

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	12
シンポジウム講演要旨	15
一般講演要旨	26
ポスター発表講演要旨	39
代表発表者索引	86
糸状菌分子生物学研究会会則	88
糸状菌分子生物学研究会運営委員名簿	89
山上会館 MAP	90

第 11 回糸状菌分子生物学コンファレンスプログラム

日時：2011年11月16日(水)-17日(木)

会場：東京大学 弥生講堂

一条ホール／アネックス

(東京都文京区弥生 1-1-1)

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16日(水)

- | | |
|---------------|---------------------|
| 11:00 - | 受付開始 |
| 11:55 - 12:00 | 開会の辞 |
| 12:00 - 15:00 | 口頭発表 (O - 1~15) |
| 15:00 - 15:10 | 休憩 |
| 15:10 - 16:40 | ポスター発表 (奇数番号) |
| 16:45 - 17:45 | 特別講演 |
| 17:45 - 18:00 | 総会 |
| 18:30 - | 懇親会 (山上会館 1階 談話ホール) |

11月17日(木)

- | | |
|-------------|--|
| 9:25-12:00 | シンポジウム (S-1~S-5)
「糸状菌・キノコの形態形成の意義とその分子機構」 |
| 12:00-13:00 | 昼食 |
| 13:00-14:30 | ポスター発表 (偶数番号) |
| 14:30-16:42 | 口頭発表 (O-16~26) |
| 16:42-17:00 | 休憩 |
| 17:00-17:30 | 表彰式並びに閉会の辞 |

発表演題および講演時間

特別講演 11月16日(水) 16:45 - 17:45

「酵母から見えて来たオートファジーの分子機構とその生理機能」

東京工業大学 統合研究院 フロンティア研究機構 大隅良典

シンポジウム 11月17日(木) 9:25 - 12:00

「糸状菌・キノコの形態形成の意義とその分子機構」

9:25- 9:30

オーガナイザー代表挨拶

堀内裕之 東京大学大学院農学生命科学研究科

9:30-10:00

S-1 「糸状菌に学ぶ多細胞生物の生存戦略」

–隔壁孔を介した細胞間連絡の分子メカニズム–

東京大学大学院農学生命科学研究科 丸山潤一

10:00-10:30

S-2 「遺伝子の網羅的破壊法を利用した麴菌の形態形成制御系の解析」

(財)野田産業科学研究所 小川真弘、金 鋒杰、小山泰二

10:30-11:00

S-3 「ウリ類炭疽病菌の侵入器官の形態形成と病原性」

京都府立大学大学院生命環境科学研究科 久保康之

11:00-11:30

S-4 「重力が影響を及ぼすキノコのかたちづくり」

–遺伝子発現の宇宙環境シミュレーション–

(独)森林総合研究所 きのこ・微生物研究領域 宮崎安将

11:30-12:00

S-5 「真正担子菌ウシグソヒトヨタケにおける

多細胞形態形成の分子機構」

岡山大学大学院自然科学研科 鎌田 堯

一般講演 (O-1~O-15) 11月16日(水) 12:00 - 15:00

- 12:00 O-1 麹菌 *A. oryzae* の MAP キナーゼ AoFus3 と相互作用する新規タンパク質の機能解析
矢萩大貴, 丸山潤一, Özgür Bayram¹, Oliver Valerius¹, Gerhard H. Braus¹, 北本勝ひこ
(東大院・農生科・応生工, ¹ゲッティンゲン大学)
- 12:12 O-2 *Aspergillus nidulans* の NO 耐性に関わるシトクロム P450 の機能とその役割
志水元亨, 鳴神寿昭, 上村曜介, 榊尾俊介, 北爪達也, 寺林靖宜, 町田桃子, 高谷直樹
(筑波大院・生命環境)
- 12:24 O-3 *Aspergillus nidulans* における高温条件下でのプロテインキナーゼ C によるアポトーシス誘導抑制機構の解析
片山琢也, 堀内裕之, 太田明德 (東大院・農生科・応生工)
- 12:36 O-4 糸状菌 *Aspergillus nidulans* における α -1,3-グルカン合成酵素遺伝子 *agsB* 破壊株および *agsA*, *agsB* 二重破壊株の機能解析
稲葉梓¹, 吉見啓², 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)
- 12:48 O-5 分泌型ラッカーゼ (Lcc1) RNAi 抑制株におけるシイタケ細胞壁構造の変化
中出啓子, 坂本裕一 (岩手生工研)
- 13:00 O-6 牧草共生糸状菌 *Epichloë festucae* の低分子量 G タンパク質 Cdc42 及び RacA の機能分化に関する研究
榎野友香, 竹本大吾 (名大院・生命農学)
- 13:12 O-7 菌類におけるヒストン遺伝子内イントロンの進化
西田洋巳, 尹 忠銖 (東大院・農学生命科学研究科)
- 13:24 O-8 麹菌 *A. oryzae* の菌核形成促進因子 ScIR の過剰発現株を用いた菌糸融合能の解析
和田龍太, 金 鋒傑¹, 小山泰二¹, 丸山潤一, 北本勝ひこ
(東大院・農生科・応生工, ¹野田産研)
- 13:36 O-9 麹菌における HECT ユビキチンリガーゼ (*hulA*) 条件的発現株の作成
田中瑞己, 新谷尚弘, 五味勝也 (東北大院農・生物産業創成)
- 13:48 O-10 麹菌転写因子 XlnR の誘導物質依存的リン酸化とその生理学的意義
石川周平, 野口祐司, 金丸京子, 加藤雅士¹, 小林哲夫
(名大院・生命農, ¹名城大・農)
- 14:00 O-11 *Trichoderma reesei* のセルラーゼ生産に関与するシグナル伝達関連タンパク質の探索
日下秀行, 古川隆紀, 深谷英嗣, 志田洋介, 小笠原 渉 (長岡技科大・生物)
- 14:12 O-12 稲いもち病菌 *Magnaporthe grisea* における植物ディフェンシンの作用メカニズム解析
小黒芳史, 山崎晴丈, 梨本正之, 高木正道, 高久洋暁 (新潟薬大・応生科)
- 14:24 O-13 イネいもち病菌弱毒化マイコウイルス MoCV1 の性状解析及びウイルスタンパク質の機能解析
太田智子, 浦山俊一, 福原敏行, 有江力, 寺岡徹, 森山裕充 (東京農工大院・農)
- 14:36 O-14 ウリ類炭疽病菌の病原性に必須である分泌タンパク質遺伝子 *LAC2* の同定及び機能解析
林 紹仔, 奥田枝穂, 奥野哲郎, 高野義孝 (京大院・農)
- 14:48 O-15 *Cryphonectria parasitica* RAS3 タンパク質の生化学・生理学的性質
山内優輝, 高橋拓也, 笠原紳 (宮城大・食産業・環境)

一般講演 (O-16~O-26) 11月17日(木) 14:30 - 16:42

- 14:30 O-16 *A. oryzae* からの不活性型二次代謝クラスター活性化と生合成産物の構造解析
中沢威人, 石内勘一郎, 渡辺賢二 (静岡県大・薬)
- 14:42 O-17 スクロースは *Fusarium asiaticum* のトリコテセン系毒素産生を誘導する
川上 颯、*中島 隆、平八重一之 (独法九沖農研・*食品安全委員会)
- 14:54 O-18 *laeA* 異種発現による *Cordyceps militaris* の二次代謝活性化
木下 浩¹, Rina Rachmawati¹, 井原史雄², 仁平卓也¹
(¹阪大・生物学国際交流セ, ²農研機構・果樹研)
- 15:06 O-19 遺伝子多重破壊による *Aspergillus oryzae* の Hydrophobin 群の機能解析
山川 結, 水野佑香, 中島春紫 (明治大・農・農化)
- 15:18 O-20 水晶振動子マイクロバランス (QCM) による界面活性蛋白質 RoIA と固体表面間の相互作用解
田邊弘毅¹, 大類景子¹, 上原健二¹, 高橋徹^{2,3}, 富樫貴成⁴, 有田稔彦⁴, 阿部敬悦^{1,3}
(¹東北大院・生物産業創成, ²酒類研・基盤, ³東北大・未来研, ⁴東北大・多元研)
- 15:30 O-21 糸状菌 *Trichoderma reesei* のセルラーゼ高生産変異株の形態学的解析
志田洋介¹, 新田美貴子¹, 大隅正子², 小笠原 渉¹
(¹長岡技科大・生物, ²総合画像研究支援)
- 15:42 O-22 *Aspergillus nidulans* の形質転換時に非相同断片を添加することによるターゲティングの効率化
伊藤靖夫¹, 金綾奈² (信州大・¹全学教育機構, ²理学部 現: 東大院・先端生命)
- 15:54 O-23 糸状菌における遺伝子機能解析のための分子生物学的ツールの開発
原島俊明, 西村麻里江 (生物研)
- 16:06 O-24 実用麹菌株のゲノム進化と各醸造産業への適応
伊藤 岳^{1,2}, 妹尾悠平^{1,2}, 澤村恒子², 徳岡昌文², 磯谷敦子², 山田 修², 岩下和裕^{1,2}
(¹ 広島大院・先端研, ² 酒総研)
- 16:18 O-25 マイタケをモデルとしたキノコ生育機構解明へのゲノミクスアプローチ
倉橋敦¹, 佐藤真之^{1,2,3}, 西堀耕三¹, 藤森文啓^{2,3}
(¹雪国まいたけ, ²ハイファジェネシス, ³東京家政大)
- 16:30 O-26 地衣類の共生菌のゲノム解析
原光二郎, 佐藤ひかり, 小峰正史, 山本好和 (秋田県大・生物資源)

ポスター発表

11月16日(水) 15:10 - 16:40 (奇数番号)

11月17日(木) 13:00 - 14:30 (偶数番号)

- P-1** *Aspergillus awamori* の *ligD* 遺伝子破壊による高頻度相同組み換え宿主の開発
高橋徹¹, 水谷治¹, 白石洋平², 山田修¹ (1 酒総研, 2 ビオック)
- P-2** Cre-loxP システムを用いた麹菌における多重遺伝子導入システムの開発
江原直樹, 水谷治*, 新谷尚弘, 五味勝也 (東北大院農・*酒総研)
- P-3** 稲わらの酵素糖化性を促進する白色腐朽菌ハタケチャダイゴケにおける遺伝子導入系構築
山岸賢治¹, 木村俊之¹, 渡辺隆司² (1 農研機構・東北農研, 2 京大・生存研)
- P-4** 糸状菌 *Coleophoma empetri* F-11899 における 2 種の次世代シーケンサーを用いたゲノムアセンブル配列の比較
中谷和也, 山田雅人, 織野陽介, 磯貝泰弘, 橋本正治 (富山県大・生物工)
- P-5** 糸状菌トランスクリプトーム配列データを用いたゲノムアノテーション
(東大院・農生科) 五十嵐圭日子, 堀 千明, 鮫島正浩, (ジナリス) 上村泰央, 竹田 綾
- P-6** 抗菌活性を有する亜熱帯性微生物のゲノム科学的解析
戸田智美, 小山芳典, 梅村舞子, 小池英明, 町田雅之
(産業技術総合研究所・生物プロセス)
- P-7** 白麹菌 *Aspergillus kawachii* IFO 4308 株のゲノム解析
二神泰基¹, 森一樹¹, 山下彩夏¹, 和田正太郎², 梶原康博², 高下秀春², 大森俊郎², 竹川薫¹, 田代康介¹, 久原哲¹, 後藤正利¹ (1 九大院・農, 2 三和酒類)
- P-8** SOLiD3 による麹菌の RNA-seq と麹菌比較ゲノムデータベースの更新
岩下和裕¹, 島原明子¹, 上村泰央², 山田 修¹ (1 酒総研, 2 株式会社ジナリス)
- P-9** ラクダ由来一本鎖抗体可変部位 V_{HH} の麹菌 *Aspergillus oryzae* による分泌生産
青木淳一¹, 田淵聡一郎¹, 岡崎文美², 荻野千秋¹, 田中 勉², 久田博元³, 秦 洋二³, 近藤 昭彦¹
(1 神戸大院・工・応化, 2 神戸大・先端融合研究環, 3 月桂冠・総研)
- P-10** 麹菌 *A. oryzae* におけるオートファジー制御による異種タンパク質生産性の向上
菊間隆志¹, 尹 載宇², 丸山潤一¹, 北本勝ひこ¹ (1 東大院・農生科, 2 啓明大学校・薬)
- P-11** 麹菌 *A. oryzae* 由来キシラナーゼの網羅的クローニングと発現生産
久田博元¹, 波部悦子¹, 塩田和功¹, 坂東弘樹¹, 堤浩子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・応用生命)
- P-12** クエン酸生産糸状菌 *Aspergillus niger* における oxaloacetate hydrolase 遺伝子(*oahA*)の破壊と高発現によるシュウ酸生産経路の検証
小林慶一, 本田裕樹, 服部貴澄, 桐村光太郎 (早大・理工・応化)
- P-13** デンプン質除去小麦フスマを用いた麹菌発酵での可溶化に関する研究
鈴木晃¹, 和田真人¹, 中村司¹, 佐野元昭¹, 尾関健二¹, 大箸信一¹, 金子明裕²
(1 金沢工大・ゲノム研, 2 日清ファルマ)
- P-14** 液体培地で高生産する麹菌機能未知タンパク質 (25kDa) 遺伝子の解析と利用
石崎浩章, 栗倉泰輔, 手取屋桃子, 佐野元昭, 尾関健二, 大箸信一 (金沢工大・ゲノム研)

- P-15** 実用麹菌株のゲノム進化と各醸造産業への適応
伊藤 岳^{1,2}, 妹尾悠平^{1,2}, 澤村恒子², 徳岡昌文², 磯谷敦子²,
山田 修², 岩下和裕^{1,2} (1 広島大院・先端研, 2 酒総研)
- P-16** 糸状菌類で広く保存された機能未知遺伝子の麹菌での解析
富川史子², 井丸 直¹, 寺戸志保¹, 池田優理子², 後藤正利, 岩下和裕^{1,2}
(¹広島大院・先端研, ²酒総研, ³九大院農)
- P-17** 米麹高生産タンパク質遺伝子破壊株の醸造上の特性について
花田照明^{1,2}, 福原真一郎^{1,2}, 下本順子², 河野美乃里², 岩下和裕^{1,2}, 山田修²
(¹広島大院・先端研, ²酒総研)
- P-18** ヘム合成酵素 porphobilinogen deaminase は *Aspergillus nidulans* を nitrosative stress から保護する
周勝敏, 鳴神寿昭, 行木弥鈴, 上村曜介, 星野貴行, 高谷直樹 (筑波大院・生命環境)
- P-19** 欠失変異体を用いた麹菌 AoSO タンパク質のストレス応答性凝集機構の解析
佐伯 圭, Cristopher Sarazar ESCAÑO, 丸山潤一, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)
- P-20** *Aspergillus nidulans* における *ypdA* 遺伝子発現制御株の解析
緑川裕良¹, 萩原大祐^{2,3}, 吉見啓², 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(現)千葉大・真菌医)
- P-21** 糸状菌 *Aspergillus nidulans* のヒスチジンキナーゼ PhkA, PhkB の機能解析
佐古知美, 山崎ゆかり, 金丸京子, 加藤雅士¹, 小林哲夫 (名大院・生命農, 名城大・農¹)
- P-22** 麹菌 *A. oryzae* の MAP キナーゼ AoFus3 と相互作用する新規タンパク質の機能解析
矢萩大貴, 丸山潤一, Özgür Bayram¹, Oliver Valerius¹, Gerhard H. Braus¹, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工, ¹ゲッティンゲン大学)
- P-23** 病原真菌 *Aspergillus fumigatus* における浸透圧応答経路の機能解析
萩原大祐, 五ノ井透, 川本進 (千葉大・真菌センター)
- P-24** *Neurospora crassa* の MAK-1 及び MAK-2 MAP キナーゼの破壊株の表現型と局在解析
亀井誠之, 高橋正和, 一石昭彦, 藤村真 (東洋大院・生命科学)
- P-25** *Aspergillus nidulans* における高温条件下でのプロテインキナーゼ C によるアポトーシス誘導抑制機構の解析
片山琢也, 堀内裕之, 太田明德 (東大院・農生科・応生工)
- P-26** 麹菌 *Aspergillus oryzae* における微小管形成中心関連タンパク質 AoApsB の機能解析
川畑絢平, 矢萩大貴, 丸山潤一, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)
- P-27** 麹菌 *A. oryzae* の持つ細胞質型ホスホリパーゼ A₂ 様タンパク質 AoPlaA の機能解析
駒井紀之, 小谷昌平, 北本勝ひこ, 有岡 学 (東大院・農生科・応生工)
- P-28** 麹菌 *A. oryzae* における Ca²⁺非依存性ホスホリパーゼ A₂ 様タンパク質 iPlaA の機能解析
小橋口聡, 北本勝ひこ, 有岡 学 (東大院・農生化・応生工)
- P-29** 麹菌 *A. oryzae* におけるエンドサイトーシス関連因子 AipC, AipD の局在および機能解析
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-30** 麴菌マルトースパーミアーゼの各種炭素源による細胞内局在変化
平本哲也, 大門口涼子, 田中瑞己, 新谷尚弘, 五味勝也
(東北大院・農・生物産業創成)
- P-31** 糸状菌 *Aspergillus nidulans* における α -1,3-グルカン合成酵素遺伝子 *agsB* 破壊株
および *agsA*, *agsB* 二重破壊株の機能解析
稲葉梓¹, 吉見啓², 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)
- P-32** *Aspergillus nidulans* のキチン合成酵素 CsmA の菌糸内局在化におけるキネシンの役割
對崎真楠, 堀内裕之, 太田明德 (東大院・農生科・応生工)
- P-33** 糸状菌 *Aspergillus nidulans* における *Saccharomyces cerevisiae* CRH オルソログの機能解析
磯村幸治, 對崎真楠, 堀内裕之, 太田明德 (東京大・農・生化工)
- P-34** 糸状菌 *Aspergillus nidulans* における出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* SKT5
オルソログ AN3445 の機能解析
星 浩臣, 對崎真楠, 堀内裕之, 太田明德 (東大院・農生科・応生工)
- P-35** 麴菌 *A. oryzae* における選択的オートファジー関連遺伝子 *Aoatg11* の解析
田所隆之, 菊間隆志, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)
- P-36** *Magnaporthe oryzae* の分化様式とオートファジー機構による物質代謝の関連性
井上加奈子^{1,3}, 目黒紘子¹, 兼松聡子^{2,3}, 朴杓允^{1,3}, 池田健一^{1,3}
(神戸大院¹・果樹研²・生研センター³)
- P-37** 担子菌ウシグソヒトヨタケにおけるオートファジー関連タンパク質 CcAtg8 の解析
渡邊 彰, 弥生貴裕, 吉村昌徳, 麻田恭彦 (香川大・農・応生科)
- P-38** 担子菌 *Coprinopsis cinerea* のタンパク質分泌へのミオシンの関与
橋本広祐¹, 横田悦雄², 新免輝男², 吉田誠¹ (¹東京農工大・農, ²兵庫県大・生命理)
- P-39** 担子菌ウシグソヒトヨタケの傘成長に関わる遺伝子 *cag1* の解析
村口 元, 煙山和樹 (秋田県立大・生物資源)
- P-40** 牧草共生糸状菌 *Epichloë festucae* の低分子量 G タンパク質 Cdc42 及び RacA の
機能分化に関する研究
榎野友香, 竹本大吾 (名大院・生命農学)
- P-41** 味噌用低ホスファターゼ麴菌の米麴, 豆麴におけるホスファターゼ遺伝子発現
丸井淳一郎¹, 多田功生¹, 福岡真里¹, 鈴木 聡¹, 服部領太¹, 和久 豊², 白石洋平²,
北本則行³, 杉本達哉⁴, 楠本憲一¹
(¹農研機構・食総研, ²ビオック, ³愛知産技研・食工技セ, ⁴ナカモ)
- P-42** 味噌用麴菌 *A. oryzae* KBN630 株における酸性ホスファターゼ (Aph) 遺伝子群の破壊
安田 (吉野) 庄子, 長谷川撰, 小野奈津子, 伊賀佳美¹, 白石洋平¹, 和久 豊¹, 杉本達哉²,
楠本憲一³, 北本則行
(愛知産技研・食工技セ, ¹株ビオック, ²ナカモ株, ³食総研)
- P-43** 遺伝子多重破壊による *Aspergillus oryzae* の Hydrophobin 群の機能解析
山川 結, 水野佑香, 中島春紫 (明治大・農・農化)
- P-44** 水晶振動子マイクロバランス (QCM) による界面活性蛋白質 RolA と
固体表面間の相互作用解
田邊弘毅¹, 大類景子¹, 上原健二¹, 高橋徹^{2,3}, 富樫貴成⁴, 有田稔彦⁴, 阿部敬悦^{1,3}
(¹東北大院・生物産業創成, ²酒類研・基盤, ³東北大・未来研, ⁴東北大・多元研)

- P-45** エノキタケ由来の hydrophobin (Fv-hyd3) 融合タンパク質の生産
吉田真澄¹、藤田将幸¹、西川良平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-46** 黄麹菌 KexA の機能解析
冨田沙耶子、森田寛人、前田浩、竹内道雄、山形洋平 (東農工大院・応生科)
- P-47** 麹菌 serine-type carboxypeptidase の *Aspergillus nidulans* における高発現株の検討
佐野和紀、森田寛人、前田浩、山形洋平、竹内道雄 (東農工大・応生化)
- P-48** 麹菌由来新規 β -グルコシダーゼに特徴的な基質特異性
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-49** 組換え麹菌生産セルラーゼを用いた広葉樹クラフトパルプの酵素糖化
吉栄俊秀¹、酒井翔司¹、岡崎文美²、萩野千秋¹、田中 勉²、久田博元³、萩原伸哉⁴、
秦 洋二³、近藤昭彦¹
(¹神戸大院・工・応化、²神戸大・先端融合研究環、³月桂冠・総研、⁴日本紙パルプ研究所)
- P-50** 担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* がアンモニア処理木材の分解時に生産する酵素の
セクレトーム解析
櫻木 潔¹、堀 千明¹、林 礼子²、三橋秀一²、五十嵐圭日子¹、鮫島正浩¹
(¹東大院農生科、²バイオエタノール革新技术研究組合)
- P-51** 糖質代謝関連酵素遺伝子を利用した木材腐朽菌の系統分類
和田朋子、五十嵐圭日子、鮫島正浩 (東大院・農生科)
- P-52** 麹菌 *A. oryzae* の菌核形成促進因子 ScIR の過剰発現株を用いた菌糸融合能の解析
和田龍太、金 鋒傑¹、小山泰二¹、丸山潤一、北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工、¹野田産研)
- P-53** *Aspergillus nidulans* の NmrA と AreB によるメナジオン耐性化機構の解明
伊藤英里子、榊尾俊介、志水元亨、高谷直樹 (筑波大学・生命環境)
- P-54** *Aspergillus oryzae* のストレス条件下での生育調節に関わる転写因子の解析
黒田明典、高谷直樹 (筑波大院・生命環境)
- P-55** ペレニアライグラス共生菌 *Epichloë festucae* の ProA が結合するプロモーター配列の
同定
田中愛子¹、Sanjay Saikia²、Gemma Cartwright²、竹本大吾¹、加藤雅士³、柘植尚志¹、Barry
Scott² (¹名大院・生農、²Massey Univ., ³名城大・農)
- P-56** *Aspergillus nidulans* AmyR の誘導物質依存的な分解に関する解析
大崎陽央、森本翔太、金丸京子、加藤雅士、小林哲夫 (名大院・生命農学)
- P-57** *Aspergillus aculeatus ace1* 欠損株における糖質加水分解酵素の生産と
塩ストレス応答の解析
山崎愛弥、小西宏和、谷修治、炭谷順一、川口剛司 (大阪府立大・生環科)
- P-58** *Aspergillus aculeatus* Zn(II)₂Cys₆型転写因子 CGAF はセルロース性基質に
応答してセルラーゼ・ヘミセルラーゼ遺伝子発現を活性化する
國武絵美、谷修治、炭谷順一、川口剛司 (阪府大院・生環科)
- P-59** 糸状菌におけるセルラーゼ生産制御機構
青山未来、金丸京子、小林哲夫 (名大院生命農・生物機構)
- P-60** 麹菌転写因子 XlnR の誘導物質依存的リン酸化とその生理学的意義
石川周平、野口祐司、金丸京子、加藤雅士¹、小林哲夫 (名大院・生命農、¹名城大・農)

- P-61** *Trichoderma reesei* のセルラーゼ生産に関与するシグナル伝達関連タンパク質の探索
日下秀行, 古川隆紀, 深谷英嗣, 志田洋介, 小笠原 渉 (長岡技科大・生物)
- P-62** 糸状菌 *Trichoderma reesei* における新規誘導発現機構の探索
佐藤春菜, 雪真弘, 小笠原渉 (長岡技科大・生物)
- P-63** *Trichoderma reesei* の比較ゲノム解析に基づく新規転写因子 ClbR の機能解析
新田美貴子^{1,2}, 山口香織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-64** 麹菌プロテアーゼ AOEXE103 のオルタナティブスプライシング
久保島恵, 森田寛人, 前田 浩, 岡本綾子, 山形洋平, 竹内道雄
(東京農工大院・農・応生化)
- P-65** 麹菌セリントイプカルボキシペプチダーゼ遺伝子群の網羅的発現解析
阿保春花, 森田寛人, 岡本綾子, 前田浩, 山形洋平, 竹内道雄 (東農工大院・応生化)
- P-66** 薬剤排出 ABC トランスポーターを制御する転写因子 AtrR と相互作用する因子の探索
大場 歩, 田中瑞己, 新谷尚弘, 五味勝也 (東北大院農・生物産業創成)
- P-67** *A. nidulans* の AmyR はグルコース存在下のステリグマトシチンの生合成を抑制する
上村曜介, 鳴神寿昭, 志水元亨, 榊尾俊介, 高谷直樹 (筑波大院・生命環境)
- P-68** 麹菌におけるコウジ酸生産遺伝子の解析
佐野元昭, 堂本光子, 小池英明¹, 大島栄治², 立花國治², 比嘉良喬², 町田雅之¹, 大箸信一
(金沢工大,¹産総研,²三省製薬)
- P-69** *Aspergillus niger* NRRL 328 由来 III 型ポリケタイド合成酵素による
ピロン化合物の生成
濱地達也, 宮井希実, 小林慶一, 本田裕樹, 桐村光太郎 (早大・理工・応化)
- P-70** 麹菌 *A. oryzae* 由来タイプ III ポリケタイド合成酵素遺伝子 *csyB* の機能解析
石田理美¹, 橋元 誠¹, 勢ノ康代¹, 北本勝ひこ², 藤井 勲¹
(¹岩手医科大・薬,²東大院・農生科・応生工)
- P-71** Pyripyropene 生合成に関わる Pyr1 の構造機能解析
下川良彦, 森田洋行, 阿部郁朗 (東大院薬)
- P-72** 糸状菌由来メロテルペノイド terretonin 生合成遺伝子の機能解析
松田侑大¹, 伊藤崇敬¹, 徳永欽也¹, 藤井勲², 久城哲夫¹, 海老塚豊¹, 阿部郁朗¹
(¹東大院・薬, ²岩手医大・薬)
- P-73** 2-アザアントラキノン生合成酵素の同定と機能解析
加治拓哉, 淡川孝義, 阿部郁朗 (東大院・薬)
- P-74** 分子内 peroxide 架橋形成を触媒する Verruculogen 合成酵素 FtmF
加藤直樹¹, 奥村英夫², 高橋俊二¹, 長田裕之¹
(¹理研基幹研・ケミカルバイオロジー, ²高輝度光科学研究センター)
- P-75** ルシラクタエン生合成遺伝子クラスターの解析
田中彰^{1,2}, 本山高幸¹, 林敏明¹, 廣田洋¹, 安藤直子², 長田裕之¹
(¹理研・ケミカルバイオロジー, ²東洋大・工)
- P-76** 糸状菌 *Coleophoma empetri* F-11899 の FR901379 非生産変異株の T-DNA 挿入
変異箇所解析
境井千佳子, 山田雅人, 織野陽介, 磯貝泰弘, 橋本正治 (富山県大・生物工)

- P-77** 真菌におけるロキシスロマイシンの新規作用点の探索
石井 晶, 熊坂 茉佑, 小泉 優希, 各務 佑哉, 鎌倉 高志 (東理大院理工・応生科)
- P-78** イネいもち病菌のキチンデアセチラーゼ相同タンパク遺伝子 *CBP1,CBL1* の機能解析
吉田翔, 大野優子, 中嶋佑一, 鎌倉高志 (東理大・応生科)
- P-79** イネいもち病菌の発芽管発現遺伝子ライブラリークローン B51 の遺伝子破壊体解析
佐々木健悟, 小泉優希, 各務佑哉, 清田司, 鎌倉高志
- P-80** イネいもち病菌におけるイネ抵抗性誘導因子生産遺伝子の探索
坂口歩・原島俊明・西村麻里江 (生物研)
- P-81** イネいもち病菌における人為的 DNA 二本鎖切断誘導と相同組換え修復
荒添貴之, 大里修一, *有江力, 米山勝美, 桑田茂 (明治大農・*農工大農)
- P-82** イネいもち病菌に感染するマイコウイルス MoCV2 と MoCV1 の生化学的な比較解析
東浦智也, 浦山俊一, 福原敏行, 有江力, 寺岡徹, 森山裕充 (農工大院・農学府)
- P-83** イネいもち病菌弱毒化マイコウイルス MoCV1 の性状解析及びウイルスタンパク質の機能解析
太田智子, 浦山俊一, 福原敏行, 有江力, 寺岡徹, 森山裕充 (東京農工大院・農)
- P-84** イネいもち病菌を弱毒化するマイコウイルス MoCV3 (*Magnaporthe oryzae* chrysovirus 3) の性状解析
迫田紘史・浦山俊一・高井遼子・福原敏行・有江 力・寺岡 徹・森山裕充 (農工大院・農学府)
- P-85** 稲いもち病菌 *Magnaporthe grisea* における植物ディフェンシンの作用メカニズム解析
小黒芳史, 山崎晴丈, 梨本正之, 高木正道, 高久洋暁 (新潟薬大・応生科)
- P-86** イネごま葉枯病菌の分生孢子形成を促進する糸状菌 *Phomopsis* sp. (*Diaporthe* sp.)
大西雄介, 上野誠, 荒瀬榮, 木原淳一 (島根大・生資)
- P-87** トウモロコシごま葉枯病菌 (*Cochliobolus heterostrophus*) の NADPH Oxidase 遺伝子群の機能解析
泉津弘佑*, 齋藤禎一, 住田卓也, 森田篤, 田中千尋 (京大・院・農, *現 滋賀県大・学振特別研究員)
- P-88** トウモロコシごま葉枯病菌における *Cdc42* 遺伝子の機能解析
住田卓也, 泉津弘佑, 森田篤, 田中千尋 (京大・院・農)
- P-89** ウリ類炭疽病菌が分泌するエフェクタータンパク質 NIS1 の機能解析
入枝泰樹, 吉野香絵, 晝間敬, 奥野哲郎, 高野義孝 (京大・院・農)
- P-90** ウリ類炭疽病菌の病原性に必須である分泌タンパク質遺伝子 *LAC2* の同定及び機能解析
林 紹仔, 奥田枝穂, 奥野哲郎, 高野義孝 (京大院・農)
- P-91** *Cryphonectria parasitica* RAS3 タンパク質の生化学・生理学的性質
山内優輝, 高橋拓也, 笠原紳 (宮城大・食産業・環境)
- P-92** ナシ黒斑病菌の感染器官における活性酸素種生成複合体の機能解析
森田雄一, 玄康洙, 森川響子, 池田健一, 朴杓允 (神戸大・農学研究科)
- P-93** 麴菌 *A. oryzae* における AoSO と Stress Granule の共局在解析
黄 湘婷, 丸山 潤一, 北本 勝ひこ (東大院・農生科・応生工)

特別講演

酵母から見えて来たオートファジーの分子機構とその生理機能

大隅 良典

(東京工業大学フロンティア研究機構)

初めに

生命活動は絶え間ないタンパク質の合成と分解のバランスによって支えられている。近年分解が様々な機能の制御に重要な役割を担うことが明らかになってきた。オートファジーはリソソーム/液胞での自己構成成分の分解機構であり、真核生物に広く保存された機構である。現在様々な生物でオートファジーの機能解析が進み、病態との関連など最もホットな研究領域の1つになっている。

1. 酵母のオートファジー発見と Atg の機能単位

酵母のオートファジーを顕微鏡下に発見してから 23 年間、一貫してその分子機構の解明を目指して研究を進めて来た。酵母の系の特性は、オートファジックボディの蓄積としてオートファジーの進行を光学顕微鏡下に実時間で追うことができる点にある (図 1)。解析に当たって、第 1 に電顕によるオートファジーの過程の微細形態が明確に示されたことと、第 2 は遺伝学的手法の導入により、最初のスクリーニングで効率よくオートファジー不能変異 (*atg*) が得られたことが重要であった。飢餓下の生存率の低下という形質が、選別に適していたことと、これらの遺伝子に重複がなかったことも幸いした。遺伝学的解析が最も進んでいる酵母にあって、全く未同定の一群の遺伝子が一挙に同定されたことの意味は大きい。これらの変異をもとに *ATG* 群のクローニングを開始したが、当初は全て新規の遺伝子であり、容易にそれらの機能を推定することができなかった。基礎生物学研究所に異動し、ほぼクローニングが完了に近づいた時期に、それらの機能単位が一気に明らかとなった。即ち *Atg1* タンパク質キナーゼ、*PI3* キナーゼ複合体、ユニークなユビキチン様タンパク質結合体、脂質結合体形成反応系、機能未知の複合体、複数回膜貫通タンパク質からなっている。

2. オートファゴソーム形成における Atg タンパク質の役割

オートファジーにおける最も重要な過程は、分解すべき細胞質成分やオルガネラを膜嚢で取り囲む、オートファゴソーム形成という特異な膜動態である。Atg タンパク質のその過程における機能を知るために、全 Atg タンパク質の細胞内局在の解析を進めた。その結果、全ての Atg タンパク質が一部局在する液胞近傍の通常 1 個のドット構造が見出され、オートファゴソーム形成の場として PAS を提唱した。それぞれの Atg タンパク質が PAS 形成にいかに関わるかを全ての各遺伝子の破壊が、他の Atg タンパク質の PAS 局在に対する影響を解析することにより、機能単位間のヒエラルヒーが明らかとなった。その後の解析からこれらの関係は、オートファゴソーム形成において機能単位が PAS に集積する時間的順序を表していることが明らかとなった (図 2)。

現時点での我々の PAS を巡る作業モデルは以下の通りである。細胞が飢餓シグナルを受けると TOR キナーゼによって、リン酸化されていた *Atg13* の脱リン酸化が進み、*Atg1* と複合体を形成する。飢餓誘導に特異的な必要とされる *Atg17*、*Atg29*、*Atg31* は安定な 2:2:2 の複合体として細胞質中に存在するが、飢餓によって PAS にリクルートされ、*Atg1-Atg13* との 5 者複合体を形成し、他の Atg タンパク質の足場として機能する。次いで *Atg9* が結合する。*Atg9* の大半は細胞質にゴルジ体に由来する直径 40-60nm の膜小胞とし

て存在する。飢餓に伴い少数の Atg9 小胞が PAS にリクルートされ、最終的に Atg9 はオートファゴソムの外膜に局在する。1つのオートファゴソム形成過程で多数の Atg9 小胞が出入りする様子が見られないことや最終的にも数個の小胞に由来する Atg9 がオートファゴソム膜に存在することから、Atg9 小胞は脂質の供給を担っているよりも、オートファゴソム形成の初期過程に関わっているらしい。最終的に2つの結合反応系が膜の伸長に関わる。それぞれの機能単位がどのような相互作用で PAS に局在するかは今後明らかにされるべき課題である。我々のスクリーニングは必須遺伝子を除外しており、今後これらのオートファジーへの関わりを解析することが重要になるものと思われる。いずれにしても PAS 及び隔離膜の中間構造体の単離とその実体の生化学的な解明が必須の状況となっている。

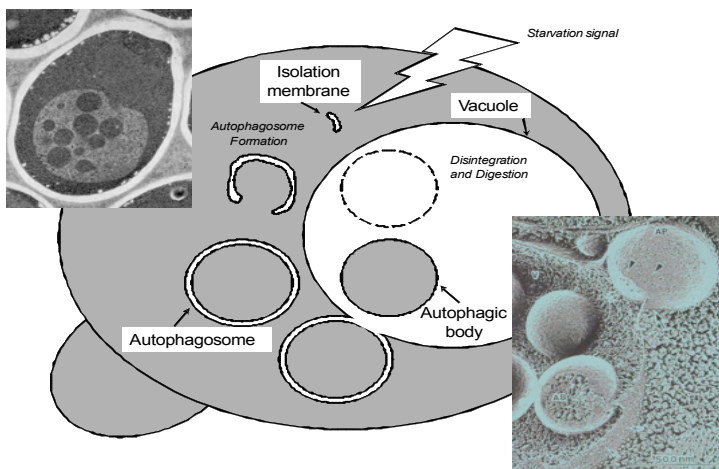


図.1 酵母の飢餓によって誘導されるオートファジーの模式図

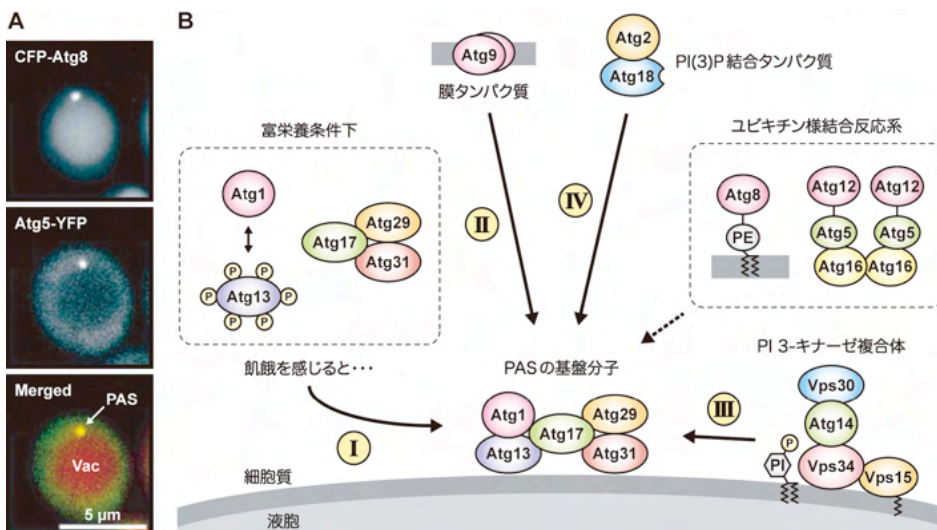


図.2 PAS への Atg タンパク質の時間的集積

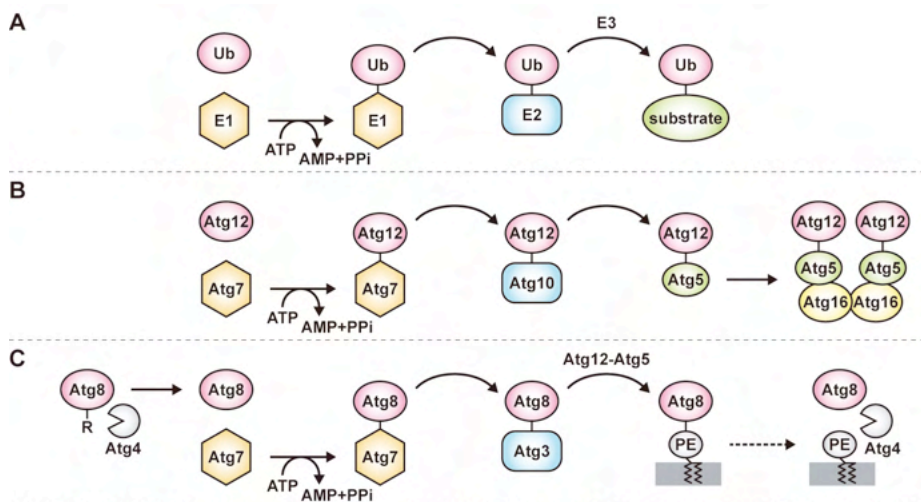


図.3 オートファジーに必須な2つのユビキチン様結合反応系

3. 酵母におけるオートファジーの機能

酵母におけるオートファジーの生理機能について考えてみたい。我々はこれまで主として栄養飢餓、とりわけ窒素源飢餓によって誘導されるオートファジーを解析して来た。最も顕著でしかも同調的にオートファジーが誘導されるからである。窒素源飢餓で誘導される非選択的でバルクな分解に関わるオートファジーは、生存率の維持に関わっている。これは飢餓下にアミノ酸レベルが低下して、翻訳活性が低下することにより、必要なタンパク質の合成ができないことによると推定された。最近、飢餓条件下で培地の pH が3以下に低下するが、これを緩衝すると *atg* 変異株でも生存率が維持されることが分った。しかし *atg* 変異株は呼吸機能不全を引き起こす。飢餓下に呼吸鎖成分や、スカベンジャーの合成が誘導されないために、活性酸素種 (ROS) が蓄積する結果、最終的には mtDNA を欠損した ρ^0 細胞を生じる。 ρ^0 細胞は酸性条件下でオートファジー活性の有無に関わらず死ぬ。オートファジーは呼吸能を維持に必須の機能を持っていることが明らかとなった。

