanabe^{1,2}, Jun-ichi Maruyama³, Katsuhiko Kitamoto³, Yukishige Ito^{1,4}

(¹RIKEN, ² Univ. of the Ryukyus, ³ Univ. of Tokyo, ⁴ ERATO, JST)

P-27

担子菌 *Coprinopsis cinerea* におけるオートファジーの誘導条件の解析

渡邊 彰, 弥生貴裕, 野地裕太, 麻田恭彦 (香川大・農・応生科)

オートファジーとは真核生物におけるタンパク質分解システムの一つであり, オートファゴソームと呼ばれる隔離膜を介したバルクな分解系である。近年, 各種生物を用いた解析から, オートファジーが栄養飢餓時の適応応答としてだけでなく, 細胞内浄化, 細胞分化, そして感染細菌の除去などの様々な生命現象にも密接に関与していることが報告されてきている。本研究では, 担子菌類におけるオートファジーの役割について明らかとするため, 担子菌 *Coprinopsis cinerea* のオートファゴソーム構成タンパク質である *CcAtg8* の局在を指標に, *C. cinerea* におけるオートファジーの誘導条件について検討を行った。

C. cinerea より取得した *Ccatg8* のプロモーター領域の下流に, 緑色蛍光タンパク質 (AcGFP1) 遺伝子および *CcAtg8*cDNA を組み込み, *CcAtg8* の N 末端に AcGFP1 が融合発現するような発現ベクターを構築した。構築した発現ベクターをマーカー遺伝子とともに共形質転換法により *C. cinerea* に導入し, 目的の発現ベクターの導入が確認された形質転換体を用いて解析を行った。その結果, 窒素源飢餓条件下において速やかな AcGFP1 の液胞への局在が観察された。現在, 種々の培養条件などが AcGFP1-*CcAtg8* 融合タンパク質の局在に及ぼす影響について解析を進めている。

The condition for induction of autophagy in basidiomycetous mushroom, *Coprinopsis cinerea*

Akira Watanabe, Takahiro Yayoi, Yuta Noji, Yasuhiko Asada

(Dept. of Appl. Biol. Sci., Fac. of Agr., Univ. of Kagawa)

P-28

Aspergillus nidulans のキチン合成酵素 ChsB 及び CsmA の菌糸内局在化部位の比較

對崎真植, 堀内裕之, 太田明德 (東大院・農生科・応生工)

キチンは糸状菌細胞壁の主要構成成分の一つであり, その生合成は形態形成, 分化に重要な役割を持つ。*A. nidulans* には, クラス III 及びクラス V に属するキチン合成酵素をコードする遺伝子 *chsB* 及び *csmA* が存在し, このクラスのキチン合成酵素遺伝子は菌糸型の生育を示す真菌類にのみ存在する。*ChsB* 及び *CsmA* は共に菌糸の生長に必須の機能を持ち, *CsmA* は N 末端側にミオシンと相同性のあるドメインを有する。これまでに当研究グループでは, *ChsB* 及び *CsmA* が共にキネシン KinA との相互作用により菌糸先端付近へ輸送され局在化することを明らかにした^{1), 2)}。今回, *ChsB* と *CsmA* の菌糸内局在化機構について検討するため, 野生型 *ChsB* 及び *CsmA* の代わりにそれぞれ EGFP-*ChsB* 及び mDsRed-*CsmA* を共発現する株を用いて両者の局在を解析した。観察の結果, 両者は菌糸先端の一部及び隔壁形成部位において共局在が観察されたが, 菌糸先端から後方においては一部共局在が観察されなかった。また, 微小管重合阻害剤である benomyl あるいはアクチン細胞骨格重合阻害剤である cytochalasin A 処理により両者の菌糸先端における共局在が失われた。現在, FRAP 解析による両者の菌糸先端への局在化機構の差異, 両者の物理的相互作用の有無等について検討している。

1) 對崎ら, 第 9 回糸状菌分子生物学コンファレンス要旨集, p. 32

2) 對崎ら, 日本農芸化学会 2010 年度大会講演要旨集, p. 198

The comparison of the localization of chitin synthases, ChsB and CsmA, in *Aspergillus nidulans*

Makusu Tsuzaki, Hiroyuki Horiuchi, and Akinori Ohta (Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo)

P-29

Aspergillus nidulans のキチン合成酵素 CsmA、CsmB における DEK C terminal domain の機能解析

前田隼見, 堀内裕之, 太田明徳 (東大院・農生科・応生工)

N 末端側にミオシン様ドメインを有するタイプのキチン合成酵素は、菌糸状の生育が可能な菌類に特異的に分布し、菌糸状の形態形成に重要な役割を果たすことが明らかにされているが、その C 末端側には機能不明の DEK C terminal ドメインが保存されている。DEK C terminal ドメインは、このタイプのキチン合成酵素の C 末端側にのみ存在しており、その機能に重要な役割を持つことが予想される。*Aspergillus nidulans* には、ミオシン様ドメインを有するキチン合成酵素をコードする遺伝子として *csmA*, *csmB* のが存在しており、*csmA*, *csmB* それぞれの単独破壊株では菌糸の形態異常、分生子形成効率の低下が起こることが確認されている。また、*csmA*, *csmB* の二重破壊株は合成致死を示す。^{1) 2)}

本研究では、*A. nidulans* の CsmA, CsmB の DEK C terminal ドメインの役割の解明を目的に解析を行った。CsmA, CsmB どちらの DEK C terminal ドメインのみを欠失させた株も、固体培地における生育速度は野生型株と同程度であったが、*csmA*, *csmB* 単独破壊株ほど重篤ではないものの、バルーン形成等の菌糸の形態異常が観察された。また、CsmA の DEK C terminal ドメイン欠失株では、分生子形成効率の低下も確認された。ウェスタン解析により、DEK C terminal ドメインの欠失は CsmA, CsmB の安定性には関与しないことを確認しており、このドメインが CsmA, CsmB の機能するうえで何らかの役割を持っていることが示された。現在、DEK C terminal ドメインを欠失した CsmA, CsmB の菌糸内の局在部位について検討中である。

1) Horiuchi, H., *et al.* (1999) J. Bacteriol, 181:3721-3729.

2) Takeshita, N., *et al.* (2006) Mol. Microbiol, 59:1380-1394.

Functional analysis of the DEK C terminal domains of *Aspergillus nidulans* chitin synthases, CsmA and CsmB

Hayami Maeda, Hiroyuki Horichi, and Akinori Ohta (Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo)

P-30

Visualization analysis of stress granules and P-bodies in stress conditions in *A. oryzae*

Hsiang-Ting Huang, Kei Saeki, Hiroyuki Nakano, Katsuhiko Kitamoto (Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo)

An important part of the cellular responses to stress or environmental stimuli is the modulation of mRNA translation and degradation. Recently, evidences from yeasts to mammalian cells have indicated that one aspect of this process can involve the remodeling of translating mRNAs into non-translating mRNPs (mRNA-protein particles) that accumulate in cytoplasmic foci referred to as stress granules and P-bodies. However, the roles of stress granules and P-bodies in mRNA metabolism and in the rapid regulation of gene expression in *A. oryzae* have not yet been elucidated. In the present study, we cloned the *A. oryzae* orthologues of *S. cerevisiae* *PAB1*, *PUB1*, *DPC2* and *EDC3*, which encode major components of stress granules (Pab1 and Pub1) or P-bodies (Dcp2 and Edc3). Then we expressed them as EGFP fusion proteins in *A. oryzae* to visualize the formation of stress granules and P-bodies in response to stresses. Fluorescence microscopic observation showed that AoPab1-EGFP was dispersed throughout the cytoplasm under normal growth condition, and the aggregates of AoPab1-EGFP formed in response to stresses. It suggested that a part of mRNAs accumulated to form mRNPs granules and the translation was impaired when stresses occurred. Microscopic observation of AoPub1-EGFP, AoDcp2-EGFP, and AoEdc3-EGFP is in progress.

P-31

麹菌 *A. oryzae* における MAP キナーゼ AoFus3 上流の分子生物学的解析

佐々木智江美、丸山潤一、北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)

【目的】Fus3 は出芽酵母 *S. cerevisiae* の接合フェロモンシグナル経路で働く MAP キナーゼであり、Ste12, Far1, Bni1, Sst2 をリン酸化する。また同時に、Tec1 をリン酸化することで invasive growth を抑制する。これまで我々は、*Aofus3* 遺伝子破壊株の表現型および AoFus3-EGFP の局在について報告した。本研究では、*A. oryzae* において、*S. cerevisiae* の MAP キナーゼ経路で Fus3 の上流に位置する Ste7, Ste11 のホモログ (AoSte7, AoSte11) を解析することで、AoFus3 の MAP キナーゼとしての役割を解明することを目的とした。

【方法・結果】*Aoste7* 遺伝子破壊株、および AoSte7-EGFP を *Aoste7* 遺伝子座で発現する株を作製した。AoSte7-EGFP 発現株を蛍光顕微鏡で観察したところ、AoSte7-EGFP が菌糸先端および隔壁孔付近に局在していた。この局在は、AoFus3-EGFP と同じであった。また、*Aoste7* 遺伝子破壊株に低浸透圧ショックを与え、菌糸先端の溶菌を誘導したところ、*Aofus3* 遺伝子破壊株と同様に、隣接する細胞への溶菌の伝播を防ぐ割合が野生株と比べて有意に減少した。現在、*Aoste11* 遺伝子破壊株および AoSte11-EGFP を *Aoste11* 遺伝子座で発現する株の解析を進めている。

Molecular analysis of the upstream of MAP kinase AoFus3 in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*

Chiemi SASAKI, Jun-ichi MARUYAMA, Katsuhiko KITAMOTO

(Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo)

P-32

麹菌 *A. oryzae* における Rab GTPase AoSec4 の分泌経路と細胞極性における機能の解析

中野浩幸¹, 早川雄悟¹, 正路淳也^{1,2}, 有岡学¹, 北本勝ひこ¹ (¹東大院農生科・応生工, ²エジンバラ大・細胞生物学研究所)

Rab GTPase は小胞輸送において小胞とオルガネラの融合を仲介する低分子量 GTPase である。我々はこれまでに *A. oryzae* の 10 個の Rab GTPase について局在解析を行い、このうち EGFP-AoSec4 が菌糸先端の Spitzenkörper (SPK) に局在することを見出している。また、*A. oryzae* を含む糸状菌においては、細胞骨格をはじめとして、高度に極性化したタンパク質輸送機構の存在が明らかにされつつある。そこで本研究では、AoSec4 の機能を解析することで糸状菌の分泌経路の特徴を明らかにするとともに、分泌機構と極性の形成、維持との関連を明らかにすることを目的とした。これまでの解析から、*Aosec4* 破壊株は、植菌後 14 時間以降に菌糸が約 2 倍に太くなることや、野生株では SPK に局在する α -アミラーゼ、分泌に関与する v-SNARE (AoSnc1), および formin (AoBni1) の EGFP との融合タンパク質の局在に異常を示すことを明らかにしている。これらの結果から、破壊株ではアクチンケーブルの重合に障害があると考え、latrunculin B (LatB) 処理によるアクチンの重合阻害実験を行った。LatB を含まない培地では破壊株で生育阻害が見られたのに対し、LatB を含む培地では破壊株と野生株の阻害の程度は、コロニー、気中菌糸量、分生子量で同等になった。また、EGFP-AoTubA を用いて破壊株における微小管の可視化を行ったところ、異常は見られなかった。以上から、破壊株で見られた生育阻害は、アクチンケーブルの重合異常が原因である可能性が示唆され、AoSec4 が菌糸先端における極性形成と維持に重要な役割を担っていることが示唆された。

Functional analysis of Rab GTPase AoSec4 in secretory pathway and cell polarity in *Aspergillus oryzae*

Hiroyuki Nakano¹, Yugo Hayakawa¹, Jun-ya Shoji^{1,2}, Manabu Arioka¹, Katsuhiko Kitamoto¹

(¹Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo, ²Institute of Cell Biol., Univ. of Edinburgh)

P-33

麹菌 *A. oryzae* におけるエンドサイトーシス関連 AAA ATPase AipA の機能解析

樋口裕次郎, 有岡 学, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)

我々はこれまでに、エンドサイトーシスの活発に行われている部位に局在する AoAbp1 を bait とした yeast two-hybrid (YTH) スクリーニングを行い、AAA (ATPases associated with diverse cellular activities) ATPase をコードする遺伝子 *aipA* (AoAbp1 interacting protein) を見出している。AipA と AoAbp1 は、YTH 解析および *in vitro* において結合し、さらに *A. oryzae* において共局在が確認されたことから、AipA が AoAbp1 と同様にエンドサイトーシスにおいて機能していることが示唆された¹⁾。そこで、AipA の機能解析を行うため、*aipA* 破壊株を作製した。しかし、さまざまな培地条件においても顕著な生育阻害は見られなかった。次に *aipA* 過剰発現株を作製したところ、生育の阻害、菌糸の形態異常が見られた。エンドサイトーシス経路の染色試薬である FM4-64 を用いた解析を行ったところ、*aipA* 過剰発現株では菌糸内へ取り込まれた FM4-64 の Spitzenkörper への輸送に阻害が見られたことから、AipA は菌糸先端でのエンドサイトーシスの機構における負の制御因子である可能性が考えられた。一方、AipA の AAA ATPase ドメインに変異を導入した ATPase 不活性型の *aipA*^{K542A} および *aipA*^{E596Q} を過剰発現する株では、WT の *aipA* を過剰発現する株で見られた生育阻害が見られなかった。このことから、AipA が機能的であるためには、AipA の AAA ATPase ドメインの ATPase 活性が必要であることが示唆された。現在、*aipA* 破壊株を用いて、より詳細な機能解析を行っている。

1) 樋口ら、第9回糸状菌分子生物学コンファレンス要旨集 p. 31

Analysis of an AAA ATPase AipA related to endocytosis in *Aspergillus oryzae*

Yujiro HIGUCHI, Manabu ARIOKA, Katsuhiko KITAMOTO (Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo)

P-34

麹菌 *A. oryzae* におけるエンドサイトーシス関連遺伝子 *aipC*, *aipD* の解析

松尾賢人, 樋口裕次郎, 有岡 学, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)

菌糸先端において、エンドサイトーシスが活発に行われている部位に局在する AoAbp1 を bait とした yeast two-hybrid スクリーニングによって、4つの遺伝子 *aipA*~*D* (AoAbp1 interacting protein) が見出された¹⁾。このうち AipC は出芽酵母 *S. cerevisiae* の App1p (actin patch protein) のホモログであり、ともに既知のドメインを持たないが、他の *Aspergillus* 属糸状菌にも高い相同性を有するホモログが存在していた。また、AipD は AoAbp1 の SH3 ドメインと相互作用すると考えられるプロリンリッチなドメインを有しており、*Aspergillus* 属糸状菌において比較的高い相同性でホモログが存在する一方で、*S. cerevisiae* にはホモログは存在せず、糸状菌に固有のタンパク質であると示唆された。本研究では、これらの2遺伝子について機能解析を行うことにより、*A. oryzae* におけるエンドサイトーシス機構の更なる理解を目指した。

まず、*aipC* および *aipD* の RACE 解析を行い、転写開始点と終了点、イントロンの位置などを決定した。その結果、AipC は 798 アミノ酸残基、AipD は 399 アミノ酸残基からそれぞれ構成され、このうち AipD はイントロンを1ヶ所含むことが明らかになった。次に、この情報をもとに、*aipC* と *aipD* の全長 cDNA のクローニングおよびそれらの遺伝子破壊株を作製した。今後は、両遺伝子の全長 cDNA クローンを用いた AoAbp1 との yeast two-hybrid による相互作用解析および、破壊株を用いた表現型解析を行う予定である。

1) 樋口ら、第9回糸状菌分子生物学コンファレンス要旨集 p. 31

Analysis of *aipC* and *aipD* related to endocytosis in *Aspergillus oryzae*

Kento MATSUO, Yujiro HIGUCHI, Manabu ARIOKA, Katsuhiko KITAMOTO

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

P-35

麹菌 *A. oryzae* のペルオキシソームにおけるビオチン生合成経路の解析

矢萩大貴, 田鍋康子, 松尾一郎¹, 丸山潤一, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工、¹群大院工・応化生)