合成培地で増殖する酵母は、増殖の最終段階でオートファジーを起こすことが、メタボライトの解析によって示され、増殖時にもオートファジーが起こることが分かった。非醗酵性の炭素源で増殖する酵母は増殖停止期にミトコンドリアの選択的な分解を引き起こすが、この過程に必須なミトコンドリアタンパク質として Atg32 が発見され、最近酵母のトランスポゾンである Ty のつくるウィルス様粒子が飢餓によって選択的に分解を受けることも見出された。選択性の分子機構についても議論を進める。研究の進展に大きな役割を担ってきた細胞内可視化技術、部分反応の *in vitro* 再構成、結晶構造解析、現在スタートしたメタボローム解析などにも言及したい。

Lessons from Yeast –dissection of molecular mechanism of autophagic machinery -
Yoshinori Ohsumi (Professor, Frontier Research Center, Tokyo Institute of Technology)

糸状菌に学ぶ多細胞生物の生存戦略 —隔壁孔を介した細胞間連絡の分子メカニズム—

丸山 潤一

(東京大学大学院 農学生命科学研究科)

麹菌 *Aspergillus oryzae* をはじめとする子囊菌門に属する糸状菌は、多数の細長い細胞が連なる“多細胞”の菌糸として生長する。隣接する細胞は隔壁で仕切られているが、隔壁孔と呼ばれる小さな穴を介して細胞間連絡を行っている。この細胞間連絡は、動物のギャップ結合 (gap junction)、植物の原形質連絡 (plasmodesmata) と共通した、多細胞真核生物にみられる興味深い特徴である。糸状菌の隔壁孔を介した細胞間連絡は、多細胞生物としての生育に重要な役割をもつと考えられるが、これに関する研究はあまり進んでいない。本講演では、演者らの *A. oryzae* を用いた研究で明らかになった、隔壁孔を介した細胞間連絡の分子メカニズムについて紹介したい。

溶菌時に隔壁孔をふさぐオルガネラ Woronin body

隔壁孔を介した細胞間連絡は、ある細胞が損傷すると隣接する細胞に溶菌が伝播する危険をもたらすシステムでもある。子囊菌門に属する糸状菌に特異的に存在するオルガネラ Woronin body は、通常隔壁近傍に存在し、菌糸損傷時には隔壁孔をふさぎ、隣接する細胞への溶菌の伝播を防ぐ働きを有する。

演者らは、寒天培地上の *A. oryzae* のコロニーに水を加えて低浸透圧ショックを与えることにより、菌糸先端が溶菌する現象を見出した¹⁾。溶菌した先端細胞に隣接する 2 番目の細胞には溶菌は伝播せず、細胞内容物が維持されていた。演者らは *A. oryzae* の Woronin body 形成に必要なタンパク質 AoHex1 を、蛍光タンパク質と融合して発現することで、Woronin body が隔壁孔をふさぐ様子を生きている細胞で初めて可視化した。そして、AoHex1 が低浸透圧ショック時に溶菌が伝播するのを防ぐのに必要であることを示した。この一連の実験により、低浸透圧ショック実験において溶菌の伝播を防ぐ機能を定量的に評価するシステムの構築に成功した。

ペルオキシソームは真核生物に普遍的に存在するオルガネラであり、脂肪酸の β 酸化などの機能をもつ。演者らは最近、ペルオキシソームがビオチンの生合成に関与することを世界で初めて明らかにした²⁾。AoHex1 タンパク質にはペルオキシソーム移行配列が存在することから、Woronin body がペルオキシソームの派生器官であることが示唆された。演者らは、ペルオキシソームの分裂・増殖に必要な AoPex11-1 が、Woronin body のペルオキシソームからの分化に関与することを明らかにした³⁾。

新しい隔壁孔局在タンパク質の発見とその機能

一方で、Woronin body 以外の細胞間連絡を制御する因子については、あまり解析が進んでいなかった。演者らは、麹菌において隔壁孔局在タンパク質を新たに見出した。そのなかで、AoSO はストレス条件になると隔壁孔に凝集すること、溶菌の伝播を防ぐ機能に関与することを明らかにした⁴⁾。このことから、AoSO がストレス依存的に細胞間連絡を制御する働きを有する可能性が示唆された。AoSO は 1195 アミノ酸からなる巨大なタンパク質であるが、WW ドメイン以外は既知のドメインが存在せず、現在、ストレス依存性の凝集と隔壁孔への特異的な凝集に必要な領域の絞り込みを行っている⁵⁾。

さらに演者らは、有性生殖に必要な MAPK 経路のキナーゼに相同性を示すタンパク質 AoFus3 が、隔壁孔の中心を囲うリング状の局在を示すことを見出した⁶⁾。また、遺伝子破壊株の表現型解析から、AoFus3 が溶菌の伝播を防ぐ機能を有することを明らかにした。この結果より、

MAPK 経路による隔壁孔での信号伝達が、細胞間連絡を制御している可能性が示された。隔壁孔において AoFus3 と同様の局在を示す微小管形成中心(microtubule-organizing center)関連タンパク質 AoApsB についても、溶菌の伝播を防ぐ機能を有することを明らかにした⁷⁾。

演者らは、AoFus3 と AoSO と相互作用するタンパク質をスクリーニングした結果、そのなかから新しい隔壁孔局在タンパク質を発見した⁸⁾。以上の知見から、隔壁孔は数々の細胞内因子を集積し、多細胞生物としての生育を支える重要な役割を担っている可能性が強く支持されている。今後は、隔壁孔局在タンパク質の機能を解析することで、細胞間連絡の制御システムの全貌を明らかにしていきたいと考えている。

参考文献

2. J. Maruyama *et al.* (2005) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Vol. 331, 1081-1088.
3. Y. Tanabe *et al.* (2011) *J. Biol. Chem.* Vol. 286, 30455-30461.
4. C. S. Escaño *et al.* (2009) *Eukaryot. Cell* Vol. 8, 296-305.
5. J. Maruyama *et al.* (2010) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Vol. 391, 868-873.
6. 佐伯ら 2011 年糸状菌分子生物学コンファレンス要旨集 p.48
7. 佐々木ら 2010 年糸状菌分子生物学コンファレンス要旨集 p. 54
8. 川畑ら 2011 年糸状菌分子生物学コンファレンス要旨集 p. 51
9. 矢萩ら 2011 年糸状菌分子生物学コンファレンス要旨集 p. 26

Molecular biological lessons about multicellular organization from septal-pore mediated intercellular communication in filamentous fungi

Jun-ichi MARUYAMA (Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo)

遺伝子の網羅的破壊法を利用した麹菌形態形成制御系の解析

小川 真弘、金 鋒杰、小山 泰二
(公益財団法人野田産業科学研究所)

麹菌 *Aspergillus oryzae* は、わが国の伝統的な食品産業に用いられてきた菌であるが、本菌の形態形成制御系の解析は、あまり進んでいない状況であった。その原因の一つとしては、本菌の遺伝子ターゲッティング効率が低く、遺伝子破壊による解析が行いにくかったことが挙げられる。そこで当研究所の高橋は、非相同組換えに関連する遺伝子である、*ku70* を破壊し、遺伝子ターゲッティング効率を飛躍的に上昇させた麹菌を開発した。そして我々は、この麹菌 *ku70* 破壊株を用い、麹菌転写制御因子遺伝子を網羅的に破壊したライブラリーの構築と麹菌 7 番染色体の最小化を試み、その過程において麹菌の形態形成に関与すると考えられる遺伝子の破壊株を複数得ることができた。本シンポジウムでは、これらの株の解析からわかってきた麹菌の形態形成制御系について発表する。

I. 麹菌分生子形成および菌糸伸長制御系の解析: 麹菌転写制御因子遺伝子破壊株ライブラリーから、近縁種である *A. nidulans* にて既に報告されている分生子形成制御系遺伝子の、麹菌でのオーソログの破壊株を取得した。また、転写制御因子ではないが、G-Protein を介したシグナル伝達に関与する *flbA* オーソログの破壊株と、*fadA* オーソログの変異株についても作製した。これら株について解析を行い、麹菌分生子形成制御系の基本経路の推定を行ったところ、麹菌の分生子形成制御系は全体的に *A. nidulans* と類似しているが、G-protein を解した菌糸伸長の制御系については麹菌 *A. oryzae* と *A. nidulans* とでは異なっていることが示唆された¹⁾。また本破壊株ライブラリーからは、新規の分生子形成制御因子が見出され、これらの中には、DNA 結合タンパク質や MED6 モチーフを有する RNA ポリメラーゼのメディエーターのほか、クロマチンリモデリングファクターをコードする遺伝子が含まれていた。

II. 大規模領域欠失により見出された新規転写制御因子の解析: これまで我々は、麹菌 7 番染色体を最小化させた株の作製を試みてきた。その作製過程において、helix-loop-helix モチーフを有する転写制御因子である AO090011000215 を破壊すると、親株よりも高密度で多数の分生子を形成することを発見した。さらに、本遺伝子を強制発現させた麹菌では、マルツ寒天培地上で分生子形成の抑制と、菌核の過剰形成が観測された。これらの結果から、本転写制御因子は麹菌の分生子や菌核の形成といった形態形成システムにおいて、非常に重要な働きをしていると考えられる²⁾。

1) Ogawa M., et al., *Fungal Genet. Biol.*, **47**: 10-18 (2010).

2) Jin F.J., et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**: 5943- 5951 (2009).

Analysis of regulatory systems for conidial and hyphal developments using comprehensive gene disruption methods in *Aspergillus oryzae*

Masahiro Ogawa, Feng Jie Jin, and Yasuji Koyama (Noda Institute for Scientific Research)

ウリ類炭疽病菌の侵入器官の形態形成と病原性

久保康之

(京都府立大学大学院 生命環境科学研究科 植物病理学研究室)

ウリ類炭疽病菌 (*Colletotrichum orbiculare*) はウリ科植物に炭疽病を起こす子囊菌である。本菌の胞子は発芽後、メラニン化を伴う形態的に発達した付着器を分化する。胞子は植物表層のシグナル受容の後、付着器を分化し侵入機能を獲得する。筆者らはシグナル受容から機能分化を伴う形態分化の分子遺伝学的解析を進めてきた。これまで、メラニン合成、ペルオキシゾーム機能、細胞極性制御、細胞壁合成制御が付着器の宿主への侵入機能として必須の要因であることを示してきた(2,3,6,7,8)。一方、本菌のゲノム解析を進め、ゲノムサイズが子囊菌の平均的なゲノムサイズに比して格段に大きく、また、染色体の細胞観察により、染色体に存在する顕著なヘテロクロマチン領域がゲノムサイズの拡大に寄与していることが推定された。本講演では細胞極性とペルオキシゾームの侵入器官の分化における機能およびゲノム解析について紹介し、今後の研究を展望する。

1) ウリ類炭疽病菌の Kelch モチーフタンパク質と侵入器官分化

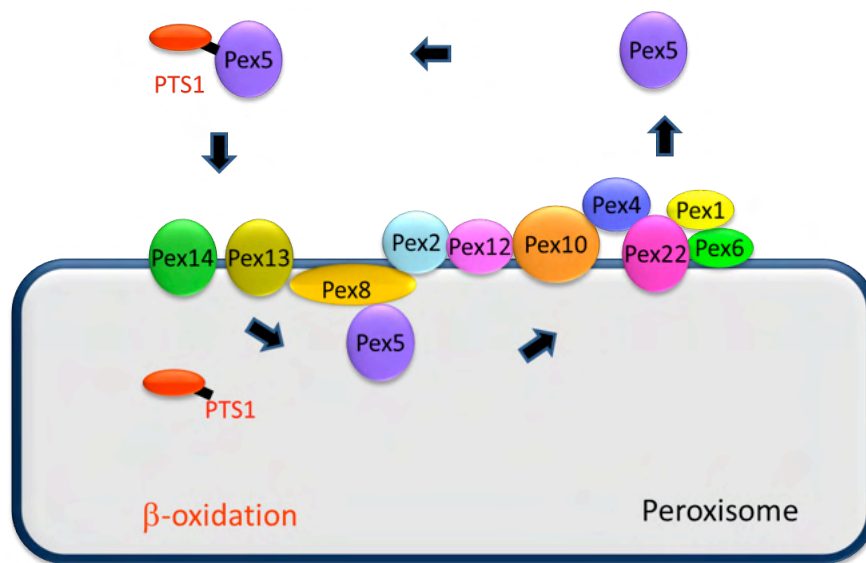
本菌の病原性欠損変異株の変異遺伝子の解析から Kelch モチーフをもつ遺伝子 (*CoKEL1*, *CoKEL2*) が付着器の正常な形態分化に必須であることが示された(4,5)。*CoKEL1* は細胞周期依存的に微小管に局在し、遺伝子欠損株は異常形態の付着器を形成し、病原性を欠く。*CoKEL2* は分裂酵母の *TEA1* 遺伝子のホモログ遺伝子であり、分裂酵母と同様に微小管依存的に細胞の極性成長部位に局在する。この変異株はスライドガラスなどの非植物性の人工基質上では異常形態の付着器を形成する。しかしながら、植物上では正常な形態の付着器を形成し、正常な侵入能と病原性を示す。このことから、極性成長には *CoKEL2* が関与するものの、植物体上ではこの経路を必須としない極性決定機構がある可能性が示唆された。

2) ウリ類炭疽病菌のペルオキシゾーム機能と侵入器官分化

出芽酵母においてペルオキシシン機能の統合的な解析が進められている。本菌の病原性欠損変異株の変異遺伝子解析からペルオキシゾーム機能が付着器の正常な分化と病原性に必須であることが示された(1)。*PEX13* はペルオキシゾーム局在シグナルを有するタンパク質の受容体タンパク質 *PEX5* のドッキングタンパク質であり、ペルオキシゾーム局在タンパク質の取り込みに関与する。*pex13* 変異株はペルオキシゾーム機能欠損により、脂肪酸代謝能に異常を生じる。また、付着器はメラニン化を欠き、侵入能を失う。メラニン合成の初期過程は acetyl-CoA を出発物質とするポリケチド合成系である。acetyl-CoA は付着器形成過程においてペルオキシゾームにおける脂肪酸の β -酸化機能により供給されると考えられ、ペルオキシゾーム機能欠損がメラニン合成欠損をもたらしていることを示した。また、付着器におけるグリセロール蓄積の低下から侵入に必要な膨圧形成に異常をきたし、このことが、メラニン合成欠損に加え侵入能の低下の要因であることを明らかにした。

また、脂肪酸代謝欠損を示し、病原性を欠く変異株の欠損遺伝子が *PEX5* 受容体のリサイクリングに関与する *PEX22* の機能オルソログ遺伝子であり、ペルオキシゾーム機能と付着器分化に関与することを明らかにした。また、特筆すべきことは、この *PEX22* タンパク質がペルオキシゾームに局在するばかりではなく、子囊菌に特徴的な細胞小器官である Woronin Body(WB)に局在を示すことを明らかにした。これまで、WB への局在性が示されたペルオキシシンは報告事例がなく、ペルオキシゾーム機能と WB の関係を示す新たな

な発見と考えている。また、炭疽病菌における *pex22* 欠損株の付着器形成異常と病原性欠損形質は *pex13* 変異株と同等であった。



ペルオキシソーム機能

3) ウリ類炭疽病菌のゲノム解析

ウリ類炭疽病菌 104-T (MAFF240422) 系統のドラフトゲノム解析を行った。本菌のゲノムサイズは約 91Mb を示し、子囊菌の報告事例としてはムギ類うどんこ病菌 (*Blumeria graminis*) に次ぐ、大きなゲノムサイズを示した。ウリ類炭疽病菌の同属の *C. graminicola* および *C. higginsianum* のゲノムサイズはそれぞれ約 57Mb、53Mb であり、本菌のゲノムの特異性が示唆された。また、染色体の細胞学的観察から本菌の染色体において AT 配列に富むヘテロクロマチン領域が各染色体の相当部分を占めることが明らかになった。一方、*B. graminis* においても AT 配列に富む反復配列がゲノムの 64% を占め、それがゲノムサイズの拡大につながっていると報告されており、こうしたゲノムインフレーションが類似の現象である可能性が示唆された。

謝辞

ウリ類炭疽病菌のゲノム解析は多賀正節博士（岡山大学）、高野義孝博士（京都大学）、白須賢博士（理研）、鳴坂義弘博士（岡山生物科学総合研究所）による共同研究である。

引用文献

- 1) Fujihara, N., Sakaguchi, A., Tanaka, S., Fujii, S., Tsuji, G., Shiraishi, T., O'Connell, R., and Kubo Y. (2010) Peroxisome biogenesis factor PEX13 is required for appressorium-mediated plant infection by the anthracnose fungus, *Colletotrichum orbiculare*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 23: 436-445.
- 2) Kubo, Y. (2011) Appressorium function in *Colletotrichum orbiculare* and prospect for genome based analysis. in *Morphogenesis and Pathogenicity in Fungi Series: Topics in Current Genetics*, vol. 22 Pérez-Martín, José; Di Pietro, Antonio (Eds.), Springer. (in press)
- 3) Kubo, Y., and Tanaka, S. (2010) Pathogenesis and plant basal resistance in *Colletotrichum orbiculare* and *Magnaporthe oryzae* infection. In *Genome-Enabled Integration of Research in*

Plant Pathogen Systems. (Wolpert, T., Shiraishi, T., Allen, C., Glazebrook, J. and Akimitsu, K. eds), APS Press.

- 4) Sakaguchi, A. Miyaji, T. Tsuji G. and Kubo Y. (2008) Kelch-repeat protein Clakel2p and calcium signaling control appressorium development in *Colletotrichum lagenarium*. Eukaryot. Cell 7:102-111.
- 5) Sakaguchi, A., Miyaji, T., Tsuji, G., and Kubo, Y. (2010) A Kelch repeat protein Cokel1p associates with microtubules and is involved in appressorium development in *Colletotrichum orbiculare*. Mol. Plant-Microbe Interact. 23: 103-111.
- 6) Sakaguchi, A., Tsuji, G., and Kubo, Y. (2010) A yeast *STE11* homologue *CoMEKK1* is essential for pathogenesis-related morphogenesis in *Colletotrichum orbiculare*. Mol. Plant-Microbe Interacti. 23:1563-1572.
- 7) Tanaka, S., Ishihama, N., Yoshioka, H., Huser, A., O'Connell, R., Tsuji, G., Tsuge, S., and Kubo Y. (2009) The *Colletotrichum orbiculare* *ssd1* mutant enhances *Nicotiana benthamiana* basal resistance by activating a mitogen-activated protein kinase pathway. Plant Cell 21:2517-2526.
- 8) Tanaka, S., Yamada, K., Yabumoto, K., Fujii, S., Huser, A., Tsuji, G., Koga, H., Dohi, K., Mori, M., Shiraishi, T., O'Connell R., and Kubo, Y. (2007) *Saccharomyces cerevisiae* *SSD1* orthologues are essential for host infection by the ascomycete plant pathogens *Colletotrichum lagenarium* and *Magnaporthe grisea*. Mol.Microbiol. 64: 1332–1349.

Infection structure development and pathogenesis of *Colletotrichum orbiculare*

Yasuyuki Kubo (Lab. Plant Pathol. Grad. Sch. Life and Environment. Sci., Kyoto Prefectural University)

重力が影響を及ぼすキノコのかたちづくり

-遺伝子発現の宇宙環境シミュレーション-

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^{2,3}

(¹森林総研・きのこ・微生物、²JAXA・宇宙研、³現・帝京大医・医真菌)

生物の形態を決定する因子を同定するためには、形態変化を伴う変異体を用いた遺伝学的手法が有効である。しかし、キノコには変異株のコレクションが少ないことに加え、遺伝子組替えの効率が悪いためその遺伝学的解析は困難を極める。

キノコが示す子実体形成は非常にドラマティックな組織分化であり、微生物としては見かけ上最も分かりやすい形態変化の一つである。キノコの子実体はその形成過程において、植物などと同様に顕著な重力屈性（重力に逆らうこと）を示し、「柄」を鉛直方向に、「傘」を地上面と並行に保とうとする。孢子形成・有性生殖にも影響するこれらの性質は100年以上も前から菌類学者により観察されているものの、はっきりとした生理学的意義は未だ導き出されていない。1970年代後半には実際の宇宙空間、衛星軌道上におけるキノコの子実体形成実験が行われ、子実体形成の開始に重力が関与する結果が得られている。

1. 子実体形成の宇宙環境シミュレーション

キノコの子実体形成期における重力屈性のメカニズムを分子レベルで解析するため、地上で宇宙環境（擬似微小重力環境）をシミュレートすることの出来る機器「3D（三次元）-クリノスタット」（図1）を用い、宇宙環境想定下における担子菌ヒラタケの子実体の発生を試みることにした。3D-クリノスタットとは、X-Y軸が独立に回転し、実験試料への単一重力の影響を無効化する実験装置である。宇宙環境下で起こりうるであろう生物学的挙動を地上にいながらして観察出来るため、特に宇宙生物学の分野において、宇宙での検証を行う前の予備実験などに良く利用される宇宙環境シミュレーターである。また、キノコの中からヒラタケを選択した理由は、①生育が速い、②子実体の形成が容易、③回転に耐える強い柄と傘を持つ、④孢子飛散が比較的少ない、⑤食用である、⑥木材腐朽菌である、等の長所からである。特に④～⑥については後で詳述する。

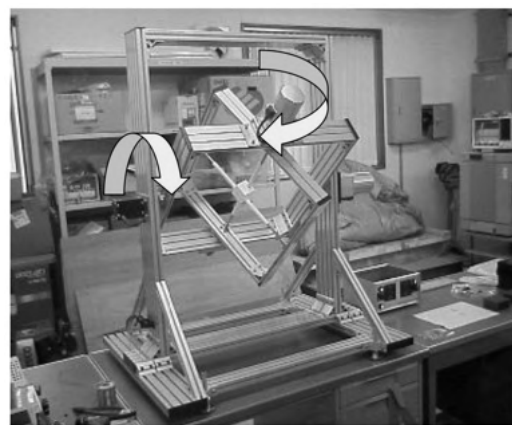


図1. 3D（三次元）-クリノスタット
直行する2つの軸が回転することにより中央の台座があらゆる方向を向く。

2. 宇宙環境想定下におけるキノコの子実体

実験により得られたヒラタケ子実体の表現型を図2に示す。地上に培地を固定し生育させた子実体（図2 A）は、通常通りの表現型を示した。一方、3D-クリノスタットを用いて宇宙を想定した環境で発生させた子実体（図2 B）は、重力とは関係なく培地と反対方向へと生育する表現型として観察された。この現象は、キノコの子実体形成時における重力屈性という性質を如実にあらわしている。双方の環境において得られた子実体のおおまかなサイズ・孢子形成の状態にはほとんど違いは見受けられなかったが、宇宙環境想定下で生育した子実体は傘の厚みが明らかに薄く、柄の長さが短くなる傾向が観察された。

3. 重力によって影響を受ける遺伝子

上記の現象を引き起こす因子と働く分子機構を同定するため、宇宙環境想定下及び通常通りに発生させた双方の子実体から mRNA を抽出し、cDNA-RDA 法を改変した PCR サブトラクションを行うことにより、重力に応答する遺伝子プールを作製した。それら遺伝子群のショットガン塩基配列解析を行い、宇宙環境想定下で発現が上昇・減少する遺伝子のカタログを作成した。

重力に応答する遺伝子として、計 36 種類（微小重力下で発現が上昇するもの 17 種、発現が現象するもの 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、いくつかのプロテアーゼ、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、ファイトトキシシンなど、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、ヘモリシン、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 などが得られた。

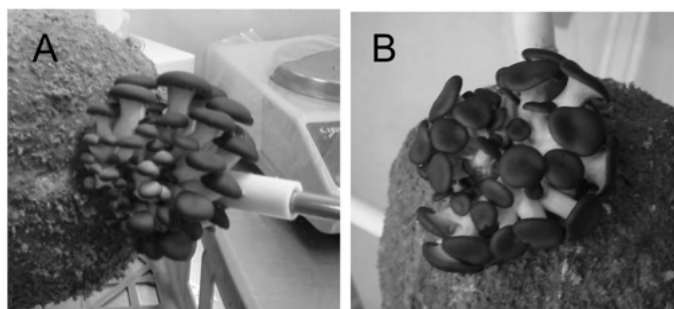


図2. 宇宙環境想定下で発生したヒラタケ子実体
A : 地上に固定して発生した子実体 (コントロール) B : 3D-クリノスタット上で発生した子実体 (宇宙環境想定下)

4. 遺伝子産物の重力に関する考察

生体が宇宙環境におかれたとき、そこには地上の重力は存在しない。しかし、減少した重力が生体にとって更なるストレスを誘発するのか、あるいは重力という一種の物理的ストレスから解放されるのかは、未だ議論の余地が残るところである。ヘモリシンタンパク質はキノコの子実体形成時に発現し、子実体形成の開始を強く誘導することが知られている。本実験においては、そのホモログをコードすると考えられる遺伝子が 2 つ単離され、子実体形成が行われたにもかかわらず宇宙環境想定下において発現が減少していた。この結果は、減少した重力がキノコの子実体形成時に与えるストレスを減少させているように見える。言い換えれば、「より少ないエネルギー」で子実体形成が進んだとも考えられる。重力はきのこの子実体形成にとっては物理的ストレスの一つであり、重力がない方がより生体活動のエネルギー負担が少ないのかもしれない。

植物の重力屈性には、液胞が大きく作用していることが知られている。キノコに関する本実験においても、液胞に局在するいもち病菌の subtilisin 様セリン・プロテアーゼと非常に高い相同性を示すタンパク質をコードする遺伝子が、宇宙環境想定下において発現が上昇する遺伝子として見出された。出芽酵母や *Aspergillus* 属においては、液胞の subtilisin プロテアーゼが胞子形成や分生子形成など、細胞の形態変化を伴う現象に関与する。宇宙環境想定下では重力の方向が分からないため、このような液胞の機構がでたらめに働くのかもしれない。その結果、縦長に伸長するはずの子実体の柄細胞が球形に近い形状となり、柄が短い表現型を伴ったとも考えられる。

キノコの子実体は胞子形成のために多量の尿素を蓄積し、子実体中におけるアルギナーゼの発現量が尿素の含有量と強く相関することが知られている。本実験における宇宙環境想定下では、アルギナーゼをコードすると考えられる遺伝子の発現は減少していた。この結果は、宇宙環境想定下では子実体における尿素の必要量が減少するかもしれないことを示している。

実際の宇宙軌道上での実験において、減少した重力は動物細胞の免疫系にもネガティブな効果を与えている。また、バクテリアの生体活動全体が下がる傾向も観察されている。本実験の宇宙環境想定下における子実体は若干わい性を示し、2D(二次元)-クリノスタットを使った他の実験においても茎が短い表現型が得られている。これらは同様に、宇宙環

境想定下における子実体形成へのネガティブな効果をあらわしているのかもしれない。

5. おわりに

近い将来、人間が宇宙に居住したとき、限られた物資での生活を余儀なくされるであろう。閉鎖系環境においては、持てる物資を出来る限りリサイクルする必要が生じてくる。滞在が長期化するにつれ、人工的な農場が必須となり食料をまかなうことになるであろう。そこでは特に、有機物を構成する元素である炭素の循環が重要となってくる。排出されるバイオマスとして巨大になるであろう植物からの主たる炭素源は、セルロース・ヘミセルロース・リグニン等であるが、中でもリグニンは化学的にも生物学的にも非常に難分解性の高分子化合物である。キノコなどの担子菌はリグニンを分解できる数少ない生物であり、閉鎖環境での炭素循環の根底を担うことが期待される。また、現在の宇宙ステーションでは既に、カビ等の孢子による汚染が非常に問題になっており、孢子を放出しないキノコを用いることにより汚染を防ぎつつ、食用にも資せるかもしれない。

キノコの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。本実験は、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。

- [1] Miyazaki Y, Sunagawa M, Higashibata A, Ishioka N, Babasaki K, and Yamazaki T. Differentially expressed genes under simulated microgravity in fruiting bodies of the fungus *Pleurotus ostreatus*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 307, 72-79 (2010).

Mushroom formation affected by gravity.

-The gene expression under simulated space environment-

Yasumasa Miyazaki¹, Masahide Sunagawa¹, Akira Higashibata², Noriaki Ishioka², Katsuhiko Babasaki¹, Takashi Yamazaki^{2,3}

(¹Dept. Appl. Microbiol., FFPRI; ²Inst. Space Astronaut. Sci., JAXA; ³(Present address) Inst. Med. Mycol., Teikyo Univ.)

真正担子菌ウシグソヒトヨタケにおける多細胞形態形成の分子機構の解析

鎌田 堯

(岡山大院自然科学研究科)

真正担子菌類の多くは、主に有性生殖により繁殖し、その過程で子実体（きのこ）を形成する。我々は、ウシグソヒトヨタケ(*Coprinopsis cinerea*)を実験材料とし、有性生殖と子実体形態形成について主として分子遺伝学的な研究を行っている。ウシグソヒトヨタケは、真正担子菌類の有性生殖の研究、特に遺伝学的研究に長年利用されてきたモデル生物である[1, 2]。最近では、全ゲノム (37 Mb) の解読と約 13, 000 個の遺伝子のアノテーションが行われ[3]、また遺伝子破壊の実験系も確立され[4]、古典遺伝学だけでなく逆遺伝学の実験も効率よく遂行できるようになっている。

1. ウシグソヒトヨタケの有性生殖サイクル

子実体傘裏面の担子器において減数分裂が行われ、担子胞子が形成される。担子胞子は発芽して各細胞に単相核を一つずつもつ一核菌糸 (n) を生じる。交配型 (性) が互いに異なる一核菌糸同士が出会うと、菌糸融合に続いて相互に核移動が起こり、各々の一核菌糸からの単相核を各細胞の一つずつもつ二核菌糸 ($n+n$) が生じる。この過程は、動物・植物の受精に相当する。二核菌糸の各細胞の二核は融合することなく対合し、共役分裂を繰り返す。二核菌糸は栄養成長を続け、菌糸体コロニーを形成した後、光などの環境シグナルに応答して子実体を形成する。二核は、子実体の担子器において初めて融合し、続いて減数分裂・担子胞子形成が起こり、有性生殖サイクルが一巡する。担子菌類では、生活環の中で複相 ($2n$) ではなく重相 ($n+n$) の時期が非常に長いことが大きな特徴となっている。

2. 有性生殖を支配する交配型遺伝子

有性生殖を支配するマスター・レギュレータは、交配型遺伝子座 A と B である。 B 座内の遺伝子群は、フェロモンとフェロモン受容体をコードし、二核化のための核移動を制御する。 A 座内の遺伝子群は二種のホメオドメインタンパク質 (HD1, HD2) をコードし、二核菌糸における共役核分裂とそれに付随するクランプ形成を制御する。フェロモンシグナルは、共役核分裂の最終段階でも働き、クランプの次端細胞への融合を誘導し共役分裂を完了させる。このような、交配型遺伝子 A と B の協調的な働きにより、二核菌糸の形成・成長が行われる。

3. 交配型遺伝子の下流で働く遺伝子

これまで我々は、交配型遺伝子の下流において、二核菌糸の形成及び子実体形態形成を制御する機構を解明するために、各々の過程が阻止された突然変異体を多数分離し、それらの原因遺伝子の同定と機能解析を行ってきた。これまでに、二核菌糸の形成・維持にかかわる遺伝子として、 B 座の下流で働き、二核化の核移動にかかわる *num1*, *Cc.ubc2*, また A 座の下流で働き、二核菌糸における共役核分裂とクランプ形成にかかわる *clp1*, *pcc1* 等を同定した。さらに、子実体形態形成を制御する遺伝子としては、子実体の傘の分化にかかわる *ich1*, 子実体の柄の伸長にかかわる *eln2*, *eln3*, 傘の展開にかかわる *expl*, 青色光受容にかかわる *dst1*, *dst2* (*wc-1* homolog), *Cc.wc2* 等を同定することができた。

現在、二核菌糸の栄養成長から子実体形成へと切り替わる過程に焦点を絞り研究を行っている。まず、restriction enzyme-mediated integration (REMI) 法により子実体形成開始が阻止された突然変異体を多数分離し、その原因遺伝子の同定を行った。その結果、クロマチン・リモデリングにかかわる遺伝子が高頻度で同定され、子実体形成が開始する過程にお

いてクロマチン・リモデリングを伴う転写調節が活発に行われていることが示唆された。そこで、青色光により子実体形成を同調的且つ短時間に開始させることができる培養条件を開発し、子実体形成開始時に発現変動する遺伝子を DNA マイクロアレイ実験で調査した。その結果、子実体形成開始時に転写活性が上昇する遺伝子 (log2: >2) が 82 個、また下降する遺伝子 (log2: <-2) が 34 個見出された。転写活性が上昇する遺伝子の中には、fasciclin, galectin, lectin, hydrophobin といった細胞外で働くタンパク質をコードするものが多く含まれていた (10 個)。この結果は、子実体形成開始において菌糸細胞間相互作用の調節が重要であることを示唆しているのかもしれない。現在、転写活性上昇を示した遺伝子のいくつかについて遺伝子破壊実験を行っている。また、子実体形成開始時にクロマチン・リモデリング複合体と協調して働く転写因子の存在が予想されるが、そうした転写因子の挙動を詳細に調査するために、次世代シーケンサーを利用した Super SAGE や chromatin immunoprecipitation (ChIP)-sequencing による解析を計画し、実験を進めている。

【参考文献】

- [1] U. Kues (2000). Life history and developmental processes in the basidiomycete *Coprinus cinereus*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 316–353.
- [2] T. Kamada (2002) Molecular genetics of sexual development in the mushroom *Coprinus cinereus*. *BioEssays* 24: 449-459.
- [3] J. E. Stajich et al. (2010) Insights into evolution of multicellular fungi from the assembled chromosomes of the mushroom *Coprinopsis cinerea* (*Coprinus cinereus*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 11889-11894.
- [4] T. Nakazawa, Y. Ando, K. Kitaaki, K. Nakahori, T. Kamada (2011) Efficient gene targeting in $\Delta Cc.ku70$ or $\Delta Cc.lig4$ mutants of the agaricomycete *Coprinopsis cinerea*. *Fungal Genet. Biol.* 48, 939-946.

Analysis of molecular mechanisms for multicellular morphogenesis of the homobasidiomycete *Coprinopsis cinerea*

Takashi Kamada (Grad. Sch. Natural Science and Technology, Okayama Univ.)

O-1 (P-22)

麹菌 *A. oryzae* の MAP キナーゼ AoFus3 と相互作用する新規タンパク質の機能解析

矢萩 大貴, 丸山 潤一, Özgür Bayram¹, Oliver Valerius¹, Gerhard H. Braus¹, 北本 勝ひこ (東大院・農生科・応生工, ¹ゲッティンゲン大学)

【目的】真核生物に広く保存されている MAP キナーゼは、外部からの情報を伝達することで細胞活動を制御している。酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において、MAP キナーゼのひとつ Fus3 は有性生殖において、接合フェロモン応答と細胞融合に関与する。糸状菌の Fus3p ホモログは有性生殖に関与することに加え、二次代謝、病原性等において重要な働きを有する。我々は以前、*A. oryzae* の Fus3p ホモログである AoFus3 が菌糸先端と隔壁孔に局在し、その遺伝子破壊株は菌糸成長の異常と分生子形成の低下を示すことを見出した。また、AoFus3 破壊株で隣接する細胞に溶菌が伝播する割合が上昇したことから、AoFus3 が隔壁孔を介した細胞間連絡にも関係することが示唆された。このような糸状菌の Fus3p ホモログの多様な機能における分子機構については、ほとんど明らかになっていない。今回、この機構を解明するため、*A. oryzae* において AoFus3 と相互作用するタンパク質の同定と機能解析を行った。

【方法・結果】AoFus3 の C 末端に TAP(Tandem Affinity Purification) タグを連結した融合タンパク質を、AoFus3 破壊株に発現させた。タグを用いた精製および LC/MS/MS 解析により AoFus3 との相互作用を示すタンパク質を同定し、そのなかで機能未知な 2 種のタンパク質について解析を行った。RACE 解析により遺伝子の予測範囲が正しいことを確認したのち破壊株を作製し、表現型解析を行った結果、両者ともに分生子形成の低下を示し、かつ各々の株で異なった菌糸形態の変化を示した。同時に EGFP 融合タンパク質を発現させて局在を解析したところ、隔壁孔と細胞質にドット状に局在していることが観察された。現在、上記 2 種のタンパク質と AoFus3 との機能的関係を検討している。

Identification and functional analysis of novel AoFus3(MAP kinase)-interacting proteins in *Aspergillus oryzae*

Daiki YAHAGI, Jun-ichi MARUYAMA, Özgür BAYRAM¹, Oliver VALERIUS¹, Gerhard H. BRAUS¹, Katsuhiko KITAMOTO (Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo,¹Georg-August-Universität Göttingen)

O-2

Aspergillus nidulans の NO 耐性に関わるシトクロム P450 の機能とその役割

志水元亨、鳴神寿昭、上村曜介、榊尾俊介、北爪達也、寺林靖宜、町田桃子、高谷直樹(筑波大院・生命環境)

【目的】病原菌は nitric oxide (NO) に応答して遺伝子の発現を変化させることによって、NO による細胞毒性を回避している。実際、病原性酵母は NO に応答して 100 以上の遺伝子の発現を変化させることが知られ出芽酵母では、転写因子 Fzf1p が NO に応答してフラボヘモグロビン Yhb1p の発現を誘導し、NO を解毒することが明らかとなっている。一方、糸状菌において、NO により誘導される遺伝子についてはほとんど知られていない。したがって、モデル糸状菌である *A. nidulans* の NO 誘導性遺伝子の同定は、糸状菌の NO 耐性化の分子機構を理解する上で重要である。このために、我々は DNA マイクロアレイ解析を行い、NO によって発現量が増加する *A. nidulans* の遺伝子を多数見いだした。また、NO によって強く発現が誘導されたシトクロム P450 (P450) と推定される遺伝子の遺伝子破壊株の生育が NO に対して超感受性を示したことから、この遺伝子が NO に対する耐性化に重要であることが示唆された。本研究では、本 P450 の NO 耐性化に関わる機能とその役割について検討した。

【方法および結果】菌体内の代謝物を GC-MS および ESI-MS を用いて解析したところ、コントロールと比較して NO ストレス条件下において、脂質画分にて nitrated oleic acid (OA-NO₂) および nitrated linoleic acid (LA-NO₂) が検出された。ごく最近、哺乳類の血液中において、NO によってオレイン酸やリノール酸が酸化されることで生成し、それらがセカンドメッセンジャーとして機能することや細胞に毒性を与えることが報告されている。そこで、上述の P450 を大腸菌にて異種発現させ、組換えタンパク質を得た。これを P450 レダクターゼとともに OA-NO₂ と反応させたところ、OA-NO₂ がニトロオレフィン部位で開裂することが示された。これらのことから、この P450 は NO によって生成するニトロ脂肪酸の分解に関与していることが示唆された。

New fungal cytochrome P450 tolerates nitrite oxide.