【目的】 ビオチンは主にカルボキシル基転移酵素の補酵素として生体内で重要な役割を担っている。真核生物のビオチン生合成経路は植物において進んだ研究がなされており、細胞質で合成される中間体がミトコンドリアに輸送され、ミトコンドリア内で以後のビオチン合成反応がなされるとの報告がある。しかし、以前の我々の研究で、ペルオキシソーム移行シグナル受容体をコードする遺伝子の破壊株において、オレイン酸のみならずグルコースを炭素源とした最少培地でも著しい生育の低下が観察され、グルコース培地ではビオチンの添加によって生育が回復した。また、ビオチン生合成経路の酵素のひとつは C 末端にペルオキシソーム移行シグナル(PTS1)を有し、ペルオキシソームに局在することを明らかにした。以上より、ビオチン生合成経路においてペルオキシソームの関与が明らかになったことから、今回はビオチン生合成中間体を用い、ペルオキシソームにおけるビオチン生合成経路についてさらなる解析を行った

【方法・結果】 ビオチンは pimelic acid から pimeloyl-CoA、KAPA (7-keto-8-aminopelargonic acid)、DAPA (7,8-diaminopelargonic acid)、DTB (dethiobiotin) を経て合成される。pimeloyl-CoA から KAPA を合成する酵素 BioF は C 末に PTS1 をもち、それをコードする遺伝子 *AobioF* の破壊株は最少培地では生育せず、ビオチン、および KAPA、DAPA の添加により生育が回復した。さらに、ペルオキシソーム移行シグナル(PTS1, PTS2) 受容体それぞれをコードする遺伝子 *Aopex5* と *Aopex7* の各破壊株において、上記のビオチン生合成中間体を含む培地での生育を観察した。この生育実験の結果より、AoPex5 が輸送する PTS1 タンパク質は KAPA から上流、AoPex7 の PTS2 タンパク質は pimelic acid から上流の経路で関与している可能性が示唆された。現在、pimelic acid を供給する、より上流のビオチン生合成経路を解析している

Analysis of biotin biosynthesis pathway in peroxisome of *Aspergillus oryzae*

Daiki Yahagi, Yasuko Tanabe, Ichiro Matsuo¹, Jun-ichi Maruyama, Katsuhiko Kitamoto
(Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo, ¹Dept. of Chem. and Chem. Biol., Gunma Univ)

P-36

Neurospora crassa における殺菌剤フルジオキソニル、イプロジオン耐性菌の出現頻度

矢部秀和, 大竹達也, 穴澤初夫, 藤村真, 一石昭彦 (東洋大・生命科学)

殺菌剤の耐性菌出現リスクは、薬剤の種類により大きく異なることが知られているが、その原因はわかっていないものが多い。フェニルピロール系薬剤フルジオキソニルやジカルボキシイミド系薬剤イプロジオンは、浸透圧シグナル伝達系に作用し殺菌効果を示すことが知られている。また、変異原性はなく直接 DNA に作用しないことがわかっている。しかし、両薬剤処理により室内耐性菌が容易に単離できるとともに、イプロジオン耐性菌が圃場で出現しており問題となっている。そこで、糸状菌における両薬剤に対する耐性菌出現機構を明らかにすることを目的として、*Neurospora crassa* の各種の遺伝子欠損株を用いて、両薬剤処理による耐性菌出現頻度の違いを調べた。

DNA 修復系に関与する遺伝子欠損株において、両薬剤に対する感受性および耐性菌出現頻度は野性株と同程度となった。しかし、損傷乗り越え複製に関与する *mus-26*、*mus-42*、*upr-1* 遺伝子欠損株では、フルジオキソニルに対して野性株より高い感受性を示すが、イプロジオンに対する感受性は示さなかった。しかし、両薬剤処理による耐性菌の出現頻度は野生株と比較して約 1/10 に減少した。各実験から単離した耐性菌の表現型を調べたところ、薬剤に耐性を示すとともに、浸透圧に感受性を示す株が 90%以上であった。このことから出現した耐性菌は浸透圧シグナル伝達経路に変異を持つ株であることが明らかとなった。次に、カタラーゼ遺伝子 *cat-1*、*cat-2*、*cat-3* 欠損株を用いて行った試験では、野性株と同程度の感受性を示したが、耐性菌出現頻度は野性株に比べ減少し、特に *cat-3* 遺伝子欠損株では耐性菌出現頻度が約 1/5 に減少した。

Mutation frequency of fludioxonil- and iprodione- resistant in *Neurospora crassa*

Hidekazu Yabe, Tatsuya Otake, Hatsuo Anazawa, Makoto Fujimura, Akihiko Ichiishi (Life Sci., Toyo Univ.)

P-37

アカパンカビにおける CDC42 経路に関わる SCD2 タンパク質の局在解析

安齋洋菫, 高橋正和, 藤村真, 一石昭彦 (東洋大院・生命科学)

真核生物において, Rho ファミリーである低分子 G タンパク質の Cdc42 はアクチンの重合や遺伝子転写, 細胞周期進行を広く制御している経路の重要構成成分である。分裂酵母における CDC42 経路は, 基盤タンパク質である Scd2, small-GTPase である Cdc42, その GDP/GTP 交換因子である Scd1, そしてキナーゼ活性を持つ Shk1 が複合体を形成することで, 下流へのシグナル伝達を行っている。これらタンパク質のどれか 1 つでも欠けるとシグナル伝達が正常に行われず, 細胞は形態形成や交配に必要な生理活性を欠損し, 時には致死となることが報告されている。

アカパンカビのゲノムデータベース上において, 分裂酵母のそれらタンパク質に高い相同性をもつ領域が存在し同様な経路を持つことが予想されるが, ほとんど研究されていない。我々が作製した *scd-2* と *shk-1* の両遺伝子破壊株は, 野生株に比べ菌糸の伸長成長が遅く, 菌糸の異常分岐と非常に狭い隔壁間隔の形成という形態異常や交配能の欠如といった表現型を示した。今回, アカパンカビの SCD2 タンパク質の局在を解析するために SCD2 と GFP の融合タンパク質の発現株を作製した。顕微鏡観察の結果, *ccg-1* 遺伝子のプロモーターを使用した場合には, 菌糸先端および隔壁において GFP の凝集が見られたが, 菌糸の形態に異常が観察された。そこで, *scd-2* 遺伝子自身のプロモーターで発現させた場合による局在性および形態を現在解析中である。

Localization analysis of SCD2 protein involved in CDC42 pathway of *Neurospora crassa*

Hirotsada Anzai, Masakazu Takahashi, Makoto Fujimura, Akihiko Ichiishi

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

P-38

アカパンカビのシアン耐性呼吸誘導に関与する MFS トランスポーター ANT-1 の解析

高橋正和¹, 館野絢香², 山下和宏¹, 亀井誠之¹, 福森文康¹, 藤村真¹ (¹東洋大院・生命科学, ²東洋大・生命科学)

多くの菌類は, シアン耐性呼吸 (alternative oxidase ; AOD) を有している。アカパンカビでは, ミトコンドリアの電子伝達系が遮断されると核にコードされる *aod-1* 遺伝子の転写が誘導され, ミトコンドリアに輸送された末端酸化酵素 AOD-1 によりシアン耐性呼吸が起こる。我々は, MFS (major facilitator superfamily) トランスポーター *ant-1* 遺伝子の破壊 ($\Delta ant-1$) 株が, ミトコンドリアの Complex III の Qo 部位阻害剤であるアズキシストロビン (AZ) と Qi 阻害剤であるアンチマイシン A に高い感受性を示すことを見出している。ANT-1 はこれらの薬剤の排出に関与していることが考えられたが, $\Delta ant-1$ 株の AZ 感受性は AOD-1 阻害剤である SHAM の影響を受けなかった。このことから, ANT-1 は薬剤の排出ではなく, AOD-1 の誘導に関与しているトランスポーターであることが示唆された。そこで, リアルタイム PCR 法とウエスタンブロット法を用いて, 野生株と $\Delta ant-1$ 株における, AOD-1 の遺伝子発現解析とタンパク質の検出を行った。その結果, 遺伝子発現解析では, 野生株と $\Delta ant-1$ 株の両株において AZ 処理後 30 分で顕著な *aod-1* の誘導が認められた。また, タンパク質の検出では, 野生株は AZ 処理後 12 時間で AOD-1 を示すバンドが検出されたが, $\Delta ant-1$ 株では検出されなかった。 $\Delta ant-1$ 株では, *aod-1* 遺伝子は誘導されるがタンパク質が生成されないことから, ANT-1 トランスポーターは AOD-1 の転写後調節に関わる可能性が示唆された。現在, ANT-1 が AOD-1 の転写後調節にどのように関与しているのかを検討するために, $\Delta ant-1$ 株から AZ 耐性リバートント株を作製し解析中である。

MFS transporter ANT-1 involvement in the induction of alternative oxidase protein in *Neurospora crassa*

Masakazu Takahashi¹, Ayaka Taten², Kazuhiro Yamashita¹, Masayuki Kamei¹, Fumiyasu Fukumori¹, Makoto Fujimura¹ (¹Grad.Sch.of Life Sci.,Toyo Univ, ²Fac.of Life Sci.,Toyo Univ)

P-39

紫外線ストレスによるアカパンカビ DNA 修復遺伝子の発現誘導の解析

高橋 司, 島山奈実, 藤村 真, 一石昭彦 (東洋大・生命科)

アカパンカビにはDNAの紫外線損傷を修復するメカニズムとして、ヌクレオチド除去修復 (nucleotide excision repair ;NER)、紫外線損傷特異的除去修復(UV dependent repair ;UVDR)、光回復の3つの修復機構が存在する。アカパンカビはこれら3つの機構により紫外線損傷を効率よく修復することで、紫外線に対し強い耐性を示す特徴を持っている。ヒトや酵母等では、紫外線損傷の除去に関与するDNA修復遺伝子の一部が紫外線により発現誘導されることが報告されている。またヒトでは、紫外線ストレスシグナルの一部がMAPK経路により伝達されていることが知られている。しかし、アカパンカビではDNA修復遺伝子の破壊株が作製され紫外線感受性など表現型解析は詳細に行われているが、これらの遺伝子の紫外線ストレスによる発現誘導の解析はまだ一部しか行われていない。また、アカパンカビにはMAPK経路が3経路存在している。そこで本研究では、紫外線ストレスによりアカパンカビのDNA修復遺伝子の発現がどのように変化するかを調べると共に、紫外線ストレスがヒトと同じ様にMAPK経路を介して伝達されているのかを検証することを目的とした。その結果、アカパンカビDNA修復遺伝子の内一部の遺伝子が紫外線により発現誘導されることが解った。また、アカパンカビのMAPK経路の1つであるOS経路とDNA修復機構の間に関係があることが示唆され、紫外線ストレスがOS経路の一部を経由して伝えられていることが明らかになった。現在、さらに他の2つのMAPK経路と紫外線ストレスの関係についても解析中である。

Expression analysis of DNA repair genes in *Neurospora crassa* under condition of UV stress

Tsukasa Takahashi, Nami Hatakeyama, Makoto Fujimura, Akihiko Ichiishi

(Fac.of Life Sciences, Toyo Univ.)

P-40 (O-4)

麹菌 hydrophobin RolA の PBSA 表面における水平方向可動性

大類景子¹, 田邊弘毅¹, 上原健二¹, 高橋徹², 山形洋平^{2,3}, 阿部敬悦^{1,2}

(¹ 東北大院・生物産業創成, ² 東北大・未来研, ³ 東京農工大院・応生科)

麹菌は生分解性プラスチックである PBSA (Polybutylene succinate-co-adipate) を唯一の炭素源として培養すると, PBSA 分解酵素の cutinase CutL1 と共に, hydrophobin RolA を発現する。RolA は PBSA に吸着することにより初めて CutL1 をリクルートすることができる。その結果 PBSA 表面上に CutL1 が濃縮され, PBSA 分解効率を上昇させる。一方, hydrophobin は一般的に固体表面を完全に被膜した状態で強固に結合し, タンパク質を変性させない限り, 剥がれない特徴を持つ。にもかかわらず, CutL1 の PBSA 分解を阻害していないことから, RolA は吸着後に水平方向へ移動している可能性が示唆された¹⁾。PBSA はぬれ性として中間的な性質を持つため, RolA-PBSA 間の相互作用として, “疎水性相互作用” と “静電的相互作用” が関与すると予想した。RolA には疎水性アミノ酸に富んだ領域 (Cys7-Cys8 ループ) が存在し, C7-C8 ループ中の Leu137 と Leu147 をそれぞれ Ser に置換した変異体の PBSA 吸着量は顕著に低下していたことから, PBSA への吸着に疎水性相互作用が関与することが示唆された。PBSA 分解実験において, C7-C8 ループ中の Lys130 / Asp134 / Asp136 を Ala に置換した変異体の分解能は上昇していたことから, 変異体の RolA の吸着量は上昇したと考えられた。一方で, 可動性には変化が見られず, より大規模な疎水度の変化が必要と考えられた。さらに, 塩濃度依存的に可動性が低下したことから, 異なる pH 条件下での可動性が異なることから, 疎水性相互作用とともに静電的相互作用も可動性へ関与することが示唆された。

1) Takahashi *et al.*, *Mol Microbiol.* 57: 1780-1798 (2005)

Horizontal mobility of *Aspergillus oryzae* hydrophobin RolA on PBSA surface

Keiko Orui¹, Hiroki Tanabe¹, Kenji Uehara¹, Toru Takahashi², Youhei Yamagata^{2,3}, Keietsu Abe^{1,2}

(¹ Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., ² NICHe., Tohoku Univ., ³ Tokyo Univ. of Agric. and Tech.)

P-41 (O-5)

麹菌の新規 β - グルコシダーゼ (BglA, BglF) の精製と酵素学的諸性質

工藤佳那子, 氏家成隆, 渡部 昭, 新谷尚弘, 五味勝也 (東北大院農・生物産業創成)

我々は麹菌ゲノムデータベースをもとに新規セルロース系バイオマス分解酵素遺伝子の高発現株を網羅的に作製している。今回はセロビオース分解に関わる新規な2種類の β -グルコシダーゼ(BglA, BglF)に着目し、その高発現株を用いて菌体外に分泌された酵素を精製し酵素学的諸性質の解明を試みた。

BglA および BglF 高発現株を液体培養し、その培養上清から酵素を精製した。目的の酵素は硫酸分画、疎水クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーによって SDS-PAGE で単一バンドとして検出されるまで精製することができた。SDS-PAGE による推定分子量は BglA が 123 kDa, BglF が 137 kDa となり、遺伝子から予想される分子量よりも大きく糖鎖付加の可能性が考えられた。精製した酵素について反応至適条件、安定性、グルコース耐性、基質特異性、金属イオンによる阻害作用などの酵素的諸性質を調べた。ゲノムデータベースの情報から両酵素は GH family 3 (Glycoside Hydrolase family 3) に属することがわかっており、同じ family に属する既知の β -グルコシダーゼと性質を比較した。その結果すでに報告されている β -グルコシダーゼと比べて高 pH 領域での安定性が高いことが明らかとなった。また、活性測定に用いた合成基質 *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside に対して高い分解活性を示すにもかかわらず、一般的な β -グルコシダーゼの基質であるセロビオースに対する分解活性をほとんど持たないという特徴的な性質が見出された。

Purification and Characterization of Novel β -Glucosidases (BglA and BglF) from *Aspergillus oryzae*

Kanako Kudo, Seiryu Ujiie, Akira Watanabe, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi

(Div. Biosci. Biotechnol. Future Bioind., Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ.)