Motoyuki Shimizu, Toshihisa Narukami, Yosuke Kamimura, Shunsuke Masuo, Tatsuya Kitazume, Yasunobu Terabayashi, Momoko Machida, Naoki Takaya (Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba)

O-3 (P-25)

Aspergillus nidulans における高温条件下でのプロテインキナーゼ C によるアポトーシス誘導抑制機構の解析

片山琢也, 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。*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⁾。当研究室において作製された *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 において *pkcA* 温度感受性株の分生子では、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、発芽管の形成が見られない。さらに、このとき DNA の複製は起こるが、その後すぐ DNA が分解された²⁾。*pkcA* 温度感受性株の分生子を 42°C で培養したとき、アポトーシスを誘導した細胞に特異的に見られる活性酸素 (ROS) の蓄積、DNA の断片化が見られたことから、高温条件下において発芽時に PkcA が失活するとアポトーシスが誘導されることが示唆された。PkcA によって制御されることが示唆されている MAP キナーゼカスケードのアポトーシス制御への関与について検討するため、この MAP キナーゼカスケードの構成因子をコードする *bckA*, *mpkA* それぞれの欠失株の解析を行った。これらの欠失株は通常の培地において 42°C では生育することができなかった。さらに、これらの株の分生子を 42°C で培養したところ、ROS の蓄積、DNA の断片化が見られた。これらのことから、高温条件下において PkcA はアポトーシスの抑制に必要であり、この機能は BckA, MpkA を含む MAP キナーゼカスケードに依存することが示唆された。

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, p213

Analysis of PkcA function in the suppression of apoptosis under heat stress condition in *Aspergillus nidulans*

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

O-4 (P-31)

糸状菌 *Aspergillus nidulans* における α -1,3-グルカン合成酵素遺伝子 *agsB* 破壊株および *agsA*, *agsB* 二重破壊株の機能解析

稲葉梓¹, 吉見啓², 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)

我々は、*Aspergillus nidulans* の細胞壁構築シグナル伝達経路について、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、出芽酵母には存在しない α -1,3-グルカン合成酵素 (AGS) 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。また、本菌における 2 種の AGS 遺伝子の機能を明らかにするため、*agsA* 破壊株、*agsB* 発現抑制株を用いて AGS 遺伝子の機能解析を進めてきた。その結果、*agsA* 遺伝子は通常生育条件下ではほとんど機能していないこと、本菌における α -1,3-グルカンの合成には主に *AgSb* が関与していることが示唆されてきた。しかしながら、*agsB* 遺伝子の致死性および AGS 遺伝子完全欠損株取得の可否については明らかにされてこなかった。今回、これまで取得ができていなかった *agsB* 破壊株の造成に成功し、*agsB* 破壊株の表現型解析を行ったのでその結果について報告する。*agsB* 破壊株は、Congo Red に対する感受性の上昇など *agsB* 発現抑制株で認められた特徴的な表現型を示した。また、細胞壁成分を抽出し、NMR 解析を行ったところ、 α -1,3-グルカンのシグナルは検出されなかった。このことから、*agsB* 遺伝子は α -1,3-グルカンの合成に必須であることが強く示唆された。さらに、*agsA* 破壊株を親株とした *agsB* 破壊株の造成を試み、*Aspergillus* 属菌において初めて AGS 遺伝子完全欠損株を取得したので、この株の表現型解析の結果についても考察した。(本研究は生研センターより支援を受けた。)

Analysis of the disruptant of α -1,3-glucan synthase gene *agsB* and the double disruptant of *agsA* and *agsB* in *Aspergillus nidulans*

Azusa Inaba¹, Akira Yoshimi², Keietsu Abe^{1,2}

(¹ Grad. Sch. Agric. Sci., ² Tohoku, Univ., NICHe., Tohoku Univ.)

O-5

分泌型ラッカーゼ (Lcc1) RNAi 抑制株におけるシイタケ細胞壁構造の変化

中出啓子, 坂本裕一 (岩手生工研)

白色腐朽菌は複数のラッカーゼ(Lcc; EC 1.10.3.2 ポリフェノールオキシダーゼ)を保有するが、その生物学的機能については殆ど報告されていない。そこで、本研究では食用担子菌シイタケ(*Lentinula edodes*)で液体培養及び菌床培養時に大量に分泌されるラッカーゼ(Lcc1)の機能解析を目的として実験を行った。まず始めに 40bp の *lcc1* に相同な dsDNA 配列をシイタケへ導入することで、*lcc1* の遺伝子発現を 98-99%抑制した *lcc1* 遺伝子発現抑制株(pChG' -ivrL1#32)を得た。次に表現型の観察を行ったところ、pChG' -ivrL1#32 は、寒天培養時に厚い気中菌糸の層を形成しないことが明らかとなった。走査型電子顕微鏡(SEM)を用いて詳細な観察を行ったところ pChG' -ivrL1#32 は短く異常に分岐した菌糸が多く観察され、菌糸密度も野生株(SR-1)と比較して低下していた。さらに透過型電子顕微鏡(TEM)を用いて観察を行った所、pChG' -ivrL1#32 は細胞壁に存在する外膜(outer layer)と内膜(inner layer)の明確な区別が出来ず、野生株と比較して細胞壁が薄くなっていることが明らかとなった。pChG' -ivrL1#32 では菌糸同士を癒着しているフィブリル層(fibrous layer)が殆ど見られなかったことから、フィブリル層の減少で菌糸同士が癒着出来ず、異常な分岐に至ったのではないかと推測された。さらに外部より 0.1mU/ml の精製 Lcc1 を pChG' -ivrL1#32 へ添加し表現型の観察を行った所、気中菌糸の量が増加し、SEM 観察で見られた短い異常な菌糸の分岐が減少し、TEM 観察でもフィブリル層が顕著に増加し、表現型の回復が見られた。

これらの結果から、シイタケ Lcc1 は細胞壁の構成及び菌糸同士の癒着に関わる可能性が示唆された。

A *Lentinula edodes* laccase (Lcc1) influences their mycelial morphology

Keiko Nakade and Yuichi Sakamoto (IBRC)

O-6 (P-40)

牧草共生糸状菌 *Epichloë festucae* の低分子量 G タンパク質 Cdc42 及び RacA の機能分化に関する研究

榎野友香, 竹本大吾 (名大院・生命農学)

E. festucae はイネ科牧草の細胞間隙で生育し、共生関係を確立する糸状菌エンドファイトである。これまでに、*E. festucae* の活性酸素生成酵素 NoxA が共生時の植物内菌糸の生育を制御すること、制御因子 NoxR と低分子量 G タンパク質 RacA が、NoxA による活性酸素生成を正に制御することが解っている。また酵母で細胞極性の確立に関与する BemA/Cdc24 が、NoxR と複合体を形成し活性酸素生成を制御する可能性が示されている。今回、RacA および RacA と高い相同性を示す Cdc42 の機能を比較解析した。Yeast two hybrid 法を用いた Nox 制御因子との結合解析により、RacA は NoxR と Cdc42 は BemA と N 末端側のアミノ酸を介して特異的に結合することが示された。*racA* 破壊株では、菌糸分岐が増加するのに対し、*cdc42* 破壊株では部分的な菌糸細胞の膨張が認められた。また *racA* 破壊株は、宿主植物内で異常な菌糸生育を示して植物を枯死させるのに対し、*cdc42* 破壊株は宿主植物と共生関係を確立できた。*cdc42* 破壊株では野生株と比較して活性酸素生成量が増加したことから、Cdc42 が活性酸素生成の負の制御因子であることが示された。これらの結果より、Cdc42 と RacA が競合的に働き、活性酸素生成や菌糸生育を制御している可能性が示唆された。

Functional analysis of small G proteins Cdc42 and RacA from fungal endophyte *Epichloë festucae*

Yka Kayano, Daigo Takemoto (Grad. School Bioagr. Sci., Nagoya Univ.)

O-7

菌類におけるヒストン遺伝子内イントロンの進化

西田洋巳, 尹 忠銖 (東大院・農学生命科学研究科)

生活環の大半を酵母で過ごす子囊菌類はヒストン遺伝子にイントロンを持たず、糸状子囊菌類や担子菌類はイントロンを持つ。菌類のヒストン遺伝子におけるイントロンの分布を比較して菌類の進化とヒストン遺伝子イントロンの関係について考察した。24 種の菌類のヒストン H2A, H2B, H3, H4 遺伝子中に存在する 305 個のイントロンの挿入位置を 85 箇所決定し、担子菌類に 7 箇所と糸状子囊菌類に 9 箇所のホットスポットを明らかにしたが、これらの系統群で共通のホットスポットは 1 箇所しか存在しなかった。よって、菌類のヒストン遺伝子内イントロンの多くは異なる起源を持っていると考えられ、菌類における共通祖先に存在したイントロンの数は極めて少ないと考えられる (1)。また、イントロン挿入領域の塩基配列比較に基づき、異なる挿入位置間におけるイントロンの水平伝播は起こってないと考えられた (2)。すなわち、酵母生活が中心の子囊菌類は進化の過程でヒストン遺伝子からイントロンをなくし、糸状子囊菌類と担子菌類は独立にイントロンを獲得したと考えられる。(1) Yun C-S, Nishida H (2011) PLoS ONE 6: e16548. (2) Nishida H, Yun C-S (2011) Mobile Genetic Elements 1: 78-79.

Evolution of introns in fungal histone genes

Hiroimi Nishida, Choong-Soo Yun (Graduate School of Agricultural and Life Sciences, Univ. Tokyo)

O-8 (P-52)

麴菌 *A. oryzae* の菌核形成促進因子 ScIR の過剰発現株を用いた菌糸融合能の解析

和田龍太, 金 鋒傑¹, 小山泰二¹, 丸山潤一, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工,¹野田産研)

麴菌 *A. oryzae* は有性世代が見つかっておらず、複数の株の優良な表現型を同時に備えた株の育種を効率的に行うことが困難である。しかし、ゲノム解析により有性生殖関連遺伝子をもつことが明らかになり、有性生殖を行う可能性が示されている。一方で、*A. oryzae* において菌核(sclerotium)の形成能や、菌糸融合能などが低下していることが有性世代の発見を困難にしている一因と考えられる。菌核とは菌糸が融合を繰り返して密集した厚膜の小粒塊であり、その外見は有性世代の構造である子囊殻(perithecium)と似ている。菌核内で接合型の異なる菌株の菌糸が融合し、それぞれの核が同一細胞内に存在すれば、核融合・減数分裂を経て有性胞子が形成されるのではないかと期待される。しかし、これまで *A. oryzae* では菌核形成や菌糸融合に関する研究がほとんど進んでいないことから、その有性生殖能に関する知見は非常に乏しい。

本研究では、核をそれぞれ緑色および赤色蛍光で可視化するための融合遺伝子を *sC* 遺伝子座に挿入した株に、ウリジン/ウラシル要求性($\Delta pyrG$)またはアデニン要求性($\Delta adeB$)を付与した株を作製した。そして、これらの株を寒天培地で対峙培養、もしくは液体培地で混合培養させることで、菌糸融合能を調べた。その結果、お互いの栄養要求性が相補され最少培地で生育可能な株を取得し、その菌糸を蛍光顕微鏡で観察すると核には緑色・赤色両方の蛍光がみとめられた。以上より異なる株の表現型が同一の株に現れたことから、*A. oryzae* における菌糸融合能を解析するシステムを確立することに成功した。現在、菌核形成促進因子 ScIR を過剰発現させることにより、菌糸融合能への効果を検討している。

Analysis of hyphal fusion ability by using the strains overexpressing ScIR, a promoting factor for sclerotia formation in *Aspergillus oryzae*

Ryuta WADA, ¹Feng Jie JIN, ¹Yasuji KOYAMA, Jun-ichi MARUYAMA, Katsuhiko KITAMOTO

(Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo, ¹Noda Ins. Sci. Res.)

O-9

麹菌における HECT ユビキチンリガーゼ (*hulA*) 条件的発現株の作成

田中瑞己, 新谷尚弘, 五味勝也 (東北大院農・生物産業創成)

麹菌は多様な多糖類分解酵素群を生産するものの、その発現はグルコースによるカタボライト抑制を受ける。そのため、グルコース抑制機構を解明し、グルコース抑制が解除された宿主株を育種することで多糖類分解酵素の高生産が可能となると期待される。グルコース抑制は広域制御型転写因子 CreA によって制御され、モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* では、CreA の機能がユビキチン・脱ユビキチン化により制御されることが示唆されている。また、CreA のユビキチン化には HECT ユビキチンリガーゼ HulA が関与すると推定されているものの、詳細な解析は行われていない。そこで、本研究では麹菌における HulA の機能を解析することを目的とした。

出芽酵母においては、*hulA* オートログである *RSP5* が生育必須遺伝子であることが知られていることから、*hulA* 条件的発現株を作成することとした。麹菌の *hulA* 上流領域を 5'-非翻訳領域にリボスイッチが存在する *nmtA* プロモーターに置換し、リボスイッチ依存的に *hulA* の発現が制御される条件的発現株を作成した。作成した条件的発現株の生育を観察した結果、発現抑制条件であるチアミン添加条件下で生育が著しく抑制され、分子形成能が完全に失われた。このことから、麹菌において HulA は生育または分子形成に必須な因子であることが示唆された。今後、作成した条件的発現を用いて HulA のグルコース抑制への関与について解析を行う予定である。

(本研究は生研センター「イノベーション創出基礎的研究推進事業」の支援を受けて行われた。)

Construction of the conditional expression strain for HECT ubiquitin ligase (*hulA*) in *Aspergillus oryzae*.

Mizuki Tanaka, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi

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

O-10 (P-60)

麹菌転写因子 XlnR の誘導物質依存的リン酸化とその生理学的意義

石川 周平, 野口 祐司, 金丸 京子, 加藤 雅士¹, 小林 哲夫 (名大院・生命農, ¹名城大・農)

【目的】麹菌 *Aspergillus oryzae* 転写因子 XlnR は、誘導物質キシロースに応答してキシラナーゼ、セルラーゼ遺伝子群の転写を活性化する。これまでに、XlnR が誘導物質依存的にリン酸化修飾されることを明らかにした。本研究では、XlnR の誘導物質依存的リン酸化の詳細を phosphate affinity SDS-PAGE を用いて解析し、また、リン酸化の生理学的意義の解明を目指して、リン酸化が XlnR の分解や DNA 結合に与える影響を解析した。

【方法と結果】c-myc 融合 XlnR を発現する麹菌の細胞抽出液を phosphate affinity SDS-PAGE に供し、ウエスタンブロッティング解析により c-myc::XlnR を検出した。その結果、非誘導条件下において XlnR はリン酸化レベルの異なる 3-4 種の分子種として存在し、誘導条件下においてはリン酸化レベルの上昇した 2 種の分子種にほぼ収束した。この付加的なリン酸化は可逆的で、キシロースの除去により非誘導時のリン酸化レベルまで低下した。リン酸化レベルの違いは XlnR の安定性に影響を与えなかった。ChIP Assay および XynF1 のプロモーター領域をプローブとした EMSA により、細胞抽出液中の XlnR はキシロース非依存的に DNA 結合することが示された。以上から、XlnR は常に DNA 上に存在し、キシロース依存的な可逆的リン酸化修飾により活性化され、下流遺伝子の転写を誘導すると考えられる。

本研究の一部は、生研センターのイノベーション創出事業による支援を受けて行われたものである。

Inducer-dependent phosphorylation of the transcriptional activator XlnR and its physiological role in *Aspergillus oryzae*

Shuhei Ishikawa, Yuji Noguchi, Kyoko Kanamaru, Masashi Kato¹, Tetsuo Kobayashi (Graduate Sch. of Bioagric. Sci., Nagoya Univ., ¹Sch. Agric. Sci., Meijo Univ.)

O-11 (P-61)

***Trichoderma reesei* のセルラーゼ生産に関与するシグナル伝達関連タンパク質の探索**

日下秀行, 古川隆紀, 深谷英嗣, 志田洋介, 小笠原 渉 (長岡技科大・生物)

糸状菌 *Trichoderma reesei* は、細胞外セルロースやその誘導体に応答してセルラーゼを誘導的に生産する。しかし、誘導の初段階でセルロースは不溶性で直接細胞膜を通過できないことから、どのように細胞外セルロースを認識しているのかは不明である。また、これまでの研究から初発のセルラーゼ誘導生産は構成的に発現しているセルラーゼによって分解された微量のセルロース分解産物が引き金となり引き起こされるというモデルが提唱されているが、その詳細は明らかにされていない。そこで本研究では、セルラーゼ誘導物質の取り込み経路および基質認識に関する知見を得ることを目的として、誘導発現に関するトランスポーターの同定を試みた。*T. reesei* ゲノムデータベース内に存在する全 9129 遺伝子から糖質輸送に関与すると推定されるトランスポーター遺伝子を抽出し、マイクロアレイを用いて種々の炭素源に対する発現応答解析を行った。その結果、セルラーゼ遺伝子と同調して発現している 7 個のトランスポーターを見出した。これらのトランスポーターについて、セルラーゼ誘導への関与を明らかにするために各遺伝子の破壊株を構築し、アビセル存在下におけるセルラーゼ生産性の解析を行った。その結果、ある遺伝子の破壊に伴いセルラーゼ生産能の著しい低下が観察された。現在、この破壊株を用いてセロオリゴ糖の取込みおよびセルラーゼ遺伝子発現についての解析を行っている。

Functional analysis of genes encoding a putative cello-oligosaccharide transporter in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*.

Hideyuki Kusaka, Takanori Furukawa, Eiji Fukaya, Yousuke Shida, Wataru Ogasawara

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

O-12 (P-85)

稲いもち病菌 *Magnaporthe grisea* における植物ディフェンシンの作用メカニズム解析

小黒芳史, 山崎晴丈, 梨本正之, 高木正道, 高久洋暁 (新潟薬大・応生科)

植物には抗菌性蛋白質による生体防御機構が存在する。我々は植物抗菌性蛋白質の 1 つであるカラシナ由来ディフェンシン BJ-AFP1 が、稲いもち病菌 *Magnaporthe grisea* に対し高い抗菌活性を示し、その際、細胞膜脱分極化、活性酸素種(ROS)の蓄積及び菌糸がバルーン構造の形成が起こることを明らかとしている。本大会では、BJ-AFP1 添加後初期の *M. grisea* 菌糸又は孢子の応答に注目し、解析した結果について報告する。組換え酵母 *Pichia pastoris* を利用し、発現・精製した BJ-AFP1 を *M. grisea* に添加したところ、15 分後には細胞膜脱分極化及び ROS の蓄積が起こり、時間経過と共に脱分極化の割合及び ROS は増加した。また、孢子に BJ-AFP1 を作用させたときも 15 分で細胞膜脱分極化が起こり、さらに過剰量の BJ-AFP1 を添加することで孢子の破裂が観察された。また、BJ-AFP1 添加による菌糸のバルーン構造形成は、高濃度 BJ-AFP1 に対しより短時間で形成されることが明らかとなった。また、プロトプラスト化した菌糸に BJ-AFP1 を作用させたときには、BJ-AFP1 低感受性を示した。このことから細胞壁上に BJ-AFP1 感受性を決定する因子が存在している可能性が示唆された。

The mechanism of action of the plant defensin BJ-AFP1 in *Magnaporthe grisea*

Yoshifumi Oguro, Harutake Yamazaki, Masayuki Nashimoto, Masamichi Takagi, Hiroaki Takaku

(Applied Life Sci, Niigata Univ. of Pharmacy and Applied Life Science)

O-13 (P-83)

イネいもち病菌弱毒化マイコウイルス MoCV1 の性状解析及びウイルスタンパク質の機能解析

太田智子, 浦山俊一, 福原敏行, 有江力, 寺岡徹, 森山裕充 (東京農工大院・農)

Magnaporthe oryzae chrysovirus 1(MoCV1)はイネいもち病菌に感染し、宿主菌に生育阻害や弱毒化を起こすマイコウイルスで、4~5 分節の二本鎖 RNA ゲノムを有する球形のウイルスである。MoCV1 に感染したイネいもち病菌は細胞内で液胞の肥大化や顆粒化といった異常な形態を現わし、MoCV1 ウイルス溶液をウイルスフリーのイネいもち病菌に添加すると菌糸の萎縮が見られる。

MoCV1 感染株の菌体収量向上を目的としてミニジャーで培養した結果、培地量、植菌量及び培養時間が同じ条件でコルベンを用いた振とう培養と比較して、約 20 倍程度の菌体量が得られた。次に菌体から MoCV1 ウイルス粒子を精製して SDS-PAGE をおこなった結果、14 日間培養した菌体由来のウイルス成分は、2 日間培養したものと比較して、ウイルス構成タンパク質のサイズが小さくなっていった。従って、ウイルス粒子を構成するタンパク質は、培養期間が長期化すると一定サイズに分解 (プロセッシング) されることが示唆された。また、イネいもち病菌の形態異常に関与するウイルス遺伝子を探索する試みとして、パン酵母を利用した MoCV1 ウイルス遺伝子発現系の構築と解析を行った。その結果、ウイルスタンパク質の一つは、酵母細胞に生育不良などの形態異常を引き起こすことが示された。

Functional analysis of viral proteins of MoCV1 (*Magnaporthe oryzae* chrysovirus 1) which confers hypovirulence traits to rice blast fungus.

Tokomo Ohta, Syunichi Urayama, Toshiyuki Fukuhara, Tsutomu Arie, Tohru Teraoka, Hiromitsu Moriyama.

(Dept. Agric., Tokyo Univ. of Agric. & Tech.)

O-14 (P-90)

ウリ類炭疽病菌の病原性に必須である分泌タンパク質遺伝子 LAC2 の同定及び機能解析

林 紹仔, 奥田枝穂, 奥野哲郎, 高野義孝 (京大院・農)

ウリ類炭疽病菌 (*Colletotrichum orbiculare*) は、ウリ科植物に病害を引き起こす植物病原糸状菌である。本菌は、メラニン化した付着器を形成して宿主植物へ侵入するが、この侵入過程において、付着器のメラニン化は必須である。今回、本菌の病原性関連遺伝子として、分泌型ラッカーゼ様遺伝子 LAC2 を同定した。LAC2 の標的破壊株においては、付着器のメラニン化は顕著に低下しており、キュウリへの病原性は失われていた。GFP を用いたレポーター解析より、LAC2 遺伝子は付着器形成過程において強く転写誘導され、その翻訳産物は、細胞外へ分泌されることが示唆された。さらに、分泌シグナル領域を欠失させた変異型 LAC2 は、lac2 破壊株を相補できなかった。また、lac2 破壊株は、その胞子の色が野生株と異なっていた。イネいもち病菌 (*Magnaporthe oryzae*) の LAC2 ホモログをウリ類炭疽病菌の lac2 破壊株へ導入した場合、その分生胞子の色は回復したが、病原性と付着器のメラニン化は回復しなかった。この結果は、LAC2 による胞子の色素と付着器のメラニン生合成は、同一反応ではなく、LAC2 の基質は単一ではないことを示唆した。さらにこの結果は、LAC2 が関与する胞子の色素生成は病原性には必須ではないことを示した。

なお、本研究は生研センター「イノベーション創出基礎的研究推進事業」の援助を受けて行われた。

Isolation and Functional Analysis of a Secreted Protein Gene LAC2 Required for Fungal Pathogenicity of *Colletotrichum orbiculare*

ShaoYu Lin, Shiho Okuda, Tetsuro Okuno, Yoshitaka Takano (Grad. School of Agriculture, Kyoto Univ.)

O-15 (P-91)

Cryphonectria parasitica RAS3 タンパク質の生化学・生理学的性質

山内優輝、高橋拓也、笠原紳 (宮城大・食産業・環境)

クリ胴枯病 (chestnut blight) は、世界三大植物病の1つとして有名で、特に米国ではアパラチア山地で極めて優勢であったクリ (American chestnut) を半世紀の間に事実上全滅させるほどの被害をもたらした。その原因糸状菌 *Cryphonectria parasitica* は、1900年頃にわが国からニューヨークに貨物に付着して移入されたという。現在、*C. parasitica* のゲノム解析はほぼ終了しており、さまざまな角度から植物への病徴発現メカニズムの解析およびその制御方法が検討されている。

C. parasitica の RAS に関しては、すでに RAS1、RAS2 が確認されているが、本研究では新たに見出された RAS3 について、生化学・生理学的機能解析を行った。RAS3 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、その点で動物の Rin および Rit との共通性が認められた。RAS3 をコードする *ras3* 遺伝子の破壊および過剰発現が菌糸成長や分生子形成に及ぼす影響を検討した。GFP 融合 RAS3 を発現させて、その局在について観察したところ、細胞表面 (細胞膜上) に強い蛍光が認められた。C 末端 32 アミノ酸を欠失した RAS3 は、この局在を示さず、細胞内部全体に分散して発現していた。このことから、C 末端 32 アミノ酸がファルネシル基に替わり膜結合に寄与している可能性が示された。また、RAS3 の GTP 結合能や GTPase 活性等の生化学的性質を調べるために、大腸菌中で RAS3 を発現し、精製した。

Biochemical and physiological functions of *Cryphonectria parasitica* RAS3

Yuki Yamauchi, Takuya Takahashi and Shin Kasahara (Dept. of Env. Sci., Miyagi Univ.)

O-16

A. oryzae からの不活性型二次代謝クラスター活性化と生合成産物の構造解析

中沢 威人, 石内 勘一郎, 渡辺 賢二 (静岡県大・薬)

現在までに行われた多数の糸状菌ゲノム解読の結果、子のう菌類のゲノム上には非常に多くの二次代謝産物生合成遺伝子クラスター (以下、クラスターと記述) が存在していることが判明した。さらに、トランスクリプトーム解析の結果からは、大部分のクラスターが極度に不活性化されており、通常の実験室における培養条件下では発現せず“眠っている”ことが明らかとなった。発表者らは、様々な糸状菌種を用いて、そのような不活性型クラスターを人為的に活性化させ、新規化合物の取得を試みている。本発表では、*Aspergillus oryzae* から活性化させたクラスターと、それから合成された新規化合物の構造決定について報告する。

A. oryzae における転写発現プロファイリングデータに基づき、不活性型クラスターを選別した。その中の1つのクラスターに関して、ポリケタイド合成酵素 (PKS) をコードする遺伝子の近傍に Zn フィンガーを有する DNA 結合性タンパク質をコードする遺伝子が存在していた。その転写因子様タンパク質をコードする遺伝子を *amyB* プロモーター制御下で誘導発現する形質転換体を作成した結果、PKS を含む当該クラスター内の複数遺伝子の転写発現が活性化した。さらに、この形質転換体では、2種類の化合物が顕著に産生されることを発見した。各種 NMR および精密質量分析の結果、それらの化学構造を決定した。それらは、同一ポリケタイド骨格から合成された、それぞれ異なるメトキシ誘導体であった。以上に加えて本発表では、クラスター内に存在する修飾酵素を用いた *in vitro* 反応の結果から、これら化合物の生合成経路に関しても議論する。

Activation of a silent secondary metabolic gene cluster by upregulating a transcriptional regulator in *A. oryzae*

Takehito Nakazawa, Kan'ichiro Ishiuchi, Kenji Watanabe

(School of Pharmaceutical Sciences, Univ. of Shizuoka)

O-17

スクロースは *Fusarium asiaticum* のトリコテセン系毒素産生を誘導する

川上 颯、*中島 隆、平八重一之 (独法九沖農研・*食品安全委員会)

Fusarium asiaticum はイネ科植物の開花期以降の穂に感染して赤かび病を引き起こし、人畜に有害なトリコテセン系毒素(ニバレノール・デオキシニバレノール)を蓄積するが、その毒素産生誘導機構は明らかでない。そこで本研究では、植物に広く含まれる糖と毒素産生との関係について検討した。

分離地の異なる *F. asiaticum* 10 菌株を供試し、グルコース、フルクトース、スクロース、1-kestose、ニストース、アミロペクチン、アミロース、マルトース、セルロビオース、キシロースをそれぞれ炭素源として添加して液体培養した。その結果、全ての菌株で、スクロース、1-kestose及びニストースにより毒素産生が強く誘導された。次にスクロースの構造異性体であるパラチノース、マルツロース、ツラノースを炭素源として培養したところ、菌体生育量はスクロースを用いた場合とほぼ同様であったが、毒素産生は誘導されなかった。1-kestose及びニストースはスクロースにフルクトースが β 2,1-結合したオリゴ糖であることから、*F. asiaticum* の毒素産生誘導には、スクロース構造が重要であることが推察された。さらに、スクロースとマルトースをそれぞれ炭素源として培養し、毒素合成酵素遺伝子の発現量を経時的に解析した。その結果、スクロースを炭素源として培養した場合にのみ合成酵素遺伝子の発現量が増加した。以上から、*F. asiaticum* では、感染した植物に含まれるスクロースが毒素合成遺伝子の発現を増加させ、毒素産生を誘導することが示唆された。

Effects of carbon sources on trichothecene production and *Tri* gene expression by *Fusarium asiaticum*.

Akira Kawakami, *Takashi Nakajima, and Kazuyuki Hirayae (Kyushu Okinawa Agricultural Research Center, *Food Safety Commission)

O-18

laeA 異種発現による *Cordyceps militaris* の二次代謝活性化

木下 浩¹, Rina Rachmawati¹, 井原史雄², 仁平卓也¹ (¹阪大・生物学国際交流セ, ²農研機構・果樹研)

【目的】 *Cordyceps militaris* は昆虫に感染、寄生する際に多様な生理活性物質を生産することから、古くから様々な効用を有する漢方薬として利用されている糸状菌である。近年、本菌から生理活性を有する化合物が単離同定され始めているが、その数は通常糸状菌がゲノム上に保有すると予測される生合成遺伝子数と比べると未だ著しく少ないままである。この原因としては、一般的に糸状菌の二次代謝物質生産は培養条件に強く依存するため、実験室では *C. militaris* が昆虫に感染する際の状況が再現できていないからであると考えられる。LaeA は *Aspergillus* 属において二次代謝を正に制御するグローバルレギュレーターとして機能することが明らかとなっている。我々は LaeA を *C. militaris* 内で異種発現させることにより、これまで発現していなかった二次代謝物質生合成遺伝子の発現活性化を行い、新規化合物の発見・同定につなげることを目指した。

【方法及び結果】 本研究では LaeA としての機能が明らかとなっている、*A. nidulans* 由来の *laeA* 遺伝子を *Beauveria bassiana* 由来の *gpd* プロモーターに結合し、プロトプラスト PEG 法により *C. militaris* に導入した。得られた形質転換体について各種培養条件を検討し、生産された二次代謝物質について逆相 HPLC により分析したところ、4つの培養条件で元の菌株では見られないピークの出現が観測された。それらのピークのうち2つについて精製を行い、¹H-NMR、EI-MS 解析を行ったところ、いずれもペプチド性の抗菌物質である Beauvericin 類縁体であることが示唆された。現在、その詳細な構造を解析中である。

Activation of secondary metabolism of *Cordyceps militaris* by heterologous expression of global regulator

Hiroshi Kinoshita¹, Rina Rachmawati¹, Fumio Ihara², Takuya Nihira¹

(¹ICBiotech, Osaka Univ, ²NIFTS)

O-19 (P-43)

遺伝子多重破壊による *Aspergillus oryzae* の Hydrophobin 群の機能解析

山川 結, 水野佑香, 中島春紫 (明治大・農・農化)

Hydrophobin (ハイドロフォービン) とは空気中に菌糸を伸長させる子囊菌・担子菌類にみられる細胞表層タンパク質である。低分子量 (70~150a.a.)、両親媒性という特徴を示す。モノマーとして菌体外に分泌された後、親水-疎水界面において自己集合し、菌糸や分生子の撥水性の付与や、植物細胞表面などの疎水面への吸着に関与することが知られている。一般に、1つの菌株は互いに相同性の低い Hydrophobin 遺伝子を複数所有しているが、その使い分けについてはほとんど解明されていない。

本研究では麹菌 *Aspergillus oryzae* に注目し、Hydrophobin をコードすると推定される遺伝子を4つ単離し (*hypA,B,C,D*)、*hypA,B,C* については発現を確認している。蛍光融合タンパク質を用いた局在解析により、分生子には HypA しか観察されず、一方菌糸では HypA,B,C の全てが局在することが示された。HypA と HypB,C の間の局在性の差異からは同一菌株が発現する Hydrophobin の機能的使い分けが示唆されている。本研究では *hypA, B, C* について単独、二重および三重破壊株を作製し、その表現型解析からそれぞれの機能を解明することを目的としている。リアルタイム PCR 解析、形態観察、発芽率測定、撥水性試験、SEM による微細構造解析の結果より、*A. oryzae* のハイドロフォービン群はそれぞれの発現時期および局在個所が異なり、それらは独立して機能していることが示された。また多重変異株でも、培養条件により撥水性が示されたことから、転写量の低い HypD、あるいは Hydrophobin 以外の物質も菌体の撥水性に関与する可能性が示唆された。

Functional analysis of Hydrophobins by multiple gene disruption in *Aspergillus oryzae*

Yui Yamakawa, Yuka Mizuno, Harushi Nakajim (Dept. of Agricultural Chemistry, Univ. of Meiji)

O-20 (P-44)

水晶振動子マイクロバランス (QCM) による界面活性蛋白質 RolA と固体表面間の相互作用解

田邊弘毅¹, 大類景子¹, 上原健二¹, 高橋徹^{2,3}, 富樫貴成⁴, 有田稔彦⁴, 阿部敬悦^{1,3}
(¹ 東北大院・生物産業創成, ² 酒類研・基盤, ³ 東北大・未来研, ⁴ 東北大・多元研)

【背景・目的】 麹菌は生分解性ポリエステルである 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、CutL1 を PBSA 表面にリクルートする事で、PBSA 分解効率を上昇させている。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する特徴を持つ。しかし、CutL1 の PBSA 分解を阻害していない事から、RolA は吸着後に水平方向へ移動する可能性が示唆された。そこで、水平方向可動メカニズムを解明する為に、RolA と PBSA 間の相互作用メカニズムを解明する事とした。

【結果・考察】 各 pH における PBSA への RolA の吸着量と可動性を解析した結果、両者に相関は見出せなかった。さらに、RolA の PBSA への推定結合領域内の変異体 (L137S, L142S, D134A/D136A, K130A/D134A/D136A) を作製し、これらについても同様の解析を行った。その結果、野生型 RolA と比較して、変異体は PBSA への吸着能が変化したが、可動性には変化が見られなかった。この事から、RolA の PBSA への吸着と可動性は異なるメカニズムに依存する現象である事が示唆された。さらに、RolA の可動性には、「PBSA の化学構造」および「点変異導入により変化した以上の静電的・疎水的な相互作用」が大きく寄与する事が推論された。そこで現在は、分子間相互作用解析装置 QCM のセンサーチップ表面に疎水度を変えた化学修飾を施して、その表面に対する RolA の吸着能を評価している。

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

QCM analysis of the interaction between *Aspergillus oryzae* hydrophobin RolA and solid surfaces

Hiroki Tanabe¹, Keiko Orui¹, Kenji Uehara¹, Toru Takahashi^{2,3}, Takanari Togashi⁴, Toshihiko Arita⁴, Keietsu Abe^{1,2}

(¹ Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., ² NICHe., Tohoku Univ., ³ NRIB., ⁴ IMRAM., Tohoku Univ.)

O-21

糸状菌 *Trichoderma reesei* のセルラーゼ高生産変異株の形態学的解析

志田洋介¹, 新田美貴子¹, 大隅正子², 小笠原 渉¹ (¹長岡技科大・生物, ²総合画像研究支援)

【目的】セルラーゼ高生産糸状菌である *Trichoderma reesei* は、セルロースを唯一の炭素源として培養したときに大量のセルラーゼを誘導生産する。これまでに、*T. reesei* の産業上の有用性から、各種セルラーゼの酵素学的諸性質およびセルラーゼ遺伝子群の転写調節機構を中心とした様々な解析が行われてきた。しかしながら *T. reesei* の形態学的な知見とセルラーゼの生産性を関連付けた報告は少ない。そこで本研究では、セルラーゼ生産条件下において *T. reesei* の形態学的解析および網羅的遺伝子発現解析を行うことで、*T. reesei* のセルラーゼ生産性に新たな知見を加えることを目的としている。

【方法と結果】セルラーゼ生産条件および非生産条件下で培養した菌糸をノンコーティングおよび定電圧条件下で走査型電子顕微鏡観察を行った。その結果、セルラーゼ生産条件下では局所的に極度に膨れ上がった菌糸の形態を示し、細胞壁上に大量の繊維状微細物質が存在することが明らかとなった。この物質が出現する条件を特定するために様々な培養条件（セルロース培養、グルコース培養、静置培養、震とう培養）で得られた菌体の電子顕微鏡観察を行ったところ、繊維状微細物質はセルラーゼ生産条件よりもむしろ培養中の菌体への物理的な刺激によって生じることを示唆する結果が得られた。現在、繊維状微細物質の生理学的役割を明らかにするために、上記の培養条件下で得られた RNA を用いてマイクロアレイ解析を進めている。

Morphological analysis of cellulolytic fungus *Trichoderma reesei*

Yosuke Shida¹, Mikiko Nitta¹, Masako Osumi², Wataru Ogasawara¹

(¹Nagaoka Univ. of Technol., ²Integr. Imaging Res Support)

O-22

Aspergillus nidulans の形質転換時に非相同断片を添加することによるターゲティングの効率化

伊藤靖夫¹, 金綾奈² (信州大・¹全学教育機構, ²理学部 現: 東大院・先端生命)

形質転換時に添加するベクター分子間の相互作用によって、反復配列が形成される。この時、真核細胞では一般的に、同方向反復配列(DR)が優勢であり、逆方向反復配列(IR)が観察されることは稀である。この理由を明らかにするために、宿主染色体と相同性を持たない断片を IR とし、非正統的(illegitimate)組込みへの効果を調べた。その結果、形質転換効率は 25%に低下した。これは非相同末端結合(NHEJ)系の阻害によるものと考えられたので、相同(homologous)組込みに対する IR の効果を調べたところ、ターゲティング頻度が 5-10 倍上昇した。このような効果は対照とした単量体分子の添加でも認められたが、IR の方が上昇率は高かった。本法の応用を考え、相同および異所的(ectopic)組込みによって得られた形質転換体における、添加した非相同断片の染色体への組込みを確認した。すると、非ターゲティング系統では添加した分子が 85%で検出されたのに対し、ターゲティングした系統では 15%であった。つまり、形質転換時に非相同断片を添加するだけでターゲティング頻度は上昇し、標的部以外での染色体への影響は限定的であった。これらの結果について、形質転換時に大量に単量体および IR とした DNA 分子を添加することによって、宿主細胞集団の過半において NHEJ が一過的に阻害されたと考えた。そのために相同組込みが顕在化し、ターゲティング頻度が上昇した。また、相同性を持たない添加断片は染色体に組込まれなかった。

Effective gene targeting by addition of excessive non-homologous fragments in *Aspergillus nidulans*

Yasuo Itoh¹, Ayana Kon² (¹Sch. Gen. Ed., ²Fac. Sci. / Shinshu Univ., Present affiliation: Frontier Sci. Univ. of Tokyo)

O-23

糸状菌における遺伝子機能解析のための分子生物学的ツールの開発

原島俊明, 西村麻里江 (生物研)

ゲノムプロジェクトにより多くの糸状菌でそのゲノムの全塩基配列が決定されており, その次のステップとして遺伝子の機能解析が待たれている。我々はイネいもち病菌をモデル生物として用い, 遺伝子の簡便な機能解析ツール (遺伝子ノックアウト用, 発現調節用, 遺伝子ターゲティング用カセットおよびタンパク質のエピトープタグ用, ドメイン置換/欠失用カセット) を構築した。糸状菌では PEG 法やアグロバクテリウム法を用いて形質転換体を作製することから, どちらの方法にも利用出来る形質転換用バイナリーベクターをカセットの基本骨格とし, さらにこのベクターに出芽酵母の選択マーカーである *URA3* と *2 μ Ori* を導入して酵母シャトルベクターとした。これにより酵母菌体内での相同的組換えを利用したベクターの構築と改変が容易に行え, さらにこれらのカセットには糸状菌における相同的組換え体のスクリーニング効率を向上させるための工夫も施されている。

イネいもち病菌の形質転換体選択マーカーには, 薬剤耐性マーカーであるハイグロマイシンはじめビアラホス, プラストサイジン, ブレオマイシン, ノウシオスリシン耐性遺伝子や栄養要求性マーカーである *PyrG* 遺伝子を用い, 発現には *Aspergillus nidulans* の構成的なプロモーターである *TrpC* プロモーターを用いた。さらに, 誘導系プロモーターとして薬剤誘導性のものを新たに実用化した。この誘導性プロモーターのカセット化により Cre 組換え酵素の発現誘導が可能になり, Cre-loxP 系が確立された。本発表では, 構築されたカセットとともに実用例も併せて紹介をする。

Comprehensive toolkits for fungal omics: Versatile modules for gene manipulation regarding replacement, expression, targeting, and tagging.

Toshiaki Harashima, Marie Nishimura (NIAS)

O-24 (P-15)

実用麹菌株のゲノム進化と各醸造産業への適応

伊藤 岳^{1,2}, 妹尾悠平^{1,2}, 澤村恒子², 徳岡昌文², 磯谷敦子², 山田 修², 岩下和裕^{1,2} (1 広島大院・先端研, 2 酒総研)

【目的】清酒や醤油といった各醸造製品の生産現場では, 各製品の製造に適した多様な菌株 (実用麹菌株) が使用されており, この選抜の歴史は, 麹菌側からみると製品製造に適した特性を持つようゲノムが進化したものが選抜されて来たと考えられる。これまでに我々は, 実用麹菌株 55 株についてゲノムアレイ情報に基づく系統解析を行い, これらの菌株が 9 つの主な系統にグループ化され, 各系統とその産業用途には関連があることを明らかにした。そこで本研究では, アレイ解析を行った 55 株について製麹及び清酒醸造を行い, その醸造特性について網羅的に解析し, ゲノムアレイ情報との相関について解析することを目的とした。

【方法・結果】まず, 各菌株を精米歩合 40% の山田錦 α 化米 (A40Y) と 60% の山田錦蒸米 (S60Y) を用いて, それぞれ異なる培養条件において生育させた米麹の作製を行い, 清酒製造に重要な役割を果たす米麹中の酵素活性及び菌体量を測定した。その結果, グルコアミラーゼをはじめとした各酵素力価と各系統との間に相関が見られた。また, A40Y 条件と S60Y 条件では, 活性値そのものには違いが見られたが, 全体的な傾向についてはほぼ同様の比率を示した。次に各菌株により作成した米麹を用いて小規模の清酒製造を行い, 清酒醸造に関する特性の解析を行った。その結果, 発酵経過や生成酒の香气成分等で各系統とその値に相関が見られた。さらに, これらのデータを基に変量解析を行ったところ, 各菌株はゲノムアレイ情報に基づく系統解析とほぼ一致する結果を示した。以上の結果から, 麹菌のゲノム構造と醸造上の特性には大きな関連があることが明瞭に示された。

Evolution of industrial *Aspergillus oryzae* genome and its adaptation to the fermentation industries

Gaku Ito^{1,2}, Yuhei Senoo^{1,2}, Tuneko Sawamura², Masahumi Tokuoka², Atsuko Isogai², Osamu Yamada², Kazuhiro Iwashita^{1,2} (1 Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ., 2 NRIB)

O-25

マイタケをモデルとしたキノコ生育機構解明へのゲノミクスアプローチ

倉橋敦¹⁾, 佐藤真之¹⁾²⁾³⁾, 西堀耕三¹⁾, 藤森文啓²⁾³⁾ (¹⁾雪国まいたけ, ²⁾ハイファジェネシス, ³⁾東京家政大)

食用キノコの子実体生育機構の解明を目的として、これまでにマイタケ栽培工程全域の EST データを取得しデータベース化している。この EST データからマイクロアレイを作製し、栽培工程における遺伝子の発現挙動を解析した結果、顕著に発現変動する遺伝子を原基形成期で 56 個、子実体生育期で 187 個見出した。中には *Gf.HSP9* のように培養期間中の発現量と子実体収量に相関が見られ、子実体生育との関連が示唆される遺伝子があった。また、子実体生育不良を示す変異体を用いたマイクロアレイ解析の結果、転写因子として知られている C2H2 型 zinc finger 蛋白質遺伝子の変異体で顕著に高発現であったことから、この蛋白質が子実体生育に必須な遺伝子の転写制御因子である可能性が示唆された。このように見出された遺伝子が実際にどのような機能を持つのかを解析するためには EST データだけでなく、ノンコーディング領域の情報も不可欠である。そこで、マイタケのゲノム解析を次世代シーケンサーである GS FLX (Roche) 及び GAIIX (Illumina) を用いて実施した。2つのシーケンサーから得られた配列データを混合アセンブルすることで、長さ 33.8 Mb, スキャホールド数が 280 のドラフトゲノムデータを取得した。このゲノムデータから遺伝子予測を行うと予測遺伝子数は 10,500 程度であったが、EST データをマッピングすることで予測遺伝子数は 16,097 に至った。このように精度の高い遺伝子予測結果を得るためには、EST データを付加することが重要であると考えられた。今後はゲノムデータを用いて遺伝子ターゲットング等による詳細な機能解析を進めることで、子実体生育機構の解明に繋がっていくと考えている。

Genomics approach for exploring mechanisms of fruiting body development using *Grifola frondosa* as model mushroom

Atsushi Kurahashi¹⁾, Masayuki Sato¹⁾²⁾³⁾, Kozo Nishibori¹⁾, Fumihiko Fujimori²⁾³⁾

(¹⁾Yukiguni Maitake Co. Ltd., ²⁾Hyphagenesis Inc., ³⁾Tokyo Kasei Univ.)

O-26

地衣類の共生菌のゲノム解析

原光二郎, 佐藤ひかり, 小峰正史, 山本好和 (秋田県大・生物資源)

地衣類は真菌類（主に子嚢菌類と一部担子菌類）と藻類（緑藻類とシアノバクテリア）との共生生物であり、地衣成分と呼ばれる特有の二次代謝産物を含む。その役割として、共生関係を保つための菌類の藻類に対する制御物質として、あるいはアレロパシー物質や忌避物質としての役割が考えられている。医薬シーズ開発に向けてさまざまな生物活性スクリーニングがこれまでにに行われており、我々は *Myelochroa aurulenta*（コナウチキウメノキゴケ）が産生するホパン型トリテルペン化合物が抗腫瘍活性を有することを明らかにした。近年、シーケンシング技術の発展に伴い、地衣類においてもゲノム解析が行われるようになり、地衣成分の生合成遺伝子の解明が期待される。今回、*M. aurulenta* から分離した地衣菌培養株を用いて、ゲノム全体およびトリテルペン生合成経路の関連遺伝子を解析した。

Genome Analyzer (illumina 社) により塩基配列を決定し、2 回のアセンブル処理の結果、総塩基数は約 37.5 Mbp, GC 含量は 47.5%であった。近縁の *Aspergillus* spp. とは総塩基数や GC 含量に大きな違いはみられなかった。Augustus および Blast2GO による遺伝子領域予測とアノテーションにより、総遺伝子数は 10,722 個と予想され、トリテルペン化合物の生合成の初期に関わると考えられる環化酵素遺伝子は、少なくとも 3 個存在することが明らかとなった。80 個以上のポリケタイド合成酵素 (PKS) 遺伝子がゲノム中に存在し、二次代謝クラスターと考えられる領域も見つかった。

Genome sequencing and analysis of lichenized fungus

Kojiro Hara, Hikari Sato, Masashi Komine, Yoshikazu Yamamoto (Akita Pref. Univ.)

P-1

Aspergillus awamori の *ligD* 遺伝子破壊による高頻度相同組み換え宿主の開発

高橋徹¹, 水谷治¹, 白石洋平², 山田修¹ (1 酒総研, 2 ビオック)

黒麹菌 *Aspergillus awamori* は泡盛や焼酎の製造に使用されている醸造微生物である。2008 年に *A. awamori* NBRC4314 株のゲノム解析が完了し遺伝子のクローニングが容易となった。しかし、それら遺伝子の機能を把握するためには宿主・発現系の開発が必須となる。本研究では非相同組み換えに関与している *ligD* 遺伝子を破壊することにより、高頻度相同組み換え宿主の開発に成功したため、これについて報告をする。

[方法・結果] *A. awamori* NBRC4314 株のゲノムデータベースから *A. oryzae* *AoligD* 遺伝子と相同性を示す *AaligD* 遺伝子を見出し、この遺伝子をアグロバクテリウム法により置換破壊をした。次に、相同組み換え効率が向上していることを確認するために、分生子の着色に関与していると推測される *pksP* 遺伝子をターゲットとし遺伝子破壊を行った。その結果、*pksP* 遺伝子の破壊に使用する 5' 及び 3' 領域の長さが 500bp 以上であれば 100% の効率で *pksP* 遺伝子は破壊されることが明らかとなった。

Development of an efficient gene-targeting system in *Aspergillus awamori* by deletion of the non-homologous end joining system

Toru Takahashi¹, Osamu Mizutani¹, Yohei Shiraishi², Osamu Yamada¹

(¹NRIB, ²Bio'c Co. Ltd)

P-2

Cre-loxP システムを用いた麹菌における多重遺伝子導入システムの開発

江原直樹, 水谷治*, 新谷尚弘, 五味勝也 (東北大院農・*酒総研)

麹菌 (*Aspergillus oryzae*) は、その優れたタンパク質生産能、分泌能などから、外来タンパク質を高生産させるための宿主として利用されている。さらに近年では、糸状菌の多様な二次代謝化合物生産能に着目し、医薬品などの有用な二次代謝化合物を麹菌で生産させようという試みもある。このような高度な二次代謝産物は、多数の生合成ステップを経て合成されており、外来生物由来の二次代謝産物を生産するためには、麹菌内に生合成に関わる一連の酵素群をすべて導入する必要がある。そこで、本研究では、Cre-loxP システムを利用した選択マーカーリサイクリング技術を応用して、選択マーカーが少ない麹菌で繰返し遺伝子導入が可能なシステムの開発を目指した。

Cre-loxP システムを用いたマーカーリサイクリングでは、選択マーカー遺伝子の両端に loxP 配列を付加して、麹菌の染色体に挿入した後、Cre リコンビナーゼ (Cre) 存在下でマーカーを含んだ配列のみを染色体上から脱落させる。その際に麹菌では、プラスミドなどで Cre を菌体内で条件誘導的に発現させることが困難なため、プロトプラストに Cre を外部から直接導入する手法を利用した(1)。遺伝子導入とマーカー除去を繰り返すと、同一染色体上に loxP 配列が複数蓄積し、それらの loxP 間で除去が起こる恐れがあるため、除去反応を受けると、その後の反応性が大幅に低下する変異型 loxP 配列を利用して導入用ベクターを構築した。現在は本手法の有用性を検証するため、麹菌自身が生産し構成遺伝子が少ないコウジ酸生合成系をモデルとして実験を行っている。

(1) 水谷ら, 2009 年度日本農芸化学会大会講演要旨集, p. 271

Development of multiple gene expression system using Cre-loxP-mediated marker recycling in *Aspergillus oryzae*.

Naoki Ebara, Osamu Mizutani*, Takahiro Shintani, Katuya Gomi

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

P-3

稲わらの酵素糖化性を促進する白色腐朽菌ハタケチャダイゴケにおける遺伝子導入系構築

山岸賢治¹, 木村俊之¹, 渡辺隆司² (¹農研機構・東北農研、²京大・生存研)

【目的】白色腐朽菌は植物性バイオマス中の高分子リグニンを分解することによりセルロースの酵素糖化性を高めることが以前より知られているが、その程度は菌種と、対象になる植物性バイオマスの組み合わせによって大きく異なる。稲わらに対してはどの白色腐朽菌が好適かスクリーニングを行った結果、ハタケチャダイゴケ（鳥の巣キノコ）が最も有望であり、60℃15分滅菌した稲わらの酵素糖化性を25日間固体培養の間に5.2倍上昇させた¹⁾。以上の知見を元に、稲わら酵素糖化性向上作用を更に強化することを目的として、ハタケチャダイゴケの遺伝子導入系を構築した。

【方法及び結果】ハタケチャダイゴケ ATCC36910 株をプロトプラスト化し、単核菌糸株 P1 を作成した。P1 株をプロトプラスト化し、UV 照射後 5-FOA 含有培地において再生操作を行い、5-FOA 耐性株を複数得た。各耐性株のウラシル要求性を調べた結果、CsURA5(オロト酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ)に欠失変異を持つウラシル要求性変異株 Cs#180 を得た。形質転換マーカー遺伝子として CsURA5 を用い、Cs#180 由来プロトプラストを PEG 法で形質転換したところ、複数のウラシル非要求性クローンが得られた。更に、ハタケチャダイゴケ GPD 遺伝子(CsGPD)のプロモーター、ターミネーター領域を利用して EGFP 発現プラスミドを構築し、同じプラスミド上に CsURA5 を挿入して遺伝子導入プラスミド pGPD-EGFP-CsURA5(pGEU5)を作成した。pGEU5 を Cs#180 に遺伝子導入したところ、複数の再生クローンにおいて強い緑色蛍光が確認された。

1) Yamagishi, K., Kimura, T., Watanabe, T. (2011) *Biores. Technol.*, 102, 6937-6943

Transformation by complementation of a uracil auxotroph of the rice straw degrading basidiomycete *Cyathus stercoreus* (bird's nest fungi)

¹Kenji Yamagishi, ¹Toshiyuki Kimura, ²Takashi Watanabe (¹National Agricultural Research Center, ²Kyoto Univ.)

P-4

糸状菌 *Coleophoma empetri* F-11899 における 2 種の次世代シーケンサーを用いたゲノムアセンブル配列の比較

中谷和也, 山田雅人, 織野陽介, 磯貝泰弘, 橋本正治 (富山県大・生物工)

糸状菌 *Coleophoma empetri* F-11899 は、深在性真菌症治療薬 micafungin の原体である FR901379 を生産する。本研究では、FR901379 生合成経路の解明を目的として、2 種の次世代シーケンサー-genome sequencer 454 FLX (FLX; Roche) と genome analyzer II (GAII; Illumina) を用いて *C. empetri* F-11899 のゲノムシーケンス解析を行った。得られたリード配列 (FLX; 計 469 Mb, GAII; 計 2,061 Mb) のそれぞれを *de novo* アセンブルするとともに(単独アセンブル)、FLX に一致しなかった GAII のリード配列をアセンブルし、それと FLX のコンティグを混合してアセンブルを行った(混合アセンブル)。一般的に FLX で得られるリード長 (400 b) は GAII のリード長 (75 b) よりも長いので、糸状菌のゲノムサイズ (数十 Mb) の *de novo* アセンブルには、FLX が長いコンティグ配列を得易く優位と考えられる。一方で、GAII は 1 リード長が約 75 b と短い、1 ランあたりに得られる解析総塩基数が多く、コストパフォーマンスに優れている。そこで、FLX 単独アセンブルと GAII 単独アセンブルのコンティグ配列を、混合アセンブルのコンティグ番号を基準に並び替えを行い、FLX 単独アセンブルと GAII 単独アセンブルがどれだけ一致するかを、解析ソフト GenomeMacher を用い視覚的に比較した。その結果、GAII, FLX の単独アセンブル配列はほぼ一致していた。

Comparison of genome sequence assembly by two NGSs in fungus *Coleophoma empetri* F-11899.

Kazuya Nakaya, Masato Yamada, Yohsuke Orino, Yasuhiro Isogai, Seiji Hashimoto

(Dept. of Biotechnol., Toyama Pref. Univ.)

P-5

糸状菌トランスクリプトーム配列データを用いたゲノムアノテーション

(東大院・農生科) 五十嵐圭日子, 堀 千明, 鮫島正浩, (ジナリス) 上村泰央, 竹田 綾

セルロース分解性の糸状菌は、様々な分解酵素を菌体外に分泌することで植物細胞壁を分解する。その際に生産される酵素群には、セルロース系バイオマスを高度利用するために必要な酵素が含まれるだけでなく、機能が未知ではあるが潜在的にセルロース系バイオマスの分解効率を高めるものなどが含まれることから、全ゲノム配列情報やアノテーションして得られた推定アミノ酸配列情報をプロテオーム解析と組み合わせることで、様々な情報を得ることが可能となる。真核生物の場合は、全ゲノム配列情報から推定アミノ酸配列情報を抽出するためにはイントロン領域を予測する必要があるが、用いられるアルゴリズムが得られるデータの精度に大きく影響することが広く知られている。しかしながら、これまでにも様々なアノテーションプログラムが構築されてきたが、一般的にカビやキノコなどのイントロン予測は難しく、既知遺伝子が同定されない場合や、アノテーション結果と実際にクローニングされた cDNA 配列が異なることがしばしば起こる。

本研究では、担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* を様々なセルロース系バイオマスを炭素源として培養し、抽出された cDNA を第2世代シーケンサによって配列解析し、得られたトランスクリプトーム配列データを用いて、ゲノムアノテーションの改良を行った。その結果、米国エネルギー省ジョイントゲノム研究所 (JGI) によるアノテーションでは 10,048 と推定されていた遺伝子数が、本アノテーションでは 13,601 遺伝子に増え、JGI のアノテーションでは予測できていなかったセルラーゼ (PcCel45A) 遺伝子も予測されていた。これらの予測結果を、特にセルラーゼ系の遺伝子群について、実験的に単離決定された mRNA 配列と比較することにより評価し、報告する。

Genome annotation using transcriptome sequence from filamentous fungi

Kiyohiko Igarashi¹, Chiaki Hori¹, Masahiro Samejima¹, Yasuo Uemura², Aya K. Takeda²

(¹Dept. of Biomaterial and Science, Univ. of Tokyo, ²Genaris, Inc.)

P-6

抗菌活性を有する亜熱帯性微生物のゲノム科学的解析

戸田 智美, 小山 芳典, 梅村 舞子, 小池 英明, 町田 雅之 (産業技術総合研究所・生物プロセス)

【目的】真菌等の微生物は様々な代謝産物を生産することが知られており、産業的にも科学的にも注目されている。我々は真菌が培養条件によって多くの異なる有用な代謝産物を生産することを経験的に知っているが、それらの解析はその多様性から必ずしも十分に行われていない。本研究では、様々な培養条件で真菌が生産する生理活性物質を、抗菌活性を指標として評価し、有用な代謝物を生産する微生物の候補を探索する。また、有用物質生産に関連する遺伝子の探索や遺伝子発現解析に利用可能な基盤情報の取得を目指し、次世代シーケンサーを用いたシーケンシングを主な手段としたゲノム解析を試みている。

【方法及び結果】株式会社ハイファジェネシスより入手した亜熱帯地域に常在する真菌を中心とした 100 以上の真菌培養抽出物の細菌及び糸状菌に対する生育阻害活性を調べた結果、抗真菌活性を示すものも存在した。これらの解析において特徴的な活性を示した抽出物が由来する真菌のゲノムを解析し、新規機能性物質及びその生合成遺伝子の同定を試みている。

Functional genomic analysis of subtropical fungi harboring antibacterial activity

Tomomi Toda, Yoshinori Koyama, Myco Umemura, Hideaki Koike, Masayuki Machida

(Bioproduction RI, AIST)

P-7

白麹菌 *Aspergillus kawachii* IFO 4308 株のゲノム解析

二神泰基¹, 森一樹¹, 山下彩夏¹, 和田正太郎², 梶原康博², 高下秀春², 大森俊郎², 竹川薫¹, 田代康介¹, 久原哲¹, 後藤正利¹ (¹九大院・農, ²三和酒類)

白麹菌 *Aspergillus kawachii* は、焼酎醸造に用いられる重要な産業微生物である。特徴として、高いクエン酸生産能と多様な糖質加水分解酵素をもつことが挙げられる。本研究では、*A. kawachii* IFO 4308 のゲノム情報を得ることを目的として、Roche 454 GS FLX titanium による全ゲノムショットガン、およびペアエンド解析を行った。その結果、36,575,290 bp のドラフトゲノム配列が決定され、11,488 の CDS (coding sequence) が推定された。得られたラージコンティグ (>500 bp) およびスキファフォルドの数は、それぞれ 1,687 および 318 であった。また、各 N50 サイズは 138 kb および 897 kb であった。特徴のひとつである糖質加水分解酵素をコードする CDS は、既知および推定のものを含めて 247 個存在し、CAZy (Carbohydrate-Active enZymes) データベースに従って 53 ファミリーに分類された。今後、ゲノム情報を利用した白麹菌の研究展開が期待される。

Genome analysis of white Koji mold *Aspergillus kawachii* IFO 4308

Taiki Futagami¹, Kazuki Mori¹, Ayaka Yamashita¹, Shotaro Wada², Yasuhiro Kajiwara², Hideharu Takashita², Toshiro Omori², Kaoru Takegawa¹, Kosuke Tashiro¹, Satoru Kuhara¹, and Masatoshi Goto¹
(¹ Faculty of Agriculture, Kyushu Univ., ² Sanwa Shurui, Co. Ltd.)

P-8

SOLiD3 による麹菌の RNA-seq と麹菌比較ゲノムデータベースの更新

岩下和裕¹, 島原明子¹, 上村泰央², 山田 修¹ (1 酒総研, 2 株式会社ジナリス)

【目的】麹菌 (*Aspergillus oryzae*) は、安全性が高く、清酒などの伝統的発酵食品や食品用、医療用の酵素の供給源、さらには、異種タンパク質生産のホストとしても使用され、我々の生活に欠くことの出来ない微生物である。その重要性から、2005 年に全ゲノム解析がなされ発表・公開されているが、現在公開されている遺伝子領域は、遺伝子予測ソフトによって推定されたもので、遺伝子予測の精度は必ずしも十分ではなく、遺伝子領域の確認を要することもしばしば生じる。そこで、麹菌遺伝子解析の一助とするために RNA-seq を行い、その結果を麹菌比較ゲノムデータベース (CFGD) に掲載した。さらに、米麹での各遺伝子の発現情報も掲載したので併せて報告する (URL: <http://nrifb21.nrif.go.jp/CFGD/>)。

【方法】*A. oryzae* RIB40 株の分生子を 2×10^7 個となるように、メンブランを敷いた改変最小寒天培地に植菌し、30°C で 24 時間静置培養した。その後、Isogen により RNA を抽出し、Qiagen 社の RNeasy により精製を行い、SOLiD 3 によりシーケンスを行った。その結果、110,835,569 リードの配列が得られ、RIB40 のゲノム配列にマッピングしたところ、約 70.4% のリードがマッピングされ、マッピングされたリードの総塩基長は 3.38Gbp となった。また、得られたコンティグは 176,694 個でコンティグの総長は 29.6Mbp、ゲノム全体の 79.7% をカバーし、冗長度は 113.8 倍と RNA-seq 解析としては十分な結果が得られた。これらの結果を、グラフィカルに表示できるように CFGD に掲載し、糸状菌分子生物学コンファレンスの開催に合わせて公開する予定としている。また、同様の RIB40 株を用い米麹を作成した時の遺伝子発現について、麹菌 DNACHIP によりマイクロアレイ解析を行ったものも公開しているのでご参照いただきたい。なお、麹菌遺伝子のアノテーションの更新についても今後取り組む予定としている。

RNA-seq analysis of *Aspergillus oryzae* and update of Comparative Fungal Genome Database

Kazuhiro Iwashita¹, Akiko Shimahara¹, Yasuo Uemura², Osamu Yamada¹ (1 NRIB, 2 Genaris, Inc.)

P-9

ラクダ由来一本鎖抗体可変部位 V_{HH} の麹菌 *Aspergillus oryzae* による分泌生産

青木 淳一¹, 田淵 聡一郎¹, 岡崎 文美², 荻野 千秋¹, 田中 勉², 久田 博元³, 秦 洋二³, 近藤 昭彦¹

(¹神戸大院・工・応化, ²神戸大・先端融合研究環, ³月桂冠・総研)

【目的】ラクダ科動物が産生する一本鎖抗体の可変部位 (V_{HH}) は, シンプルな構造と高い熱安定性を有することから, 次世代型抗体としてターゲティング治療薬などへの応用が期待されている。本研究では, 安全性が広く認知され, 高いタンパク質生産能力を有する麹菌を用いた V_{HH} 分泌生産系の構築を試みた。

【方法】癌細胞に過剰発現している上皮増殖因子受容体 (EGFR) に対して, 特異的結合能を有する抗 EGFR-V_{HH} をコードする遺伝子を, 麹菌由来タカアミラーゼ A のシグナルペプチド (sTAA) 遺伝子の下流に連結した。構築した遺伝子を麹菌のゲノム中に組み込み, *sodM* プロモータ制御下で発現させた。GPY 液体培地中, 30 °C, 150 rpm で 10 日間培養を行い, 抗 EGFR-V_{HH} の分泌生産量の経時変化をウェスタンブロット法により解析した。EGFR 結合能は, ELISA 法およびヒト扁平上皮癌 A431 細胞への結合性により評価した。

【結果】培地中への抗 EGFR-V_{HH} の分泌生産量は約 80 mg/L に達した。培養上清中から精製した抗 EGFR-V_{HH} は, ゲル濾過クロマトグラフィーで単一のピークを示し, V_{HH} に特有の遠紫外円偏光二色性 (CD) スペクトルを示したことから, 会合体を形成しておらず, 正しい構造を有する事が推察された。また, 糖鎖付加は認められず, EGFR 特異的な結合能を示し, さらに EGFR を高発現している A431 細胞への結合性を有した。以上の結果から, 組換え麹菌により機能を有する V_{HH} が分泌生産されたことが明らかとなった。

Production of camel variable heavy chain antibody fragment V_{HH} by *Aspergillus oryzae*

Jun-ichi AOKI¹, Soichiro TABUCHI¹, Fumiyoshi OKAZAKI², Chiaki OGINO¹, Tsutomu TANAKA², Hiromoto HISADA³, Yoji HATA³, Akihiko KONDO¹ (¹Dept. Chem. Sci. Eng., Grad. Sch. Eng., Kobe Univ., ²Org. Adv. Sci. Tech., Kobe Univ., ³Res. Inst., Gekkeikan Sake Co.)

P-10

麹菌 *A. oryzae* におけるオートファジー制御による異種タンパク質生産性の向上

菊間隆志¹, 尹 載宇², 丸山潤一¹, 北本勝ひこ¹ (¹東大院・農生科, ²啓明大学校・薬)

【目的】オートファジーは真核生物に広く保存された細胞内分解機構であり, 栄養飢餓時の生存戦略として機能するほか, 発生や分化, 免疫応答, 細胞死などにも重要な役割を果たしている。我々は以前, *A. oryzae* において S-S 結合を欠損した変異型 α -アミラーゼを発現させると, オートファジー依存的に液胞へ取り込まれることを明らかにした¹⁾。これは, オートファジーが異種タンパク質生産におけるボトルネックのひとつであることを示唆している。本研究は, *A. oryzae* による異種タンパク質の効率的な生産を目的とし, オートファジーの制御による異種タンパク質高分泌生産株の育種を行った。

【方法・結果】オートファジーの誘導に関与する *Aoatg1* および *Aoatg13*, オートファゴソームの形成に必要な *Aoatg4* および *Aoatg8*, オートファジックボディ崩壊に必要な *Aoatg15*, 以上 5 つのオートファジー関連遺伝子について破壊株を作製した。それぞれの遺伝子破壊株で異種タンパク質のモデルとしてウシ・キモシンを発現し, 培地中の生産量を測定した。その結果, *Aoatg15* 以外の 4 つのオートファジー関連遺伝子の破壊株において最高で約 3 倍のキモシン生産量の増加が見られた。しかし, オートファジー欠損株は通常の培地での増殖は野生株と差はないものの, 分生子形成が阻害される特徴を有している。現在, オートファジー関連遺伝子を発現抑制可能なプロモーター (*thiA* プロモーター) 下で発現させ, 分生子形成時には発現をオンにし, ウシ・キモシン生産時はオフにすることが可能な株を作製し, 培地中の生産量を検討している。

1) Kimura *et al.* (2011) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 406: 464-470

Highly efficient production of heterologous proteins by control of autophagy in *Aspergillus oryzae*

Takashi Kikuma¹, Jaewoo Yoon², Jun-ichi Maruyama¹, Katsuhiko Kitamoto¹

(¹Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo, ²College of Pharmacy, Keimyung Univ.)

P-11

麹菌 *A. oryzae* 由来キシラナーゼの網羅的クローニングと発現生産

久田博元¹, 波部悦子¹, 塩田和功¹, 坂東弘樹¹, 堤浩子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・応用生命)

【目的】食料と競合しない非可食性バイオマスから前処理・酵素処理・微生物発酵によりバイオエタノールを生産する事は持続性社会の実現にとっても重要である。市販セルラーゼ剤のみではセルロースを効率よく可溶性セロオリゴ糖にまで分解できない事が多い。これまで我々は転写因子 *AoxlnR* 遺伝子高発現麹菌の培養液上清を市販酵素剤に添加することにより、前処理稲ワラの酵素分解が促進される事を明らかにしてきた。そこで本培養液上清に含まれる酵素群のうち鍵となる酵素を同定する事を目的とした。【方法】*AoxlnR* 遺伝子高発現株の培養上清を 1 次元電気泳動で分離後、主要なバンドについて LC-MS/MS 分析およびマスコット検索を行った。出現頻度の高い酵素群については、CAZy database から網羅的にアイソザイムをコードする遺伝子群の抽出を行った。得られた情報から各遺伝子の発現コンストラクトを作製し、麹菌 *A. oryzae* OSI1013 株に導入した。【結果】LC-MS/MS 分析およびマスコット検索の結果、キシラナーゼ群が多く発現生産している事が明らかとなった。データベースを検索した結果、既知のキシラナーゼ遺伝子が 4 種類、推定遺伝子が 4 種類存在することが明らかとなった。これら 8 種類の遺伝子の発現系を構築し、それぞれ形質転換体を得た。各培養上清を SDS-PAGE により確認した結果、全ての目的タンパク質が生産されている事が明らかとなった。幾つかの推定遺伝子のタンパク質にもキシラナーゼ活性が見出された。【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の一環として行われたものである。

Expression of xylanase genes from *Aspergillus oryzae*.

Hiomoto Hisada¹, Etsuko Habe¹, Kazunori Shiota¹, Hiroki Bando¹, Hiroko Tsutsumi¹, Hiroki Ishida¹, Yoji Hata¹, Akihiko Kondo², Mitsuyoshi Ueda³ (¹Res. Inst., Gekkeikan Sake Co., ²Dept. Chem. Sci. Eng., Kobe Univ., ³Div. Appl. Life Sci., Kyoto Univ.)

P-12

クエン酸生産糸状菌 *Aspergillus niger* における oxaloacetate hydrolase 遺伝子(*oahA*)の破壊と高発現によるシュウ酸生産経路の検証

小林慶一, 本田裕樹, 服部貴澄, 桐村光太郎 (早大・理工・応化)

【目的】糸状菌 *Aspergillus niger* によるクエン酸生産におけるシュウ酸の副生は、クエン酸生産量の低下や精製工程の煩雑化などの原因となる。本研究では、*A. niger* におけるシュウ酸生成経路の検証を目的として、*A. niger* WU-2223L 由来 oxaloacetate hydrolase(OAH) 遺伝子 *oahA* をクローニングした。さらに *oahA* 破壊株と高発現株を作製し、クエン酸生産量とシュウ酸生産量について検討した。

【方法および結果】クエン酸生産糸状菌 *A. niger* WU-2223L 由来 *oahA* は 2 つのイントロンを含む全長 1,232bp の遺伝子領域から成り、341 個のアミノ酸残基をコードしていた。*oahA* 破壊株(DOAH-1)は *oahA* の一部を欠失させた *oahA* 破壊用プラスミドを用いて、WU-2223L を宿主としたプロトプラスト-PEG 法により作製した。DOAH-1 においては *oahA* の転写および OAH の活性が消失し、クエン酸生産条件においてシュウ酸を生産しないことを確認した。*oahA* 高発現株(EOAH-1)は糸状菌用高発現プロモーター-P-No8142 下流に *oahA* を連結させた構造のプラスミドを用いて、WU-2223L を宿主としたプロトプラスト-PEG 法により作製した。EOAH-1 においては、*oahA* の転写量とともに OAH 比活性が最大 35 倍まで増加し、炭素源として 30 g/l のグルコースを含む培地での 12 日間培養にてシュウ酸生産量が 28.9 g/l(収率 96%)に達した。以上より、*A. niger* WU-2223L におけるシュウ酸生産が OAH によるオキサロ酢酸の加水分解に由来するもので、*oahA* 高発現によりクエン酸からシュウ酸への発酵転換が可能なることを明らかにした。

Disruption and overexpression of oxaloacetate hydrolase gene (*oahA*) in citric acid-producing *Aspergillus niger*

Keiichi Kobayashi, Yuki Honda, Takasumi Hattori, Kohtaro Kirimura

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

P-13

デンプン質除去小麦フスマを用いた麹菌発酵での可溶化に関する研究

鈴木晃¹, 和田真人¹, 中村司¹, 佐野元昭¹, 尾関健二¹, 大箸信一¹, 金子明裕²
(¹金沢工大・ゲノム研, ²日清ファルマ)

【目的】小麦は、平成 21 年で 570 万トンが食糧用として流通しており、小麦フスマとして年間 50 万トン以上排出され、ほとんどが食品バイオマスの廃棄物として扱われている。アラビノース・キシロースの可溶化には、小麦フスマを培地とした麹菌培養では、小麦フスマ内のデンプンによってアミラーゼ系酵素が誘導されるため、ヘミセルロース分解に関連する酵素の発現が隠れ、プロテオーム解析が困難であった。そこで本研究では、小麦フスマに含まれているデンプン質を除去し、最適な酵素処理条件での機能性糖の可溶化向上、および可溶化に関連する酵素の遺伝子群の同定を目的とした。

【方法および結果】クエン酸とオートクレーブによってデンプン質を除去し、標準の小麦フスマ培地（標準）から、デンプン質除去小麦フスマ培地（AC+Wash）が調製できることが分かった。そして、標準と AC+Wash の培地でのマイクロウェブの前処理を行なうことによる可溶化の変化を調べた。標準の小麦フスマにマイクロウェブ処理を行なっても可溶化率に変化は見られなかったが、AC+Wash の小麦フスマにマイクロウェブ処理を 1 分間行なうことで、既知キシラナーゼ酵素によるキシロース可溶化率が向上した。また、麹菌培養においてのタンパク質を比較したところ、プロテオーム解析では新規の酵素が数種見つかり、DNA マイクロアレイ解析では発現量が 27 倍高い既知のキシラナーゼ遺伝子、および新規の β グルカナーゼが 3 種類見つかった。

Study on solubilization by the *Aspergillus oryzae* fermentation using the starch removal wheat sliding paper-door

Akira Suzuki¹, Masato Wada¹, Tsukasa Nakamura¹, Motoaki Sano¹, Kenji Ozeki¹, Siniti Ohashi¹, akihiro kaneko²

(¹KIT, ²nissin pharma)

P-14

液体培地で高生産する麹菌機能未知タンパク質（25kDa）遺伝子の解析と利用

石崎浩章, 粟倉泰輔, 手取屋桃子, 佐野元昭, 尾関健二, 大箸信一（金沢工大・ゲノム研）

【目的】麹菌RIB40株を用いたYPD液体振盪培養で高生産されるタンパク質を見出し、培養初期から後期まで安定して菌体外に分泌生産されることを報告した。今回、本タンパク質遺伝子においてアルカリ条件下で応答する配列が見つかったので、アルカリ条件下での培養における遺伝子の発現量、および生産性の検討を行った。

【方法および結果】本タンパク質は、YPD (Yeast Extract, Bact Peptone, D-Glucose) 液体培地よりもグルコース - トリプトン液体培地(高純度培地)の方が純度良く生産されることが分かった。また、本タンパク質の生産量が多い培養条件は、デキストリン - Yeast extract液体培地(高生産培地)の生産量が多いことが分かった。全ての培地において、アルカリ条件下における培養の結果、アルカリ側で本タンパク質遺伝子の発現量が多く、また本タンパク質が高生産されることが分かった。現在、本タンパク質遺伝子と α - アミラーゼ遺伝子の発現量とタンパク質の蓄積量を比較している。また、本タンパク質をキャリアータンパク質として用いた、異種タンパク質生産系の検討を目指している。

Analysis of 25kDa protein gene on *Aspergillus oryzae* liquid culture.

Hiroaki Ishizaki, Taisuke Awakura, Momoko Tedoriya, Motoaki Sano, Kenji Ozeki, Shiniti Ohashi

(KIT, Univ. GENOMU Labo.)