P-42 (O-6)

比較ゲノム解析に基づく *Trichoderma reesei* BGLII の機能解析

新田美貴子^{1,2}, 山口香織¹, 中澤光¹, 志田洋介¹, 森一樹³, 平川秀樹⁴, 久原哲³, 森川康¹, 小笠原渉¹ (¹長岡技科大・生物,²JST,³九大・生物資源,⁴かずさDNA研究所)

【目的】糸状菌 *Trichoderma reesei* は、30年以上も昔から世界中で UV 照射や NTG 処理等の物理的変異導入法により数多くの変異株が造成され、セルラーゼ生産能が高められてきた。しかしながら、変異株の変異点とセルラーゼの高生産化との関連付けに係る解析は乏しく、セルラーゼ高生産化の要因の多くは不明のままである。本研究室では、世界標準株 QM9414 の他、我が国独自の *T. reesei* 変異株系統樹 N-25, KDG-12, PC-3-7, および CDU-11 等を保有しており、当該変異株の全ゲノム配列を次世代シーケンサーにより決定し、一塩基多型 (SNP) を対象とした遺伝子の比較解析を進めている。セルラーゼ高生産変異株では多数の遺伝子に SNP が認められており、これらがセルラーゼの高生産化に寄与しているものと推測されている。

BGLII (Cell1A) は細胞内 β -グルコシダーゼであり、*T. reesei* セルラーゼ群の誘導物質である α -ソホロースの生成に関与していると考えられている。PC-3-7株において、BGLII 遺伝子 (*bgl2*) にも SNP が生じていることが明らかとなった。よって本研究では、*bgl2* での SNP の影響を解析することで、セルラーゼの誘導発現に関する新たな知見を得ることを目的としている。

【結果】種々の条件で培養した PC-3-7 株および $\Delta bgl2$ 株について、セルラーゼ活性、糖転移活性、およびセルラーゼ遺伝子の発現挙動を解析した。その結果、PC3-7 株および $\Delta bgl2$ 株では α -ソホロース生成能が欠損していることが認められた。更に、 $\Delta bgl2$ 株のセルラーゼ遺伝子の誘導発現能が PC-3-7 株と比較して遅くなっていた。現在、*bgl2* の SNP を野生株 (QM6a) の配列に復帰した変異株を作製し、セルラーゼ誘導活性に係る解析を進めている。

Functional analysis of BGLII based on Comparative Genome Analysis of *Trichoderma reesei*

Mikiko Nitta^{1,2}, Kaori Yamaguchi¹, Hikaru Nakazawa¹, Yosuke Shida¹, Kazuki Mori³, Hideki Hirakawa⁴, Satoru Kuhara³, Yashushi Morikawa¹, Wataru Ogasawara¹ (¹Nagaoka Univ. of Tech.,²JST,³Kyushu Univ.,⁴Kazusa DNA Inst.)

P-43

Aspergillus aculeatus 由来 β -glucosidase 1 (BGL1) の N 型糖鎖欠損 variants の作製と解析

馬場祐太朗, 谷修治, 炭谷順一, 川口剛司 (阪府大院・生環科)

【目的】*A. aculeatus* 由来の BGL1 は分泌後細胞表層に局在し, 培養初期には培養上清中に遊離しない。この局在に BGL1 に多量に存在する糖鎖が関与していることが考えられたことから, BGL1 の糖鎖欠損変異酵素を作製し, 培養上清中への分泌の改善を試みた。

【方法】BGL1 中の 16 ヶ所の N 型糖鎖結合配列中の Asn を Gln に置換することで 1 ヶ所ずつ糖鎖を欠損させた *bgl1* を糸状菌高発現ベクター pNAN8142 へ繋ぎ, *A. oryzae* にて発現させた。分泌への影響は培養上清の活性測定と SDS-PAGE により野生型 BGL1 と比較検討した。

【結果と考察】全ての variants で野生型と比べて分泌の向上は見られなかった。そのうちの N322Q と N523Q の 2 種類は上清に活性もタンパク質も検出されなかったことから, BGL1 の安定した立体構造形成に必要な糖鎖であることが推察された。現在は酵素活性に影響がないと判断できる糖鎖を組み合わせて欠損させることで分泌への影響を引き続き評価し, 糖鎖が最小限付加された BGL1 の作製を目指している。

Creation and analysis of *N*-glycosylation deficient β -glucosylase 1 (BGL1) variants derived from *Aspergillus aculeatus*

Yutaro Baba, Shuji Tani, Jun-ichi Sumitani, Takashi Kawaguchi

(Dept. Life. Env. Sci., Osaka Pref. Univ.)

P-44

麹菌酸性プロテアーゼのイントロン

岡本綾子¹, 森田寛人¹, 前田浩¹, 楠本憲一², 天野仁³, 石田博樹⁴, 山形洋平¹, 竹内道雄¹

(¹東京農工大院・応生科, ²食総研, ³天野エンザイム・研究部, ⁴月桂冠・総研)

麹菌ゲノム解析の結果, 麹菌ゲノムにはアスパルティックプロテアーゼ(APase)と推定される遺伝子が 11 種類存在することが明らかになった。*A. oryzae* の APase は 3 種のパラログが存在し, *A. nidulans* や *A. fumigatus* の APase と相同性を有するオルソログが 3 種存在していた。この 3 種のイントロンの存在位置は完全に一致していた。このことから遺伝子重複により遺伝子が増加したものと考えられた。一方, AOENA03 と 11 はパラログであるが AOENA11 は *A. nidulans* や *A. fumigatus* にオルソログが認められない麹菌特異的な酵素である。

麹菌における AOENA11 発現状況を調べるために, *A. oryzae*RIB40 から mRNA を抽出し, AOENA11 特異的なプライマーを用いて RT-PCR を行った。その結果, *A. oryzae*RIB40 は液体培養時に AOENA11 を mRNA レベルで発現していることが確認された。RT-PCR により得られた AOENA11cDNA についてシークエンスを行ったところ, 3 つのイントロンのうち, 3 番目のイントロンは 5' 側が GC で始まり 3' 側が AG で終わっており, GT-AG ルールに従わないタイプのイントロンであることが明らかになった。

イントロンは 5' 側が GT で始まり 3' 側が AG で終わる GT-AG のタイプが主流であると言われているが, AOENA11 のイントロンはそれとは異なるものであることが明らかになった。

なお, 本研究は生研センター基盤研究推進事業の一環として行われたものである。

Introns sequence in *A. oryzae* APase AOENA11.

Ayako Okamoto¹, Hiroto Morita¹, Hiroshi Maeda¹, Ken-Ichi Kusumoto², Hitoshi Amano³, Hiroki Ishida⁴, Youhei Yamagata¹, Michio Takeuchi¹

(¹Tokyo Univ. of Agriculture and Technology, ²NFRI, ³Amano Enzyme Inc., ⁴Gekkeikan Sake Co. Ltd.)

P-45

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* の分泌型ロイシンアミノペプチダーゼの発現と酵素学的機能解析

松下(森田)真由美¹、多田功生¹、丸井淳一郎¹、古川育代¹、鈴木聡¹、服部領太¹、天野 仁²、石田博樹³、山形洋平⁴、竹内道雄⁴、柏木豊⁵、楠本憲一¹ (¹食総研、²天野エンザイム、³月桂冠、⁴東京農工大・院・応生科、⁵東京農大・応生・醸造)

【背景】 leucine aminopeptidase (LAP) はペプチド鎖の N 末端のアミノ酸、主にロイシンを遊離する、基質特異性の広いアミノペプチダーゼである。LAP は食品加工利用(苦味の低減、香りの改良など)に関する研究もあり、ペプチドの代謝・アミノ酸生産にかかわる重要な酵素である。前年度、我々は、麹菌 RIB40 株のゲノム情報から、分泌型の LAP (LapA) (AO090011000052)を見だし、*A. oryzae* を宿主として、LAP 過剰発現株を作成し、LapA の精製と合成基質に対する酵素学的特性の解明を行った。今回は、LapA のペプチド基質に対する作用と、様々なストレス条件下で麹菌を培養した時の *lapA* 遺伝子の発現解析を行ったので報告する。【方法及び結果】 LapA 過剰分泌発現株から精製した LapA を用いて、N 末端にロイシンをもつジペプチド以上のオリゴペプチドに対する活性を調べた。その結果、LapA はジペプチド、トリペプチドより長いペプチドを基質として好み、高い酵素活性を示した。また、LapA 遺伝子の発現について、*A. oryzae* RIB40 株を塩ストレス、アルカリストレス、熱ストレス条件下で培養した時の転写量を Semi-quantitative RT-PCR 法にて調べた。その結果、*lapA* は非ストレス時と比較して、アルカリストレス条件下にて転写量が増大した。(M. Matsushita-Morita *et al.* Current Microbiology (in press)) 本研究は生研センター基礎研究推進事業の一環として実施された。

Overexpression and characterization of an extracellular leucine aminopeptidase from *Aspergillus oryzae*

Mayumi Matsushita-Morita¹, Sawaki Tada¹, Junichiro Marui¹, Ikuyo Furukawa¹, Satoshi Suzuki¹, Ryota Hattori¹, Hitoshi Amano², Hiroki Ishida³, Youhei Yamagata⁴, Michio Takeuchi⁴, Yutaka Kashiwagi⁵, Ken-Ichi Kusumoto¹
(¹Natl. Food Res. Inst., ²Amano Enzyme, ³Gekkeikan, ⁴Tokyo Univ. of Agric. Tech., ⁵Tokyo Univ. of Agric.)

P-46

麹菌グリシン・D-アラニンアミノペプチダーゼ GdaA の解析

丸井淳一郎¹、松下(森田)真由美¹、多田功生¹、古川育代¹、鈴木聡¹、服部領太¹、天野仁²、石田博樹³、山形洋平⁴、竹内道雄⁴、楠本憲一¹ (¹食総研、²天野エンザイム、³月桂冠、⁴東京農工大・院・応生科)

アミノペプチダーゼは、ポリペプチド鎖 N 末端のアミノ酸を加水分解により遊離する。麹菌は基質特異性の異なる複数のアミノペプチダーゼを生産する。これらは他のプロテアーゼと共に菌体内、外で作用し、細胞内アミノ酸レベルの恒常性維持やタンパク質品質管理、更には麹菌を用いた発酵食品の呈味形成に重要な役割を果たすと考えられる。我々はグリシンおよび D-アラニンに対して高い特異性を示すアミノペプチダーゼを麹菌から見出し、GdaA とした。グリシンを含むペプチド結合は、他のアミノ酸からなるペプチド結合に比べてプロテアーゼによる加水分解を受けにくいとも言われており、グリシンを特異的に遊離する本酵素の機能に注目している。

gdaA 遺伝子の転写レベルは窒素源および炭素源飢餓に応答し 2 倍に上昇した。*gdaA* 遺伝子破壊株、高発現株を用いた解析から、GdaA は麹菌の菌体内グリシンおよび D-アラニンアミノペプチダーゼ活性の大半を担うことが示唆された。高発現株から精製した GdaA を使用し、アミノ酸-p-パラニトロアニリド (*pNA*)誘導体を基質として酵素活性を解析したところ、グリシン-および D-アラニン-*pNA* に対する高い基質特異性と反応性が見られた。現在、GdaA の酵素学的諸性質とペプチド分解への寄与について解析を行っている。本研究は生研センター基盤研究推進事業の一環として行われたものである。

Characterization of glycine D-alanine aminopeptidase (GdaA) of *Aspergillus oryzae*

Junichiro Marui¹, Mayumi Matsushita-Morita¹, Sawaki Tada¹, Ikuyo Furukawa¹, Ryota Hattori¹, Satoshi Suzuki¹, Hitoshi Amano², Hiroki Ishida³, Youhei Yamagata⁴, Michio Takeuchi⁴, Ken-Ichi Kusumoto¹ (¹Natl. Food Res. Inst., ²Amano Enzyme, ³Gekkeikan, ⁴Tokyo Univ. of Agric. Tech.)

P-47

麹菌におけるシステイニルジペプチダーゼの生理学的機能についての検討

服部領太¹、松下（森田）真由美¹、多田功生¹、丸井淳一郎¹、古川育代¹、鈴木聡¹、天野仁²、石田博樹³、山形洋平⁴、竹内道雄⁴、楠本憲一¹（¹食総研、²天野エンザイム、³月桂冠、⁴東京農工大・院・応生科）

我々は麹菌ゲノム情報に見出された遺伝子産物の特性解明を行っている。そのうち、金属ペプチダーゼ様タンパク質についての特性解明を行った結果、システインを含むジペプチドに対して特に強い活性を有していることを見出し、前回のコンファレンスで発表した。この酵素を CdpA (cysteinyll dipeptidase in *A. oryzae*) と命名し、CdpA が麹菌においてどのような生理学的機能に関与しているかを調べることを目的とした。pyrG 遺伝子を選択マーカーとして用いた遺伝子破壊カセットを作製し、 Δ ligD::ptrA Δ pyrG 株の CdpA をコードする領域と置換させることで破壊株を作製、取得した。現在、遺伝子破壊による生育への影響等の差異を比較検討している。なお、本研究は生研センター基礎研究推進事業の一環として行われたものである。

Study at physiological function of a cysteinyl dipeptidase in *Aspergillus oryzae*

Ryouta Hattori¹, Mayumi Matsusita-Morita¹, Sawaki Tada¹, Junichiro Marui¹, Ikuyo Furukawa¹, Satoshi Suzuki¹, Hitoshi Amano², Hiroki Ishida³, Youhei Yamagata⁴, Michio Takeuchi⁴, Ken-Ichi Kusumoto¹（¹Natl. Food Res. Inst., ²Amano Enzyme, ³Gekkeikan, ⁴Tokyo Univ. of Agric. Tech.）

P-48

麹菌 *Aspergillus oryzae* 由来ファミリーM19 に属するジペプチダーゼの性質

田中良男¹、大鹿初恵¹、千田綾乃¹、小出芳直¹、天野仁¹、山形洋平²、楠本憲一³、石田博樹⁴、竹内道雄²（¹天野エンザイム、²東京農工大院・応生科、³食総研、⁴月桂冠・総研）

ジペプチダーゼはジペプチドのみを特異的に加水分解する酵素であり、一部のジペプチダーゼは細胞内のグルタチオン代謝系に関与している。またラット腎臓ジペプチダーゼはベネム・カルベペネム系 b-ラクタム抗生物質を分解する性質を持ち、新規な抗生物質を開発する上で注目されている。麹菌ゲノム解析から、*Aspergillus oryzae* RIB40 には、ラット腎臓ジペプチダーゼとアミノ酸レベルで約 70% の similarity を持ち、ペプチダーゼファミリーM19 に属する 3 種の遺伝子(AO090023000428, AO090023000540, AO090001000042) が存在することが明らかにされた。ファミリーM19 ペプチダーゼは、哺乳動物では多くの知見があるが、酵母・カビなどの真菌類ではほとんど研究されていない。そこで 3 種の遺伝子を *Pichia pastoris* で菌体内発現させ、組み換え型タンパク(AOEXG101, AOEXG102, AOEXG103)を部分精製した。得られた 3 種の遺伝子発現産物は、いずれも DL-Leu-Gly に作用したが、L-Leu-Gly-Gly からアミノ酸の遊離はほとんど認められず、3 種の遺伝子はすべてジペプチダーゼをコードすることが明らかとなった。なお本研究は生研センター基礎研究推進事業の一環として行われたものである。

Properties of family M19 dipeptidases from *Aspergillus oryzae*

Yoshio Tanaka¹, Hatsue Oshika¹, Ayano Senda¹, Yoshinao Koide¹, Hitoshi Amano¹, Youhei Yamagata², Ken-Ichi Kusumoto³, Hiroki Ishida⁴, Michio Takeuchi²（¹Amano Enzyme Inc., ²Tokyo Univ. of Agric. Tech., ³Natl. Food Res. Inst., ⁴Gekkeikan）

P-49

***A. oryzae* 特異的セリントイプカルボキシペプチダーゼの酵素学的性質**

森田寛人¹, 岡本綾子¹, 前田浩¹, 楠本憲一², 天野仁³, 石田博樹⁴, 山形洋平¹, 竹内道雄¹

(¹東京農工大院・応生科, ²食総研, ³天野エンザイム・研究部, ⁴月桂冠・総研)

A. oryzae のゲノムにはセリントイプカルボキシペプチダーゼをコードすると推定される遺伝子が 12 個存在する。しかし、これらのうち 4 つの遺伝子のオルソログは、*A. flavus* のゲノムには存在するが他の *Aspergillus* 属のゲノムには見いだされない。このことから、これら 4 つの遺伝子は *A. oryzae* グループ (*A. oryzae*, *A. flavus*) のみが有する特異的な遺伝子であると考えられる。本研究では、これら 4 つの *A. oryzae* グループ特異的遺伝子のうち 2 つの遺伝子産物を精製し、それらの酵素学的性質を決定した。

精製した 2 つの遺伝子産物 (AOEXE103, AOEXE109) は、どちらも dynorphin A (1-13) や bradykinin を基質としたときに基質の C 末端から一つずつアミノ酸を遊離した。また、これらの精製遺伝子産物のプロテアーゼ活性は PMSF によって阻害されたことから、これらの酵素はセリントイプカルボキシペプチダーゼであると考えられた。AOEXE103 および AOEXE109 の至適 pH や安定性はこれまでに報告されてきた *A. oryzae* の分泌型セリントイプカルボキシペプチダーゼと似ていた。しかし、これら酵素の基質特異性は既知のセリントイプカルボキシペプチダーゼとは大きく異なっていた。

なお、本研究は生研センター基盤研究推進事業の一環として行われたものである

Enzymatic characterization of *A. oryzae* unique serine-type carboxypeptidases.