P-15 (O-24)

実用麹菌株のゲノム進化と各醸造産業への適応

伊藤 岳^{1,2}, 妹尾悠平^{1,2}, 澤村恒子², 徳岡昌文², 磯谷敦子², 山田 修², 岩下和裕^{1,2} (1 広島大院・先端研, 2 酒総研)

【目的】清酒や醤油といった各醸造製品の生産現場では、各製品の製造に適した多様な菌株（実用麹菌株）が使用されており、この選抜の歴史は、麹菌側からみると製品製造に適した特性を持つようゲノムが進化したものが選抜されて来たと考えられる。これまでに我々は、実用麹菌株 55 株についてゲノムアレイ情報に基づく系統解析を行い、これらの菌株が 9 つの主な系統にグループ化され、各系統とその産業用途には関連があることを明らかにした。そこで本研究では、アレイ解析を行った 55 株について製麹及び清酒醸造を行い、その醸造特性について網羅的に解析し、ゲノムアレイ情報との相関について解析することを目的とした。

【方法・結果】まず、各菌株を精米歩合 40%の山田錦 α 化米(A40Y)と 60%の山田錦蒸米(S60Y)を用いて、それぞれ異なる培養条件において生育させた米麹の作製を行い、清酒製造に重要な役割を果たす米麹中の酵素活性及び菌体量を測定した。その結果、グルコアミラーゼをはじめとした各酵素力価と各系統との間に相関が見られた。また、A40Y 条件と S60Y 条件では、活性値そのものには違いが見られたが、全体的な傾向についてはほぼ同様の比率を示した。次に各菌株により作成した米麹を用いて小規模の清酒製造を行い、清酒醸造に関する特性の解析を行った。その結果、発酵経過や生成酒の香り成分等で各系統とその値に相関が見られた。さらに、これらのデータを基に多変量解析を行ったところ、各菌株はゲノムアレイ情報に基づく系統解析とほぼ一致する結果を示した。以上の結果から、麹菌のゲノム構造と醸造上の特性には大きな関連があることが明瞭に示された。

Evolution of industrial *Aspergillus oryzae* genome and its adaptation to the fermentation industries

Gaku Ito^{1,2}, Yuhei Senoo^{1,2}, Tuneko Sawamura², Masahumi Tokuoka², Atsuko Isogai², Osamu Yamada², Kazuhiro Iwashita^{1,2} (1 Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ., 2 NRIB)

P-16

糸状菌類で広く保存された機能未知遺伝子の麹菌での解析

富川 史子², 井丸 直¹, 寺戸志保¹, 池田 優理子², 後藤 正利, 岩下 和裕^{1,2} (1 広島大院・先端研, 2 酒総研, 3 九大院農)

麹菌及び他の糸状菌の全ゲノムシーケンス解析の結果、50%以上の遺伝子が機能未知である事が明らかとなった。また、これまでの比較ゲノム解析の結果、これらの機能未知遺伝子の多くが様々な糸状菌類で保存されていることが明らかとなっている。麹菌の解析で、これらの機能未知遺伝子は米麹等で発現していることが確認されたことから、これらの保存された機能未知遺伝子は、糸状菌に共通で固有の生物分子システムに関与する事が示唆された。そこで糸状菌類に保存されていて、且つ米麹で高発現している麹菌遺伝子について、301 遺伝子を解析対象として選抜した。さらに Uniprot に対する BLAST 解析で、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 257 遺伝子のうちランダムに 156 遺伝子を選択し、破壊カセットを取得した 147 遺伝子で遺伝子破壊を試みた。得られた株で遺伝子破壊の確認を行った結果、ホモ・ヘテロを含めて 130 遺伝子の破壊成功株を得ている。これらについて、必須と示唆される遺伝子や、形態観察により特徴的な表現型を示す遺伝子が見いだされたので報告する。

Analysis of *Aspergillus oryzae* genes conserved among filamentous fungi but not characterized the functions.

Humiko Tomikawa², Nao Imaru¹, Shiho Terado¹, Yuriko Ikeda², Masatoshi Goto³, Kazuhiro Iwashita^{1,2}
(¹ AdSM, Hiroshima Univ, ² NRIB, ³ Kyushu Univ)

P-17

米麴高生産タンパク質遺伝子破壊株の醸造上の特性について

花田照明^{1,2}, 福原真一郎^{1,2}, 下本順子², 河野美乃里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】当研究室において普通用米麴と大吟醸用米麴のプロテオーム解析が実施され、160 個の遺伝子(内 1 遺伝子がイネ由来)が米麴タンパク質として同定されている。これまでに、我々のグループではこれらの遺伝子の中から、55 遺伝子について破壊株を作成し、生育や形態形成などについて解析を行ってきた。そして本研究では、これまでに得られている遺伝子破壊株を用いて、破壊した遺伝子の製麴及び清酒製造上の機能について明らかにする事を目的とした。

【方法・結果】各遺伝子につき 2 株以上の独立した遺伝子破壊株を使用し、製麴と小仕込み試験を行い解析を行った。まず初めに製麴を行い、米麴における遺伝子破壊株を評価するため、菌体量、総タンパク質量、各種酵素活性の定量を行った。その結果、ほとんど生育が出来なくなる破壊株が 3 遺伝子、顕著に生育が抑制されるものが 6 遺伝子存在した。また、ほとんどの菌株では菌体量と各種酵素活性値に高い相関性が見られた。しかし、コントロールと比較し、菌体量は変わらず、酵素活性が減少しているものが 1 遺伝子存在した。また、グルコアミラーゼ B 遺伝子(*glaB*)破壊株においてはグルコアミラーゼ活性が顕著に減少し、 α -アミラーゼ、酸性プロテアーゼ活性が増大することが明らかとなった。

続いて 15°C で 20 日間の小仕込み試験を行い、もろみ中の炭酸減量の測定、および製成酒の一般成分(日本酒度・アミノ酸度・酸度・エタノール量)、香氣成分、アミノ酸組成、有機酸組成の解析を行った。米麴でほとんど生育が見られなかった 3 遺伝子のうち、2 遺伝子については僅かに発酵が見られた。また、これらとは別に発酵が遅れが見られたものが 3 遺伝子、エタノール量が 1%以上増加するものが 3 遺伝子存在した。これらを除くその他の遺伝子では香氣成分、酸度・アミノ酸度、日本酒度に関して、顕著な違いは観察できなかった。

現在、醸造上の特性を解析した結果、興味深い結果が得られたものについてさらに研究を進めている。

Functional characterization of RKP (Rice koji protein) disruptants in sake brewing procedure

Teruaki Hanada^{1,2}, Shinichiro Fukuhara^{1,2}, Junko Shitamoto², Minori Kono², Kazuhiro Iwashita^{1,2}, Osamu Yamada²

(1 Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ., 2 NRIB)

P-18

へム合成酵素 porphobilinogen deaminase は *Aspergillus nidulans* を nitrosative stress から保護する

周 勝敏, 鳴神寿昭, 行木弥鈴, 上村曜介, 星野貴行, 高谷直樹 (筑波大院・生命環境)

微生物の活性化窒素物質(RNS)に対する耐性化とその機構は医学・農学分野で高い関心を持たれている。細菌と酵母の RNS 耐性化機構に関する研究は盛んに進められているが、カビのそれに関する研究は極めて少ない。本研究はカビの新規な RNS 耐性化遺伝子を発見し、その耐性化機構を解明することを目指している。そこで、*A. nidulans* の遺伝子ライブラリーの導入の手法によって、RNS 耐性を増強する遺伝子 *AN0121* が単離された。*AN0121* はへム合成酵素 porphobilinogen deaminase (PBG-D)をコードしている遺伝子である。細胞局在性を調べた結果、PBG-D は細胞質に存在していた。PBG-D 高発現株 (PD1) の生育は野生株 (WT) と比較して高い RNS 耐性を示し、PBG-D 発現抑制株 (ALC) の生育は WT より低い RNS 耐性を示した。また、*AN0121* の発現は RNS によって誘導された。菌体内のへムの合成量は PBG-D の発現量に依存することも明らかとなった。カビにおいて、Flavohemoglobin (FHb) と nitrite reductase (Nir)は RNS 耐性化に関わるへム酵素であることが知られている。WT, PD1, ALC 株の FHb と Nir の活性を比較したところ、FHb と Nir の活性の強さは PD1>WT>ALC であった。以上のことから、PBG-D は RNS に応答してへムの合成を促進し、へム含有 RNS 解毒酵素である FHb と Nir を活性化することによって、生育を RNS 化させると考えられた。

Heme-biosynthetic porphobilinogen deaminase protects *Aspergillus nidulans* from nitrosative stress.

Shengmin Zhou, Toshiaki Narukami, Misuzu Nameki, Yosuke Kamimura, Takayuki Hoshino, Naoki Takaya

(Graduate School of Life and Environmental Sciences, Univ. of Tsukuba)

P-19

欠失変異体を用いた麹菌 AoSO タンパク質のストレス応答性凝集機構の解析

佐伯 圭, Christopher Sarazar ESCAÑO, 丸山 潤一, 北本 勝ひこ (東大院・農生科・応生工)

【目的】 SO/Pro40 は真正子囊菌綱に特異的に存在するタンパク質であり、有性生殖や菌糸融合に関与することが報告されている。麹菌 *Aspergillus oryzae* もこれと相同性を有するタンパク質 AoSO をもち、我々は AoSO がストレスに応答して隔壁孔に凝集することを初めて明らかにした¹⁾。このことから、AoSO が隔壁孔を介した細胞間連絡をストレス依存的に制御している可能性が示唆された。しかし、AoSO がストレス応答性の凝集を示す機構については不明である。そこで今回は、AoSO タンパク質の各領域を欠失させた変異体を作製し、ストレス応答性の凝集および隔壁孔への局在に必要な領域の同定を試みた。

【方法および結果】 AoSO に EGFP を融合したタンパク質を発現させ、細胞内の AoSO の挙動を蛍光顕微鏡によって観察した。1195 アミノ酸から成る巨大な AoSO タンパク質を効率良く解析するため、まず実験操作の簡便な出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用い、数多くの欠失変異体を発現・スクリーニングする方法を採用した。*S. cerevisiae* の細胞内において AoSO-EGFP がストレスに応答して点状の凝集構造を形成することを指標に、AoSO の 556-1146 アミノ酸の領域がストレス応答性の凝集に必要かつ十分であることが確認された。次に、*A. oryzae* においてこの欠失変異体 AoSO[556-1146]を EGFP と融合して発現させた結果、細胞質にストレス応答性の凝集が観察されたが、隔壁孔には見られなかった。現在、AoSO が隔壁孔へ特異的に凝集するために必要な領域の同定を試みている。

1) J. Maruyama *et al.* (2010) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Vol. 391, 868-873

Deletion analysis of *A. oryzae* AoSO protein for its aggregation mechanism in response to stresses

Kei SAEKI, Christopher Sarazar ESCAÑO, Jun-ichi MARUYAMA, Katsuhiko KITAMOTO

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

P-20

Aspergillus nidulans における *ypdA* 遺伝子発現制御株の解析

緑川裕良¹, 萩原大祐^{2,3}, 吉見啓², 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(現)千葉大・真菌医)

His-Asp リン酸リレー情報伝達系はバクテリアから高等植物にまで保存された普遍的な環境応答機構であり糸状菌でも広く保存されている。我々は、これまでに *Aspergillus nidulans* の高浸透圧応答経路について解析しヒスチジンキナーゼ NikA リン酸転移中間因子 YpdA レスポンスレギュレーター SskA および SrrA が浸透圧応答、酸化ストレス応答などに関与していることを明らかにしてきた。また遺伝学的に欠損が致死であることが証明されている YpdA について *alcA* プロモーターにより *ypdA* 遺伝子の発現を制御可能な Conditional-*ypdA* 株 (CypdA 株) を造成し、YpdA の機能について解析を進めてきた。しかしながら、YpdA 欠損が致死となる原因の特定には至っていない。これまでの解析では、FGSC A89 株を親株とした CypdA 株を使用してきた。本株は利用できる栄養要求性マーカーが乏しく、また *ypdA* の発現制御が不十分であることも一因となり、さらなる機能解析が困難になりつつあった。そこで今回、YpdA の機能についてさらに理解を深めるため、交配により多重変異の作出が可能であり、複数の選択マーカーを利用できる ABPU1 株を親株とした CypdA 株の造成を試みた。また、*alcA* プロモーターの連結配列を見直すことにより制御状態が良好な CypdA 株を取得したので、その表現型の解析結果について報告する。本株は *ypdA* 発現抑制条件においてのみ顕著な生育阻害を示し、*ypdA* 発現抑制下での HOG 経路の活性化も認められた。現在、本株を親株として *sskA* および *srrA* 遺伝子の破壊を試みるとともに、浸透圧ストレスおよび酸化ストレスに対する応答についても解析しており、YpdA 欠損が致死となるメカニズムについて考察している。(本研究は生研センターより支援を受けた。)

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

Yura Midorikawa¹, Daisuke Hagiwara^{2,3}, Akira Yoshimi², Keietsu Abe^{1,2}

(¹ Grad. Sch Agric. Sci., Tohoku Univ., ² Tohoku Univ. NICHe, ³ Present address: MMRC, Univ. of Chiba)

P-21

糸状菌 *Aspergillus nidulans* のヒスチジinkinナーゼ PhkA, PhkB の機能解析

佐古知美, 山崎ゆかり, 金丸京子, 加藤雅士¹, 小林哲夫 (名大院・生命農, 名城大・農¹)

【目的】糸状菌 *A. nidulans* には 15 種のヒスチジinkinナーゼ (HK), 1 種のリン酸転移中間因子 Hpt, 4 種のレスポンスレギュレーター (RR) が存在する。15 種の HK 遺伝子のうち *phkA*, *phkB* はそれぞれ *Schizosaccharomyces pombe* の *phk1/mak2*, *phk2/mak3* 及び *phk3/mak1* と高い相同性を示す。これらの 3 つの HK は *S. pombe* において有性生殖, 酸化ストレス応答, 有糸分裂の制御に関わっていることがすでに報告されている¹⁾。本研究では, *A. nidulans* における PhkA, PhkB の生理的役割を明らかにするため, *phkA* 及び *phkB* 遺伝子破壊株と誘導発現株を作製し, ストレスに対する応答や生育の変化を観察した。

【方法と結果】2 日間培養の分生子を, 過酸化水素を含む培地にスポットし, 生育を観察したところ, *phkA* 破壊株は過酸化水素 1.5mM で, *phkB* 破壊株は 2mM において野生株と比較して酸化ストレスへの感受性が高くなった。また, 酸素制限条件において, *phkB* 誘導発現株は菌糸の伸長に変化が見られた。現在, リアルタイム PCR により, カタラーゼ遺伝子や NADPH オキシダーゼ遺伝子の発現について解析を進めている。

¹⁾ Nakamichi, N. et al. (2002) Biosci. Biotechnol. Biochem. 66(12): pp. 2663-2672

Characterization of Histidine kinase PhkA, PhkB in *Aspergillus nidulans*

Tomomi Sako, Yukari Yamazaki, Kyoko Kanamaru, Masashi Kato¹, Tetsuo Kobayashi

(Grad. Sch. of Bioagricultural Sciences, Nagoya Univ. ¹Sch. of Agriculture, Meijo Univ)

P-22 (O-1)

麹菌 *A. oryzae* の MAP キナーゼ AoFus3 と相互作用する新規タンパク質の機能解析

矢萩大貴, 丸山潤一, Özgür Bayram¹, Oliver Valerius¹, Gerhard H. Braus¹, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工, ¹ゲッティンゲン大学)

【目的】真核生物に広く保存されている MAP キナーゼは, 外部からの情報を伝達することで細胞活動を制御している。酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において, MAP キナーゼのひとつ Fus3 は有性生殖において, 接合フェロモン応答と細胞融合に関与する。糸状菌の Fus3p ホモログは有性生殖に関与することに加え, 二次代謝, 病原性等において重要な働きを有する。我々は以前, *A. oryzae* の Fus3p ホモログである AoFus3 が菌糸先端と隔壁孔に局在し, その遺伝子破壊株は菌糸成長の異常と分生子形成の低下を示すことを見出した。また, *Aofus3* 破壊株で隣接する細胞に溶菌が伝播する割合が上昇したことから, AoFus3 が隔壁孔を介した細胞間連絡にも関係することが示唆された。このような糸状菌の Fus3p ホモログの多様な機能における分子機構については, ほとんど明らかになっていない。今回, この機構を解明するため, *A. oryzae* において AoFus3 と相互作用するタンパク質の同定と機能解析を行った。

【方法・結果】AoFus3 の C 末端に TAP (Tandem Affinity Purification) タグを連結した融合タンパク質を, *Aofus3* 破壊株に発現させた。タグを用いた精製および LC/MS/MS 解析により AoFus3 との相互作用を示すタンパク質を同定し, そのなかで機能未知な 2 種のタンパク質について解析を行った。RACE 解析により遺伝子の予測範囲が正しいことを確認したのち破壊株を作製し, 表現型解析を行った結果, 両者ともに分生子形成の低下を示し, かつ各々の株で異なった菌糸形態の変化を示した。同時に EGFP 融合タンパク質を発現させて局在を解析したところ, 隔壁孔と細胞質にドット状に局在していることが観察された。現在, 上記 2 種のタンパク質と AoFus3 との機能的関係を検討している。

Identification and functional analysis of novel AoFus3 (MAP kinase)-interacting proteins in *Aspergillus oryzae*

Daiki YAHAGI, Jun-ichi MARUYAMA, Özgür BAYRAM¹, Oliver VALERIUS¹, Gerhard H. BRAUS¹, Katsuhiko KITAMOTO (Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo, ¹Georg-August-Universität Göttingen)

P-23

病原真菌 *Aspergillus fumigatus* における浸透圧応答経路の機能解析

萩原大祐, 五ノ井透, 川本進 (千葉大・真菌センター)

深在性真菌症は、主として免疫力の低下した宿主に感染するため致死率が高い。現在、利用可能な抗真菌薬は4クラスに限られ、新奇な治療薬が強く望まれている。本研究ではアスペルギルス症の主な原因菌である *Aspergillus fumigatus* において、新奇抗真菌剤の標的となりうる浸透圧応答情報伝達系の分子遺伝学的解析を行い、その可能性を評価する。

多くの酵母や糸状菌において、浸透圧応答経路は二成分制御系と HogA/SakA MAPK カスケードによって構成され、浸透圧ストレス以外にも多様な環境ストレスに対する応答を司っている。特に、HAMP ドメインリピートを N 末端側に持つヒスチジンキナーゼ NikA は、フルジオキシニルなどの農薬化合物の生育阻害効果に深く関与し、薬剤作用点であると推測されている。また、HogA/SakA MAPK は高浸透圧ストレスおよびフルジオキシニル処理によってリン酸化（活性化）し、その下流因子が発現応答する。

今回、*A. fumigatus* における浸透圧応答経路の機能を明らかにするために、NikA および SakA MAPK の遺伝子破壊株を作製した。NikA 遺伝子破壊株はフルジオキシニルに耐性を示し、高浸透圧ストレスに対して強い感受性を示した。一方 SakA 遺伝子破壊株は、野生株と同等のフルジオキシニル感受性を示し、NikA 遺伝子破壊株より弱いが高浸透圧ストレス感受性を示した。また、カタラーゼ遺伝子 *catA* の発現が SakA 依存的に高浸透圧ストレスおよびフルジオキシニルによって上昇した。これらの性質は *A. nidulans* における解析結果と相似しているが、SakA 遺伝子破壊株の分生子がストレス感受性を示さなかった点は異なった。

Functional analysis of HOG pathway in opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus*

Daisuke Hagiwara, Tohru Gono, Susumu Kawamoto

(MMRC, Chiba Univ.)

P-24

Neurospora crassa の MAK-1 及び MAK-2 MAP キナーゼの破壊株の表現型と局在解析

亀井誠之, 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、細胞壁の損傷に応答して Slt2p MAP キナーゼによって細胞壁構築 (cell wall integrity:CWI) が厳密に制御されている。昨年度、*Neurospora crassa* の MAK-1 (出芽酵母 細胞壁構築経路 Slt2p オルソログ) は、無性胞子発芽から菌糸生育過程において恒常的にリン酸化していること、MAK-2 (出芽酵母の Pheromone 応答経路 Fus3p オルソログ) が beta-1,3-glucan 合成酵素阻害剤 micafungin による細胞壁損傷処理によって顕著にリン酸化されることを報告した。*N. crassa* の 2 種類の MAP キナーゼの CWI への貢献度を明らかにするため、 $\Delta mak-1$ 株と $\Delta mak-2$ 株の種々の細胞壁損傷剤に対する感受性を調べた。両破壊株は Calcofluor White や Congo Red に対しては野生株と同等の感受性であったが、micafungin と SDS に対しては共に顕著な感受性を示した。キチン生合成阻害剤 polyoxin や nikkomycin に対しては $\Delta mak-1$ 株のみが野生株よりも高い感受性であった。次に、MAK-1 と MAK-2 の局在を調べるため、各 MAP キナーゼと GFP との融合タンパク質を産生する株を作製し、蛍光顕微鏡で観察した。*mak-1-sgfp* 株の菌糸においては、MAK-1 は細胞壁損傷ストレスの有無に関係なく核に局在していた。これは、MAK-1 の恒常的リン酸化との関連が示唆される。また、*mak-2-sgfp* 株では菌糸生育過程における MAK-2 の局在は認められなかった。 $\Delta mak-1$ 株や $\Delta mak-2$ 株は、無性胞子の形態異常や発芽の遅延、発芽管間同士の融合能の欠損が認められることから、現在、無性胞子における MAK-1 及び MAK-2 の局在性について解析を進めている。

Localization of two MAP kinases, MAK-1 and MAK-2 in *Neurospora crassa*.

Masayuki Kamei, Masakazu Takahashi, Akihiko Ichiishi and Makoto Fujimura

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

P-25 (O-3)

Aspergillus nidulans における高温条件下でのプロテインキナーゼ C によるアポトーシス誘導抑制機構の解析

片山琢也, 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。*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⁾。当研究室において作製された *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 において *pkcA* 温度感受性株の分生子では、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、発芽管の形成が見られない。さらに、このとき DNA の複製は起こるが、その後すぐ DNA が分解された²⁾。*pkcA* 温度感受性株の分生子を 42°C で培養したとき、アポトーシスを誘導した細胞に特異的に見られる活性酸素 (ROS) の蓄積、DNA の断片化が見られたことから、高温条件下において発芽時に PkcA が失活するとアポトーシスが誘導されることが示唆された。PkcA によって制御されることが示唆されている MAP キナーゼカスケードのアポトーシス制御への関与について検討するため、この MAP キナーゼカスケードの構成因子をコードする *bckA*, *mpkA* それぞれの欠失株の解析を行った。これらの欠失株は通常の培地において 42°C では生育することができなかった。さらに、これらの株の分生子を 42°C で培養したところ、ROS の蓄積、DNA の断片化が見られた。これらのことから、高温条件下において PkcA はアポトーシスの抑制に必要であり、この機能は BckA, MpkA を含む MAP キナーゼカスケードに依存することが示唆された。

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, p213

Analysis of PkcA function in the suppression of apoptosis under heat stress condition in *Aspergillus nidulans*

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

P-26

麹菌 *Aspergillus oryzae* における微小管形成中心関連タンパク質 AoApsB の機能解析

川畑絢平, 矢萩大貴, 丸山潤一, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)

【目的】動物のギャップ結合や植物の原形質連絡と同様に、糸状菌も隔壁孔を介して細胞間連絡を行う、多細胞生物として共通したシステムを有している。*Aspergillus nidulans* において微小管形成中心(microtubule-organizing center)関連タンパク質 ApsB が隔壁孔に局在するとの報告があり、細胞間連絡に関与している可能性が示唆されている。我々は以前、*A. oryzae* において MAP キナーゼ AoFus3 が隔壁孔に局在する事を発見したが、その局在パターンは ApsB と同様に隔壁孔の中心を囲うリング状であった。本研究では、MAP キナーゼと微小管形成中心関連タンパク質が隔壁孔において協同して細胞間連絡を制御しているという仮説を検証するため、*A. oryzae* における微小管形成中心関連タンパク質の機能解析を行った。

【方法および結果】*A. nidulans* *apsB* 遺伝子の配列を用いて *A. oryzae* のゲノムデータベースで BLAST 検索した結果、相同性を示す遺伝子 AO090020000040 を見出し、*AoapsB* と命名した。*AoApsB* の機能を調べるため、*AoapsB* 破壊株を作製した。寒天培地上のコロニーに水を加えて先端細胞の溶菌を誘導する低浸透圧ショック実験の結果、*AoapsB* 破壊株で隣接する細胞に溶菌の伝播する割合が増加し、*Aofus3* 破壊株と同様の結果が得られた。微小管形成中心関連タンパク質が溶菌の伝播を防ぐ機能をもつことを示したのは、本研究が初めてである。現在、*AoApsB* と *AoFus3* それぞれの隔壁孔局在に関する機能的な相互作用について解析を行っている。

Functional characterization of microtubule-organizing center component AoApsB in *Aspergillus oryzae*

Junpei KAWABATA, Daiki YAHAGI, Jun-ichi MARUYAMA, Katsuhiko KITAMOTO

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

P-27

麹菌 *A. oryzae* の持つ細胞質型ホスホリパーゼ A₂ 様タンパク質 AoPlaA の機能解析

駒井紀之, 小谷昌平, 北本勝ひこ, 有岡 学 (東大院・農生科・応生工)

【目的】ホスホリパーゼ A₂ (PLA₂) はグリセロリン脂質を加水分解し、脂肪酸とリゾリン脂質を遊離する酵素である。このうち細胞質型 PLA₂ (cytosolic PLA₂; cPLA₂) は動物において受容体刺激に応じて小胞体やゴルジ体膜からアラキドン酸を遊離し、エイコサノイド類など脂質メディエーターの産生に関与することが知られている。一方、我々は糸状菌においても cPLA₂ 様の配列が存在することを見出し、麹菌の持つ唯一の cPLA₂ 様タンパク質 AoPlaA がミトコンドリア外膜と内膜の間の膜間スペースに局在することなどを明らかにしたが、その生理機能は不明である。本研究では AoPlaA の詳細な機能解析を目的とした。

【方法・結果】AoPlaA はその局在からミトコンドリアの脂質代謝に関与する可能性が考えられた。そこで AoPlaA 高発現株・破壊株とコントロール株について粗ミトコンドリア画分を調製し、そのリン脂質組成を MS/MS 解析により比較した。その結果、AoPlaA 高発現株では 36:3 や 36:4 という鎖長の脂肪酸を持つホスファチジルエタノールアミン (PE) が減少しており、34:1 や 34:2 の脂肪酸を持つ PE が増加していた。一方、AoPlaA 破壊株においてはカルジオリピン量の増加が認められた。続いて様々な培養条件において各株の生育比較を行ったところ、グルコースを炭素源とする最少培地において AoPlaA 高発現株の生育が低下することを見出した。また、この生育低下は 15°C で培養した PD 培地においても認められた。現在、予想活性中心残基に変異を導入した AoPlaA を高発現する株を作製し、高発現株における生育の低下とリン脂質組成の変化にどのような相関が見られるかなど、さらなる解析を行っている。

Functional analysis of cytosolic phospholipase A₂-like protein AoPlaA in *A. oryzae*

Noriyuki Komai, Shohei Kotani, Katsuhiko Kitamoto, Manabu Arioka (Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo)

P-28

麹菌 *A. oryzae* における Ca²⁺非依存性ホスホリパーゼ A₂ 様タンパク質 iPlaA の機能解析

小橋口聡, 北本勝ひこ, 有岡 学 (東大院・農生化・応生工)

ホスホリパーゼ A₂ (PLA₂) はリン脂質の持つグリセロール骨格の sn-2 位のエステル結合を加水分解し、脂肪酸とリゾリン脂質を生成する酵素である。PLA₂ は主として分泌型の secretory PLA₂ (sPLA₂)、細胞質局在型の cytosolic PLA₂ (cPLA₂)、および Ca²⁺非依存型の Ca²⁺-independent PLA₂ (iPLA₂) の 3 つのタイプに分けられるが、このうち iPLA₂ は動物においては炎症反応やアポトーシスなど様々な生理機能に関与することが分かっている。我々はこれまで麹菌 *A. oryzae* の持つ 2 つの sPLA₂ (sPlaA, sPlaB) や cPLA₂ 様タンパク質 (AoPlaA) の解析を行ってきたが、今回はヒト iPLA₂ と相同性を示す *A. oryzae* iPlaA (AO090011000913) を見出し、その解析を行った。

DPY 液体培地で生育させた *A. oryzae* の cDNA をもとに、DOGAN 上の予測が正しいかを RACE 解析および PCR 解析によって検討した。その結果、*iplaA* 遺伝子はその転写開始点が予想 ORF の約 200 bp ほど上流、終結点が 300 bp ほど下流であり、DOGAN 上の予測と一致し、イントロンを 2 つ持つ全長 601 アミノ酸残基のタンパク質をコードするものと推定された。また、iPlaA-EGFP を発現する AIE 株を作製してウエスタンブロット解析を行ったところ、予想サイズである約 90 kDa の位置に EGFP 融合タンパク質のバンドが認められた。次に、AIE 株を蛍光顕微鏡で観察し iPlaA の局在を調べたところ、液胞を除く細胞質全体に分布していることが確認された。また、隔壁への局在も観察された。現在、iPlaA の機能を明らかにするため、遺伝子破壊株の作製を行っている。

Identification and characterization of putative Ca²⁺-independent phospholipase A₂-like protein iPlaA in *A. oryzae*

Sou Kohashiguchi, Katsuhiko Kitamoto, Manabu Arioka (Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo)

P-29

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-30

麹菌マルトースパーミアーゼの各種炭素源による細胞内局在変化

平本 哲也, 大道口 涼子, 田中 瑞己, 新谷 尚弘, 五味 勝也

(東北大院・農・生物産業創成)

我々は, 麹菌のデンプン分解酵素の生産において, 誘導基質であるマルトースの細胞内取込み系が重要であり, その取込みを担うマルトースパーミアーゼ(MalP)遺伝子がグルコースにより転写レベルで抑制を受けていることをすでに明らかにしている¹⁾。一方, 出芽酵母では, マルトースパーミアーゼの発現が転写レベルで抑制を受けるとともに, タンパク質レベルでエンドサイトーシス依存的に液胞へ輸送され分解を受けることが報告されている。麹菌においても同様の分解機構の存在が予想されるが, その有無は未だ不明である。そこで, 本研究では, MalP の環境シグナル応答におけるタンパク質レベルでの分解機構を解明するために, グルコースをはじめとする各種炭素源存在下における MalP の細胞内局在について解析を行った。

GFP-MalP 融合タンパク質を麹菌で発現させ, 蛍光顕微鏡観察を行ったところ, マルトース誘導条件下では主として細胞膜に GFP-MalP の局在が観察された。これにグルコースを添加すると速やかに細胞膜からの GFP 蛍光の消失と液胞への移行が認められた。また, フルクトースやマンノースの存在下においても細胞膜からの GFP 蛍光の消失が認められ, グルコースアナログである 2-デオキシグルコース, 3-メチル-O-グルコース, 6-デオキシグルコースのそれぞれに対する MalP の細胞内局在応答に差が観察された。このことから, MalP も酵母のマルトースパーミアーゼと同様にエンドサイトーシスによる分解制御を受けるものの, 糖に対する応答に違いがある可能性が示唆された。

1) Hasegawa et al. *Fungal Genet. Biol.* **47**, 1-9 (2010).

Intracellular localization of maltose permease (MalP) in response to carbon sources in *Aspergillus oryzae*

Tetsuya Hiramoto, Ryoko Daidouguchi, Mizuki Tanaka, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi

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

P-31 (O-4)

糸状菌 *Aspergillus nidulans* における α -1,3-グルカン合成酵素遺伝子 *agsB* 破壊株および *agsA*, *agsB* 二重破壊株の機能解析

稲葉梓¹, 吉見啓², 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)

我々は, *Aspergillus nidulans* の細胞壁構築シグナル伝達経路について, 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, 出芽酵母には存在しない α -1,3-グルカン合成酵素 (AGS) 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。また, 本菌における 2 種の AGS 遺伝子の機能を明らかにするため, *agsA* 破壊株, *agsB* 発現抑制株を用いて AGS 遺伝子の機能解析を進めてきた。その結果, *agsA* 遺伝子は通常生育条件下ではほとんど機能していないこと, 本菌における α -1,3-グルカンの合成には主に AgsB が関与していることが示唆されてきた。しかしながら, *agsB* 遺伝子の致死性および AGS 遺伝子完全欠損株取得の可否については明らかにされてこなかった。今回, これまで取得ができていなかった *agsB* 破壊株の造成に成功し, *agsB* 破壊株の表現型解析を行ったのでその結果について報告する。*agsB* 破壊株は, Congo Red に対する感受性の上昇など *agsB* 発現抑制株で認められた特徴的な表現型を示した。また, 細胞壁成分を抽出し, NMR 解析を行ったところ, α -1,3-グルカンのシグナルは検出されなかった。このことから, *agsB* 遺伝子は α -1,3-グルカンの合成に必須であることが強く示唆された。さらに, *agsA* 破壊株を親株とした *agsB* 破壊株の造成を試み, *Aspergillus* 属菌において初めて AGS 遺伝子完全欠損株を取得したので, この株の表現型解析の結果についても考察した。(本研究は生研センターより支援を受けた。)

Analysis of the disruptant of α -1,3-glucan synthase gene *agsB* and the double disruptant of *agsA* and *agsB* in *Aspergillus nidulans*

Azusa Inaba¹, Akira Yoshimi², Keietsu Abe^{1,2}

(¹ Grad. Sch. Agric. Sci., ² Tohoku, Univ., NICHe., Tohoku Univ.)

P-32

Aspergillus nidulans のキチン合成酵素 CsmA の菌糸内局在化におけるキネシンの役割 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 V に属するキチン合成酵素をコードする遺伝子 *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。CsmA は菌糸の生長に必須の機能を持ち、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、CsmA がキネシン 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⁾。今回、CsmA の菌糸内局在化機構について、KinA とは別のクラスのキネシンであり、菌糸先端生長に機能することが示唆されている KipA の役割を検討した。*kipA* が破壊された遺伝的背景において、野生型 CsmA の代わりに EGFP-CsmA を発現する株を作製し、EGFP-CsmA の局在を観察した結果、*kinA* 単独破壊株の場合と同様に菌糸先端における EGFP-CsmA の局在異常が観察された。また、微小管に結合したままとなる変異型キネシン EGFP-KipA^{rigor} と mDsRed-CsmA を同時に発現する株を作製し、両者の局在部位の比較を行なったところ、菌糸先端部及び菌糸先端から後方の菌糸内において、EGFP-KipA^{rigor} の局在する微小管上に mDsRed-CsmA の局在が観察された。また、CsmA-HA と EGFP-KipA^{rigor} を同時に発現する株を作製し、抗 HA 抗体を用いた免疫沈降実験により両者の物理的相互作用について検討した結果、両者の相互作用が示された。これらの結果から、CsmA の菌糸先端への局在化には KinA だけでなく KipA も関与することが示唆された。

1) 對崎ら、日本農芸化学会 2010 年度大会講演要旨集、p. 198

The roles of kinesins in the localization of chitin synthase CsmA in *Aspergillus nidulans*

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

P-33

糸状菌 *Aspergillus nidulans* における *Saccharomyces cerevisiae* CRH オルソログの機能解析

磯村幸治, 對崎真楠, 堀内裕之, 太田明德 (東京大・農・生化工)

酵母, 糸状菌等の真核微生物の細胞表層は細胞壁によって覆われており, 細胞壁はグルカン, キチン, マンナン等を主要構成成分としている。これらの細胞壁構成成分のうち, 酵母ではキチンの占める割合が 1-2%程度であるのに対し, 糸状菌では 10-30%程度であることが知られており, 糸状菌における細胞壁キチンの合成, 分解 (リモデリング) は酵母よりも厳密に制御されていると予想される。

S. cerevisiae においては, 細胞壁キチンのリモデリングに機能する因子について解析されており, それらのうちキチンとグルカンとの架橋に機能する糖転移酵素 Crh (Crh1p, Crh2p)が近年明らかとなった。一方, *A. nidulans* のゲノム中においても 5 個の CRH オルソログ(*crhA*, *crhB*, *crhC*, *crhD*, *crhE*)が存在することが明らかとなっているが, その機能は未解明のままである。

今回, *A. nidulans* A1149($\Delta nkuA$)株を親株として 5 個の CRH オルソログをそれぞれ単独破壊した株を作製し, その性質の検討を行ったところ, $\Delta crhA$, $\Delta crhB$, $\Delta crhC$, $\Delta crhE$ 株においては顕著な生育遅延や形態異常は見られなかった。一方, $\Delta crhD$ 株においては顕著な形態異常は見られなかったものの, 生育遅延が見られ, コロニー直径は野生型株の 76%程度であった。これらのことから *A. nidulans* においてこれら遺伝子が重複した機能を持つことが推定された。現在, *crh* 遺伝子の多重破壊株の作製等を進めている。

Functional analyses of CRH orthologs of *Saccharomyces cerevisiae* in *Aspergillus nidulans*.