Hiroto Morita¹, Ayako Okamoto¹, Hiroshi Maeda¹, Ken-Ichi Kusumoto², Hitoshi Amano³, Hiroki Ishida⁴, Yohei Yamagata¹, Michio Takeuchi¹

(¹Tokyo Univ. of Agriculture and Technology, ²NFRI, ³Amano Enzyme, ⁴Gekkeikan)

P-50

麹菌 (*Aspergillus oryzae*) 由来 tripeptidyl-peptidase の酵素学的比較解析

前田 浩¹, 森田寛人¹, 岡本綾子¹, 楠本憲一², 天野 仁³, 石田博樹⁴, 竹内道雄¹, 山形洋平¹

(¹東農工大農・応生科, ²食総研, ³天野エンザイム, ⁴月桂冠・総研)

【目的】麹菌ゲノム中にはプロテアーゼ群をコードしている 134 遺伝子の存在が推定されている。しかしながら安全性の高いものとして、既に食品産業等で用いられている麹菌由来のプロテアーゼ群の個々の酵素学的性質は殆ど明らかになっていない。そこで本事業では、麹菌プロテアーゼ群の産業上の有効利用を念頭に入れた酵素学的解析を進めている。

本報告では、経腸吸収に優れる生理活性トリペプチドの製造に有用と考えられる tripeptidyl-peptidase (TPP) の単離・諸性質の決定を目的とした。

【方法・結果】麹菌ゲノム DNA には 3 種類の TPP をコードすると推定される遺伝子 (AOEXD007, AOEXD008, AOEXD009) が存在した。これらはその推定アミノ酸配列から Sedolisin family に属する菌体外分泌酵素と考えられた。これらの cDNA を *A. oryzae* 液体培養時の mRNA 群より増幅し、*Pichia pastoris* を発現宿主とする発現系を構築した。次いで、培養上清より TPP 活性を指標に精製を進めた。得られた TPP について酵素学的諸性質を決定し、さらに麹菌由来 TPP の分別利用を可能とするための基質特異性の比較を実施した。

なお本研究は、生研センター基礎研究推進事業の一環として行なわれたものである。

Enzymatic comparison of tripeptidyl-peptidases in *Aspergillus oryzae*.

Hiroshi Maeda¹, Hiroto Morita¹, Ayako Okamoto¹, Ken-Ichi Kusumoto², Hitoshi Amano³, Hiroki Ishida⁴, Michio Takeuchi¹, Youhei Yamagata¹

(¹Tokyo Univ. of Agriculture and Technology, ²NFRI, ³Amano Enzyme Inc., ⁴Gekkeikan Sake Co. Ltd.)

P-51

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* におけるクチナーゼのホモログのクローニングとその性質

柏木豊, 渡辺久美子, 股野麻未, 前橋健二 (東京農大・醸造)

麹菌は多種類の酵素を多量に生産する能力を有し、清酒・味噌・醤油をはじめとする醸造物の製造において、酵素源として重要な働きを担っている。味噌の醸造において原料大豆には脂質が多く含まれており、味噌の発酵熟成中での脂質分解には triacylglycerol lipase, esterase 等が関与することが判っている。麹菌の esterase の一種である cutinase については、すでに CutL1 が液体培養から酵素が単離されその性質および遺伝子に関する報告がなされている^{1,2)}。

麹菌ゲノムデータベースにおいては、cutinase 遺伝子には CutL1 遺伝子以外に4種類のホモログが存在するが、これらの遺伝子がコードする遺伝子産物については未だ詳細に検討されていない。本研究では、これらの遺伝子を PCR 法によってクローニングし宿主大腸菌によって発現させ、遺伝子産物の性質について検討する。

麹菌ゲノムデータベースにおける ID No. AO090005000029 を元にして overlap extension PCR 法によって酵素遺伝子を増幅した。大腸菌発現ベクター pET48b に組み込み、組換えプラスミドベクターを作製した。これを宿主大腸菌 BL21(DL3)pLysS に形質転換し発現を行ったところ、菌体破砕液に強い pNP-butyrate 分解活性が発現した。現在得られた酵素活性について性質を検討している。

1) Ohnishi, K. et al., FEMS Microbiol. Lett., 126, 145-150 (1995)

2) Maeda, H. et al., Appl. Microbiol. Biotechnol., 67, 778-788 (2005)

Cloning and characterization of cutinase homologue from *Aspergillus oryzae*

Yutaka kashiwagi, Kumiko Watanabe, Mami Matano, Kenji Maehashi

(Dept. Ferment. Sci., Tokyo Univ. of Agriculture)

P-52

麹菌 cutinase CutL1 の分子表面負電荷アミノ酸による hydrophobin RolA との相互作用

村垣公英¹, 上原健二², 高橋徹², 山形洋平^{2,3}, 阿部敬悦^{1,2}

(¹東北大院・農・生物産業創成, ²東北大・未来研, ³東京農工大院・農・応生科)

Hydrophobin は糸状菌に広く分布し、疎水性が高く菌糸や分生子の細胞壁に局在していることから、動植物への感染に重要なタンパク質であると考えられている。麹菌 *Aspergillus oryzae* は、生分解性ポリエステルの polybutylene succinate-co-adipate (PBSA) を唯一の炭素源として培養すると、cutinase CutL1 と hydrophobin RolA を発現する。RolA は PBSA の表面に吸着して CutL1 をリクルートする事で分解を促進している¹⁾。これまでに化学修飾と部位特異的変異導入を用いた方法とで、RolA と CutL1 の相互作用に関与しているアミノ酸残基の特定を行ったところ、RolA 側では His32, Lys34 が、CutL1 側では Asp142 が相互作用に重要な残基である事を見出した。本研究ではさらに CutL1 の Asp142 に加え、同じ負電荷アミノ酸である Glu31, Asp171 も相互作用に重要な残基であることを見出した。そこで CutL1 と RolA の相互作用を詳細に解析するために、CutL1 のこれら負電荷アミノ酸残基の多重変異体を作製し RolA との相互作用解析を行った。その結果、CutL1 の Asp142 を中心に、Glu31, Asp171 が多価効果を生み出し、RolA との結合をより強固にしていることが示唆された。現在、分子間相互作用解析装置 QCM を用いて CutL1 多重変異体の RolA への結合能を評価している。

1) Takahashi et al. Mol. Microbiol. 57:1780-1798 (2005)

Glu31, Asp142 and Asp171 of *Aspergillus oryzae* cutinase CutL1 is involved in interaction with hydrophobin RolA

Kimihide Muragaki¹, Kenji Uehara², Toru Takahashi², Youhei Yamagata^{2,3}, Keietsu Abe^{1,2}

(¹Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., ²NICHe., Tohoku Univ., ³Tokyo Univ. of Agric. and Tech.)

P-53

麹菌 *Aspergillus oryzae* の細胞表面タンパク質 Hydrophobin の機能解析

山川 結, 落合夏紀, 高橋李奈, 中島春紫 (明大・農・農化)

Hydrophobin(ハイドロフォービン)とは空気中に菌糸を伸長し分生子形成などを行う担子菌類や子囊菌類が生産する分泌型細胞表面タンパク質である。75~150 アミノ酸の低分子量で、1つの菌株には互いに相同性の低い Hydrophobin 遺伝子を複数(通常 2~5 個)存在する。このタンパク質は両親媒性であり、親水-疎水界面において自己集合し疎水面と親水面を持つ単層を形成する。

麹菌 *Aspergillus oryzae* について Hydrophobin をコードすると推定される遺伝子を5つ単離し (*hypA,B,C,D,E*), *hypA* と *hypB* の2遺伝子についての発現を確認している。蛍光タンパク質との融合タンパク質を作製し、発現させることにより HypA(*hypA*)は主として分生子と菌糸に、HypB(*hypB*)は主として菌糸に存在していることが明らかとなった。このように局在場所に違いがあったことから同一菌株が発現する Hydrophobin の機能的使い分けが示唆された。本研究では *hypA* および *hypB* の単独および二重破壊株を作製し、その表現型解析から HypA, HypB の機能解析を行うことを目的とする。*A. nidulans* 由来 *pyrG* 遺伝子 5'端領域の約 300bp を 3'端に結合したリサイクリング用マーカー(*AnpyrG-MR*)を作製した。*A. oryzae*(Δ *ligD*, Δ *pyrG*)株の *hypB* 遺伝子を *AnpyrG-MR* を用いて破壊した。5-FOA によりマーカー遺伝子を除去し、続けて *hypA* 遺伝子を破壊した。この結果、作製した破壊株とコントロール株で生育速度の違いは見られなかった。しかし全ての破壊株の生育初期段階において、最少培地で培養した場合に限り、撥水性の低下が観察された。現在は分生子形成数の違いや発芽率、さらには表層構造についての詳細などの解析を行っている。

Functional Analysis of Cell Surface Protein; hydrophobin in *Aspergillus oryzae*.

Yui Yamakawa, Natsuki Ochiai, Rina Takahashi, Harushi Nakajima

(Dept. of Agricultural Chemistry, Univ. of Meiji)

P-54

麹菌のハイドロフォービン(HypA)融合タンパク質の生産

大野真尚, 加瀬明日香, 石田千絵, 堂前圭佑, 高橋李奈, 茂木里紗, 中島春紫 (明治大農・農化)

ハイドロフォービンは糸状菌・担子菌の細胞表面に普遍的に存在し、気中菌糸および孢子・分生子の表面に撥水性を与えるタンパク質であり、細胞外に分泌された後、細胞表面に自己集合して外側に撥水性の表面が露出した両親媒性の層を形成する。麹菌(*Aspergillus oryzae*)のハイドロフォービンをコードすると考えられる5つの遺伝子(*hypA/rolA*, *hypB*, *hypC*, *hypD*, *hypE*)について real time RT-PCR 解析を行ったところ、MY 寒天培地、PD 寒天培地において *hypA* 遺伝子が最も多く発現していることを観察している。HypA の機能解析および細胞表面に新たな機能を付与する応用の目的で、HypA に GFP 等の機能的ドメインを結合した HypA 融合タンパク質の生産条件について検討した。一般にハイドロフォービンは固体培養時に強く発現する。液体培養では炭素源としてリンゴ酸・クエン酸等の有機酸を用いたとき、単量体の HypA 融合タンパク質が生産されることを見出した。液体培養で強発現するプロモーターを用いることにより、HypA および HypA 融合タンパク質の大量生産および疎水クロマトグラフィーを用いた精製を進めている。

Expression of hydrophobin (HypA) fusion protein in *Aspergillus oryzae*

Masahisa Ohno, Asuka Kase, Chie Ishida, Keisuke Domae, Rina Takahashi, Risa Motegi, Harushi Nakajima

(Dept. Agri. Chem., Meiji Univ.)

P-55

麹菌 *A. oryzae* による海洋細菌由来 β -1,3-キシラナーゼの生産

久田博元¹, 岡崎文美², 石田博樹¹, 荻野千秋³, 秦洋二¹, 近藤昭彦³ (¹月桂冠・総研, ²神戸大・自科研究環, ³神戸大院・工・応化)

【目的】ガン細胞のアポトーシス誘導活性を有する β -1,3-キシロオリゴ糖は、海藻細胞壁に含まれる β -1,3-キシランを加水分解することにより調製する事が出来る。しかしながら、その加水分解酵素である β -1,3-キシラナーゼの大量生産系は確立されていない。そこで、麹菌の宿主ベクター系を用いた本酵素の大量生産系の構築を試みた。

【方法】超好熱性海洋細菌 *Thermotoga neapolitana* DSM4359 株及び中温性海洋細菌 *Vibrio* sp. AX-4 株由来の β -1,3-キシラナーゼ遺伝子を *sodM* プロモーター制御下で麹菌を宿主として発現させた。各遺伝子のコドン最適化及び培養工学的アプローチによる生産性の向上を検討した。

【結果】*T. neapolitana* 由来 β -1,3-キシラナーゼ遺伝子の麹菌型遺伝子への改変及び分泌シグナル配列の置換により、組換えタンパク質の分泌生産が確認された。同様の方法を用いて、*Vibrio* sp. AX-4 株由来の β -1,3-キシラナーゼ遺伝子も発現・生産をする事が出来た。しかしながら、分泌生産に最適な分泌シグナル配列及び培養条件は発現させる遺伝子で異なっていた。

【謝辞】本研究は科学技術振興調整費「先端融合領域イノベーション創出拠点の形成 - バイオプロダクション次世代農工連携拠点」の一環として行った。

Production of marine bacterial β -1,3-xylanases by *Aspergillus oryzae*

Hiromoto Hisada¹, Fumiyoshi Okazaki², Hiroki Ishida¹, Chiaki Ogino³, Yoji Hata¹, Akihiko Kondo³ (¹Res. Inst., Gekkeikan Sake Co., ²Org. Adv. Sci. Tech., Kobe Univ., ³Dept. Chem. Sci. Eng., Grad. Sch. Eng., Kobe Univ.)

P-56

麹菌 *A. oryzae* により生産した海洋細菌由来 β -1,3-キシラナーゼの酵素学的諸性質

岡崎文美¹, 仲島菜々実¹, 久田博元², 荻野千秋³, 石田博樹², 秦洋二², 近藤昭彦³ (¹神戸大・自科研究環, ²月桂冠・総研, ³神戸大院・工・応化)

【目的】 β -1,3-キシラナーゼは、ガン細胞のアポトーシス誘導効果を有する β -1,3-キシロオリゴ糖の調製に有用な酵素である。我々はこれまでに超好熱性および中温性海洋細菌由来 β -1,3-キシラナーゼの麹菌による分泌生産系を構築した。本研究では、麹菌で生産した β -1,3-キシラナーゼの酵素学的諸性質を解析した。

【方法】超好熱性海洋細菌 *Thermotoga neapolitana* DSM4359 株および中温性海洋細菌 *Vibrio* sp. AX-4 株由来の β -1,3-キシラナーゼを、組換え麹菌により培地中に分泌生産し、陰イオン交換クロマトグラフィーにより精製した。酵素活性は、緑藻スリコギズタ由来 β -1,3-キシランを基質とし、生成した還元糖量を定量することにより求めた。生成したオリゴ糖は薄層クロマトグラフィーにより解析した。

【結果】麹菌により分泌生産した両組換えタンパク質は共に、 β -1,3-キシランに特異的に作用して重合度 2~3 を中心とした β -1,3-キシロオリゴ糖を生成したことから、エンド型の β -1,3-キシラナーゼ活性を保持することが確認された。至適 pH, pH 安定性, 至適温度, 温度安定性等の酵素学的諸性質を解析した結果、大腸菌により発現した組換え酵素とほぼ同様の性質を示した。至適反応条件において、*T. neapolitana* DSM4359 株由来酵素は *Vibrio* sp. AX-4 株由来酵素の約 10 倍の分子活性 (k_{cat}) を有することが明らかとなった。

【謝辞】本研究は科学技術振興調整費「先端融合領域イノベーション創出拠点の形成 - バイオプロダクション次世代農工連携拠点」の一環として行った。

Enzymatic properties of marine bacterial β -1,3-xylanases produced by *Aspergillus oryzae*.

Fumiyoshi Okazaki¹, Nanami Nakashima¹, Hiromoto Hisada², Chiaki Ogino³, Hiroki Ishida², Yoji Hata², Akihiko Kondo³ (¹Org. Adv. Sci. Tech., Kobe Univ., ²Res. Inst., Gekkeikan Sake Co., ³Dept. Chem. Sci. Eng., Grad. Sch. Eng., Kobe Univ.)

P-57

Heterologous expression, purification, and characterization of β -glucosidases from termites

Cristiane A. Uchima¹, Gaku Tokuda², Hirofumi Watanabe³, Katsuhiko Kitamoto¹, Manabu Arioka¹ (¹ Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo; ² Center of Mol. Biosci., Univ. of the Ryukyus; ³ National Inst. of Agrobiol. Sci.)

Worries regarding to the current crisis of climate change and depletion of fossil fuels make the utilization of bioethanol as an attractive option for combating both global warming and less dependence on fossil fuels. Lignocellulose is the most abundant renewable substrate for conversion into fuel. Although cellulosic biomass is difficult to be degraded, it is well-known that termites are efficient decomposers of this material. Since β -glucosidase is essential for cellulose utilization, the aim of this study is to produce and characterize β -glucosidases from termites. The enzyme G1NkBG is derived from the lower termite *Neotermes koshunensis*, whereas G1mgNtBG1 is from the higher termite *Nasutitermes takasagoensis*. These enzymes were successfully expressed in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae* and in the yeast *Pichia pastoris*, respectively. They were purified to homogeneity from the culture supernatants. The effect of temperature, pH, cations, and some reagents on β -glucosidases activity and stability, as well as the substrate specificities, were studied. Kinetic analyses were performed using *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside as a substrate. G1NkBG showed a slight enhancement in its activity in the presence of low concentration of glucose, a characteristic that renders this enzyme of interest for biotechnological applications. Further characterization of G1mgNtBG1 will also be done to explore its applicability in biomass conversion.

P-58

麹菌 *A. oryzae* を用いたシロアリ腸内原生生物由来グルクロン酸エステラーゼの生産とその性質の検討

松井真¹, 木原久美子², 小田切正人², 守屋繁春², 坂本康治², 伊藤幸成², 北本勝ひこ¹, 有岡学¹ (¹ 東大院・農生科, ² 理研基幹研)

近年、地球温暖化や石油資源の枯渇などが問題からバイオエタノールへの期待が高まる中、その製造技術開発において木材の高い資化効率を持つシロアリのバイオマス分解システムが注目されている。グルクロン酸エステラーゼ (GE) は、キシランの側鎖にある 4-O-メチルグルクロン酸とリグニンとの間をつなぐエステル結合を切断すると考えられている新規酵素である。しかし、この酵素に関する報告は少なく、実際にバイオマス分解に関与しているかどうかはよく分かっていない。そこで本研究では、トリコデルマ由来の GE に類似した配列を持つ、ヤマトシロアリ腸内原生生物由来の RsGE について *A. oryzae* を用いて分泌生産を試みた。宿主として麹菌のプロテアーゼ遺伝子 10 重破壊株 NS1D-tApEnBdIVdVaApApAapAdcl を用いて、*glaA142* プロモーター下で RsGE を α -アミラーゼとの融合タンパク質として発現させた。その培養上清を用いて酵素活性を測定したところ、微弱な活性を確認できた。なお、酵素活性測定には新たに作製した合成基質 3-(4-methoxyphenyl)propylglucuronate を用いた。今後は、生産量を増加させるための様々な改良を検討しつつ、酵素学的性質の検討のために RsGE の精製を行う予定である。

Production of glucuronoyl esterase from symbiotic protists in the hindgut of termites by *A. oryzae*

Makoto Matsui¹, Kumiko Kihara², Masato Otogiri², Shigeharu Moriya², Yasuharu Sakamoto², Yukishige Ito², Katsuhiko Kitamoto¹, Manabu Arioka¹ (¹Dept. of Biotech., Univ. of Tokyo, ²RIKEN ASI)

P-59

麹菌 *A. oryzae* によるシロアリ腸内共生原生生物由来マンナーゼの生産

塚越光¹, 松井真¹, 小田切正人², 守屋繁春², 本郷裕一^{3,4}, 西田有一郎^{2,5}, 北本勝ひこ¹, 有岡学¹ (¹ 東大院・農生科, ² 理研基幹研, ³ 理研バイオリソース, ⁴ 東工大, ⁵ 東北大)

近年、地球温暖化や石油枯渇問題によりバイオエタノールへの期待が高まっている。中でも非可食性の木質バイオマスを原料としたバイオ燃料生産においては、木材を高効率で分解するシロアリの木質バイオマス分解システムが注目されている。シロアリのバイオマス分解はシロアリ自身が持つ酵素による分解と、腸内に共生する原生生物群の持つ酵素による分解の二重のシステムによって成り立つことがわかっている。シロアリ腸内共生原生生物由来のマンナーゼは、木材構成成分であるヘミセルロースの一種であるマンナンの分解を行うことから、シロアリの木質バイオマス分解において重要な役割を担っていると考えられる。

本研究では、シロアリ共生系由来の GHF26 に属するマンナーゼの麹菌 *A. oryzae* による生産を試みた。 α -アミラーゼとの融合タンパク質として発現させるプラスミドを作製し、*A. nidulans* sC マーカーを用いて麹菌プロテアーゼ遺伝子 10 重破壊株 NSID-tApEnBdIVdVaApApAdcI 株および酵母 *P. pastoris* に導入してマンナーゼ生産株を取得した。この形質転換株を培養したところ、培養上清にマンナーゼ活性が認められた。現在、この培養上清を用いてマンナーゼの酵素学的性質の検討を行っている。

Production of mannanases from the symbiotic protists in the hindgut of termites by *A. oryzae* and their characterization

Hikaru Tsukagoshi¹, Makoto Matsui¹, Masato Otagiri², Shigeharu Moriya², Yuichi Hongoh^{3,4}, Yuichiro Nishida^{2,5}, Katsuhiko Kitamoto¹, Manabu Arioka¹ (¹ Dept. of Biotech., Univ. of Tokyo, ² RIKEN ASI, ³ RIKEN BRC, ⁴ Tokyo Tech, ⁵ Tohoku Univ.)

P-60 (O-8)

Aspergillus nidulans におけるセルラーゼ遺伝子の発現制御機構

山川陽平、遠藤良知、金丸京子、*加藤雅士、小林哲夫 (名大院・生命農学、*名城大・農)

Aspergillus 属糸状菌において、セルラーゼ遺伝子群の発現は転写因子 XlnR による制御を受けることが知られている。一方、我々は *A. nidulans* のエンドグルカナーゼ *eglA* の誘導発現が XlnR 非依存的であることを示し、詳細なプロモーター解析により転写誘導に関わる *cis*-element (CeRE; Cellulose Responsive Element) を同定した。CeRE には、*Saccharomyces cerevisiae* の広域転写因子 Mcm1p の結合配列が存在する。そこで本研究では、*A. nidulans* の Mcm1p オルソログである McmA について、そのセルラーゼ発現制御への関与を明らかにするため、McmA 変異がセルラーゼ生産に与える影響を解析するとともに、McmA の *eglA* プロモーターへの結合を *in vitro* で解析した。

McmA の破壊は致死的であると予測されたため、MADS box 内の I70 を alanine 置換した McmA_{I70A} 遺伝子を構築し、相同組換えにより野生型 *mcmA* 遺伝子と置換した。本変異株では、親株と比較しセルラーゼ生産性が半減していた。また、大腸菌で発現・精製した His-tagged McmA を用い EMSA により DNA 結合特性を解析したところ、CeRE を含む DNA 断片に結合すること、CeRE への変異導入は McmA の結合能の著しい低下を引き起こすことが明らかとなった。以上から、McmA は *eglA* プロモーター上の CeRE に直接結合し転写を制御すると考えられる。CeRE の類似配列は *eglA* 以外のセルラーゼ遺伝子のプロモーターにも存在する。そこで現在、これらプロモーターへの McmA の結合を調べると共に、real time PCR によりセルラーゼ遺伝子群の発現解析も進めている。

Regulation of cellulase genes in *Aspergillus nidulans*

Yohei Yamakawa, Yoshikazu Endo, Kyoko Kanamaru, Masashi Kato*, Tetsuo Kobayashi (Graduate Sch. of Bioagric. Sci., Nagoya Univ., *Dept. Agric., Meijo Univ.)

P-61

Aspergillus aculeatus 由来転写因子 AceI の機能解析

小西宏和, 谷修治, 炭谷順一, 川口剛司 (阪府大院・生環科)

糸状菌 *Aspergillus aculeatus* は糖化力に優れたセルラーゼを生産する。そこで当研究室では本菌のセルラーゼ遺伝子発現抑制機構の解明を通して、これら酵素を効率的に生産する株の育種を目指している。*Trichoderma reesei* AceI はセルラーゼやキシラナーゼ遺伝子の発現を抑制する DNA 結合タンパク質である。一方オルソログである *Aspergillus nidulans* の StzA は塩ストレス応答に関与することが報告されており、両因子間に機能の類似性は見られない。今回は *Aspergillus aculeatus* において *aceI* 遺伝子欠損株を作製し、塩ストレス応答やセルラーゼ・キシラナーゼ生産への影響を解析したので報告する。

相同組換えを用いて *aceI* 遺伝子欠損株を作製し、その形質を観察したところ、欠損株では野生株に比べて生育が低下した。また終濃度が 10~750 mM になるように NaCl を添加した最少培地と添加していない最少培地を用いて、塩に対する感受性を調べた。野生株は NaCl 濃度に依存して菌糸伸長が段階的に低下したのに対して、欠損株は 10 mM NaCl 培地で菌糸伸長が 0.6 倍に低下した。これは野生株における 500 mM での結果に相当し、*A. aculeatus* AceI は *A. nidulans* StzA と同様に塩ストレス応答に関与していることが示唆された。次に *aceI* 遺伝子欠損のセルラーゼ、キシラナーゼの生産への影響を解析した。野生株と欠損株におけるセルラーゼ・キシラナーゼ生産を比較したところ、*endoglucanase* と *endoxylanase* の生産に影響はなかったが、 β -glucosidase の生産量が欠損株では野生株の約 2 倍に上昇した。

今後は転写解析を行い、*A. aculeatus* AceI が *bgII* 遺伝子発現を抑制する機構について調べると共に、*A. aculeatus* AceI の塩ストレス応答メカニズムについても明らかにしていきたい。

Functional analysis of taranscription factor AceI in *Aspergillus aculeatus*

Hirokazu Konishi, Tani Shuji, Jun-ichi Sumitani, Takashi Kawaguchi

(Grad. Sch. Life Env. Sci., Osaka Pref. Univ.)

P-62

遺伝子タギング法を利用した *Aspergillus aculeatus* cellobiohydrolase I 遺伝子発現制御因子の探索

國武絵美, 谷修治, 炭谷順一, 川口剛司 (阪府大院・生環科)

A. aculeatus セロビオハイドロラーゼ I 遺伝子 (*cbhI*) の発現はセルロース性基質により誘導される。この応答は転写因子 XlnR とは異なる因子によって転写レベルで制御されることがこれまでに明らかにされている。本研究では、アグロバクテリウム形質転換法 (AtMT) により構築したランダム遺伝子破壊ライブラリから *cbhI* 発現誘導能低下株を取得し、T-DNA タギングにより新奇セルラーゼ遺伝子発現制御因子の同定を試みたので報告する。

まず、*cbhI* プロモータ制御下でオロチジンリン酸脱炭酸酵素遺伝子 (*pyrG*) を発現する株を構築し、これを宿主に AtMT を行った。約 6000 株のランダム変異体の中から、小麦フスマを単一炭素源とした FOA 含有培地上で生育する株を選択した。このうちグルコースを炭素源とした培地上での生育は宿主と同等かつ、アビセル培地では生育が低下した株を 7 株単離した。これらの株における T-DNA 挿入座位を inverse-PCR 法を用いて決定し、また *cbhI* 発現量を RT-PCR 法及び real-time PCR 法により解析した結果、Zn(II)₂Cys₆ motif を持つ推定の転写因子をコードする遺伝子に T-DNA が挿入されていた株において、アビセル・セロビオースを炭素源とした場合に *cbhI* 発現量が低下していることが明らかとなった。一方、キシラン存在下で XlnR に誘導されるキシラナーゼ遺伝子の発現量には影響はなかった。現在遺伝子置換により同定した転写因子遺伝子破壊株を作製し、その機能を解析している段階である。

Screening for a regulator involved in the cellobiohydrolase I gene expression using T-DNA tagging in *Aspergillus aculeatus*

Emi Kunitake, Shuji Tani, Jun-ichi Sumitani, Takashi Kawaguchi

(Grad. Sch. Life Env. Sci., Osaka Pref. Univ.)

P-63

麹菌のリン酸獲得系遺伝子制御機構における転写因子

多田 功生¹, 鈴木 聡¹, 福岡 真里¹, 大口 ひかる¹, 北本 則行², 安田 (吉野) 庄子², 和久 豊³, 白石 洋平³, 伊賀 佳美³, 杉本 達哉⁴, 冨師 境子⁴, 楠本 憲一¹ (¹食総研,²愛知産技研・食工技セ,³ビオック,⁴ナカモ)

日本の伝統的発酵食品の製造には、麹菌の生産する各種酵素の働きが重要である。分泌型ホスファターゼは、調味味噌製造において添加された核酸系旨味成分を分解してしまうため、味噌用麹においては低減化が望ましい。一方、清酒醸造においては酵母の生育に必要なリン酸供給のため、分泌型ホスファターゼ、特に原料米のフィチン酸からリン酸を遊離するフィターゼが重要となる。リン酸獲得系遺伝子群の発現制御機構については酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において詳細に明らかとされているが、麹菌 *Aspergillus oryzae* におけるホスファターゼの制御機構については全く明らかとなっていない。そこで我々は、*A. oryzae* におけるリン酸獲得系遺伝子制御機構の解明のため、*S. cerevisiae* のリン酸獲得系遺伝子の発現を制御する転写因子である PHO4 のオルソログ遺伝子をゲノム情報より検索したが、全長にわたり相同性を保持する配列は見つからなかった。そこで、*A. nidulans* において PHO4 と同様の機能を持つとされている PALCA のオルソログを *A. oryzae* KBN616 株よりクローニングし、その機能解析を行った。その結果、*A. oryzae* の PALCA オルソログが *S. cerevisiae* の PHO4 と同様にリン酸獲得系遺伝子制御機構における転写因子であることが明らかとなった。本研究は、農林水産省「新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業」の一環として行われたものである。

A transcription factor in the systems for inorganic phosphate acquisition of *Aspergillus oryzae*

Sawaki Tada¹, Satoshi Suzuki¹, Mari Fukuoka¹, Hikaru Ohkuchi¹, Noriyuki Kitamoto², Shoko Yoshino-Yasuda², Yutaka Wagu³, Yohei Shiraiishi³, Yoshimi Iga³, Tatsuya Sugimoto⁴, Kyoko Zushi⁴, Ken-Ichi Kusumoto¹ (¹NFRI, ²Food Res. Center, Aichi Ind. Tech. Inst., ³Bio'c, ⁴Nakamo)

P-64

麹菌 pal 経路の解析

佐野元昭, 北川治恵, 堂本光子, 大箸信一 (金沢工大・ゲノム研)

【目的】 麹菌 *Aspergillus oryzae* の生産するアルカリプロテアーゼ(ALP)は、醤油醸造において重要な酵素の1つである。我々は ALP の制御機構の解明を行うため、ALP の発現解析に関わる pal シグナル経路と pal 経路により活性化される転写因子 pacC に注目して研究を進めてきた。しかしながら、pal 経路に関与する全ての因子の特定までには至っていない。そこで、今までに作製した *palF*¹, *palI*², *palH*³破壊株の影響を詳細に解析した結果、今までに知られていなかった pal 経路に関与する遺伝子の特定に成功し、解析を行ったので報告する。

【方法および結果】 pal 経路に関与する候補遺伝子を、*palF*, *palI*, *palH*破壊株の DNA マイクロアレイ解析結果等より抽出し、候補にあがった遺伝子について *A. oryzae* Δ *ligD* Δ *pyrG* 株を宿主に用いて遺伝子破壊株の作製を行った。作製した破壊株について、定量 PCR により *pacC* 遺伝子の発現量の解析を行ったところ、*pacC* 遺伝子の発現量の減少が認められた。また、ALP 活性の減少も確認できた。現在、その候補遺伝子について詳細な解析を行っている。

- 1) 佐野ら : 2008 年日本生物工学会大会講演要旨集 P.150
- 2) 佐野ら : 2009 年日本生物工学会大会講演要旨集 P.73
- 3) Inoue et al. : Biosci. Biotechnol. Biochem., (2010) 74, p188-190

Analysis of pal pathway from *Aspergillus oryzae*

Motoaki Sano, Harue Kitagawa, Mitsuko Dohmoto, Shin-ich Ohashi (KIT)

P-65

Aspergillus niger におけるフィターゼ遺伝子 (*PhyA*) プロモーターの解析

手島沙織¹, 梅原亮介¹, 平光優議¹, 田中隆志¹, 山本 綽², 浅野行蔵¹, 曾根輝雄¹ (¹北大・院農・応生科, ²新日本化学工業)

Aspergillus niger M3 株は, 野生株 AC134 株に NTG による変異誘起を繰り返し得られた, 野生株の 10~20 倍のフィターゼを生産する高生産株である. 一方で M3 株は蓄積した突然変異のために生育や胞子形成が野生株に比べて大きく劣っており, 実生産における問題となる. M3 株におけるフィターゼ高生産の機構を明らかにすることで生育, 胞子形成が正常なフィターゼ高生産株の構築が可能になると考えられる. まず, フィターゼの構造遺伝子 *PhyA* 遺伝子の転写量を Northern blotting により調べたところ, M3 株で顕著に増大していたことから, M3 株のフィターゼ生産の増大が転写レベルで起こっていることが示された. AC134 株と M3 株の *PhyA* のコピー数, *PhyA* とその推定プロモーターである上流約 1 kbp (*PhyA* promoter) の塩基配列に違いは認められなかったことから, M3 株における *PhyA* 転写量の増大は *PhyA* promoter における転写制御の変化によるものと考えられた. そこで, *PhyA* promoter をさらに解析するために, *PhyA* promoter に GUS 遺伝子を連結し, さらに *PhyA* terminator 領域をつなげた GUS レポーター発現系を構築した. M3 株及び AC134 株は形質転換が困難であったため, *A. niger* A732 株に上記レポーター系を導入し, その活性を解析した. 液体培地中のリン酸濃度の違いによるフィターゼ活性と GUS 活性の間に相関が見られ, レポーター系が機能していることが示唆された. さらに現在, 5'-末端を 100bp ずつ欠損させた各 *PhyA* promoter を作成し, GUS 遺伝子の発現を酵素活性測定または qRT-PCR によって比較することで, *PhyA* promoter のシスエレメントの同定を目指している.