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

P-34

糸状菌 *Aspergillus nidulans* における出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* SKT5 オルソログ AN3445 の機能解析

星 浩臣, 對崎真楠, 堀内裕之, 太田明德 (東大院・農生科・応生工)

Saccharomyces cerevisiae において, division 2 に属するクラスIVキチン合成酵素 Chs3p は, 細胞壁キチン合成の大部分を担っている。Chs3p の制御サブユニットである Skt5p は, 出芽形成時に Chs3p を bud neck の形質膜上にリクルートすること, Chs3p の活性化に関与することが示唆されている。*Aspergillus nidulans* において division 2 に属するクラスV及びVIキチン合成酵素 CsmA 及び CsmB は, 菌糸先端及び隔壁形成部位に局在して菌糸型の形態形成に重要な役割を果たす。*A. nidulans* には SKT5 のオルソログとして 3 つの遺伝子が存在する。当研究室におけるこれまでの解析の結果, その中の AN3445 の遺伝子破壊株においてのみ野生型株と比較して菌糸の多分岐, 細胞壁構造の異常等が観察された。また EGFP-AN3445 は CsmA あるいは CsmB と同様に菌糸先端及び隔壁形成部位に局在が観察され, AN3445 が division 2 キチン合成酵素の機能制御に関与する可能性が考えられている¹⁾。今回, AN3445 の破壊株において EGFP-CsmA の菌糸先端における局在を観察した結果, 野生型株と比較して菌糸先端付近の形質膜上における局在の割合が低下し, 細胞質中におけるドット状の局在等がより高頻度で観察された。一方, CsmA-FLAG 及び EGFP-AN3445 を同時に生産する株の細胞抽出液を用いて免疫沈降法により CsmA と AN3445 との相互作用の有無を検討したところ, 両者間に相互作用は確認されなかった。これらの結果から, AN3445 の破壊は菌糸先端における CsmA の局在に一部影響を与えるものの, その影響は間接的であることが示唆された。

1) 西出ら, 日本農芸化学会 2010 年度大会講演要旨集, p. 212

Functional analysis of a *Saccharomyces cerevisiae* SKT5 ortholog in *Aspergillus nidulans*

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

P-35

麹菌 *A. oryzae* における選択的オートファジー関連遺伝子 *Aoatg11* の解析

田所隆之, 菊間隆志, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)

【目的】オートファジーは、細胞質成分を隔離膜で囲い込むことによってオートファゴソームを形成し、リソソーム/液胞で分解する機構であり、真核生物に広く保存されている。近年、酵母において特定のタンパク質やオルガネラを特異的に認識し、液胞へ輸送する選択的オートファジーの存在が確認されている。しかし、*A. oryzae* など糸状菌ではその存在は確認されていない。オートファジー関連タンパク質の中で選択的オートファジー特異的に機能するタンパク質が見つかっており、酵母 *S. cerevisiae* の Atg11p は選択的に認識した基質のオートファゴソーム形成の場への輸送に機能することが報告されている。本研究では、*A. oryzae* における選択的オートファジーの存在を明らかにすることを目的とし、そのホモログである *AoAtg11* の機能解析を行った。

【方法・結果】*Aoatg11* 遺伝子破壊株を作製し、最少培地における生育を観察したところ、生育の差や、これまで解析されているオートファジー欠損株に特徴的な気中菌糸および分生子の形成阻害は見られなかった。また、*A. oryzae* におけるオートファジーのマーカータンパク質である *AoAtg8* の EGFP 融合タンパク質を破壊株に発現させたところ、野生株と同様、液胞への蓄積が観察され、非選択的オートファジーは正常に機能していることが分かった。これらの結果より、*AoAtg11* は非選択的オートファジーではなく、選択的オートファジーに機能するタンパク質であることが示唆された。現在、*Aoatg11* 破壊株において、選択的オートファジーの基質であるアミノペプチダーゼ I (*AoApe1*) やミトコンドリア、ペルオキシソーム、核の液胞への取り込みを観察中であり、選択的オートファジーにおける *AoAtg11* の機能解析を進めている。

Analysis of *Aoatg11* related to selective autophagy in *Aspergillus oryzae*

Takayuki Tadokoro, Takashi Kikuma, Katsuhiko Kitamoto (Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo)

P-36

Magnaporthe oryzae の分化様式とオートファジー機構による物質代謝の関連性

井上加奈子¹⁾³⁾, 目黒絃子¹⁾, 兼松聡子²⁾³⁾, 朴杓允¹⁾³⁾, 池田健一¹⁾³⁾

(神戸大院¹⁾・果樹研²⁾・生研センター³⁾)

Magnaporthe oryzae は、発芽過程の環境条件によって異なる分化様式をとる。接地面が疎水性の場合、附着器を分化させるが、親水性では発芽管を伸長し続ける。これまでの研究から、附着器を分化させた胞子では、オートファジーを介して産生されたエネルギー源を利用して成熟した附着器が形成されることが分子生物学的に示されてきた。しかしながら、未だ胞子内のオートファジー小胞の実態を捉えるに至っていない。我々は、性質の異なる接地面で発芽させた胞子の超微細構造と分化に伴う貯蔵物質の動きを解析した。附着器を形成する疎水面上で 12 時間培養した胞子では、液胞が融合・膨大化し、その内部には脂肪滴等を含むオートファジーに特徴的な二重膜小胞が観察された。また、24 時間培養した胞子では、ほとんどの細胞小器官が消失していた。一方、附着器を形成しない親水面上の胞子では、液胞内に二重膜小胞は観察されず、細胞小器官は保持され、新たに隔壁や Woronin 小体が形成されていた。また、胞子の貯蔵エネルギー源の転送はほとんど認められなかった。これらの結果は、附着器を分化させる環境条件下の胞子では、オートファジー機構による貯蔵エネルギーの代謝と、その転送が促されることを強く支持している。

Differentiation in *Magnaporthe oryzae* regulated metabolism in conidia via autophagy

Kanako Inoue¹⁾³⁾, Satoko Kanematsu²⁾³⁾, Pyoyun Park²⁾³⁾, Kenichi Ikeda²⁾³⁾

(Kobe Univ.¹⁾, Natl. Inst. Fruit Tree Sci.²⁾, Bio-oriented Tech. Res. Adv. Inst.³⁾)

P-37

担子菌ウシグソヒトヨタケにおけるオートファジー関連タンパク質 CcAtg8 の解析

渡邊 彰, 弥生貴裕, 吉村昌徳, 麻田恭彦 (香川大・農・応生科)

オートファジーとは、二重膜構造を取るオートファゴソームを介した大規模な細胞内分解システムである。近年、各種真核生物におけるオートファジーの解析から、オートファジーが栄養飢餓に対する適応だけでなく、細胞内タンパク質やオルガネラの品質管理、細胞分化、感染細菌の除去など、様々な生命現象に関与することが明らかとなってきた。

本研究では、モデル担子菌キノコであるウシグソヒトヨタケ (*Coprinopsis cinerea*) 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、オートファジーの進行にともない液胞に取り込まれるオートファゴソーム結合タンパク質 CcAtg8 に着目し、解析を行った。これまでのところ、緑色蛍光タンパク質を融合させた CcAtg8 の局在解析から、ウシグソヒトヨタケにおいては窒素源飢餓条件下およびラパマイシン存在下において、オートファジーが誘導されることを示唆している。今回、さらにオートファジーの誘導条件について探索を進めた結果、上記条件の他、培地中への EDTA 添加条件下においても、液胞中への緑色蛍光の蓄積が観察され、同条件においてオートファジーが誘導されることが示唆された。また、ウシグソヒトヨタケにおける CcAtg8 の生物学的機能を明らかとするため、CcAtg8 のノックダウン解析についても検討した。細胞内で dsRNA を産生するような RNAi 誘導ベクターを構築し、マーカー遺伝子と共に共形質転換法により、ウシグソヒトヨタケ染色体中に導入した。その結果、得られた発現抑制株は、親株に比べると貧弱な菌糸生育を示した。現在、得られた株の諸性質についてさらに解析を進めている。

Analysis of CcAtg8 involved in autophagy of *Coprinopsis cinerea*

Akira Watanabe, Takahiro Yayoi, Masanori Yoshimura, Yasuhiko Asada

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

P-38

担子菌 *Coprinopsis cinerea* のタンパク質分泌へのミオシンの関与

橋本広祐¹, 横田悦雄², 新免輝男², 吉田誠¹ (¹東京農工大・農,²兵庫県大・生命理)

これまでに演者らのグループでは、担子菌 *Coprinopsis cinerea* が生産する植物細胞壁多糖類分解酵素の酵素学的機能について研究を行ってきた。これらの酵素の分泌機構に関する知見は、本菌の植物細胞壁分解機構を理解する上で重要であるが、その詳細は不明である。動物や酵母などで、分泌に関与する因子の一つとしてアクチン系モータータンパク質であるミオシンが特定されていることから、演者らは本菌のタンパク質分泌においてもミオシンが関与しているのではないかと考えた。そこで本研究では、*C. cinerea* を研究対象として、ミオシン活性阻害剤の添加が本菌のタンパク質分泌に与える影響について調査した。また *C. cinerea* で発現しているミオシンの運動活性や細胞内局在についても解析を行った。

Involvement of myosins in protein secretion by basidiomycete, *Coprinopsis cinerea*

Kohsuke Hashimoto¹, Etsuo Yokota², Teruo Shimmen², Makoto Yoshida¹

(¹Fac. of Agri., Tokyo Univ. of Agri. & Tech., ²Grad. Sch., Life Sci., Univ. Hyogo)

P-39

担子菌ウシグソヒトヨタケの傘成長に関わる遺伝子 *cag1* の解析

村口 元, 煙山和樹 (秋田県立大・生物資源)

担子菌ウシグソヒトヨタケの子実体形成過程において、子実体原基の傘部分が成長せずに子実体原基の状態で止まってしまう突然変異体を見出した。子実体原基の縦断切片を作って組織を観察したところ、傘部分が石突上で膨らみはしているものの、子実層が分化していないように思われた。その突然変異体を野生型株と交配し、F1 子孫における表現型の分離比を調べたところ、野生型：突然変異体=47：65 (1：1、 $\chi^2=2.89$, $P>0.05$) に分離したので、1 遺伝子支配の形質であることが示唆された。そこで、原因遺伝子を *cap-growthless1* (*cag1*) と名付け、*cag1* 遺伝子座のマッピングを行った。F1 子孫から野生型株 20 株と突然変異株 20 株を選び、ゲノム DNA を抽出して鋳型とし、RAPD PCR を行い、表現型と連鎖する RAPD マーカーを探したところ、第 IX 染色体上の G13-900B マーカーが組換え率 15% で連鎖していることを見出した。野生型 *cag1* 遺伝子を特定するための形質転換受容菌株 #58 (*cag1-1 trp1-1, 1-6*) を作り、G13-900B マーカー近傍に由来する BAC DNA (*trp1⁺* を持つ) を導入して行ったところ、BAC クローン 7H8 および 1F2 が相補活性 (*cag1⁺*)

を持つことを突き止めた。7H8 の DNA を制限酵素 *HindIII* で部分分解し、セルフライゲートしてサブクローンを作り、相補活性を調べたところ、サブクローン B4 が相補活性を持っていた。B4 の DNA を *HindIII* で切断してから形質転換実験に用いても相補活性は残っていた。そこで、B4 の *HindIII* 断片をそれぞれクローニングして、どの断片に野生型 *cag1* 遺伝子が乗っているのかを調べているところである。

Analysis of the *cag1* gene, which is involved in cap growth of *Coprinopsis cinerea*

Hajime Muraguchi, Kazuki Kemuriyama

(Dept. of Biotechnology, Akita Prefectural Univ.)

P-40 (O-6)

牧草共生糸状菌 *Epichloë festucae* の低分子量 G タンパク質 Cdc42 及び RacA の機能分化に関する研究

榎野友香, 竹本大吾 (名大院・生命農学)

E. festucae はイネ科牧草の細胞間隙で生育し、共生関係を確立する糸状菌エンドファイトである。これまでに、*E. festucae* の活性酸素生成酵素 NoxA が共生時の植物内菌糸の生育を制御すること、制御因子 NoxR と低分子量 G タンパク質 RacA が、NoxA による活性酸素生成を正に制御することが解っている。また酵母で細胞極性の確立に関与する BemA/Cdc24 が、NoxR と複合体を形成し活性酸素生成を制御する可能性が示されている。今回、RacA および RacA と高い相同性を示す Cdc42 の機能を比較解析した。Yeast two hybrid 法を用いた Nox 制御因子との結合解析により、RacA は NoxR と Cdc42 は BemA と N 末端側のアミノ酸を介して特異的に結合することが示された。*racA* 破壊株では、菌糸分岐が増加するのに対し、*cdc42* 破壊株では部分的な菌糸細胞の膨張が認められた。また *racA* 破壊株は、宿主植物内で異常な菌糸生育を示して植物を枯死させるのに対し、*cdc42* 破壊株は宿主植物と共生関係を確立できた。*cdc42* 破壊株では野生株と比較して活性酸素生成量が増加したことから、Cdc42 が活性酸素生成の負の制御因子であることが示された。これらの結果より、Cdc42 と RacA が競合的に働き、活性酸素生成や菌糸生育を制御している可能性が示唆された。

Functional analysis of small G proteins Cdc42 and RacA from fungal endophyte *Epichloë festucae*

Yuka Kayano, Daigo Takemoto

(Grad. School Bioagr. Sci., Nagoya Univ.)

P-41

味噌用低ホスファターゼ麹菌の米麹，豆麹におけるホスファターゼ遺伝子発現

丸井淳一郎¹，多田功生¹，福岡真里¹，鈴木 聡¹，服部領太¹，和久 豊²，白石洋平²，北本則行³，杉本達哉⁴，楠本憲一¹（¹農研機構・食総研，²ビオック，³愛知産技研・食工技セ，⁴ナカモ）

調味味噌（だし入り味噌）の製造に用いられるイノシン酸などの核酸系旨味成分は，麹菌に由来する味噌中のホスファターゼにより分解されることが知られている。その分解防止には加熱による酵素の失活処理が必要とされるが，高温加熱処理は味噌の品質低下にもつながることから，菌体外ホスファターゼ活性の低い麹菌実用株が求められている。我々は麹菌のホスファターゼ発現制御機構を正しく理解し，味噌用麹のホスファターゼ活性低減に応用することを目指している。

本研究では，米麹，豆麹での酸性ホスファターゼ活性が低い味噌用麹菌として *Aspergillus oryzae* KBN8048 株を 503 種類の麹菌株の中から選抜した。KBN8048 株の特徴として，酸性ホスファターゼ活性が豆麹で特に低く，イノシン酸分解活性も米麹より低いことが挙げられる。同株の米麹は，pH が 5.0 付近で，リン酸源が豆麹よりも少ないことから，酸性ホスファターゼが誘導されやすいと考えられた。定量 RT-PCR の結果から，同株の 13 種の菌体外酸性ホスファターゼ遺伝子を転写量が米麹で多い type R と豆麹で多い type S に分類できた。type R 遺伝子群とその制御機構は特に米麹のホスファターゼ活性低減のための標的として有望である。一方で，type S 遺伝子群の発現に影響する pH，リン酸以外の因子の存在も示唆された。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。

Transcriptional profiles of the acid phosphatase genes in *A. oryzae* low acid phosphatase activity strain in solid-state rice and soybean cultures for *miso* brewing

Junichiro Marui¹，Sawaki Tada¹，Mari Fukuoka¹，Satoshi Suzuki¹，Ryota Hattori¹，Yutaka Wagu²，Yohei Shiraishi²，Noriyuki Kitamoto³，Tatsuya Sugimoto，Ken-Ich Kusumoto¹

(¹NFRI，²Bio'c，³Food Res. Center，Aichi Ind. Tech. Inst.，⁴Nakamo)

P-42

味噌用麹菌 *A. oryzae* KBN630 株における酸性ホスファターゼ(Aph)遺伝子群の破壊

安田(吉野)庄子，長谷川 摂，小野奈津子，伊賀 佳美¹，白石 洋平¹，和久 豊¹，杉本 達哉²，楠本 憲一³，北本 則行(愛知産技研・食工技セ，¹株ビオック，²ナカモ株，³食総研)

【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】これまでに，味噌用麹菌 *A. oryzae* KBN630 株において，*ku70*・*pyrG* 遺伝子二重破壊株 *A. oryzae* KBN630-17K3 株を取得し 90%以上の高頻度相同組換え系を開発した。次に麹菌ゲノム情報から *A. niger phyA* 遺伝子と同一性のある遺伝子 8 個 (*aphA*～*aphH* 遺伝子)，*A. niger phyA* 遺伝子及び *A. niger phyA* 遺伝子と同一性が高い推定酸性ホスファターゼ遺伝子をそれぞれ 3 個及び 2 個 (*aphI* 遺伝子～*aphM* 遺伝子) 見出し，それぞれの遺伝子破壊を行った。13 種類の遺伝子破壊株を用いて豆麹を作製し，酸性ホスファターゼ活性および調味料のイノシン酸分解活性を測定した結果，*aphC* 遺伝子破壊株において両活性とも顕著に低下していた。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 acid phosphatase (Aph) genes in the miso koji mold, *A. oryzae* KBN630

Shoko YOSHINO-YASUDA，Osamu HASEGAWA，Natsuko ONO，Yoshimi IGA¹，Yohei SHIRAISHI¹，Yutaka WAGU¹，Tatsuya SUGIMOTO²，Ken-Ichi KUSUMOTO³，Noriyuki KITAMOTO (Food Res. Center，Aichi Ind. Tech. Inst.，¹Bio'c CO.,LTD.，²NAKAMO CO.,LTD.，³Nat'l Food Res. Inst.)

P-43 (O-19)

遺伝子多重破壊による *Aspergillus oryzae* の Hydrophobin 群の機能解析

山川 結, 水野佑香, 中島春紫 (明治大・農・農化)

Hydrophobin (ハイドロフォービン) とは空気中に菌糸を伸長させる子囊菌・担子菌類にみられる細胞表層タンパク質である。低分子量 (70~150a.a.)、両親媒性という特徴を示す。モノマーとして菌体外に分泌された後、親水-疎水界面において自己集合し、菌糸や分生子の撥水性の付与や、植物細胞表面などの疎水面への吸着に関与することが知られている。一般に、1つの菌株は互いに相同性の低い Hydrophobin 遺伝子を複数所有しているが、その使い分けについてはほとんど解明されていない。

本研究では麹菌 *Aspergillus oryzae* に注目し、Hydrophobin をコードすると推定される遺伝子を4つ単離し (*hypA,B,C,D*)、*hypA,B,C* については発現を確認している。蛍光融合タンパク質を用いた局在解析により、分生子には HypA しか観察されず、一方菌糸では HypA,B,C の全てが局在することが示された。HypA と HypB,C の間の局在性の差異からは同一菌株が発現する Hydrophobin の機能的使い分けが示唆されている。本研究では *hypA, B, C* について単独、二重および三重破壊株を作製し、その表現型解析からそれぞれの機能を解明することを目的としている。リアルタイム PCR 解析、形態観察、発芽率測定、撥水性試験、SEM による微細構造解析の結果より、*A. oryzae* のハイドロフォービン群はそれぞれの発現時期および局在個所が異なり、それらは独立して機能していることが示された。また多重変異株でも、培養条件により撥水性が示されたことから、転写量の低い HypD、あるいは Hydrophobin 以外の物質も菌体の撥水性に関与する可能性が示唆された。

Functional analysis of Hydrophobins by multiple gene disruption in *Aspergillus oryzae*

Yui Yamakawa, Yuka Mizuno, Harushi Nakajima (Dept. of Agricultural Chemistry, Univ. of Meiji)

P-44 (O-20)

水晶振動子マイクロバランス (QCM) による界面活性蛋白質 RolA と固体表面間の相互作用解

田邊弘毅¹, 大類景子¹, 上原健二¹, 高橋徹^{2,3}, 富樫貴成⁴, 有田稔彦⁴, 阿部敬悦^{1,3}

(¹ 東北大院・生物産業創成, ² 酒類研・基盤, ³ 東北大・未来研, ⁴ 東北大・多元研)

【背景・目的】麹菌は生分解性ポリエステルである 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、CutL1 を PBSA 表面にリクルートする事で、PBSA 分解効率を上昇させている。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する特徴を持つ。しかし、CutL1 の PBSA 分解を阻害していない事から、RolA は吸着後に水平方向へ移動する可能性が示唆された。そこで、水平方向可動メカニズムを解明する為に、RolA と PBSA 間の相互作用メカニズムを解明する事とした。

【結果・考察】各 pH における PBSA への RolA の吸着量と可動性を解析した結果、両者に相関は見出せなかった。さらに、RolA の PBSA への推定結合領域内の変異体 (L137S, L142S, D134A/D136A, K130A/D134A/D136A) を作製し、これらについても同様の解析を行った。その結果、野生型 RolA と比較して、変異体は PBSA への吸着能が変化したが、可動性には変化が見られなかった。この事から、RolA の PBSA への吸着と可動性は異なるメカニズムに依存する現象である事が示唆された。さらに、RolA の可動性には、「PBSA の化学構造」および「点変異導入により変化した以上の静電的・疎水的な相互作用」が大きく寄与する事が推論された。そこで現在は、分子間相互作用解析装置 QCM のセンサーチップ表面に疎水度を変えた化学修飾を施して、その表面に対する RolA の吸着能を評価している。

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

QCM analysis of the interaction between *Aspergillus oryzae* hydrophobin RolA and solid surfaces

Hiroki Tanabe¹, Keiko Orui¹, Kenji Uehara¹, Toru Takahashi^{2,3}, Takanari Togashi⁴, Toshihiko Arita⁴, Keietsu Abe^{1,2}

(¹ Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., ² NICHe., Tohoku Univ., ³ NRIB., ⁴ IMRAM., Tohoku Univ.)

P-45

エノキタケ由来の hydrophobin (Fv-hyd3) 融合タンパク質の生産

吉田真澄、藤田将幸¹、西川良平¹、稲富 聡²、田口悟朗¹、下坂 誠¹
(¹信州大・繊維・応生系、²ホクトきのご総合研究所)

Hydrophobin は糸状菌の細胞表層に普遍的に存在する低分子量のタンパク質で、細胞外で自己集合し両親媒性の膜を形成する。一般的に糸状菌には複数の hydrophobin 遺伝子が存在し、各々が異なった役割を持っている。Hydrophobin の主な役割として気中菌糸形成、疎水性表面への菌糸の吸着、胞子表面における疎水的な竿状構造の形成などが挙げられる。

これまでにエノキタケゲノムライブラリーより 2 つの hydrophobin 遺伝子 Fv-hyd1、Fv-hyd3 の単離に成功した。半定量的 RT-PCR の結果から、これらはそれぞれ子実体、菌糸特異的に発現していることが明らかとなった。これら 2 つの hydrophobin 遺伝子の cDNA 全長配列を、それぞれタンパク質発現ベクター pGEX 5X-1 に導入し、*E.coli* Rosetta2(DE3)株による異種宿主発現を行ない、SDS-PAGE により解析したところ、GST と融合した Fv-hyd3 タンパク質 (37k Da) を得ることができた。現在、得られた Fv-hyd3 融合タンパク質の大量生産を試みるとともに、Fv-hyd3 融合タンパク質の両親媒性について評価を行なっている。

Expression of hydrophobin (Fv-hyd3) fusion protein derived from *Flammulina velutipes*

Masumi Yoshida¹, Masayuki Fujita¹, Ryohei Nishikawa¹, Satoshi Inatomi², Goro Taguchi¹, Makoto Shimosaka¹
(¹Division Appl.Bio., Fac.Tex.Sci.Shinshu Univ., ²Mushroom Lab.Hokuto Co.)

P-46

黄麹菌 KexA の機能解析

富田沙耶子、森田寛人、前田浩、竹内道雄、山形洋平 (東農工大院・応生科)

【目的】黄麹菌のゲノムには serine-type carboxypeptidase をコードすると推定される遺伝子が 12 個存在する。このうちの 하나가 *Saccharomyces cerevisiae* の *KEX1* 遺伝子のホモログであることがアミノ酸配列の相同性から推定され、これを KexA と名付けた。*S.cerevisiae* の Kex1p は、ペプチドの C 末端から Lys,Arg を遊離する exo 型プロテアーゼであり、接合フェロモンのプロセッシングや細胞死に関与している。本研究では黄麹菌における KexA の機能を解析することを目的とした。

【方法及び結果】 KexA の欠損株、過剰発現株を作製し、その表現型をコントロール株と比較した。その結果、欠損株では分生子形成能の低下が認められた。一方、過剰発現株では菌糸の多分岐や脆弱化が観察され、Calcofluor White を添加した培地において著しい生育阻害が認められた。以上のような表現型は細胞壁異常が惹起された株でよく認められることから、KexA は黄麹菌において細胞壁関連タンパク質のプロセッシングに関与していると考えられた。

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。

Functional analysis of KexA in *Aspergillus oryzae*

Sayako Tomita, Hiroto Morita, Hiroshi Maeda, Mitio Takeuti, Youhei Yamagata
(Dept. of Applied Biological Science, Tokyo univ. of Agriculture and Technology)

P-47

麹菌 serine-type carboxypeptidase の *Aspergillus nidulans* における高発現株の検討

佐野和紀, 森田寛人, 前田浩, 山形洋平, 竹内道雄 (東農工大・応生化)

麹菌 *Aspergillus oryzae* のゲノム配列解析の結果, 12 個の serine-type carboxypeptidases (CPase) の存在が明らかとなった。これら 12 個の CPase 遺伝子を, *Aspergillus nidulans* を宿主として異種発現を試みた。その結果, 高分泌のものと低分泌のものが存在した。配列解析により, この相違は開始メチオニン以下 5 アミノ酸にあると予測された。本研究では, 低分泌 CPase である TA13 の開始メチオニン以下 5 アミノ酸を高分泌 CPase である TA4 のものに置換した CPase 変異遺伝子を, アミラーゼプロモーター下流に結合し *A. nidulans* A89 株を形質転換した。形質転換体をサザンブロット解析やリアルタイム PCR により解析した結果, 開始メチオニン以下 5 アミノ酸置換形質転換株は, 5 アミノ酸を置換していない TA13 形質転換株と比べて高いコピー数を有す傾向が認められた。高コピー数の形質転換体を炭素源をスターチとした誘導条件で 5 日間の液体培養をおこない, 培養上清の CPase 活性測定, SDS-PAGE およびウエスタンブロット解析をおこなったところ, 培養上清への CPase 分泌も上昇していることが判明した。

Serine-type carboxypeptidase from *Aspergillus oryzae* hyper expression mutants in *Aspergillus nidulans*

Kazunori Sano, Hiroto Morrita, Hiroshi Maeda, Yohei Yamagata, Michio Takeuchi

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

P-48

麹菌由来新規 β -グルコシダーゼに特徴的な基質特異性

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作製した β -グルコシダーゼ遺伝子の網羅的高発現株から, 新規な β -グルコシダーゼを精製して酵素学的諸性質の解明を行っている(1)。そのうち BglA は GH family 3 に属しており, 同ファミリーに属する既知 β -グルコシダーゼと類似した反応至適条件等を示した。しかし合成基質 *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (pNPG) に対して極め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をほとんど分解しないという特徴が見出された。このことから BglA はセロビオースではなく pNPG と構造的類似性を持つ配糖体に対して高い分解活性を有する可能性が考えられ, 実際に大豆イソフラボンに対する分解活性を検出することができた。大豆イソフラボンの分解活性を有する β -グルコシダーゼとしては麹菌由来の BGL1 が既に報告されており(2), BGL1 についても精製し解析した結果 BglA と同様に pNPG に対して高い分解活性を示した。また, BglA について遺伝子の発現プロファイルを調べたところ, 興味深いことにセロビオースでは誘導が起らない一方でイソフラボンによって発現誘導されることが示唆された。

(1)工藤佳那子ほか: 第 10 回糸状菌分子生物学コンファレンス要旨集, p.31

(2)Kaya. et al., Appl Microbiol Biotechnol (2008) 79:51-60

The Unique Substrate Specificity of Novel β -Glucosidases from *Aspergillus oryzae*

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

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

P-49

組換え麹菌生産セルラーゼを用いた広葉樹クラフトパルプの酵素糖化

吉榮 俊秀¹, 酒井 翔司¹, 岡崎 文美², 荻野 千秋¹, 田中 勉², 久田 博元³, 萩原 伸哉⁴, 秦 洋二³,
近藤 昭彦¹ (¹神戸大院・工・応化, ²神戸大・先端融合研究環, ³月桂冠・総研, ⁴日本紙パルプ研究所)

【目的】近年, 化石燃料の枯渇や環境問題などの観点から, 地球上に豊富に存在し, 食糧と競合しない木質系バイオマスから燃料や化学品を生産するバイオリファイナリーへの期待が高まっている。我々は, バイオマス原料として, 脱リグニン処理等の前処理が施されており, 既存の設備を用いて大量供給可能であるパルプに着目している。本研究では, 組換え麹菌で生産したセルラーゼを用いたパルプの酵素糖化条件の検討を行った。

【方法】エンドグルカナーゼ (EG), セロビオヒドロラーゼ I および II (CBH I, CBH II), β グルコシダーゼ (BGL) を組換え麹菌により分泌生産した。広葉樹晒クラフトパルプ (LBKP) に, 生産したセルラーゼを種々の混合比率で作用させ, 遊離したグルコース量により糖化効率を評価した。

【結果】組換え麹菌で生産した EG, CBH I, BGL を適切な比率で作用させることにより, LBKP が効率的に酵素糖化された。さらに, 酵母を用いた同時糖化発酵により, LBKP からのエタノール生産に成功した。

バイオマスの糖化および発酵プロセスを同時に行う統合バイオプロセス (Consolidated BioProcessing, CBP) は, プロセス簡略化による省エネルギー化のための重要な技術である。現在, 我々は, 優れたタンパク質・二次代謝産物生産およびバイオマス資化能力を有する麹菌による CBP の開発を行っている。

Enzymatic saccharification of kraft pulp using cellulase mixture produced by recombinant *Aspergillus oryzae*.

Toshihide YOSHIE¹, Shoji SAKAI¹, Fumiyoshi OKAZAKI², Chiaki OGINO¹, Tsutomu TANAKA², Hiromoto HISADA³, Shin-ya HAGIWARA⁴, Yoji HATA³, Akihiko KONDO¹ (¹Dept. Chem. Sci. Eng., Grad. Sch. Eng., Kobe Univ., ²Org. Adv. Sci. Tech., Kobe Univ., ³Res. Inst., Gekkeikan Sake Co., ⁴JPRI)

P-50

担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* がアンモニア処理木材の分解時に生産する酵素のセクレトーム解析

櫻木 潔¹, 堀 千明¹, 林 礼子², 三橋 秀一², 五十嵐 圭日子¹, 鮫島 正浩¹ (¹東大院農生科, ²バイオエタノール革新技術研究組合)

セルロース系バイオマスの酵素糖化は, アルコールやプラスチックの原料となる単糖を穏和な条件で得るために重要な技術である。酵素糖化を効率的に行うためには前処理が必要であり, その一つにアンモニア処理がある。これまでの研究によって, アンモニア処理はシラカバやヤナギなどの広葉樹材に対して効果が高いことを見いだした。しかし, バイオマスのどのような変化が酵素糖化効率を上げているのかに関しては依然不明な点が多い。そこで本研究では, シラカバの未処理木粉とアンモニア処理木粉を基質として担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* を培養し, 得られた菌体外液に含まれる主要なタンパク質のセクレトーム解析を行うことで, アンモニア処理が本菌による菌体外酵素の生産に与える影響について調べた。その結果, アンモニア処理によってエステラーゼやキシラナーゼ, キシログルカナーゼの分泌パターンに変化が起こっていることが明らかになった。このことは, 本菌がアンモニア処理によるヘミセルロース構造の変化に対応して酵素を生産している可能性を示しており, セルロース系バイオマスを糖化する際の酵素選択に重要な情報を与えると考えられた。

Secretome analysis on extracellular proteins of basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* grown on ammonia treated wood

Kiyoshi Sakuragi¹, Chiaki Hori¹, Reiko Hayashi², Shuichi Mihashi², Kiyohiko Igarashi¹, Masahiro Samejima¹.
(¹Dept. Biomat. Sci., Univ. of Tokyo., ²RAIB)

P-51

糖質代謝関連酵素遺伝子を利用した木材腐朽菌の系統分類

和田朋子, 五十嵐圭日子, 鮫島正浩 (東大院・農生科)

木材腐朽菌の多くは担子菌であり, その腐朽様式の違いから褐色腐朽菌と白色腐朽菌に分類される。近年, 担子菌の種間・属間の類縁関係を調べるなどの分子系統解析には, リボソーム DNA の ITS 領域配列が頻繁に利用されている。これまで演者らは Phi29 DNA ポリメラーゼによる非特異的な DNA 増幅を, 担子菌特異的プライマーを用いた ITS 領域の PCR 増幅に組み合わせ, 極微量の試料中の担子菌を同定する手法を確立した。しかしながら, 木材腐朽菌の ITS 領域配列から得た分子系統樹は白色, 褐色腐朽菌が混在している。両者は共に木材多糖(セルロースとヘミセルロース)を分解することができる点では共通する。そこで本研究では, 糖質代謝関連酵素に着目し, 本酵素遺伝子による木材腐朽菌の系統分類を行った。

ゲノムデータベースに登録されている種々の木材腐朽担子菌の様々な酵素遺伝子の配列を取得し, 系統樹の作成を行った。その結果, ITS 領域配列の系統樹では白色腐朽菌, 褐色腐朽菌がハラタケ綱内に混在しているのに対して, GAPDH 遺伝子配列の系統樹では白色腐朽菌, 褐色腐朽菌はそれぞれ別のクレードを形成し, 色徴による分類と一致した。また, 褐色腐朽菌は2つのクレードに分かれており, 一つは木製の枕木や電柱など屋外に, もう一方は住宅部材など屋内に発生する木材腐朽菌であった。このように, これら3つのクレードに属するそれぞれの木材腐朽菌はクレードごとに棲息環境や加害対象が異なっていた。以上から, GAPDH 等の糖質代謝関連酵素遺伝子に基づく系統分類は木材腐朽菌の特性や色徴に基づく系統分類と一致することが明らかとなった。

Phylogenetic classification of wood rotting fungi using enzyme genes related to carbohydrate metabolism

Tomoko Wada, Kiyohiko Igarashi, Masahiro Samejima (Dept. of Biomaterial and Science, Univ. of Tokyo)

P-52 (O-8)

麹菌 *A. oryzae* の菌核形成促進因子 ScIR の過剰発現株を用いた菌糸融合能の解析

和田龍太, 金 鋒傑¹, 小山泰二¹, 丸山潤一, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工,¹野田産研)

麹菌 *A. oryzae* は有性世代が見つかっておらず, 複数の株の優良な表現型を同時に備えた株の育種を効率的に行うことが困難である。しかし, ゲノム解析により有性生殖関連遺伝子をもつことが明らかになり, 有性生殖を行う可能性が示されている。一方で, *A. oryzae* において菌核(sclerotium)の形成能や, 菌糸融合能などが低下していることが有性世代の発見を困難にしている一因と考えられる。菌核とは菌糸が融合を繰り返して密集した厚膜の小粒塊であり, その外見は有性世代の構造である子嚢殻(perithecium)と似ている。菌核内で接合型の異なる菌株の菌糸が融合し, それぞれの核が同一細胞内に存在すれば, 核融合・減数分裂を経て有性胞子が形成されるのではないかと期待される。しかし, これまで *A. oryzae* では菌核形成や菌糸融合に関する研究がほとんど進んでいないことから, その有性生殖能に関する知見は非常に乏しい。

本研究では, 核をそれぞれ緑色および赤色蛍光で可視化するための融合遺伝子を *sC* 遺伝子座に挿入した株に, ウリジン/ウラシル要求性($\Delta pyrG$)またはアデニン要求性($\Delta adeB$)を付与した株を作製した。そして, これらの株を寒天培地で対峙培養, もしくは液体培地で混合培養させることで, 菌糸融合能を調べた。その結果, お互いの栄養要求性が相補され最少培地で生育可能な株を取得し, その菌糸を蛍光顕微鏡で観察すると核には緑色・赤色両方の蛍光がみとめられた。以上より異なる株の表現型が同一の株に現れたことから, *A. oryzae* における菌糸融合能を解析するシステムを確立することに成功した。現在, 菌核形成促進因子 ScIR を過剰発現させることにより, 菌糸融合能への効果を検討している。

Analysis of hyphal fusion ability by using the strains overexpressing ScIR, a promoting factor for sclerotia formation in *Aspergillus oryzae*

Ryuta WADA, ¹Feng Jie JIN, ¹Yasuji KOYAMA, Jun-ichi MARUYAMA, Katsuhiko KITAMOTO

(Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo, ¹Noda Ins. Sci. Res.)

P-53

Aspergillus nidulans の NmrA と AreB によるメナジオン耐性化機構の解明

伊藤英里子, 梶尾俊介, 志水元亨, 高谷直樹 (筑波大学・生命環境)

A. nidulans の窒素代謝系遺伝子の発現を制御する転写因子である NmrA は、NAD(P)H に比べ NAD(P)⁺に高い親和性を示すことから生体内の NAD(P)⁺/NAD(P)H 比を感知するセンサーとして機能することが予想される。これまで我々は、NmrA が glucose-6-phosphate 脱水素酵素、6-phosphogluconate 脱水素酵素および glycerol 脱水素酵素の遺伝子の発現を正に制御すること及び *A. nidulans* の生育のメナジオン(MD)に対する耐性化に寄与していることを示した。本研究では、NmrA 結合タンパク質として知られる AreA と同様に GATA ドメインを持つ AreB が本菌の MD 耐性に関与していることを見出した。Bimolecular Fluorescence Complementation 法および NmrA と AreB の組換えタンパク質を用いた GST pull-down 法により、NmrA と AreB が相互に結合することを示した。また、両者の *in vitro* での結合は NADP⁺により促進され、NADPH により抑制された。また、クロマチン免疫沈降法により、上記の遺伝子プロモーターに AreB が結合することを明らかとした。NmrA は MD により酸化的に生じる NADP⁺を感知し、AreB と相互作用することによって上記の遺伝子の発現を活性化し NADPH の生産を促進させる機能を持つと考えられた。

The *Aspergillus nidulans* NmrA and AreB are involved in menadione stress tolerance.

Eriko Ito, Shunnsuke Masuo, Motoyuki Shimizu, Naoki Takaya

(Graduate Sch. of Life and Environmental Sci., Univ. of Tsukuba)

P-54

Aspergillus oryzae のストレス条件下での生育調節に関わる転写因子の解析

黒田明典, 高谷直樹 (筑波大院・生命環境)

DNA マイクロアレイ解析とリアルタイム PCR 解析を用いて、低炭素条件下で特異的に発現量が増加する転写因子遺伝子 AO090005000179 (*hypB*)を見出した。この遺伝子の遺伝子破壊株 (Δ HYP, 野田産業科学研究所) と野生株を、組成を様々に改変した固体培地上で培養したが、通気条件に関係なくそれらのコロニーの形態と生育速度はかわらなかった。次に、 Δ HYP を液体培養したところ 低炭素条件下での生育が野生株より良好だった。また、両株の分生子の発芽率とグルコースの消費量を比較してみると、炭素源の濃度に関わらず Δ HYP は野生株より常に高い発芽率と消費量を示した。そして、これらの差は低炭素濃度下で最も顕著となった。一方、生育が部分的に抑制される低 pH, 高 pH などのストレス条件下でも、 Δ HYP は野生株より良好に生育した。また、このとき、 Δ HYP の生育は抗真菌剤に対して超感受性であった。以上の結果から、*hypB* は低炭素源、低 pH, 高 pH などの生育を制限するストレス条件下で、*A. oryzae* の栄養増殖を抑制させる機能を持つことが示された。

さらに、*hypB* の高発現株 (HYP) を作製し、破壊株と同様の解析を行った。その結果、HYP では *brlA* の発現の誘導、および分生子の形成時期の早期化と着生数の増加がみられた。また、HYP のコロニーには既存の分生子柄の先端からまた菌糸が伸長し、新たな分生子柄を形成している特異的な構造 (二次分生子柄) が稀にみられた。以上の結果から、*hypB* は分生子の形成を活性化させる機能をもつ可能性が示された。

Transcription factor regulating growth and development of *Aspergillus oryzae* under stress conditions

Akinori Kuroda, Naoki Takaya

(Graduate School of Life and Environmental Sciences, Univ. of Tsukuba)

P-55

ペレニアルライグラス共生菌 *Epichloë festucae* の ProA が結合するプロモーター配列の同定

田中愛子¹, Sanjay Saikia², Gemma Cartwright², 竹本大吾¹, 加藤雅士³, 柘植尚志¹, Barry Scott² (¹名大院・生農, ²Massey Univ., ³名城大・農)

Epichloë エンドファイトは、宿主ペレニアルライグラスの細胞間隙を伸長して共生する。先に、*E. festucae* において、子のう菌の有性生殖に関与する Zn(II)2Cys6 タイプの転写制御因子 ProA/NosA と相同性を示す EfProA を同定した。EfPROA 破壊株では、宿主内での菌糸生育が野生株に比べ著しく促進され、接種植物に生育阻害や枯死を引き起こした。さらに、EfPROA 破壊株において、*Aspergillus nidulans* の有性生殖に必須な *esdC* の相同遺伝子 (EfESDC) の転写レベルが顕著に低下していることを見出した。そこで、ゲルシフトアッセイ法を用いて、ProA の EfESDC プロモーター配列への結合活性について調査したところ、ProA が EfESDC プロモーターの GCGCCG 配列に結合することが明らかとなった。EfESDC 近傍のゲノム配列を解析したところ、EfESDC 上流の逆鎖にコードされる遺伝子 (EF320) が見出され、EfPROA 破壊株では、EfESDC と同様に EF320 の転写レベルが顕著に低下していることが確認された。EfESDC と EF320 の 2.4 kb の遺伝子間領域 (プロモーター領域) には、ProA 結合配列 (GCGCCG) が 1 か所のみ存在することから、ProA はこの配列に結合することにより、EfESDC と EF320 の発現を同調的に制御することが示唆された。

Identification of the promoter sequence for the ProA binding in *Epichloë festucae*, a mutualistic symbiont of perennial ryegrass.

Aiko Tanaka¹, Sanjay Saikia², Gemma Cartwright², Daigo Takemoto¹, Masashi Kato³, Takashi Tsuge¹, Barry Scott² (¹Grad. Sch. Bioagric. Sci., Nagoya Univ., ²IMBS, Massey Univ., ³Dept. of Agr., Meijo Univ.)

P-56

Aspergillus nidulans AmyR の誘導物質依存的な分解に関する解析

大崎陽央, 森本翔太, 金丸京子, 加藤雅士, 小林哲夫 (名大院・生命農学)

Aspergillus 属に普遍的に存在する転写因子 AmyR はデンプン分解酵素遺伝子群の転写を正に制御している。これまでに、AmyR は生理的誘導物質である isomaltose (IM) に応答して核移行し、転写を活性化することが明らかにされた。また、IM 依存的にリン酸化を受けること、その後分解されることも示されている。これは誘導条件から非誘導条件への移行の際、転写の停止が AmyR の分解により行われることを示唆している。この IM 依存的分解のメカニズムを明らかにするため、本報告では各種 AmyR 誘導体を用いてその安定性を解析した。

GFP-AmyR は野生型 AmyR と同等の性質を持ち、IM 依存的に核移行・分解される。誘導シグナル受容ドメインに点変異を持つ GFP-AmyR_{H478L}、核移行シグナルに変異を持つ GFP-AmyR_{pmw} は核移行しない。これらの誘導体は GFP-AmyR より安定であり、前者では IM 依存的な分解は観察されず、後者でも分解は著しく軽減されていた。核局在が分解を引き起こす可能性を検証するため、SV40 由来の NLS を融合した NLS-GFP-AmyR を作製した。本誘導体は予想通り常に核に局在し、IM 非存在下でも不安定化していた。また、IM 存在下でさらに分解が促進され GFP-AmyR と同程度の半減期を示した。NLS-GFP-AmyR_{pmw} は、現在、理由は不明であるが、IM 依存的に核移行する。本誘導体は GFP-AmyR とほぼ同様に IM 依存的に分解された。以上から、IM 依存的な AmyR の分解は IM 依存的な構造変化と核局在という二つの要因により引き起こされることが明らかとなった。

本研究の一部は、生研センターのイノベーション創出事業による支援を受けて行われたものである。

Analysis on inducer-dependent degradation of AmyR in *Aspergillus nidulans*

Akio Osaki, Shota Morimoto, Kyoko Kanamaru, Masashi Kato, Tetsuo Kobayashi

(Graduate Sch. of Bioagric. Sci., Nagoya Univ.)

P-57

***Aspergillus aculeatus ace1* 欠損株における糖質加水分解酵素の生産と塩ストレス応答の解析**

山崎愛弥, 小西宏和, 谷修治, 炭谷順一, 川口剛司 (大阪府立大・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。そこで我々は本菌のセルラーゼ遺伝子発現抑制に関わる因子を破壊し、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転写抑制因子である。一方、オルソログの *Aspergillus nidulans* StzA は塩ストレス応答に関与しており、AceI/StzA オルソログ間で機能の類似性は見られず、*A. aculeatus* AceI の機能を類推することはできない。そこで、本研究では *Aspergillus aculeatus ace1* 欠損株を作製し、*A. aculeatus* AceI の機能を解析したので報告する。

A. aculeatus ace1 欠損株における endoglucanase, endoxylanase 活性は、コントロール株と同程度であったが、 β -glucosidase(BGL)活性は、コントロール株の約 2 倍に増加した。

また、*ace1* 遺伝子欠損株を 100, 300, 500 mM NaCl を含む YPD 培地上で生育させると、コントロール株と比べて 300, 500 mM NaCl 添加培地上での菌糸伸長と孢子形成が著しく低下したことから、*A. aculeatus* AceI は塩ストレス応答にも関与していることが示唆された。

今後は、*A. aculeatus* BGL の主要な酵素である BGL1 遺伝子や孢子形成に関与する遺伝子の発現量を定量することで、AceI の機能を解析する計画である。

Production of biomass degrading enzymes and salt stress response in *Aspergillus aculeatus ace1* deficient mutant

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

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

P-58

***Aspergillus aculeatus* Zn(II)₂Cys₆型転写因子 CGAF はセルロース性基質に応答してセルラーゼ・ヘミセルラーゼ遺伝子発現を活性化する**

國武絵美, 谷修治, 炭谷順一, 川口剛司 (阪府大院・生環科)

Aspergillus aculeatus の cellobiohydrolase I 遺伝子 (*cbhI*) 及び carboxymethyl cellulase 2 遺伝子 (*cmc2*) 発現は転写因子 XlnR に依存しない経路を介してセルロースにより誘導される。この未同定のセルロースシグナル伝達経路に関与する因子をスクリーニングし、Zn(II)₂Cys₆型 DNA 結合ドメインを持つ因子 cellulase genes-activating factor (*cgaF*) を取得した。CGAF の機能解析を行うため、まず *cgaF* 破壊株を作製し、定量 PCR によりセルラーゼ遺伝子の転写解析を行った。結果、*cbhI* と *cmc2* のセロビオースとアビセル誘導条件下における発現がコントロール株に比べて低下した。XlnR 依存的に発現が制御される *cmc1* 及び Fib-xylanase 遺伝子 (*xynIb*) の発現もアビセル誘導条件下では同様に減少したが、キシロース誘導条件下では差が認められなかった。また、transcription elongation factor 1 α 遺伝子 (*tef1*) プロモーター制御下で *cgaF* を構成的に高発現した株では、セルラーゼ・キシラナーゼ活性が培養 10 日目にコントロール株の 2 倍及び 5 倍上昇した。これらの結果から CGAF はセルロースシグナルに応答したセルラーゼ・ヘミセルラーゼ遺伝子の転写活性化因子として機能することが示された。

Zn(II)₂Cys₆ type transcription factor CGAF activates expression of the cellulase and hemicellulase genes in response to cellulosic carbon sources in *Aspergillus aculeatus*

Emi Kunitake, Shuji Tani, Jun-ichi Sumitani, Takashi Kawaguchi (Grad. Sch. Life Env. Sci., Osaka Pref. Univ.)

P-59

糸状菌におけるセルラーゼ生産制御機構

青山未来, 金丸京子, 小林哲夫 (名大院生命農・生物機構)

【目的】 *Aspergillus oryzae* において同定された転写因子 ManR は、マンノピオースに応答してマンナナーゼ・セルラーゼの発現を誘導する。*A. oryzae* はセルラーゼ生産性が低く研究が困難であるため、本研究では *A. nidulans* における ManR 相同因子の解析を行った。

【方法・結果】 ManR 相同因子の破壊株を作成し、セルラーゼおよびマンナナーゼのプレートアッセイに供したところ、セルラーゼ生産性はほぼ失われたが、マンナナーゼ生産性に影響は見られなかった。また、CMC および konjac glucomannan を単一炭素源として液体培養し、その培養上清をザイモグラフィにより解析したところ、主要エンドグルカナーゼである EglA、EglB の生産がほとんど見られず、一方、4-5 種見られるマンナナーゼのうち 2 種の生産が著しく減少した。この 2 種のマンナナーゼは EglA、EglB と同様にマンノピオースではなく、セロピオースにより誘導された。従って、ManR 相同因子はセロピオースに応答してセルラーゼと一部のマンナナーゼの生産を制御する因子であり、機能的には ManR と言うよりむしろ CelR であると考えられる。また、マンノピオースに応答してマンナナーゼ発現を制御する転写因子は別に存在することも示唆された。

本研究の一部は、生研センターのイノベーション創出事業による支援を受けて行われたものである。

Regulation of cellulase synthesis in filamentous fungi

Miki Aoyama, Kyoko Kanamaru, Tetsuo Kobayashi

(Graduate Sch. of Bioagric. Sci., Nagoya Univ.)

P-60 (O-10)

麴菌転写因子 XlnR の誘導物質依存的リン酸化とその生理学的意義

石川周平, 野口祐司, 金丸京子, 加藤雅士¹, 小林哲夫 (名大院・生命農, ¹名城大・農)

【目的】 麴菌 *Aspergillus oryzae* 転写因子 XlnR は、誘導物質キシロースに応答してキシラナーゼ、セルラーゼ遺伝子群の転写を活性化する。これまでに、XlnR が誘導物質依存的にリン酸化修飾されることを明らかにした。本研究では、XlnR の誘導物質依存的リン酸化の詳細を phosphate affinity SDS-PAGE を用いて解析し、また、リン酸化の生理学的意義の解明を目指して、リン酸化が XlnR の分解や DNA 結合に与える影響を解析した。

【方法と結果】 c-myc 融合 XlnR を発現する麴菌の細胞抽出液を phosphate affinity SDS-PAGE に供し、ウエスタンブロッティング解析により c-myc::XlnR を検出した。その結果、非誘導条件下において XlnR はリン酸化レベルの異なる 3-4 種の分子種として存在し、誘導条件下においてはリン酸化レベルの上昇した 2 種の分子種にほぼ収束した。この付加的なリン酸化は可逆的で、キシロースの除去により非誘導時のリン酸化レベルまで低下した。リン酸化レベルの違いは XlnR の安定性に影響を与えなかった。ChIP Assay および XynF1 のプロモーター領域をプローブとした EMSA により、細胞抽出液中の XlnR はキシロース非依存的に DNA 結合することが示された。以上から、XlnR は常に DNA 上に存在し、キシロース依存的な可逆的リン酸化修飾により活性化され、下流遺伝子の転写を誘導すると考えられる。

本研究の一部は、生研センターのイノベーション創出事業による支援を受けて行われたものである。

Inducer-dependent phosphorylation of the transcriptional activator XlnR and its physiological role in *Aspergillus oryzae*

Shuhei Ishikawa, Yuji Noguchi, Kyoko Kanamaru, Masashi Kato¹, Tetsuo Kobayashi

(Graduate Sch. of Bioagric. Sci., Nagoya Univ., ¹Sch. Agric. Sci., Meijo Univ.)

P-61 (O-11)

Trichoderma reesei のセルラーゼ生産に関するシグナル伝達関連タンパク質の探索

日下秀行, 古川隆紀, 深谷英嗣, 志田洋介, 小笠原 渉 (長岡技科大・生物)

糸状菌 *Trichoderma reesei* は、細胞外セルロースやその誘導体に応答してセルラーゼを誘導的に生産する。しかし、誘導の初段階でセルロースは不溶性で直接細胞膜を通過できないことから、どのように細胞外セルロースを認識しているのかは不明である。また、これまでの研究から初発のセルラーゼ誘導生産は構成的に発現しているセルラーゼによって分解された微量のセルロース分解産物が引き金となり引き起こされるというモデルが提唱されているが、その詳細は明らかにされていない。そこで本研究では、セルラーゼ誘導物質の取り込み経路および基質認識に関する知見を得ることを目的として、誘導発現に関するトランスポーターの同定を試みた。*T. reesei* ゲノムデータベース内に存在する全 9129 遺伝子から糖質輸送に関与すると推定されるトランスポーター遺伝子を抽出し、マイクロアレイを用いて種々の炭素源に対する発現応答解析を行った。その結果、セルラーゼ遺伝子と同調して発現している 7 個のトランスポーターを見出した。これらのトランスポーターについて、セルラーゼ誘導への関与を明らかにするために各遺伝子の破壊株を構築し、アビセル存在下におけるセルラーゼ生産性の解析を行った。その結果、ある遺伝子の破壊に伴いセルラーゼ生産能の著しい低下が観察された。現在、この破壊株を用いてセロオリゴ糖の取込みおよびセルラーゼ遺伝子発現についての解析を行っている。

Functional analysis of genes encoding a putative cello-oligosaccharide transporter in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*.

Hideyuki Kusaka, Takanori Furukawa, Eiji Fukaya, Yousuke Shida, Wataru Ogasawara
(Dept. Bioeng., Nagaoka Univ. of Tech)

P-62

糸状菌 *Trichoderma reesei* における新規誘導発現機構の探索

佐藤春菜, 雪真弘, 小笠原渉 (長岡技科大・生物)

Trichoderma reesei において、これまでにセルロース・キシラン系誘導物質によるセルラーゼ・ヘミセルラーゼ誘導発現機構が盛んに研究されており、これらの遺伝子の転写制御において中心的な役割を担っている転写因子が XYR1 であることがすでに報告されている。一方で、*T. reesei* が自然界で生育する環境中には様々な栄養源が存在し、それらに応答して誘導される未知のタンパク質発現機構が存在することが考えられる。本研究では、様々な植物細胞壁構成成分への発現応答を明らかにすることにより、これまで一部の誘導物質に限られていた発現機構に新たな知見を加えることにより、自然界における *T. reesei* の誘導発現機構を解明することを目的とした。

様々な植物細胞壁構成成分を炭素源に培養を行い、その培養液を SDS-PAGE した結果、炭素源特異的な発現挙動を示す幾つかのタンパク質を明らかにした。そのうち、ガラクトース等に強い応答性を示したバンドを質量分析で解析した結果、アスパラギン酸プロテアーゼが同定された。この遺伝子の発現に既知のセルラーゼ遺伝子調節因子が関与しているのかを明らかにするために、XYR1, ACEI, ACEII, CreI 破壊株を用いて解析を行った。その結果、アスパラギン酸プロテアーゼがこれら既知の転写制御因子の制御下でないことが示唆され、未知の誘導発現機構の支配下にあることが考えられた。現在、新規転写調節因子の特定に向けて遺伝子上流領域の解析を行うとともに、マイクロアレイを用いた発現遺伝子の網羅的解析を行っている。また、未同定タンパク質に対して質量分析を行い、新規誘導発現機構の発見に向けて多方面から研究を進めている。

Search for novel transcriptional mechanism in *Trichoderma reesei*

Haruna Sato, Masahiro Yuki, Wataru Ogasawara (Dept. of Bioeng., Nagaoka Univ. of Tech.)

P-63

Trichoderma reesei の比較ゲノム解析に基づく新規転写因子 ClbR の機能解析

新田美貴子^{1,2}, 山口香織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】*Trichoderma reesei* のセルラーゼ高生産変異株 PC-3-7 とその親株である KDG-12 との比較ゲノム解析より, ORF 内に一塩基多型 (SNPs) が生じた遺伝子が 9 つ確認されている。Avicel を唯一の炭素源として両変異株を培養したところ, セルラーゼ生産性に大きな差異が認められなかったものの, 炭素源を 2 糖であるセロビオースとしたときに, PC-3-7 株ではセルラーゼ生産能が飛躍的に向上することが明らかとなった。我々はこのような変異株間において同定されている 9 つの SNPs のいずれかに起因するものと想定し, 其々の遺伝子破壊株の解析を進めている。

SNP が生じている 9 種の遺伝子の 1 つに推定の Zn(II)2Cys6 型転写因子が含まれており, 推定 DNA 結合部位近傍のアミノ酸が置換されていることが明らかとなった。当該転写因子 (ClbR: Cellobiose responding Regulator) のホモログを Blast で検索したところ, 種々の真菌特異的転写調節因子のなかで, AoAmyR に最も高い相同性を示した。AmyR は, *Aspergillus* 属における 2 糖であるイソマルトースによるアミラーゼ遺伝子群の転写調節因子である。そのため, PC-3-7 株において強化されたセロビオースによるセルラーゼの生産性に ClbR が関与している可能性が考えられた。本研究では ClbR を解析のターゲットとし, セルラーゼの誘導発現機構に関する新たな知見を得ることを目的としている。

【結果】PC-3-7 株について, *clbR* の SNP を野生株 (QM6a) の配列に復帰した変異株 (復帰株), および ORF 部位を破壊した破壊株を作製した。KDG-12, PC-3-7, 復帰株および破壊株についてセロビオース誘導培養条件におけるセルラーゼ活性, 炭素源の分解・取り込み挙動, およびセルラーゼ遺伝子の発現挙動を解析したところ, 復帰株は, 親株の KDG-12 と同等の値を一連の解析で示した。更に, *clbR* の SNP (PC-3-7) 株および破壊株では, 復帰株と比較してセルラーゼ活性の大幅な向上, 炭素源の分解・取り込み遅延, 特定の β -グルコシダーゼ遺伝子および転写因子の調節 (発現抑制・遅延) が示唆された。

Identification of new Zn(II)2Cys6 type transcription factor involved in cellobiose hydrolysis in *Trichoderma reesei*

Mikiko Nitta^{1,2}, Kaori Yamaguchi¹, 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.)

P-64

麴菌プロテアーゼ AOEXE103 のオルタナティブスプライシング

久保島 恵, 森田 寛人, 前田 浩, 岡本 綾子, 山形 洋平, 竹内 道雄 (東京農工大院・農・応生化)

【目的】麴菌 *Aspergillus oryzae* のゲノム解析により, *A.oryzae* の 12 種のセリンタイプカルボキシペプチダーゼ (CPase) 遺伝子の存在が明らかとなった。AOEXE103 はその 12 種の CPase の内の 1 つであり, この酵素をコードする遺伝子は, 全長 1775 bp で 3 つのイントロンを含むと推定されている。本研究で, その mRNA の配列を調べたところ, 一部のイントロンが除去されないオルタナティブスプライシングの可能性が示唆されたのでその詳細について検討した。

【方法・結果】*A.oryzae* RIB40 株を N 源の異なる Czapeck-Dox 液体培地で培養し, そこから経時的に gDNA を全く含まない mRNA を精製して逆転写反応を行うことで様々な培養条件の cDNA を得た。それらの cDNA を鋳型として AOEXE103 遺伝子特異的プライマーを用いた PCR を行い, 大腸菌を宿主として AOEXE103 の cDNA ライブラリを作製した。得られたライブラリからプラスミドを抽出, イントロン中に特異的に存在する制限酵素サイトを用いた制限酵素処理と PCR により AOEXE103 cDNA の 3 つのイントロンの有無を解析した。その結果, mRNA の中には, 3 つのイントロンが全てスプライスされたものも存在していたが, 一部のイントロンが除去されないオルタナティブスプライシングによる産物も存在することが明らかになった。さらに, AOEXE103 のオルタナティブスプライシングは, 培養時間依存的, 培地依存的にそのパターンが変化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推進事業の一環として行われたものである。

Alternative splicing of protease gene AOEXE103 in *Aspergillus oryzae*.

Megumi Kuboshima, Hiroto Morita, Hiroshi Maeda, Ayako Okamoto, Youhei Yamagata, Michio Takeuchi

(Tokyo Univ. of Agriculture and Technology)

P-65

麴菌セリントイプカルボキシペプチダーゼ遺伝子群の網羅的発現解析

阿保春花, 森田寛人, 岡本綾子, 前田浩, 山形洋平, 竹内道雄 (東農工大院・応生化)

【目的】麴菌 *A.oryzae* のゲノム解析の結果, 塩基配列から推定されるアミノ酸配列から, 麴菌のゲノムにはセリントイプカルボキシペプチダーゼの活性中心モチーフを有すると推定される遺伝子が 12 種類存在することが明らかとなった。これまでにこれらの遺伝子にコードされるタンパク質のアミノ酸配列に基づく系統樹が作成され, 液胞局在型, ゴルジ体局在型, 菌体外分泌型 2 つの計 4 つのクラスターに分類されることが示唆された。しかし, これら 12 種類の遺伝子の発現時期, 発現条件などはこれまでに解明されていない。そこで, 本研究では 12 種類の遺伝子の発現時期, 発現条件などの解明を目的とした。

【方法・結果】*A.oryzae* RIB40 株を液体または平板の Czapeck-Dox 培地で培養し, 経時的に菌体を回収して mRNA を精製後, cDNA を合成した。得られた cDNA をテンプレートに, 各酵素に特異的なプライマーを用いて半定量的 PCR を行い, これら 12 種類の遺伝子の転写パターンを解析した。その結果, 11 種類の遺伝子は mRNA として発現していることが確認された。しかし, その発現パターンは培養条件により異なっていた。麴菌に特有の遺伝子はタンパク質を N 源とした培地で発現量が増大する傾向が認められた。また, 今回の条件では発現が見られない遺伝子も存在していた。

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。

Semiquantitative transcriptional analysis of serine-type carboxypeptidase encoding genes in *Aspergillus oryzae*

Haruka Abo, Hiroto Morita, Ayako Okamoto, Hiroshi Maeda, Yohei Yamagata, Michio Takeuchi

(Tokyo Univ. of Agriculture and Technology)

P-66

薬剤排出 ABC トランスポーターを制御する転写因子 AtrR と相互作用する因子の探索

大場歩, 田中瑞己, 新谷尚弘, 五味勝也 (東北大院農・生物産業創成)

麴菌の転写因子 AtrR は, アズール系薬剤を排出する複数の ABC トランスポーター遺伝子の発現を制御している。出芽酵母では, 同様の薬剤排出 ABC トランスポーター遺伝子の発現制御に関わる転写因子 PDR1/PDR3 の機能発現において, メディエーター活性化補助因子 GAL11/MED15 サブユニットが, 極めて重要で特異的な役割を果たしていることが明らかにされている。しかし, 麴菌ゲノム上には GAL11 と同様の高いタンパク質が見出されておらず, 麴菌では出芽酵母と同じような転写制御機構が存在しない可能性がある。また, これまでに糸状菌の転写メディエーターに関連した知見もほとんどない。そこで, 本研究では, 麴菌において ABC トランスポーター遺伝子の発現に関与する転写メディエーターの役割を担うタンパク質を明らかにするために, アスペルギルス属用にコドンが最適化された TAP (Tandem Affinity Purification) タグを融合した AtrR を発現させ, 薬剤を加えて活性化させた AtrR と相互作用するタンパク質をプルダウン法によって単離を試みた。単離したタンパク質をマスマスペクトロメトリー解析したところ, HSP70 に分類されるタンパク質が AtrR と結合する可能性が示唆された。出芽酵母において, HSP70 である SSZ1 が PDR1 と結合して薬剤耐性を付与していること, また PDR3 が HSP70 の SSA1/SSA2 により負に制御されていることが明らかになっている。今回同定された HSP70 は SSA1 のオーソログであり, AtrR とこの SSA1 オーソログが相互作用していることが予想されるため, その可能性について詳細に解析を行っている。

Screening for the factor(s) that interacts with the transcription activator AtrR involved in ABC transporter gene expression

Ayumi Ohba, Mizuki Tanaka, Shintani Takahiro, Katsuya Gomi

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

P-67

A. nidulans の AmyR はグルコース存在下のステリグマトシスチンの生合成を抑制する

上村曜介, 鳴神寿昭, 志水元亨, 梶尾俊介, 高谷直樹 (筑波大院・生命環境)

AmyR は、澱粉やマルトースに応答して α -アミラーゼ等のアミロース分解系酵素遺伝子群の転写を活性化する転写因子として知られる。我々は、グルコース最少培地 (GMM) において、*A. nidulans* の AmyR 遺伝子の遺伝子破壊株 (Δ AmyR) が野生株に比べ、カビ毒ステリグマトシスチン (ST) を大量に生産することを見出した。ST 生合成遺伝子群の発現は転写因子 AfIR によって誘導される。DamyR では AfIR および ST 生合成酵素の遺伝子発現レベルが上昇した。一方、グルコース以外の炭素源を用いて培養した場合、野生株と DamyR の ST 生産量、AfIR および ST 生合成酵素の遺伝子発現レベルは同等であった。

GMM において添加するグルコース濃度を増加させると ST の生成量が低下した。*A. nidulans* のカタボライト抑制は転写因子 CreA が誘導する。CreA の遺伝子破壊株は ST を大量に生産した。また、AfIR 遺伝子のプロモーター領域には CreA の結合配列が存在した。このことから、CreA が AfIR の遺伝子発現を抑制することによって ST 生合成が抑制されることが考えられた。以上の結果から、DamyR では AmyR の欠損によって何らかのメカニズムによるグルコース代謝が正常に行われず、細胞内のグルコースが枯渇した状態となり、CreA によるカタボライト抑制が解除され、AfIR の発現が活性化し ST が大量に生成された可能性が考えられる。

DamyR は野生株と比べ GMM 上で多くの ST を生産するとともに、その生育が部分的に抑制される。また、アミロース分解系酵素遺伝子群の一部は GMM を用いた培養でも発現し、それらの遺伝子の発現が AmyR によって活性化されることを DNA マイクロアレイ解析により示している。これらのアミロース分解系酵素遺伝子群が AmyR による未知のグルコース代謝制御に関わる可能性を考えている。

Transcription factor AmyR of *A. nidulans* represses sterigmatocystin biosynthesis on glucose minimal medium.

Yosuke Kamimura, Toshiaki Narukami, Motoyuki Shimizu, Shunsuke Masuo, Naoki Takaya

(Graduate School of Life and Environmental Sciences, Univ. of Tsukuba)

P-68

麹菌におけるコウジ酸生産遺伝子の解析

佐野元昭, 堂本光子, 小池英明¹, 大島栄治², 立花國治², 比嘉良喬², 町田雅之¹, 大箸信一

(金沢工大,¹産総研,²三省製薬)

【目的】 コウジ酸は麹菌(*Aspergillus oryzae*)で生産される二次代謝産物で、チロシナーゼ活性を阻害することによりメラニンの生成を抑制する。コウジ酸はグルコースから変換されると考えられており、その一部の遺伝子については最近の研究で明らかとなった¹⁾。そこで今回我々は、コウジ酸生産経路の全体像を明らかにするため、DNA マイクロアレイ解析により解析をすすめた。

【方法と結果】 以前の研究で明らかとなったコウジ酸生産を制御する遺伝子の高発現株と破壊株を用いて DNA マイクロアレイ解析を行い、コウジ酸生産に関わる遺伝子の抽出を行った。候補にあがった遺伝子を *A. oryzae* Δ ligD Δ pyrG 株を宿主にして遺伝子破壊株を作製した。その結果、2つの遺伝子でコウジ酸生産量の減少が確認され、コウジ酸生産に関与する遺伝子であることが確認された。これらの遺伝子について詳細な解析を現在行っている。

1) Terabayashi et al.: Fungal. Genet. Biol. (2010) 47, p953-61.

Analysis of kojic acid synthesis genes from *Aspergillus oryzae*

Motoaki Sano, Mistuko Dohmoto, Hideaki Koike¹, Eiji Ohsima², Kuniharu Tachibana², Yoshitaka Higa²,

Masayuki Machida¹, Shinichi Ohashi (KIT, ¹AIST, ²Sansho Seiyaku Co., Ltd)

P-69

Aspergillus niger NRRL 328 由来 III 型ポリケタイド合成酵素によるピロン化合物の生成

濱地達也, 宮井希実, 小林慶一, 本田裕樹, 桐村光太郎 (早大・理工・応化)

【目的】植物において, 有用な二次代謝産物であるフラボノイドの骨格は III 型ポリケタイド合成酵素(PKS)により形成される。III 型 PKS は植物に特異的に存在すると考えられていたが, 糸状菌 *Aspergillus oryzae* においてオルセリン酸合成酵素 CsyA をコードする *csyA* の存在が確認され, ゲノム解析により *A. niger* NRRL 328 においても CsyA とアミノ酸配列で 36%の相同性を示す機能未知の III 型 PKS ホモログをコードする遺伝子 *An-csyA* の存在が見出された。そこで, *An-csyA* のクローニングおよびその遺伝子産物 An-CsyA の機能を解析した。

【方法および結果】*A. niger* NRRL 328 より抽出した mRNA を鋳型とした RT-PCR により An-CsyA をコードする cDNA をクローニングし, 大腸菌を宿主として His-tag を連結した組換え An-CsyA を生産させた。精製した組換え An-CsyA, 伸長基質マロニル CoA, 開始基質として炭素数 2~20 の脂肪酸アシル CoA を用いた反応を行い, 反応液の酢酸エチル抽出物を LC-MS/MS により分析した。An-CsyA は, 炭素数 2~12 の脂肪酸アシル CoA を開始基質として 2~5 回の縮合反応によりピロン化合物を生成可能であることを明らかにした。比較対照として, *A. oryzae* 由来の CsyA の機能解析を行い, CsyA が炭素数 2~14 の脂肪酸アシル CoA を開始基質として 2~3 回の縮合反応によりピロン化合物を生成可能であることを確認した。以上より, An-CsyA は CsyA とは基質特異性の異なる新規な III 型 PKS であることを明らかにした。

Production of pyrone compounds by a type III polyketide synthase from *Aspergillus niger* NRRL 328

Tatsuya Hamachi, Nozomi Miyai, Keiichi Kobayashi, Yuki Honda, Kohtarō Kirimura

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

P-70

麹菌 *A. oryzae* 由来タイプ III ポリケタイド合成酵素遺伝子 *csyB* の機能解析

石田理美¹, 橋元 誠¹, 勢 康代¹, 北本勝ひこ², 藤井 勲¹

(¹岩手医科大・薬,²東大院・農生科・応生工)

タイプ III 型ポリケタイド合成酵素 (PKS) 遺伝子は植物で多く見出されているが, 最近のゲノム解析により糸状菌にも存在することが明らかになっている。我々は麹菌 *A. oryzae* 由来の 4 種類のタイプ III 型 PKS 遺伝子のうち, *csyB* 遺伝子を *amyB* プロモーター下に組み込んだ発現ベクターを作製し, *A. oryzae* M-2-3 株を形質転換したところ, その形質転換体の培養液中に α -pyrone 骨格をもつ新規化合物 csypyron B1 の生産を確認した。この培養液中にはさらに 2 種類のマイナー成分 (csypyron B2, B3) が確認されていることから, 今回その構造解析を行った。

形質転換体誘導培養液を酢酸エチルで抽出後, ODS シリカゲルカラムクロマトグラフィーおよび ODS-HPLC 精製を繰り返すことに培養液 1.5 L から csypyron B2 (4.3 mg) および B3 (2.8 mg) を得た。各種機器分析により B2 は csypyron B1 より側鎖が 1 メチレン分長い類縁体, B3 は 2 メチレン分長い類縁体であることを明らかにした。これらの化合物は同じタイプ III 型 PKS で作られる germicidin と構造類縁体であり, 生合成的にも興味深いことから, 現在, ¹³C 標識化合物の投与実験により csypyron B 類への取り込み部位を明らかにするとともに, 生合成経路の解析を進めている。

Functional analysis of type III polyketide synthase gene *csyB* from *A. oryzae*

Satomi Ishida, Makoto Hashimoto, Yasuyo Seshime, Katsuhiko Kitamoto, Isao Fujii

(¹School of Pharmacy, Iwate Medical Univ., ²Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo)

P-71

Pyripyropene 生合成に関わる Pyr1 の構造機能解析

下川良彦, 森田洋行, 阿部郁朗 (東大院薬)

Pyripyropene A は高脂血症治療薬として臨床応用が期待されるメロテルペノイド化合物である。当研究室で、ゲノムデータベースから Pyripyropene 生合成遺伝子クラスターが見出され、*Aspergillus oryzae* を宿主としてクラスター構成遺伝子の異種発現が行われた。Pyripyropene A 生合成に関わる CoA ligase ホモログ (Pyr1)、およびポリケタイド合成酵素(Pyr2)の共発現の結果、ニコチン酸を開始基質とした Pyripyropene A 前駆体の生成が確認された。これまでニコチン酸を本来の基質とする CoA リガーゼの報告例は無く、Pyr1 の基質特異性等の酵素学的特性に興味を持たれた。そこで、大腸菌において異種発現した組換え酵素を用いて *in vitro* での Pyr1 の機能解析を行った。

Aspergillus fumigatus F37 株から Pyr1 の cDNA を取得後、GST 融合タンパクとして大腸菌に異種発現させた。CoA リガーゼは、第一基質であるカルボン酸を ATP により活性化した後、第二基質である CoA と AMP 中間体とのエステル交換反応を行う。そこで酵素活性の検討は、反応副生成物である AMP 生成量を指標とした。第一基質であるカルボン酸の特異性を検討した結果、Pyr1 はニコチン酸だけでなく、ピコリン酸や安息香酸を基質として認識した。一方で、第二基質の検討では本来の基質である CoA は受け入れず、acyl carrier protein (ACP)のホスホパンテテインアーム先端構造である *N*-acetylcysteamine (NAC)を受け入れることが明らかになった。現在、ホモロジーモデルに基づいた部位特異的変異導入により、基質認識機構の更なる解明を目指している。

Structure functional analysis of Pyr1 involved in the biosynthesis of Pyripyropene

Yoshihiko Shimokawa, Hiroyuki Morita, Ikuro Abe

(Graduate School of Pharmaceutical Science, The University of Tokyo)

P-72

糸状菌由来メロテルペノイド terretonin 生合成遺伝子の機能解析

松田侑大¹, 伊藤崇敬¹, 徳永欽也¹, 藤井勲², 久城哲夫¹, 海老塚豊¹, 阿部郁朗¹ (¹東大院・薬, ²岩手医大・薬)

Aspergillus terreus の生産する terretonin はポリケタイドと farnesyl 基由来のテルペノイド構造を併せ持つ特異なハイブリッド型化合物である。糸状菌由来メロテルペノイド化合物の中には顕著な生物活性を有するものがあり、その生合成遺伝子の解明は、今後の創薬を目指した物質生産において重要である。最近、本化合物の類縁体である pyripyropene の基本骨格を構築する遺伝子群が同定されたが、terretonin の生合成においても pyripyropene と同様に、ポリケタイド合成酵素 (PKS), プレニル基転移酵素 (PT), フラビン含有モノオキシゲナーゼ (FMO), テルペン環化酵素 (CYC) によって基本骨格が構築されると考えられる。*A. terreus* のゲノム上に見出された terretonin の推定生合成遺伝子クラスター中には、PKS, PT, FMO, CYC 遺伝子が含まれ、すでに本クラスター中の PKS, PT, FMO 遺伝子による予想生合成中間体の生成を確認している。

今回、さらに CYC 遺伝子の機能解析のため、PT, FMO, CYC の 3 遺伝子共発現系を異種糸状菌 *A. oryzae* にて構築し、PKS 産物添加した培地にて誘導培養することで環化産物の生成を試みたが、CYC 特異的な化合物の生産を確認することはできなかった。そこで、環化反応が進行する以前に、他の修飾酵素が働く可能性を考え、クラスター中に存在しているメチル基転移酵素 (MT) に着目した。*A. oryzae* にて PKS, PT, MT 共発現系を構築し、その代謝物を分析したところ PKS および PT 産物のメチルエステル体の生成が確認された。現在、このメチルエステルが FMO と CYC によって環化体へと変換されるか否かを検討している。

Functional analysis of the biosynthetic genes involved in the biosynthesis of a fungal meroterpenoid terretonin

Yudai Matsuda¹, Takayuki Itoh¹, Kinya Tokunaga¹, Isao Fujii², Tetsuo Kushiro¹, Yutaka Ebizuka¹, Ikuro Abe¹

(¹Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Univ. of Tokyo, ²School of Pharmacy, Iwate Medical Univ.)

P-73

2-アザアントラキノン生合成酵素の同定と機能解析

加治拓哉, 淡川孝義, 阿部郁朗 (東大院・薬)

2-アザアントラキノンはポリケタイドに由来するヘテロ芳香族化合物であり糸状菌や地衣類により産生される。このような化合物は抗がん活性や抗結核作用などの多様な生理活性を示す事が知られている。2-アザアントラキノン骨格は Wagoner らによる Scorpinone の生合成研究において、同位体投与実験によりヘプタケタイド中間体から生合成されることが明らかにされている¹。生合成中間体と生成物の構造から判断するとこの化合物は ACP からアルデヒドとして解離することが予想されていた。そこで、チオレダクターゼ(R)ドメインを有する type I PKS を生合成酵素として注目した。

これまでに *Fusarium solani* において 2-アザアントラキノンである bostrycoidin が産生される事が報告されている。そこで *F. solani* のゲノムに対して 3-methylorcinolaldehyde 合成酵素の R ドメインのアミノ酸配列を用いた相同性検索を行ったところ、R ドメインを持つ type I PKS (*bos1*)と Adenosine deaminase like protein (*bos2*) を含む生合成遺伝子クラスターが見いだされた。Bos1 がアルデヒドを持つヘプタケタイド中間体を合成し、Bos2 がアミノ基転移酵素として働いてアザアントラキノン骨格を合成すると予想した。

2つの遺伝子 *bos1* と *bos2* を *Aspergillus oryzae* M-2-3 株で異種発現させる事で、本遺伝子クラスターが 2-アザアントラキノン骨格の生合成に関わるか否かを明らかにし、また *in vitro* で酵素反応を行い、それぞれの酵素機能を明らかにする予定である。

1: Van Wagoner, R.M. *et al. J. Nat. Prod.* (2008) 71, 426-430

Biosynthesis of 2-Azaanthraquinone

Takuya Kaji, Takayoshi Awakawa, Ikuro Abe (Dept. of Pharmaceutical Sciences, Univ. of Tokyo)

P-74

分子内 peroxide 架橋形成を触媒する Verruculogen 合成酵素 FtmF

加藤直樹¹, 奥村英夫², 高橋俊二¹, 長田裕之¹ (¹理研基幹研・ケミカルバイオロジー, ²高輝度光科学研究センター)

マイコトキシン verruculogen は *Aspergillus fumigatus* における fumitremorgin 生合成経路の最終産物の一つであり、分子内に peroxide 架橋を有する特徴的な構造を有している。我々のこれまでの fumitremorgin 生合成遺伝子クラスターの解析から、 α -ケトグルタル酸依存型ジオキシゲナーゼと相同性を示す酵素遺伝子 *ftmF* が、その生成に関与していることを明らかにしている。FtmF の触媒する分子内 peroxide 架橋形成反応のメカニズムの理解を目的に、本研究では FtmF の機能解析ならびに結晶構造解析を行った。

大腸菌において His タグタンパク質として発現させた組換え FtmF を、 α -ケトグルタル酸、 Fe^{2+} イオン、アスコルビン酸存在下で、fumitremorgin B と反応させたところ、verruculogen の生成が確認できた。最適化した反応条件において、fumitremorgin B および α -ケトグルタル酸に対する反応動力学定数の測定を行った。

また、蒸気拡散法にて精製タンパク質の結晶化条件を探ったところ、PEG4000 を沈殿剤とした条件で結晶が得られた。この結晶を用いて X 線回折実験を行ったところ、1.82Å 分解能にて FtmF の結晶構造を明らかにすることが出来た。FtmF は結晶中においてダイマー構造をとっており、FtmF が属する Clavaminase synthase-like スーパーファミリーにおいてよく保存されている double-stranded β -helix 構造を有していた。

Functional characterization of verruculogen synthase FtmF of *Aspergillus fumigatus*

Naoki Kato¹, Hideo Okumura², Shunji Takahashi¹, Hiroyuki Osada¹

(¹Chemical Biology Dept., RIKEN ASI, ²JASRI)

P-75

ルシラクタエン生合成遺伝子クラスターの解析

田中彰^{1,2}, 本山高幸¹, 林敏明¹, 廣田洋¹, 安藤直子², 長田裕之¹ (¹理研・ケミカルバイオロジー, ²東洋大・工)

【目的】ルシラクタエンは糸状菌 *Fusarium* sp. RK97-94 株によって生産される低分子化合物であり, がん抑制遺伝子 p53 不活化細胞で細胞周期阻害活性を示す。p53 遺伝子は細胞周期のコントロールなどに関与しており, 多種の腫瘍において欠損, あるいは変異を起こしている。よって, p53 遺伝子が関与しない細胞周期の停止, 又は p53 変異体の立体構造変化による活性化を行う化合物は抗がん剤として期待できる。そのため, ルシラクタエンは抗がん剤のリード化合物として期待される。そこで, 生合成経路の解明と, 生合成遺伝子改変による新規高活性類縁体取得を目的に, ルシラクタエン生合成遺伝子クラスターの単離を行った。

【方法と結果】ルシラクタエンは, その構造が *Fusarium* sp.によって生産されるかび毒であるフザリン C と類似している。フザリン C は PKS-NRPS hybrid 酵素である FUSS によって生合成される。そのため, ルシラクタエンも同様の酵素によって生合成されると考えられた。そこで, PKS に必須である AT ドメインのアミノ酸配列情報を用いてプライマーを作製し, 遺伝子クローニングを行った。その結果, FUSS と高い相同性を示す配列を得た。次に, AT ドメインを欠失させた遺伝子破壊株を作製したところ, ルシラクタエンの生産能を完全に失った。更に, Genome Walking 法によってこの遺伝子断片の周辺領域をクローニングし, 配列決定を行った。その結果, 生合成遺伝子クラスターと推定される遺伝子配列の取得に成功した。また, 推定される生合成遺伝子クラスター内の methyltransferase ホモログの遺伝子破壊株を作成したところ, ルシラクタエンの脱メチル体を生産するようになり, 生合成への関与が明らかになった。

Analysis of the lucilactaene biosynthetic gene cluster

Akira Tanaka^{1,2}, Takayuki Motoyama¹, Toshiaki Hayashi¹, Hiroshi Hirota¹, Naoko Takahashi-Ando², Hiroyuki Osada¹
(¹Chemical Biology Dept., RIKEN, ²Graduate School of Engineering, Univ. of Toyo)

P-76

糸状菌 *Coleophoma empetri* F-11899 の FR901379 非生産変異株の T-DNA 挿入変異箇所の解析

境井千佳子, 山田雅人, 織野陽介, 磯貝泰弘, 橋本正治 (富山県大・生物工)

糸状菌 *Coleophoma empetri* F-11899 は抗真菌活性物質 FR901379 を生産する。この FR901379 生合成遺伝子の単離を目的として ATMT 法による挿入変異を行い, FR901379 非生産株を単離した。そのうちの 1 株である 77-6D 変異株はサザン解析の結果, ゲノム DNA に挿入された T-DNA は 2 個と推定された。しかし, TAIL-PCR 法とプラスミドレスキュー法によりゲノム DNA の T-DNA 挿入変異箇所近傍領域を単離しシーケンスした結果, RB 側と LB 側で連続していない 2 組の配列が得られ, T-DNA は 4 箇所挿入されていることが示唆された。これらの挿入変異箇所はいずれも推定される FR901379 生合成遺伝子ではない領域であった。このことから 77-6D 変異株は T-DNA の挿入の際にゲノム DNA の大きな欠失, または遺伝子座の転座が起きたと考えられた。そこで, 77-6D 変異株のゲノム DNA にどのような変異が起きたのかを PCR とサザン解析により調べた。4 箇所の挿入変異箇所それぞれプライマーを作成し, 組み合わせを変えて PCR 増幅を行った。また, 野生株と 77-6D 変異株のゲノム DNA を *Cl* I と *Eco* RV で消化し, 4 箇所の挿入変異箇所それぞれ作成したプローブを用いてサザン解析し比較を行った。

Investigation of inserted T-DNA regions in FR901379 non-producing mutant of fungus *Coleophoma empetri* F-11899

Chikako Sakai, Masato Yamada, Yhosuke Orino, Yasuhiro Isogai, Seiji Hashimoto
(Dept. of Biotechnol., Toyama Pref. Univ.)