Analysis of *Aspergillus niger PhyA* promoter

Saori Teshima¹, Ryosuke Umehara¹, Yugi Hiramitsu¹, Takayuki Tanaka¹, Yutaka Yamamoto², Kozo Asano¹, and Teruo Sone¹ (¹Applied Bioscience, Graduate School of Agriculture, Hokkaido Univ., ²Shin Nihon Chemical Co., Ltd.)

P-66

Expressions of genes for fatty acid metabolism and the hydrophobin production in the *farA* disruptants of *A. oryzae*.

Sharon Marie Garrido¹, Noriyuki Kitamoto², Akira Watanabe¹, Takahiro Shintani¹, and Katsuya Gomi¹

¹Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, Japan; ²Food Research Center, Aichi Industrial Technology Institute, Japan.

FarA is a Zn₂Cys₆ transcription factor which upregulates genes required for growth on fatty acids in *Aspergillus nidulans*. FarA is also highly similar to the cutinase transcription factor CTF1a of *Nectria hematococca*. In this study, we examine the implication of FarA in the regulation of genes responsible for the production of hydrophobin proteins which mediate the activity of CutL1 in the degradation of a biodegradable plastic, PBSA in *A. oryzae*. Wild-type (WT) and *farA* disruptants were grown in minimal agar medium with PBSA, and WT showed clear zone around the colony and the presence of HsbA protein while the disruptants did not. However, RolA was both detected in the WT (at higher level) and the disruptant. Furthermore, qRT-PCR and RT-PCR revealed that the expression of *hsbA* and *rolA* genes were significantly reduced in the disruptants compared to WT. In addition to this, expressions of genes such as acyl-CoA dehydrogenase and isocitrate lyase for fatty acid metabolism were reduced in the disruptant compared to the WT when grown in minimal medium with oleic acid as a sole C source. These results indicated that FarA may be implicated in the expression of hydrophobin genes and genes for fatty acid metabolism in *A. oryzae*.

P-67

麴菌の転写制御因子 AtrR はアゾール系薬剤により活性化する

大場歩, 新谷尚弘, 五味勝也 (東北大院・生物産業創成)

近年、出芽酵母および病原性カンジダ属酵母の PDR1 ファミリーに属する転写因子が、アゾール系薬剤と直接結合し、薬物排出トランスポーターの発現と多剤耐性の誘導を促進することが明らかにされた。しかし、糸状菌に関しては、麴菌においてアゾール系薬剤排出に関与する ABC トランスポーター遺伝子 3 種類と、それらを同時に制御する転写因子 AtrR が同定されているのみで、転写因子の活性化に関する分子機構は明らかにされていない。本研究では、*atrR* 遺伝子高発現時よりも薬剤を添加した場合の方が 3 種類の ABC トランスポーター遺伝子の発現量が高いことに着目し、転写因子 AtrR が薬剤により何らかの活性化を受けている可能性について検討した。

マルトース誘導により *atrR* を高発現させた状態でアゾール系薬剤を添加することで、*atrR* の発現量にはほとんど差が見られないにもかかわらず、その制御下にある遺伝子の発現量は薬剤を添加せずに *atrR* を高発現させた場合と比較して 2～3 倍に増加していた。また、*atrR* 破壊株において *atrR* の制御下にある ABC トランスポーター遺伝子の発現量は薬剤の有無によって違いが見られなかったため、*atrR* 以外の転写因子の影響により *atrR* の発現が増加したとは考えにくい。以上のことから、AtrR はアゾール系薬剤により何らかの活性化を受けている可能性が高いと考えられる。

The transcription activator AtrR is activated by azole drugs in *Aspergillus oryzae*

Ayumi Ohba, Shintani Takahiro, Katsuya Gomi

(Div.Biosci.Biotechnol.Future Bioind., Grad.Sch.Agric.Sci., Tohoku Univ.)

P-68

アカパンカビのストレス応答 MAP キナーゼ下流で制御される転写因子 RCO-1 の同定

山下和宏, 高橋正和, 亀井誠之, 藤村真 (東洋大院・生命科)

アカパンカビのストレス応答シグナル伝達経路は、浸透圧ストレスや殺菌剤フルジオキシニルに応答することが良く知られているが、近年、分生子形成や概日リズムに関わるものが報告されている。OS-2 MAP キナーゼの下流では、CREB 型の転写因子 ATF-1 が制御されており、分生子特異的タンパク質の発現に関わっていることが示唆されているが、その他の転写因子については糸状菌では同定されておらず不明である。そこで、本研究では、OS-2 下流の転写因子の同定を行った。

昨年度に、OS-2 の活性化によって ATF-1 非依存的に誘導される *ccg-13* 遺伝子のプロモーターアッセイを行い、*ccg-13* 遺伝子を制御する転写因子は、上流 1,000～1,200bp 付近に結合領域をもつリプレッサーであることを報告した。本研究では、結合領域の DNA をビオチン標識し、ストレプトアビジン磁気ビーズを用いて DNA 結合タンパク質を精製した。その結果、regulator of conidiation-1 (*rco-1*) が同定された。RCO-1 は、分生子形成に関与する遺伝子の発現を抑制する転写因子であり、その変異株は分生子形成能を消失することが報告されている。*rco-1* 破壊株の浸透圧および殺菌剤感受性は野生株と同程度であったが、*ccg-13* 遺伝子の発現解析を行ったところ、無処理での発現量がフルジオキシニル処理した野生株と同程度であった。また、*rco-1* 破壊株では、フルジオキシニル処理による *ccg-13* 遺伝子の発現誘導が消失した。*ccg-13* 遺伝子の他に ATF-1 非依存的に誘導される遺伝子 (*ccg-14*, *phi4*) の発現を調べたが、どちらの遺伝子も *ccg-13* 遺伝子と同様の結果が得られた。これらのことから、RCO-1 は OS-2 MAP キナーゼの下流で制御される転写因子であることが明らかになった。

RCO-1 is a transcriptional repressor that regulated by OS-2 MAP kinase in *Neurospora crassa*.

Kazuhiro Yamashita, Masakazu Takahashi, Masayuki Kamei, Makoto Fujimura

(Life Sci., Toyo Univ.)

P-69

赤かび病菌の CREB 型転写因子 *FgATF1* 破壊株の単離とその解析

齋須秀昭¹, 山下和宏¹, 高橋正和¹, 亀井誠之¹, 木村真², 藤村真¹ (¹東洋大院・生命科学, ²理研・微生物代謝制御)

赤かび病菌 (*Fusarium graminearum*) はコムギなどの重要穀類に感染して、カビ毒であるトリコテセン類を蓄積する為、穀物生産と食の安全を脅かす重要な病原菌である。これまでの研究により、浸透圧シグナル伝達 (FgOS) 経路は浸透圧感受性やフルジオキソニル耐性のみならず、二次代謝であるトリコテセン合成の制御に関わっており、MAP キナーゼカスケードの変異株は、いずれもトリコテセン合成能が消失することが報告されている。アカパンカビの OS 経路の下流では、CREB 型の転写因子が多数の遺伝子群の制御に関与していることが明らかになっている。そこで、赤かび病菌のオルソログである *FgATF1* 遺伝子の破壊株を作製した。 $\Delta FgATF1$ 株は、アカパンカビの $\Delta aft-1$ 株と同様に、顕著な浸透圧感受性やフルジオキソニル耐性は認められなかった。トリコテセンの合成培地 (米粉培地) で $\Delta FgATF1$ 株を培養し、トリコテセンを抽出したところ、野生株と同様にトリコテセンが TLC により検出された。このことから、転写因子 *FgATF1* はトリコテセン合成に関与しないことが明らかになった。*FgOS2* (MAP キナーゼ) により制御される遺伝子と *FgATF1* との関係性を明らかにするために、まず、YG 培地 (トリコテセン非生産培地) で培養した赤かび病菌の野生株にフルジオキソニル処理し、アカパンカビ OS-2 に制御される遺伝子のオルソログが誘導されるかを検証した。その結果、*FgCAT1*, *Fg CCG1*, *FgGCY1*, *FgCUT1* などが顕著に誘導されることが明らかになった。現在、これらの遺伝子が *FgOS2* や *FgATF1* により制御されているかを解析中である。

Isolation of the knock-out strain of *FgATF1* gene which encodes a CREB family transcription factor in *Fusarium graminearum*

Hideaki Saisu, Kazuhiro Yamashita, Masakazu Takahashi, Masayuki Kamei, Makoto Kimura, Makoto Fujimura (Grad.Sch.of Life Sci., Toyo Univ)

P-70

His-Asp リン酸リレー情報伝達系阻害剤のリン酸基転移に与える影響

野田真奈美、小暮篤史*、藤岡智則*、金丸京子、加藤雅士**、小林哲夫
(名大院・生命農学、*クミアイ化学、**名城大・農)

His-Asp リン酸リレー系は、環境の物理化学的变化に応答するための情報伝達系であり、真核生物においては環境センサーである hybrid 型 histidine kinase (HK-RR)、中間因子 His-containing phosphotransmitter (HPt)、制御因子 response regulator (RR) から構成される。糸状菌においても、10 種以上の HK-RR、1 種の HPt、少なくとも 2 種の RR からなる本情報伝達系が存在する。しかし、糸状菌では 1 種の HPt で如何にして異なる環境シグナルに応答するかという問題を好例として未知の部分が多く、本情報伝達系解析のためのツール開発が強く望まれる。本報告では、糸状菌 His-Asp リン酸リレー系特異的阻害剤としてスクリーニングされた新規化学物質について、リン酸基転移に与える影響を *in vitro* で解析し、作用機構の解明を試みた。

His-tag を連結した *A. nidulans* 由来 YpdA (HPt) をニッケルアガロースを用いて精製した。HK としては ArcB を高発現する大腸菌の膜画分、RR としては SskA を高発現する大腸菌の細胞抽出液を用い、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 存在下で ArcB の自己リン酸化後、それに引き続く YpdA、SskA へのリン酸基転移に与える阻害剤の影響を経時的に追跡した。その結果、阻害剤の存在下で SskA のリン酸化レベルが顕著に上昇していた。これは、SskA のリン酸化の促進、あるいは SskA の脱リン酸化の阻害を示唆しており、本阻害剤が Hog 経路の抑制を引き起こすという既出のデータと一致していた。現在、同様にスクリーニングされた他の新規阻害剤についても検討を加えている。

Effect of newly identified His-Asp phosphorelay inhibitors on phosphotransfer in filamentous fungi

Manami Noda, Atsushi Kogure*, Tomonori Fujioka*, Kyoko Kanamaru, Masashi Kato**, Tetsuo Kobayashi (Graduate Sch. of Bioagric. Sci., Nagoya Univ., *Kumiai Chem. Ind. Co. Ltd, **Facult. Agric., Meijo Univ.)

P-71 (O-10)

転写因子 AmyR が *Aspergillus nidulans* の二次代謝に及ぼす影響の解析

上村曜介, 鳴神寿昭, 梶尾俊介, 高谷直樹 (筑波大院・生命環境)

AmyR は DNA 結合能を持つ転写因子であり, α -アミラーゼを含むアミロース分解系酵素遺伝子群の発現誘導に関わることが知られる。我々は, *A. nidulans* の amyR 遺伝子破壊株 (DamyR) を, グルコースを単一の炭素源とした無機固体培地を用いて培養した際に, 培地が赤色に呈色することを見出した。また, DamyR は野生型株 (WT) と比べ, 培地中に多くのステリグマトシスチン (ST) を生成し, ST 生合成遺伝子群の発現量も大きく増加していたことから, AmyR が ST の生合成を転写レベルで負に調節することが示された。WT と DamyR を無機固体培地で培養した際のトランスクリプトーム解析を行ったところ, DamyR では, ST 以外の多くの二次代謝産物合成系酵素遺伝子の発現量が増加するとともに, 転写因子 CreA に依存して発現がカタボライト抑制される遺伝子の発現量が増加していた。*A. nidulans* の CreA は, グルコースやスクロースを炭素源とした際のカタボライト抑制を担う転写因子である。creA 遺伝子破壊株 (DcreA) は, DamyR と同様に培地中に赤色色素を生産したことから, 赤色色素の生合成はカタボライト抑制をうけることが示された。また, amyR と creA の二重遺伝子破壊株も同レベルの赤色色素を生産したことから, AmyR は CreA と協調して赤色色素の生合成に関する遺伝子の発現抑制に関わると考えられた。一方, DcreA および amyR-creA 二重遺伝子破壊株は, それぞれ WT および DamyR と同レベルの ST を生成したことから, AmyR は CreA の機能によらず ST 生合成を抑制することが示された。

以上の結果は, *A. nidulans* の AmyR が, これまで知られていたアミロース分解系の発現誘導 (一次代謝) だけでなく, ST を含む多様な二次代謝系遺伝子の発現の制御に関わることを初めて示したものである。

Role of fungal transcriptional factor AmyR in regulating secondary metabolism

Yosuke Kamimura, Toshiaki Narukami, Shunsuke Masuo, Naoki Takaya (Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba)

P-72

Aspergillus niger 由来 III 型ポリケタイド合成酵素遺伝子の機能解析

宮井希実, 本田裕樹, 服部貴澄, 桐村光太郎 (早大・理工・応化)

【目的】ポリフェノールは微生物や植物の細胞において種々の機能を示す二次代謝産物である。III 型ポリケタイド合成酵素 polyketide synthase は, 植物に特異的に存在すると考えられてきた。しかし, ゲノム解析の結果から, 糸状菌 *Aspergillus oryzae* においても III 型 PKS をコードする遺伝子 *csyA* の存在が明らかにされた。一方, ゲノム解析が終了した糸状菌 *Aspergillus niger* NRRL328 株においても *A. oryzae* の *CsyA* とアミノ酸配列の相同性が 36% を示すホモログ (以下 An-CsyA と略) をコードする遺伝子が見出された。本研究では, *A. niger* NRRL328 由来の An-CsyA が III 型 PKS としての機能を有するかどうかについて検討した。

【方法および結果】*A. niger* NRRL328 由来の mRNA を鋳型にして An-CsyA をコードする cDNA をクローニングした。推定される An-CsyA のアミノ酸配列では, *A. oryzae* 由来 *CsyA* と同様に III 型 PKS の活性残基が保存されていた。His-Tag を付加した An-CsyA 遺伝子を大腸菌で発現させ, 精製した組換え酵素 An-CsyA, 開始基質, malonyl-CoA を用いて *in vitro* 反応を行った。反応終了後, 生成物を酢酸エチル抽出し, LC-MS/MS を用いて An-CsyA の基質特異性と反応生成物を同定した。炭素数 2~12 の acyl-CoA を開始基質とした際, 2 回の伸長反応により計 9 種の triketide pyrone, 3 回の伸長反応により計 7 種の tetraketide pyrone, 4 回の伸長反応により計 2 種の pentaketide pyrone, 5 回の伸長反応により計 3 種の hexaketide pyrone を合成可能なことを確認した。以上より, An-CsyA が III 型 PKS としての機能を有することを明らかにした。

Functional analysis of the type III polyketide synthase gene from *Aspergillus niger*

Nozomi Miyai, Yuki Honda, Takasumi Hattori, Kohtarō Kirimura

(Dept. Appl. Chem., Fac. Sci. Eng., Waseda Univ.)

P-73

麹菌 *Aspergillus oryzae* を宿主とするテレキノン A 異種生産系の構築

木下 浩, 酒井香奈絵, 仁平卓也 (阪大・生物学国際交流セ)

【目的】これまでの様々な生理活性物質の発見, さらにゲノム解析による多数の二次代謝遺伝子の存在確認から, 糸状菌は新規物質の重要な探索源と見なされている。しかし, 糸状菌は生育が遅く, またその二次代謝は環境に強く依存するため, 化合物取得には個々に至適培養条件を設定する必要があり, 労力, 時間を要する。糸状菌の二次代謝遺伝子を効率よく発現しうる生産系が構築できれば, 膨大な遺伝子資源の有効利用が可能となる。*A. oryzae* は生育が速く, これまでの研究により様々な知見が得られており, また遺伝子工学的技術も開発されている。そこで我々は *A. oryzae* を宿主とする化合物生産系の構築を試みた。

【方法・結果】これまでに, *A. oryzae* を宿主としてポリケタイド化合物であるカビ毒シトリニン, 高脂血症治療薬モナコリンの生産に成功した。本研究では *A. nidulans* において, 生産およびその生合成遺伝子が同定されたテレキノン A (TQA) の生産を試みた。TQA はポリケタイドとは異なり, アミノ酸とイソプレノイドからなる複合型の化合物である。宿主としては, 予め二次代謝能を高めた *laeA* 遺伝子導入株を用いた。*A. nidulans* から単離された 12 kb からなる TQA 遺伝子クラスターをコスミドベクターを用いて, *A. oryzae* に導入し, 得られた形質転換体を合成培地により 7 日間培養し, 培養上清をジクロロメタンにより抽出した。得られた抽出物について HPLC により解析を行ったところ, 4 つの形質転換体について TQA と同じ UV 吸収を示すピークが新たに出現していた。更に解析を進めた結果, *A. oryzae* を宿主として TQA およびその類縁体の生産が確認できたのでここに報告する。

Heterologous production of telequinone A in *Aspergillus oryzae*

Hiroshi Kinoshita, Kanae Sakai, Takuya Nihira

(ICBiotech, Osaka Univ)

P-74

糸状菌 *Chaunopycnis alba* が生産する M 期キネシン Eg5 阻害剤テルペンドール E はマイコトキシン生合成の中間体である

本山高幸, 林敏明, 廣田洋, 植木雅志, 長田裕之 (理研・ケミカルバイオロジー)

M 期キネシン Eg5 は動物細胞の細胞周期進行に必須で, 抗がん剤のターゲットとして注目される。我々はテルペンドール E を天然物初の Eg5 阻害剤として報告し, テルペンドール E 生合成経路の解明と, 生合成経路改変による高活性類縁体取得を目的として研究している。テルペンドール E は, インドールジテルペン化合物で, 子囊菌門に属する糸状菌 *Chaunopycnis alba* が生産する。インドールジテルペンは一部の糸状菌が生産し, 多くはマイコトキシンとして働く。テルペンドール E 生産菌は主要産物として強力なマイコトキシンであるテルペンドール C を生産する。現在までに 7 遺伝子からなるテルペンドール E 生合成遺伝子クラスターを単離し, P450 遺伝子 (*terP*) 破壊株でテルペンドール C の生産がなくなり, テルペンドール E が蓄積するようになることを明らかにしている。

テルペンドール E は *C. alba* とその近縁種からしか単離されておらず, インドールジテルペン生合成中間体としての報告はない。テルペンドール E が生合成中間体であることを明らかにするために 7 遺伝子のうち *terP* のみを発現する株を作成した。この株は C11 水酸基を持つテルペンドール E を, テルペンドール C に至る生合成中間体であり C11-C12 エポキシ構造を持つ 13-desoxy-terpendole I に変換したことから, テルペンドール E が生合成中間体であることが示された。インドールジテルペンに属するマイコトキシンのうち, *Penicillium paxilli* の paxilline や *Aspergillus flavus* の aflatrem は C11-C12 エポキシ構造を持たず, *C. alba* に近縁な *Neotyphodium lolii* の lolitrem は持つことから, テルペンドール E は *C. alba* 及びその近縁種でのみ合成されるマイコトキシンの生合成中間体であることが示唆される。

Terpendole E, a mitotic kinesin Eg5 inhibitor, is a biosynthetic intermediate of a mycotoxin in a filamentous fungus *Chaunopycnis alba*

Takayuki Motoyama, Toshiaki Hayashi, Hiroshi Hirota, Masashi Ueki, Hiroyuki Osada (Chem. Biol., RIKEN)

P-75

***Gibberella sacchari* 形質転換体交配後代に生じるハイグロマイシン B 耐性遺伝子の変異について**

波田野未由来, 寺岡 徹, 有江 力 (農工大院農)

Gibberella sacchari (anamorph: *Fusarium sacchari*) は異なる交配型を持つ菌株間で交配し完全世代を形成するヘテロタリック (self-incompatible) な子のう菌である。FGSC 7610 株 (MAT1-2) と 7611 株 (MAT1-1) を、それぞれプラスミド pMK412 (*egfp hph*; Watanabe *et al.*, 2007) と pAK2-HYG (*dsred2 hph*; 加藤, 2008) で形質転換した。得られた形質転換体 FGSC 7610-*gfp-hph* と FGSC 7611-*rfp-hph* を交配して得られた子のう胞子を単胞子分離したところ、緑 (*egfp* -) : 赤 (- *dsred2*) : 黄 (*egfp dsred2*) : 白 (-) に分離した。緑、赤、黄の蛍光を示す単胞子分離株は理論上ハイグロマイシン B 耐性遺伝子 (*hph*) を保持するはずで、PCR によって *hph* 遺伝子は確認できた。しかし、その中にハイグロマイシン B 感受性を示す菌株が認められ、遺伝子型と表現型が矛盾した。これら矛盾した菌株の *hph* 遺伝子の部分塩基配列 (約 900 bp) を解析したところ、C:G の 2.5~11.6% が T:A に置換していた。これは *Neurospora crassa* において確認されている RIP (repeat-induced point mutation; Selker *et al.*, 1987) に類似の現象と考えられた。

Mutations in hygromycin B resistance gene (*hph*) found in sexual cross of *Gibberella sacchari*-transformants

Miyuki Hatano, Tohru Teraoka, Tsutomu Arie

(Tokyo Univ. of Agric. & Tech.)

P-76

イネいもち病菌 Mps1 MAP キナーゼ経路と Pmk1 MAP キナーゼ経路は拮抗しない

藤川貴史^{1,2}・阿部敬悦³・西村麻里江¹ (1生物研・2現 農研機構 花き研・3東北大院農)

これまでに我々はイネいもち病菌 (*Magnaporthe grisea* =*M.oryzae*) が宿主感染時もしくは植物ワックス成分処理時に Mps1 MAP キナーゼを活性化させ、 α -1,3-グルカン (α -G) を細胞壁表層に蓄積することを報告した。Mps1 は細胞壁ストレスシグナルによって活性化される MAP キナーゼに属することから、既報の細胞壁ストレスを引き起こす薬剤をいもち病菌に処理し Mps1 のタンパク質リン酸化を調べたところ、Mps1 は植物ワックス成分処理だけでなく細胞壁ストレス (カルコフロー, ミカファンギン) 処理によってもリン酸化されることが確認された。次に、付着器形成への関与が報告されている Pmk1 のリン酸化を調べたところ、cAMP 処理によってリン酸化されただけでなく、Mps1 をリン酸化させた植物ワックス成分及び細胞壁ストレス処理によっても同様にリン酸化されていた。

これまでのいもち病菌シグナル伝達研究において、Pmk1 経路の活性化は Mps1 経路の活性化を抑えるということ (拮抗関係) が示唆されていたが (Zhao *et al.*, 2005, Plant Cell), 今回 Mps1 と Pmk1 が同時にリン酸化されることが観察されたことから、両 MAP キナーゼ経路の間に拮抗関係は成立していないということが明らかとなった。

Mps1 MAP kinase pathway and Pmk1 MAP kinase pathway in *Magnaporthe grisea* are not in an antagonistic relationship.

Takashi Fujikawa^{1,2}, Keietsu Abe³, Marie Nishimura¹ (1NIAS, 2current address: NARO NIFS, 3Tohoku Univ., Grad. Sch. of Agri.)

P-77

イネいもち病菌における体細胞相同組換えの検出とその特色

荒添貴之, 大里修一, 有江力*, 倉橋良雄, 米山勝美 (明大農・*農工大農)

植物病原菌であるイネいもち病菌は品種間において病原性が異なる多数のレースが存在しており, これらレースの出現には非病原性遺伝子の変異等の関与が知られている。本研究では, 遺伝的変異機構の一つとして考えられる体細胞相同組換えに着目し, その検出と特色付けを目的とした。

体細胞相同組換えの検出のために EYFP 遺伝子とブラストサイジン S デアミナーゼ遺伝子を融合した EYFP::BSD 遺伝子をもとに, 2つの非発現型の相同組換え検出マーカー(pTG, pRS)を構築した。両検出マーカー遺伝子をいもち病菌に共導入した株を用いて, YFP 蛍光およびブラストサイジン S 耐性能を指標に体細胞相同組換えの検出およびその効率を算出することに成功した。共導入株では一次代謝阻害, 熱ストレス, DNA 損傷, 拮抗菌などの様々なストレス条件下において高い相同組換え効率の向上がみられた。一方, 二次代謝ストレス, ストレプトマイシンなどでは, 相同組換えはほとんど見られなかった。さらに, 酸化ストレス存在下や付着器誘導プレート上, 幼植物体に対する接種試験においても相同組換えの検出および効率の向上が認められたことから, 本菌自身が産生する活性酸素や植物の抵抗性反応により相同組換えが誘導されていることが考えられた。組換え後のマーカー遺伝子領域の解析から, 発現型配列の他に混合型配列も存在していることから, 遺伝的多様性が生じていることが確認できた。また複数の共導入株間において, ブラストサイジン S 含有プレート上での体細胞相同組換え反応速度に差異が見出されたことから, 本菌においてストレスを受けてから相同組換えが生じるまでの速度がマーカー遺伝子のゲノム内コピー数や挿入位置と関連性があることが考えられた。

Characterization of somatic homologous recombination in Rice blast fungus

Takayuki Arazoe, Shuichi Ohsato, Yoshio Kurahashi, Tsutomu Arie* and Katsuyoshi Yoneyama

(Sch. Agric., Meiji Univ.; *Grad. Sch. Agric. Sci., Tokyo Univ. of Agric. & Tech.)

P-78

Yeast Two Hybrid assayによるイネいもち病菌の非病原性遺伝子 AVR-Pia のタンパク質相互作用の解析

佐藤 佑樹¹, 三木 慎介¹, 尾瀬 農之², 奥山 雄大³, 神崎 洋之³, 寺内 良平³, 曾根 輝雄¹ (¹北大院農・応生科, ²北大院薬・創薬, ³岩手生工研)

イネいもち病菌の非病原性遺伝子 AVR-Pia とイネの真性抵抗性遺伝子 Pia (RGA4, RGA5) について, それらの遺伝子産物の間に相互作用があるのか, Matchmaker Gold Two Hybrid system (Clontech)を用いて解析を試みた。AVR-Pia, RGA4 および RGA5 を Bait または Prey タンパク質として発現する Yeast Two Hybrid 系を作成し, 4つのレポーター遺伝子の発現によりタンパク質間相互作用の有無を調べた。その結果, N 末端推定分泌シグナルを欠く AVR-Pia をそれぞれ Bait, Prey として発現する菌株間の接合でレポーター遺伝子の発現が見られ, AVR-Pia タンパク質同士の相互作用が示唆された。一方, AVR-Pia, RGA4, RGA5 の間の相互作用は確認することが出来なかった。また, C 末端 12 アミノ酸欠失型および, 66 番目のシステインをグリシンに置換した 1 アミノ酸置換型の改変 AVR-Pia を発現する系を作成し, 同様に相互作用の有無を調べた。その結果, 改変 AVR-Pia の相互作用は野生型に比べ相対的に弱くなることが分かった。一方, これらの改変 AVR-Pia を発現するいもち病菌は Pia をもつイネに対し病原性を示した。このことから, 改変 AVR-Pia は非病原性遺伝子産物としての機能を失っていることが示された。以上のことから, AVR-Pia の多量体形成がイネの Pia による抵抗性の誘導に関与している可能性が示唆された。

Protein interaction analysis of AVR-Pia derived from Magnaporthe oryzae by Yeast Two Hybrid assay

Yuki Sato¹, Shinsuke Miki¹, Toyoyuki Ose², Yudai Okuyama³, Hiroyuki Kanzaki³, Ryouhei Terauchi³, Teruo Sone¹

(¹ Graduate school of Agriculture, and ² Research faculty of Pharmacology, Hokkaido Univ., ³ Iwate Biotechnology Research Center.)

P-79

イネいもち病菌の非病原性遺伝子 *AVR-Pia* の変異機構の解明

三木慎介, 竹内紗央里, 大塚圭輔, 曾根輝雄 (北大院農・応生科)

AVR-Pia はイネ品種愛知旭の抵抗性遺伝子 *Pia* に対応するいもち病菌が持つ非病原性遺伝子で, 日本産菌株 Ina168 株からその宿主特異性変異株 Ina168m95-1 株 (*avr-pia*) を用いてクローニングされた。*AVR-Pia* は全長 255 bp, そのうち 19 アミノ酸がシグナルペプチドであると考えられている。

AVR-Pia の内部 1 箇所と外側で切断する制限酵素 *EcoRI* を用い, Ina168 株の *AVR-Pia* 遺伝子のコピー数を調べたところ, 3 コピー保有することが分かった。また PFGE 法により Ina168 株の染色体 DNA を分離し, サザン解析を行ったところ, 3 コピーは同一染色体上に存在することが明らかとなった。また一方で Ina168m95-1 株は全ての *AVR-Pia* 遺伝子を欠損しており, そのため何らかの変異機構が存在したと考えられる。

そこで, *AVR-Pia* 遺伝子欠損変異機構の解明を目指し, Ina168 株由来の *AVR-Pia* 領域を含むコスミドクローンの塩基配列情報を基に, Ina168m95-1 株との違いを調べた。その結果, Ina168m95-1 株では, DNA 型トランスポゾン *Occan* の 5' 末端側近接領域において Ina168 株と 100% の相同性を保持していたが, 一方 3 コピーの *AVR-Pia* を含む 3' 末端側近接領域を大きく欠損していることが分かった。続いて, Ina168m95-1 株の DNA を用い, 5' 末端側近接領域内において inverse PCR を行い, *AVR-Pia* 欠損に関わった両端を含む領域のクローニングを行った。その領域の塩基配列を解析したところ, *Occan* 全長が含まれており, また *Occan* の 3' 末端側近接領域は Ina168 株の DNA にも保存されていた。以上により, 2 つの *Occan* の間で相同組み換えが起こり, その間に存在する 3 つの *AVR-Pia* が欠失した, と示唆された。

Analysis of the deleted region in *AVR-Pia* mutant, Ina168m95-1

Shinsuke Miki, Saori Takeuchi, Keisuke Otsuka and Teruo Sone

(Graduate School of Agriculture, Hokkaido Univ.)

P-80

Cryphonectria parasitica RAS3 の変異導入による機能解析

高橋 拓也, 笠原 紳 (宮城大・食産業・環境)

Ras スーパーファミリーに属する低分子量 GTP 結合タンパク質をクリ胴枯病菌 *Cryphonectria parasitica* 中に見出した。RAS3 と命名された本タンパク質は, 同菌においてすでに確認されている RAS1 および RAS2 とは, アミノ酸のレベルでそれぞれ 40% および 43% の相同性を有していた。本タンパク質は, 他の Ras 関連タンパク質にほぼ共通して認められる C 末端領域のファルネシル化部位 (CAAX Box) を欠くことが大きな特徴であり, その点において動物の Rin および Rit1 との共通性が認められた。本タンパク質は, C 末端ファルネシル化部位を欠失しているにもかかわらず, RAS3-GFP 融合タンパク質による局在性試験においては, 菌糸の隔壁や分枝点, 出芽細胞の先端部の細胞膜で強い蛍光が認められた。また, 本タンパク質の遺伝子 *ras3* を破壊してコロニー形態, 菌糸成長における影響を検討し, *ras1* および *ras2* 遺伝子破壊株とも比較しながら, *C. parasitica* における RAS の全体的な調節機構を推定した。さらに, *gpd-1* プロモーターによる *ras3* の過剰発現実験を行い, 形態や病原性への影響を調べた。また, ファルネシル化される可能性がある Cys 残基, GTPase 活性に必要とされるアミノ酸残基に変異を加え, 細胞形態等への影響を検討した。

Mutational analyses of *Cryphonectria parasitica* RAS3

Takuya Takahashi and Shin Kasahara

(Dept. of Environmental Sciences, Miyagi Univ. School of Food, Agricultural and Environmental Sciences)

P-81

灰色かび病菌における *Sec4* 遺伝子の機能解析

木村駿一, 泉津弘佑, 齋藤禎一, 小林甫, 森田篤, 田中千尋 (京大・微生物環境制御学分野)

灰色かび病菌は 200 種を超える広範な宿主範囲を持ち、園芸作物生産に甚大な被害をもたらしている重要植物病原菌である。植物病原菌ゲノム情報の比較解析から、我々は、本菌が多種の細胞壁分解酵素遺伝子を有することを見いだした。また、本病防除に用いられている非殺菌性殺菌剤“メバニピリム”は高い防除効果を有し、その作用機構はタンパク質分泌阻害であると考えられている。したがって、本菌の病原性においては、細胞壁分解酵素ならびにその分泌が重要な役割を担っているものと思われる。しかし、現在まで本菌のタンパク質分泌について詳細な研究は行われていない。そこで、我々は酵母菌等においてタンパク質分泌、特にトランスゴルジ網-細胞膜間の小胞輸送に大きく関与していることが知られている、Rab small GTPase の一種である *Sec4* 遺伝子に着目し、本遺伝子の灰色かび病菌の病原性における機能解明を目指した。まず、灰色かび病菌より PCR 法を用いて *Sec4* 遺伝子と相同性の高い遺伝子 *BcSec4* をクローニングし、*BcSec4* 遺伝子破壊ベクターを構築した。さらに、相同組換え法を用いて野生型株の遺伝子破壊を行った結果、2 菌株の遺伝子破壊株を得た。これらの遺伝子破壊株は、野生型株に比べ、成長が著しく遅く、コロニーの形態異常、分生子数の減少が観察された。また、通常野生型株においては菌核形成が誘導される低温条件下においても、ほとんど菌核の形成が観察されなかった。さらに、灰色かび病菌の宿主植物であるトマト葉に対して菌叢ディスク接種を行ったところ、野生型株に比べ病斑形成能力の著しい低下が観察された。以上の結果より、*BcSec4* 遺伝子は灰色かび病菌において、生育や菌核形成や胞子形成などの形態形成、病原性に大きく関与していることが示唆された。

Characterization of *BcSec4* gene in *Botrytis cinerea*

Syunichi Kimura, Kosuke Izumitsu, Yoshimoto Saitoh, Hajime Kobayashi, Atsushi Morita, Chihiro Tanaka

(Grad. School of Agriculture, Kyoto Univ.)

P-82

メロンつる割病菌から作出した病原性遺伝子変異株の生物防除活性

神田紘輝^{1,2}, 緒方綾³, 寺見文宏¹, 柘植尚志³, 飯田祐一郎¹ (野菜茶研¹・近畿大農²・名大院生命農³)

Fusarium oxysporum 病害では、非病原性の *F. oxysporum* 菌株を各種作物に前接種することによって病害発生を抑制できること、すなわち非病原性菌株が生物防除活性を有することが見出されている。しかしながら、すべての非病原性菌株が生物防除活性を示すわけではなく、有効な菌株の生理学的、遺伝学的特徴についてはほとんど明らかにされていない。本研究では、生物防除に有効な非病原性株を作出するための遺伝学的情報の提供を最終目的として、*F. oxysporum* 病原菌の 7 個の病原性遺伝子 (*FGAI*, *FGBI*, *FMK1*, *GAS1*, *FRP1*, *FOW2*, *FoPCK1*) について、メロンつる割病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *melonis*) から変異株を作出し、それらのつる割病に対する生物防除活性を検定した。各遺伝子の変異株は、メロンに対する病原性が著しく低下、または病原性を失うことを確認した。各種濃度 (10^6 , 10^7 , 10^8 細胞/ml) に調整した変異株の bud cell 懸濁液を本葉が 1 枚展開したメロン苗に浸根接種した後、汚染土壌 (野生株の bud cell を 10^5 細胞/g の濃度で添加) で 3 週間栽培し、継時的に発病程度を観察した。*FGAI*, *FGBI*, *GAS1*, *FRP1* または *FoPCK1* の変異株を前接種した苗では、変異株無接種苗とほぼ同様に萎凋・枯死が引き起こされ、これら変異株の前接種では防除効果がないことが明らかとなった。一方、Zn(II)2Cys6 タイプの転写制御因子をコードする *FOW2* または MAP キナーゼをコードする *FMK1* の変異株を前接種した苗では、変異株の bud cell 濃度が高いほど顕著に発病が抑制され、これら変異株、特に *FOW2* 変異株が高い生物防除活性を持つことが明らかとなった。以上の結果は、同じ菌株由来の非病原性変異株でも、変異遺伝子によって生物防除活性が異なることを示した。

Biocontrol activity of pathogenicity mutants of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*

Hiroki Kanda^{1,2}, Aya Ogata³, Fumihiko Terami¹, Takashi Tsuge³, Yuichiro Iida¹

(¹Nat. Inst. Veg. Tea Sci, ²Fac. Agric., Kinki Univ., ³Grad. Sch. Bioagric. Sci., Nagoya Univ.)

P-83

トマトアルターナリア茎枯病菌のドラフトシーケンス解析により見出された G タンパク質共役型受容体遺伝子

高尾和実, 赤木靖典, 柘植尚志¹, 尾谷 浩, 児玉基一朗 (鳥取大・農, ¹名大院・生農)

細胞膜に局在する G タンパク質共役型受容体 (GPCR) は, 7 回膜貫通型構造を有し, 受容体における最大のファミリーを構成している。糸状菌においても, *Aspergillus* 属菌や *Neurospora crassa*, また植物病原糸状菌である *Magnaporthe grisea* などから GPCR 候補遺伝子が数多く同定されている。一方, それら遺伝子の機能, 病理学的役割などについては不明な点が多い。本研究では, 植物病原菌であるトマトアルターナリア茎枯病菌 (*Alternaria alternata* tomato pathotype, 茎枯病菌) の全ゲノムドラフトシーケンス解析を行い, GPCR 候補遺伝子 3 種 (*AaGPR1-3*) を見出した。これら GPCR 遺伝子は, 7 回膜貫通型構造を有し, *A. fumigatus* Car4 遺伝子 (*AaGPR1*) や *A. flavus* GprD 遺伝子 (*AaGPR2, 3*) などと相同性を示した。*AaGPR1, 2* および *3* 全てのノックアウト株を作出し, 現在, これら遺伝子の機能解析を進めている。

G-protein-coupled receptor genes determined by draft sequencing of the genome of the *Alternaria alternata* tomato pathotype.

Kazumi Takao, Yasunori Akagi, Takashi Tsuge, Hiroshi Otani, Motoichiro Kodama

(Fac. Agric., Tottori Univ., ¹Grad. Sch. Bioagric. Sci., Nagoya Univ.)

P-84

近紫外線照射が数種植物病原糸状菌のメラニン生合成遺伝子の発現に及ぼす影響

池島裕輔, 上野誠, 荒瀬栄, 木原淳一 (島根大・生物資源)

イネごま葉枯病菌 (*Bipolaris oryzae*) のメラニン生合成遺伝子や光回復酵素遺伝子の発現が近紫外線 (波長 300 - 400 nm) 照射によって増加することが明らかになっている。このような近紫外線照射によるメラニン生合成遺伝子の発現量の増加が, 他の植物病原糸状菌でも認められるか否かを明らかにするため, 本研究では, イネごま葉枯病菌に加え, イネいもち病菌 (*Magnaporthe oryzae*), ウリ類炭疽病菌 (*Colletotrichum orbiculare*), 及び, キュウリ褐斑病菌 (*Corynespora cassiicola*) を用いて解析を行った。はじめに, メラニン生合成遺伝子が報告されていなかったキュウリ褐斑病菌から, Sytalone dehydratase 遺伝子と 1,3,8-trihydroxynaphthalene reductase 遺伝子をクローニングした。4 種類の植物病原糸状菌において, 各 2 種類のメラニン生合成遺伝子に対する特異的プライマーをそれぞれ作成し, Real-time PCR による発現解析を行なった。その結果, 暗黒下と比較した場合, 近紫外線照射によって, すべての植物病原糸状菌において 2 種類のメラニン生合成遺伝子の発現量が約 5-10 倍に増加した。また, メラニン生合成遺伝子の発現量の増加の程度は近紫外線の照射時間に比例した。以上の結果から, イネごま葉枯病菌以外にも, 近紫外線によるメラニン生合成遺伝子の発現制御機構が存在することが示唆された。今後, メラニン生合成遺伝子の発現に及ぼす近紫外線以外の可視光の影響を調査するとともに, メラニン含量の定量解析を行う予定である。

Effect of near-ultraviolet irradiation on expression of melanin biosynthesis genes in several phytopathogenic fungi

Yusuke Ikeshima, Makoto Ueno, Sakae Arase, Junichi Kihara

(Fac. Life Env. Sci., Shimane Univ.)

P-85

米麴プロテオーム解析結果に基づく *Aspergillus oryzae* 遺伝子の網羅的機能解析

北村洋朗^{1,2}, 福原真一郎^{1,2}, 花田照明^{1,2}, 河野美乃里², 山田修², 岩下和裕² (1: 広島大・先端研 2: 酒総研)

【目的】製麴に用いる麴菌株の決定は、清酒の風味を左右する要因の一つになると考えられている。しかし、麴菌が産生する物質の機能については、一部の加水分解酵素を除き、大半が明らかとなっていない。これまでに我々は、普通麴及び吟醸麴についてのプロテオーム解析を行い、高生産されている麴菌タンパク質をコードする 159 遺伝子を同定してきた。本研究においては、それらの遺伝子を網羅的に破壊し、形質を観察する事で、該当遺伝子の機能を明らかにしていく。

【方法及び結果】同定された 159 遺伝子のアノテーションより機能分類を行った結果、38 遺伝子が機能既知遺伝子 (identity \geq 80 %)、50 遺伝子が機能推定可能遺伝子 (80 % > identity \geq 50 %)、71 遺伝子が機能未知遺伝子 (50 % > identity) となった。次いで、各カテゴリーから合計 55 遺伝子を選出し、アデニン合成関連遺伝子 (*adeA*) をマーカーとした破壊カセットを作製した。作製したカセットを宿主である *A. oryzae* NSR-11D2 株 (*niaD*⁻, *sC*⁻, *adeA*⁻, *ligD*⁻) へ導入し、PCR により破壊が確認された株について、液体、及びプレート培養における形質観察を行った結果、分生子形成率や、生育速度などにおいて形態異常を起こした株が確認された。また、アノテーション結果より Hsp88、及び Cofilin と相同性を示した遺伝子についての破壊株は、いずれの培養形態においても著しい生育阻害が確認され、機能未知の遺伝子の破壊株についても生育阻害が確認された。現在は、これらの破壊株について製麴を行い形質の検討を行うと共に、新たに 70 遺伝子について遺伝子破壊を行っている。新たに破壊を行っている遺伝子についても同様に破壊株のプレート、及び液体培養における遺伝子破壊株の形質変化について観察を行っていく予定である。

Comprehensive function analysis of *Aspergillus oryzae* genes based on a result of proteome analysis of Rice-koji

Hiroaki Kitamura^{1,2}, Shinichiro Fukuhara^{1,2}, Teruaki Hanada^{1,2}, Minoru Kohno², Osamu Yamada², Kazuhiro Iwashita² (1: Hiroshima Univ. 2: NRIB)

代表発表者索引

C

Cristiane A. Uchima-----67

H

Hsiang-Ting Huang-----53

K

Ken Oda-----34

M

Michelle Momany-----14

S

Sharon Marie Garrido-----71

Y

尹 載宇-----36

あ

赤木靖典-----38

荒添貴之-----77

安斎洋帝-----57

安藤晃規-----42

安藤友貴-----49

い

池島裕輔-----80

石神陽平-----39

石黒真希-----37

石田博樹-----32

泉津弘佑-----38

伊藤 岳-----43

お

太田一良-----46

大野真尚-----65

大場 歩-----72

岡崎文美-----66

小笠原博信-----45

岡本綾子-----60

小川 順-----26

か

加座健士郎-----42

柏木 豊-----64

片山琢也-----49

上村曜介-----33, 74

亀井誠之-----30, 48

神田紘輝-----79

き

菊間隆志-----51

北村洋朗-----81

木下 浩-----75

木村駿一-----79

く

工藤佳那子-----31, 59

國武絵美-----69

こ

小池英明-----36

小西宏和-----69

小町裕司-----50

さ

齋須秀昭-----73

酒井香奈江-----50

佐々木智江美-----54

佐藤宏樹-----47

佐藤佑樹-----77

佐野元昭-----70

そ

曾根輝雄-----37

た

高尾和実-----80

高橋拓也-----78

高橋 司-----58

高橋正和-----57

多田功生-----70

田中瑞己-----29, 48

田中良男-----62

田邊弘毅-----30, 58

つ

對崎真楠-----52

塚越 光-----68

て

手島沙織-----71

と

富川史子-----43

な

中沢威人-----40

中嶋康之-----20

中野浩幸-----54

に

新田美貴子-----31, 59

ね

根本 崇-----47

の

野田知嗣 -----41
 野田真奈美 -----73
 野村孝典 -----44

は

橋元 誠 -----34
 波田野未由来 -----76
 服部領太 -----62
 馬場祐太郎 -----60
 原 精一 -----35
 坂東弘樹 -----45

ひ

樋口裕次郎 -----55
 久田博元 -----66
 日野資弘 -----22

ふ

藤井達也 -----40
 藤川貴史 -----76
 藤村友明 -----44
 二神泰基 -----51

ほ

本田裕樹 -----39

ま

前田隼見 -----53
 前田 浩 -----63
 松井 真 -----67
 松尾賢人 -----55
 松下（森田）真由美 -----61
 丸井淳一郎 -----61

み

三木慎介 -----78
 宮井希実 -----74
 宮崎安将 -----29

む

村垣公英 -----64

も

本山高幸 -----75
 森田寛人 -----63

や

安田（吉野）庄子 -----41
 矢萩大貴 -----56
 矢部秀和 -----56
 山川 結 -----65
 山川陽平 -----32, 68
 山下和宏 -----72
 山下秀行 -----18
 山田裕史 -----46
 山本 綽 -----16

ゆ

雪 真弘 -----33

よ

吉見 啓 -----35

わ

渡邊 彰 -----52

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) 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. 本会の事務年度は研究会の開催準備開始から「次期」研究会の開催準備開始直前までとする。
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。

糸状菌分子生物学研究会運営委員会名簿（2010年度）

会 長

五味 勝也 東北大学大学院農学研究科

運営委員

阿部敬悦（会計担当） 東北大学大学院 農学研究科
有江 力（会計担当） 東京農工大学大学院 農学研究院
有岡 学 東京大学大学院 農学生命科学研究科
尾関 健二 金沢工業大学 ゲノム生物工学研究所
加藤 雅士（編集担当） 名城大学 農学部
川口 剛司（広報担当） 大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科
鮫島 正浩 東京大学大学院 農学生命科学研究科
高木 忍 ノボザイムズジャパン株式会社 研究開発部
西村麻里江 独立行政法人 農業生物資源研究所
秦 洋二 月桂冠株式会社 総合研究所
堀内 裕之（庶務担当） 東京大学大学院 農学生命科学研究科
山田 修 独立行政法人 酒類総合研究所