P-77

真菌におけるロキシスロマイシンの新規作用点の探索

石井 晶, 熊坂 茉佑, 小泉 優希, 各務 佑哉, 鎌倉 高志 (東理大院理工・応生科)

真菌であるイネいもち病菌(*Magnaporthe oryzae*)はイネに感染する植物病原糸状菌であり, 現在でも全世界で多くの被害を出しているとともに植物病原糸状菌のモデル生物として重要視されている。本菌は感染時に胞子から発芽管を伸ばし, その先に付着器と呼ばれるドーム状の器官を形成し, 植物体内に侵入する。このいもち病菌に対して様々な抗生物質を作用させたところ 14 員環マクロライド系抗生物質であるロキシスロマイシン(RXM)を添加すると発芽管の伸長を阻害せず, 付着器の形成を阻害することが分かった。この作用は本来の作用点では説明がつかず, RXM はヒトにおいても作用点のわかっていない効果が報告されていることより新規作用点の存在が示唆されたため, 標的分子の探索を行った。RXM のターゲットを解明することで感染に重要な器官である付着器の分化機構の解明のみならず, RXM のヒトへの作用機構の解明や新たな薬剤への応用を目的として研究を行った。

ファージディスプレイ法により得られた, ヒトにまで共通に保存されている遺伝子に注目して解析を進めた。その結果, イネいもち病菌においてこの遺伝子が付着器形成時特異的に発現している事が分かった。さらにこの遺伝子の発現量が低下した株が得られ, RXM に対する感受性の低下していた。そのためこの遺伝子が RXM の標的と考え, さらなる解析を進めていく。

A Possible alternative Target of Roxithromycin in Fungi

Akira Ishii, Mayu Kumasaka, Yuuki Koizumi, Yuuya Kakumu, Takashi Kamakura

(Tokyo Univ. of science)

P-78

イネいもち病菌のキチンデアセチラーゼ相同タンパク遺伝子 *CBPI*, *CBLI* の機能解析

吉田翔, 大野優子, 中嶋佑一, 鎌倉高志 (東理大・応生科)

イネいもち病菌 *Magnaporthe oryzae* は宿主植物内への侵入において付着器と呼ばれる感染特異的器官を形成する。この付着器形成は, 接着表面の硬度, 疎水性度などの物理的シグナル, または化学誘導因子によって誘導されることがわかっているが, その詳細な分子機構は未知な部分が多い。その分子機構を解明することを目的に, 付着器形成誘導時において高い発現特異性を示す遺伝子としてキチンデアセチラーゼ相同タンパク遺伝子 *CBPI*(chitin binding protein 1)を単離した。物理的シグナルのみが存在する疎水性人工固体基質上において, *CBPI* 遺伝子破壊株の付着器形成率は顕著に低下したが, 化学誘導因子の添加によって野生株と同等まで付着器形成率が回復したことから, *CBPI* は物理的シグナルの認識に関与すると考えられた。さらに, *CBPI* とドメインレベルで相同性の高い遺伝子 *CBLI* (*CBPI* like gene 1)を発見, ノックアウトを行った。*CBLI* 遺伝子破壊株は野生株と変わらぬ形質であったが, *CBPI**CBLI* 遺伝子二重破壊株は *CBPI* 遺伝子破壊株よりもさらに低い付着器形成率を示し, 化学誘導因子を添加しても付着器形成率は完全に回復しなかったため, *CBLI* が化学シグナルの認識に関与している可能性が示唆された。しかし, 極親水性人工固体表面上では化学誘導因子存在下で野生株と *CBLI* 遺伝子破壊株が付着器を形成するのに対し, *CBPI* 遺伝子破壊株 *CBPI**CBLI* 遺伝子二重破壊株では付着器をほとんど形成しなかった。これらの結果から, 付着器形成における *CBPI*, *CBLI* の作用機作は予想よりも複雑であると考えられ, その解明に向けて現在解析を行っている。

The role of *Magnaporthe oryzae* Chitin-Binding Protein Genes, *CBPI* and *CBLI*, in Appressorium Differentiation

Sho Yoshida, Yuko Ohno, Yuichi Nakajima, Takashi Kamakura

(Dept. of Applied Biological Sci., Tokyo Univ. of Science)

P-79

イネいもち病菌の発芽管発現遺伝子ライブラリークローン B51 の遺伝子破壊体解析

佐々木健悟, 小泉優希, 各務佑哉, 清田司, 鎌倉高志

イネいもち病菌 *Magnaporthe oryzae* は、イネいもち病を引き起こす植物病原糸状菌である。本菌の分生子は植物表面上に付着した後、発芽管を伸長し、その先端に形成される感染特異的器官である付着器から侵入糸を伸ばすことで植物体内に侵入する。イネいもち病菌の感染過程における付着器分化は真核生物の形態分化や病害防除といった観点において非常に興味深い現象であることから、本研究室では発芽管伸長時に発現する遺伝子の解析を行っている。

我々のグループは発現遺伝子ライブラリーの中でも、特にクローン B51 に着目して研究を進めている。B51 は DNA 修復や細胞周期制御、転写制御などに関与する FHA ドメインを持つと考えられている。当研究室で作製した B51 破壊株において、明らかな菌糸成長速度低下が確認されるとともに、発芽率および付着器形成率の低下がみられた。加えて、分生子の形態や核数、発芽形態に関する異常がみられる分生子が多数観察された。以上より、B51 がイネいもち病菌における分生子形成、核分裂制御、発芽制御、付着器形成において重要な働きを持つことが示唆され、現在、さらなる解析を進めている。

Functional analysis of germ tube expressing cDNA library of *Magnaporthe oryzae*

Kengo Sasaki, Yuki Koizumi, Yuya Kakumu, Tsukasa Seida, Takashi Kamakura

(Dept. of Applied Biological Sci., Tokyo Univ. of Sci.)

P-80

イネいもち病菌におけるイネ抵抗性誘導因子生産遺伝子の探索

坂口歩・原島俊明・西村麻里江 (生物研)

イネいもち病菌はヘテロ 3 量体 G タンパク質を介した細胞内シグナル伝達により宿主を認識し感染を成立させる。G タンパク質シグナルの活性は負の制御因子である RGS (Regulators of G-protein Signaling) によって調整されている。本研究室では、イネいもち病菌における RGS の一つである Rgs2 の欠損株が宿主上で壊死斑様の褐点を形成し病原性が顕著に低下することから、G タンパク質シグナル活性の厳密な制御が感染に重要であることを明らかにしてきた。rgs2 破壊株は付着器からの侵入菌糸形成能を保持していることから、宿主の抵抗性反応を誘導し感染が抑制されていることが考えられる。

rgs2 破壊株で発現誘導している宿主抵抗性誘導因子を同定するため、野生株、rgs2 破壊株および各種 G タンパク質変異株の液体培養中の菌糸または侵入菌糸から RNA を抽出し、マイクロアレイ解析により Rgs2 が関与する細胞内シグナル伝達経路により発現調節される遺伝子候補を絞り込んだ。その結果、Rgs2 関連シグナル伝達経路により発現誘導されると考えられる 25 個の遺伝子を同定した。今回、それら遺伝子の中で抵抗性誘導に関与すると思われる代謝関連遺伝子に着目したところ、rgs2 破壊株においてポリケチド合成酵素クラスター内の遺伝子発現の増加が見られた。現在、これらクラスター内遺伝子の破壊株を作出し、病原性への関与を検討している。

Screening of genes related to production of an elicitor-like agent in *Magnaporthe oryzae*.

Ayumu Sakaguchi, Toshiaki Harashima, Marie Nishimura.

(NIAS)

P-81

イネいもち病菌における人為的 DNA 二本鎖切断誘導と相同組換え修復

荒添貴之, 大里修一, *有江力, 米山勝美, 桑田茂 (明治大農・*農工大農)

イネに重要病害を引き起こすイネいもち病菌 (*Magnaporthe oryzae*) にはイネ品種により病原性が異なるレースが多数存在する。これは作物として育種されてきた高度抵抗性イネ品種に対して、本菌が新たな病原性を獲得してきたこと、つまり新規レースが出現してきたことを意味している。新規レースの出現は本菌が保有する非病原性遺伝子に変異が生じることで引き起こされるため、我々はその変異機構の一つとして体細胞相同組換え (HR) に着目し、解析を進めてきた。現在までに、HR 検出用マーカー遺伝子を本菌ゲノムに導入することで、様々なストレス条件下や感染過程において生じる HR を YFP 蛍光として検出することに成功し、HR により非病原性遺伝子に変異することを実証した (平成 22 年度 本コンファレンス)。そこで、HR が多くの生物種において DNA 二本鎖切断 (DSBs) の修復機構として働くことに注目し、基礎的機構の解析を視野にいたった人為的 DSBs の誘導と HR 修復について評価をおこなった。DSBs の誘導には、18 塩基認識の希少切断制限酵素である I-Sce I の遺伝子配列を酵母ミトコンドリア DNA から取得し、真核生物コドン利用頻度に最適化して供試した。大腸菌により発現、精製をおこなった I-Sce I の制限酵素活性は、I-Sce I 認識配列を含むプラスミド DNA の切断により確認した。また、本菌ゲノムにおける DSBs の評価は I-Sce I 認識配列を YFP 遺伝子内に挿入した受容体遺伝子と、認識配列を含まない供与体遺伝子とを共導入した系統を取得後、当系統に I-Sce I 遺伝子を導入することで評価した。I-Sce I 遺伝子を導入した系統においては DSBs が生じた受容体配列が供与体配列を鋳型とした HR により修復されたことを示す YFP 蛍光を観察できたことから、本菌において I-Sce I 遺伝子を用いた人為的 DSBs 誘導が可能であること、DSBs 修復機構として HR が作用することを明らかとした。

Induction of artificial DNA double strand breaks and homologous recombination repair in Rice blast fungus

Takayuki Arazoe, Shuichi Ohsato, * Tsutomu Arie, Katsuyoshi Yoneyama, Shigeru Kuwata

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

P-82

イネいもち病菌に感染するマイコウイルス MoCV2 と MoCV1 の生化学的な比較解析

東浦智也, 浦山俊一, 福原敏行, 有江力, 寺岡徹, 森山裕充 (農工大院・農学府)

イネいもち病菌 *Magnaporthe oryzae* の弱毒化株 S-0412-II I c 株には 2 種類のマイコウイルスが混合感染しており、それぞれ、*Magnaporthe oryzae* chrysovirus 2 (MoCV2)、*Magnaporthe oryzae* endogenous virus 1 (MoEV1) と命名された。MoCV2 は 2.8-3.6kb に 4-5 分節の 2 本鎖 RNA セグメントを、MoEV1 は 1.2-2.4kb に 4 分節の 2 本鎖 RNA セグメントを有する。MoCV2 の部分的なシーケンス解析の結果、別の弱毒化株 S-0412-II I a 株に感染している *Magnaporthe oryzae* chrysovirus 1 (MoCV1) と非常に高い相同性 (核酸:99%以上、アミノ酸:99%以上) を示すことが判明した。しかし、MoCV2 が感染する S-0412-II I c 株は MoCV1 が感染する S-0412-II I a 株と比較して顕著な生育阻害作用を受けており、MoCV2 は MoCV1 よりも強い弱毒化作用を有する、又は、各宿主菌のウイルスに対する感受性が異なることが想定された。

MoCV2 と MoCV1 の比較解析を行うために、MoCV2 のウイルス様粒子の純化、ウイルス構成タンパク質の解析、全塩基配列決定を試みた。純化した MoCV2 ウイルス様粒子を電子顕微鏡で観察すると、直径約 35nm の球形の粒子が確認された。また、SDS-PAGE を用いてウイルス由来タンパク質を展開すると、130kDa、70kDa、65kDa、58kDa の分子量を持つ 4 種類のタンパク質が検出された。これらの性質において、MoCV2 と MoCV1 の間では顕著な相違が認められなかった。一方、MoCV2 は MoCV1 と比べて宿主菌に対して強い生育阻害を示すが、細胞内でのウイルス含量は約 1/10 以下と低かった。今後、2 種のウイルス間における、生育阻害やウイルス含量の相違について調査する。

Comparison between two related mycoviruses, MoCV2 and MoCV1, infecting *Magnaporthe oryzae*

Tomoya Higashiura, Syunichi Urayama, Toshiyuki Fukuhara, Tsutomu Arie, Tohru Teraoka,

Hiromitsu Moriyama (Faculty of Agriculture, Tokyo Univ. of Agri. & Tech.)

P-83 (O-13)

イネいもち病菌弱毒化マイコウイルス MoCV1 の性状解析及びウイルスタンパク質の機能解析

太田智子, 浦山俊一, 福原敏行, 有江力, 寺岡徹, 森山裕充 (東京農工大院・農)

Magnaporthe oryzae chrysovirus 1(MoCV1)はイネいもち病菌に感染し、宿主菌に生育阻害や弱毒化を起こすマイコウイルスで、4~5 分節の二本鎖 RNA ゲノムを有する球形のウイルスである。MoCV1 に感染したイネいもち病菌は細胞内で液胞の肥大化や顆粒化といった異常な形態を現わし、MoCV1 ウイルス溶液をウイルスフリーのイネいもち病菌に添加すると菌糸の萎縮が見られる。

MoCV1 感染株の菌体収量向上を目的としてミニジャーで培養した結果、培地量、植菌量及び培養時間が同じ条件でコルベンを用いた振とう培養と比較して、約 20 倍程度の菌体量が得られた。次に菌体から MoCV1 ウイルス粒子を精製して SDS-PAGE をおこなった結果、14 日間培養した菌体由来のウイルス成分は、2 日間培養したものと比較して、ウイルス構成タンパク質のサイズが小さくなっていった。従って、ウイルス粒子を構成するタンパク質は、培養期間が長期化すると一定サイズに分解 (プロセッシング) されることが示唆された。また、イネいもち病菌の形態異常に関与するウイルス遺伝子を探索する試みとして、パン酵母を利用した MoCV1 ウイルス遺伝子発現系の構築と解析を行った。その結果、ウイルスタンパク質の一つは、酵母細胞に生育不良などの形態異常を引き起こすことが示された。

Functional analysis of viral proteins of MoCV1 (*Magnaporthe oryzae chrysovirus 1*) which confers hypovirulence traits to rice blast fungus.

Tokomo Ohta, Syunichi Urayama, Toshiyuki Fukuhara, Tsutomu Arie, Tohru Teraoka, Hiromitsu Moriyama.

(Dept. Agric., Tokyo Univ. of Agric. & Tech.)

P-84

イネいもち病菌を弱毒化するマイコウイルス MoCV3 (*Magnaporthe oryzae chrysovirus 3*) の性状解析

迫田紘史・浦山俊一・高井遼子・福原敏行・有江力・寺岡徹・森山裕充 (農工大院・農学府)

イネいもち病菌 S-0412-II 2a 株は 5 成分の 2 本鎖 RNA (dsRNA) を有するマイコウイルスに感染しており、先行研究の進んでいる MoCV1 (*Magnaporthe oryzae chrysovirus 1*) 感染株と比較すると、著しいアルビノ化、分生子形成量の低下などの生育阻害を示す。当該ウイルスは、MoCV1 と塩基配列の相同性を示すことから、MoCV3 (*Magnaporthe oryzae chrysovirus 3*) と命名した。MoCV3 も MoCV1 と同様に、菌類ウイルスとしてはまれな性質である細胞外フェーズを有した。塩化セシウム密度勾配遠心法により、浮遊密度 1.36-1.39g/ml の画分に回収した純化ウイルス溶液は、直径約 35nm の球状を示した。SDS-PAGE では、少なくとも 4 成分 (P130, P70, P65, P58) のタンパク質で構成されることが示された。現在菌体の収量アップのために、ミニジャーでの S-0412-II 2a 株の培養条件を検討しており、ウイルス粒子の収量向上や、ウイルス構成タンパク質の成分変化についての解析に資する予定である。

Characterization of MoCV3 (*Magnaporthe oryzae chrysovirus 3*) that confers hypovirulence to rice blast fungus.

Hirofumi Sakoda, Syunichi Urayama, Ryoko Takai, Toshiyuki Fukuhara, Tsutomu Arie, Tohru Teraoka, Hiromitsu Moriyama

(Faculty of Agriculture, Tokyo Univ. of Agri. & Tech)

P-85 (O-12)

稲いもち病菌 *Magnaporthe grisea* における植物ディフェンシンの作用メカニズム解析

小黒芳史、山崎晴丈、梨本正之、高木正道、高久洋暁（新潟薬大・応生科）

植物には抗菌性蛋白質による生体防御機構が存在する。我々は植物抗菌性蛋白質の 1 つであるカラシナ由来ディフェンシン BJ-AFP1 が、稲いもち病菌 *Magnaporthe grisea* に対し高い抗菌活性を示し、その際、細胞膜脱分極化、活性酸素種(ROS)の蓄積及び菌糸がバルーン構造の形成が起こることを明らかとしている本大会では、BJ-AFP1 添加後初期の *M. grisea* 菌糸又は胞子の応答に注目し、解析した結果について報告する。組換え酵母 *Pichia pastoris* を利用し、発現・精製した BJ-AFP1 を *M. grisea* に添加したところ、15 分後には細胞膜脱分極化及び ROS の蓄積が起こり、時間経過と共に脱分極化の割合及び ROS は増加した。また、胞子に BJ-AFP1 を作用させたときも 15 分で細胞膜脱分極化が起こり、さらに過剰量の BJ-AFP1 を添加することで胞子の破裂が観察された。また、BJ-AFP1 添加による菌糸のバルーン構造形成は、高濃度 BJ-AFP1 に対しより短時間で形成されることが明らかとなった。また、プロトプラスト化した菌糸に BJ-AFP1 を作用させたときには、BJ-AFP1 低感受性を示した。このことから細胞壁上に BJ-AFP1 感受性を決定する因子が存在している可能性が示唆された。

The mechanism of action of the plant defensin BJ-AFP1 in *Magnaporthe grisea*

Yoshifumi Oguro, Harutake Yamazaki, Masayuki Nashimoto, Masamichi Takagi, Hiroaki Takaku

(Applied Life Sci, Niigata Univ. of Pharmacy and Applied Life Science)

P-86

イネごま葉枯病菌の分生胞子形成を促進する糸状菌 *Phomopsis* sp. (*Diaporthe* sp.)

大西雄介、上野誠、荒瀬榮、木原淳一（島根大・生資）

イネごま葉枯病菌 (*Bipolaris oryzae*) の分生胞子形成は、近紫外線 (波長 300-400 nm) 照射後の暗黒下において認められる。今回、イネごま葉枯病菌との対峙培養によって、イネごま葉枯病菌の分生胞子形成を促進する糸状菌を得た。コロニーの性状、および、rDNA の ITS 領域の塩基配列から、本糸状菌は、*Phomopsis* sp. (*Diaporthe* sp.) であると推察され、D1 菌株と名付けた。対峙培養を行った場合、D1 菌株コロニーと接触する周辺で、イネごま葉枯病菌の分生胞子形成が有意に増加した。この現象は、イネごま葉枯病菌と D1 菌株のそれぞれの菌糸が直接接触していなくても認められた。次に、D1 菌株のみを培養した PDA 培地を、菌体を含んだままオートクレーブ滅菌し、再度、シャーレ内で固化させた培地でイネごま葉枯病菌を培養した結果、コントロールと比較して、イネごま葉枯病菌の分生胞子形成が有意に増加した。さらに、D1 菌株を各種液体培地で培養後、ろ過滅菌した培養ろ液をペーパーディスクに滴下し、このペーパーディスクとイネごま葉枯病菌を対峙培養した結果、コントロールと比較して、イネごま葉枯病菌の分生胞子形成が有意に増加した。以上の結果から、D1 菌株によって分泌される熱安定性の何らかの物質が、イネごま葉枯病菌の分生胞子形成を促進することが考えられた。今後、D1 菌株を用いて、イネごま葉枯病菌以外の糸状菌の分生胞子形成が促進するか否かについて調査するとともに、分生胞子形成を促進する物質の単離・同定を行う予定である。

Conidiation-promoting fungus *Phomopsis* sp. (*Diaporthe* sp.) against rice brown spot fungus *Bipolaris oryzae*

Yusuke Ohnishi, Makoto Ueno, Sakae Arase, Junichi Kihara

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

P-87

トウモロコシごま葉枯病菌 (*Cochliobolus heterostrophus*) の NADPH Oxidase 遺伝子群の機能解析

泉津弘佑*, 齋藤禎一, 住田卓也, 森田篤, 田中千尋 (京大・院・農, *現 滋賀県大・学振特別研究員)

NADPH Oxidase は、生体内における主要な活性酸素 (O₂⁻) 産生酵素として知られている。動物や植物では、病原菌の侵入に対する防御手段として NADPH Oxidase を利用していることが知られている。その一方で、植物病原菌類も NADPH Oxidase 遺伝子群を保有している。今回我々は、主要植物病原菌であるトウモロコシごま葉枯病菌 (*Cochliobolus heterostrophus*) を用いて、NADPH Oxidase 遺伝子群の遺伝子破壊および機能解析を行い、植物病原菌における役割を調べた。ゲノム解析の結果、トウモロコシごま葉枯病菌は 3 つの NADPH Oxidase 遺伝子 (*Nox1*, *Nox2*, *Nox3*) を保有していた。*Nox1* 遺伝子破壊株では、メラニン化の不全、孢子形成能の低下、および子のう殻形成の不全など形態形成において著しい影響が認められた。一方、*Nox2* および *Nox3* 破壊株ではこのような形態形成の異常はみとめられなかった。トウモロコシに対する病原性試験では、*Nox2* は宿主への侵入過程において著しい不全を示したのに対し、*Nox1* および *Nox3* の破壊株では、病原性への強い影響はみとめられなかった。*Nox2* 破壊株は、侵入器官である付着器を形成することが出来るもののその後の侵入過程に異常が認められた。以上の結果から、トウモロコシごま葉枯病菌においては、形態形成を主に制御する *Nox1* 遺伝子と宿主への侵入過程を主に制御する *Nox2* 遺伝子という使い分けが存在することが強く示唆された。

Characterization of NADPH oxidase genes in *Cochliobolus heterostrophus*.

*Kosuke Izumitsu, Yoshimoto Saitoh, Takuya Sumita, Atsushi Morita, Chihiro Tanaka

(Grad. School of Agriculture, Kyoto Univ., * Research Fellow of the Japan Society for the Promotion of Science)

P-88

トウモロコシごま葉枯病菌における *Cdc42* 遺伝子の機能解析

住田卓也, 泉津弘佑, 森田篤, 田中千尋 (京大・院・農)

トウモロコシごま葉枯病菌 *Cochliobolus heterostrophus* はトウモロコシの主要病原菌の一つであり、植物病原性糸状菌のモデル生物として遺伝子研究が進められている。我々は、本菌の細胞内シグナル伝達経路についての調査を行ってきた。これまでの調査により、CHK1-MAPK 経路と *Nox2* 経路には他の多くの経路と異なり、病原性との注目すべき関連性が存在することが示唆されている。中でも CHK1-MAPK 経路は付着器形成をはじめとする感染初期過程を制御していると考えられる。本研究では、トウモロコシごま葉枯病菌の感染初期過程を制御するマスターレギュレータを明らかにするため、CHK1-MAPK 経路の上流因子の探索を行った。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* においては、MAPKK キナーゼ Ste11 のリン酸化を MAPKKK キナーゼ Ste20 が制御すること、そして Ste20 の上流因子として Rho 型 small GTPase *Cdc42* が存在することが明らかになっている。トウモロコシごま葉枯病菌の CHK1-MAPK 経路を構成する MAPKK キナーゼ ChSte11 は Ste11 のオーソログであることから、我々は *Cdc42* 遺伝子に着目し、トウモロコシごま葉枯病菌からそのオーソログと推定される遺伝子 *ChCdc42* をクローニングし、相同組換えを利用した野生型株の遺伝子破壊を行った。その結果得られた遺伝子破壊株は野生型株と比較して成長が著しく遅かった。また顕微鏡下において、分枝後の菌糸が膨潤するなどの形態異常が観察された。さらに、野生型株と交配したところ子嚢核形成能がなかった。現在植物への侵入に重要な付着器形成能、宿主における病原性試験を行っている。本発表では、これらの結果についても報告したい。

Characterization of *Cdc42* gene of *Cochliobolus heterostrophus*

Takuya Sumita, Kosuke Izumitsu, Atsushi Morita, Chihiro Tanaka (Grad. School of Agriculture, Kyoto Univ.)

P-89

ウリ類炭疽病菌が分泌するエフェクタータンパク質 NIS1 の機能解析

入枝泰樹, 吉野香絵, 晝間敬, 奥野哲郎, 高野義孝 (京大・院・農)

ウリ類炭疽病菌 (*Colletotrichum orbiculare*) はウリ科植物に病害を引き起こす植物病原糸状菌であるが、ウリ科植物に加えて、*Nicotiana benthamiana* に感染することが知られている。我々は、ウリ類炭疽病菌が、この *N. benthamiana* に対する細胞死誘導活性を有するエフェクタータンパク質 NIS1 を分泌することを明らかにしている。今回、NIS1 が植物免疫反応を抑制できるかを検討するために、モデル植物であるシロイヌナズナにおいて、NIS1 を恒常的に発現する形質転換植物を作出した。作出した NIS1 発現シロイヌナズナは、野生型シロイヌナズナと比較して、生育の低下を示し、NIS1 の発現がシロイヌナズナの生育に対して阻害的効果を及ぼすことが明らかとなった。一方で、分泌シグナルを欠失した NIS1 を発現させた場合、このような影響は観察されず、NIS1 がアポプラストへと分泌されることにより生育阻害が引き起こされると推定された。この NIS1 発現シロイヌナズナに不適応型の炭疽病菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*) を接種した結果、抵抗性の著しい低下が観察された。この結果より、NIS1 の発現によって、シロイヌナズナの病原糸状菌への抵抗性が低下することが明らかとなった。さらに、病原細菌 *Pseudomonas syringae* に対しても、NIS1 発現シロイヌナズナはその抵抗性の低下を示した。これらの結果より、エフェクター NIS1 は、シロイヌナズナの植物抵抗性を抑制する機能を有することが強く示唆された。現在、ウリ類炭疽病菌の宿主植物感染プロセスにおける NIS1 タンパク質の動態を明らかにするために、蛍光タンパク質融合による、分泌前の病原糸状菌細胞内および分泌後の植物組織における局在解析をおこなっている。その結果についても併せて報告する。

なお、本研究は生研センター「イノベーション創出基礎的研究推進事業」の援助を受けて行われた。

Studies on an effector protein NIS1 secreted by *Colletotrichum orbiculare*.

Hiroki Irieda, Kae Yoshino, Kei Hiruma, Tetsuro Okuno, and Yoshitaka Takano

(Grad. School of Agriculture, Kyoto Univ.)

P-90 (O-14)

ウリ類炭疽病菌の病原性に必須である分泌タンパク質遺伝子 *LAC2* の同定及び機能解析

林 紹仔, 奥田枝穂, 奥野哲郎, 高野義孝 (京大院・農)

ウリ類炭疽病菌 (*Colletotrichum orbiculare*) は、ウリ科植物に病害を引き起こす植物病原糸状菌である。本菌は、メラニン化した付着器を形成して宿主植物へ侵入するが、この侵入過程において、付着器のメラニン化は必須である。今回、本菌の病原性関連遺伝子として、分泌型ラッカーゼ様遺伝子 *LAC2* を同定した。*LAC2* の標的破壊株においては、付着器のメラニン化は顕著に低下しており、キュウリへの病原性は失われていた。GFP を用いたレポーター解析より、*LAC2* 遺伝子は付着器形成過程において強く転写誘導され、その翻訳産物は、細胞外へ分泌されることが示唆された。さらに、分泌シグナル領域を欠失させた変異型 *LAC2* は、*lac2* 破壊株を相補できなかった。また、*lac2* 破壊株は、その胞子の色が野生株と異なっていた。イネいもち病菌 (*Magnaporthe oryzae*) の *LAC2* ホモログをウリ類炭疽病菌の *lac2* 破壊株へ導入した場合、その分生胞子の色は回復したが、病原性と付着器のメラニン化は回復しなかった。この結果は、*LAC2* による胞子の色素と付着器のメラニン生合成は、同一反応ではなく、*LAC2* の基質は単一ではないことを示唆した。さらにこの結果は、*LAC2* が関与する胞子の色素生成は病原性には必須ではないことを示した。

なお、本研究は生研センター「イノベーション創出基礎的研究推進事業」の援助を受けて行われた。

Isolation and Functional Analysis of a Secreted Protein Gene *LAC2* Required for Fungal Pathogenicity of *Colletotrichum orbiculare*

ShaoYu Lin, Shiho Okuda, Tetsuro Okuno, Yoshitaka Takano (Grad. School of Agriculture, Kyoto Univ.)

P-91 (O-15)

***Cryphonectria parasitica* RAS3 タンパク質の生化学・生理学的性質**

山内優輝、高橋拓也、笠原紳 (宮城大・食産業・環境)

クリ胴枯病 (chestnut blight) は、世界三大植物病の1つとして有名で、特に米国ではアパラチア山地で極めて優勢であったクリ (American chestnut) を半世紀の間に事実上全滅させるほどの被害をもたらした。その原因糸状菌 *Cryphonectria parasitica* は、1900年頃にわが国からニューヨークに貨物に付着して移入されたという。現在、*C. parasitica* のゲノム解析はほぼ終了しており、さまざまな角度から植物への病徴発現メカニズムの解析およびその制御方法が検討されている。

C. parasitica の RAS に関しては、すでに RAS1、RAS2 が確認されているが、本研究では新たに見出された RAS3 について、生化学・生理学的機能解析を行った。RAS3 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、その点で動物の Rin および Rit との共通性が認められた。RAS3 をコードする *ras3* 遺伝子の破壊および過剰発現が菌糸成長や分生子形成に及ぼす影響を検討した。GFP 融合 RAS3 を発現させて、その局在について観察したところ、細胞表面 (細胞膜上) に強い蛍光が認められた。C 末端 32 アミノ酸を欠失した RAS3 は、この局在を示さず、細胞内部全体に分散して発現していた。このことから、C 末端 32 アミノ酸がファルネシル基に替わり膜結合に寄与している可能性が示された。また、RAS3 の GTP 結合能や GTPase 活性等の生化学的性質を調べるために、大腸菌中で RAS3 を発現し、精製した。

Biochemical and physiological functions of *Cryphonectria parasitica* RAS3

Yuki Yamauchi, Takuya Takahashi and Shin Kasahara

(Dept. of Env. Sci., Miyagi Univ.)

P-92

ナシ黒斑病菌の感染器官における活性酸素種生成複合体の機能解析

森田雄一、玄康洙、森川響子、池田健一、朴杓允 (神戸大・農学研究科)

これまでに、感受性ナシ葉に接種したナシ黒斑病菌の貫穿菌糸及び付着器底部において活性酸素種 (Reactive Oxygen Species: ROS) が生成し、ROS 生成に関わる 2 コピーの NADPH oxidase (Nox) 遺伝子 *noxA*, *noxB* のうち、後者の破壊変異株において侵入能力および病斑形成能力が喪失することが明らかとなっている。さらに、*nox* 変異株では菌糸分岐頻度の増加が認められている。今回、本菌のゲノムライブラリーよりサブクローニングした *noxB* に *gfp* を融合させたレポーター遺伝子を *noxB* 破壊変異株に導入し、蛍光局在性を調査した。その結果、レポーター遺伝子導入株では侵入能力および病斑形成能力を回復した。セルロース膜上の孢子発芽体を蛍光顕微鏡観察したところ、GFP 蛍光が付着器に局在していた。一方、栄養生長させた菌糸では、その全体に GFP 蛍光が認められた。以上より、感染時と栄養生長時では菌糸における NoxB の発現・局在様式が異なることが明らかとなり、NoxB が菌糸の極性生長において重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

The functional analysis of Nox complex in infection structures of *Alternaria alternata* Japanese pear pathotype

Yuichi Morita, Gang-Su Hyon, Kyoko Morikawa, Ken-ichi Ikeda, and Pyoyun Park

(Dept. of Agriculture, Univ. of Kobe)

P-93

麹菌 *A. oryzae* における AoSO と Stress Granule の共局在解析

黄 湘婷, 丸山 潤一, 北本 勝ひこ (東大院・農生科・応生工)

【目的】真核生物は、ストレスを受けると mRNA を stress granule などの構造体に隔離し非翻訳状態にすることが知られている。しかし、この転写後発現調節の仕組みについて糸状菌ではほとんど研究されていない。一方、*A. oryzae* AoSO タンパク質はストレス依存的に隔壁孔に凝集することから、AoSO もストレス条件下での細胞の恒常性維持に関わっている可能性が考えられる。そこで、両者の関連を明らかにすることを目的として本研究を行なった。

【方法・結果】*A. oryzae* における *Saccharomyces cerevisiae* Pab1p と Pub1p のホモログ AoPab1, AoPub1 を stress granule のマーカーとして用いた。それぞれを EGFP と融合して *A. oryzae* で発現させ、ストレス条件下での観察を行なった。その結果、AoPab1-EGFP と AoPub1-EGFP は通常状態で細胞質全体に存在し、ストレス条件下では凝集して顆粒状の構造をとることが観察された。さらに、AoPab1-mDsRed と AoSO-EGFP の共発現株を作製し、局在解析を行なったところ、一部で共局在が観察された。このことから、AoSO と stress granule が相互作用していることが示唆された。現在、AoSO が stress granule の形成に関与するかについて調べている。

1) J. Maruyama *et al.* (2010) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Vol. 391, 868-873.

Localization Analysis of AoSO and Stress Granule in *Aspergillus oryzae*

Hsiang Ting HUANG, Jun-ichi MARUYAMA, Katsuhiko KITAMOTO (Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo)

代表発表者索引

あ

青木淳一	43
青山未来	68
阿保春花	71
荒添貴之	79

い

五十嵐圭日子	41
石井 晶	77
石川周平	30, 68
石崎浩章	45
石田理美	73
泉津弘佑	82
磯村幸治	55
伊藤英里子	65
伊藤 岳	37, 46
伊藤靖夫	36
稲葉 梓	27, 54
井上加奈子	56
入枝泰樹	83
岩下和裕	42

え

江原直樹	39
------	----

お

大隅良典	12
太田智子	32, 80
大場 歩	71
小川真弘	17
小黒芳史	31, 81

か

加治拓哉	75
片山琢也	27, 51
加藤直樹	75
鎌田 堯	24
上村曜介	72
亀井誠之	50
榎野友香	28, 58
川上 顕	34
川畑絢平	51

き

菊間隆志	43
木下 浩	34

木原淳一	81
------	----

く

日下秀行	31, 69
工藤佳那子	62
國武絵美	67
久保島恵	70
久保康之	18
黒田明典	65

こ

小池英明	41
小橋口聡	52
小林慶一	44
駒井紀之	52

さ

佐伯 圭	48
境井千佳子	76
坂口 歩	78
坂本裕一	28
櫻木 潔	63
迫田紘史	80
佐古知美	49
佐々木健悟	78
佐藤真之	38
佐野和紀	62
佐野元昭	72

し

志田洋介	36
志水元亨	26
下川良彦	74

す

鈴木 晃	45
住田卓也	82

そ

周 勝敏	47
------	----

た

高橋 徹	39
田所隆之	56
田中愛子	66

田中 彰	76
田中瑞己	30
田邊弘毅	35, 60

つ

對崎真楠	54
------	----

て

寺戸志保	46
------	----

と

富田沙耶子	61
-------	----

な

中沢威人	33
中谷和也	40

に

西田洋巳	29
新田美貴子	70

は

萩原大祐	50
橋本広祐	57
花田照明	47
濱地達也	73
原光二郎	38
原島俊明	37
黄 湘婷	85

ひ

東浦智也	79
久田博元	44
平本哲也	53

ふ

黄 湘婷	85
二神泰基	42

ほ

星 浩臣	55
------	----

ま

松尾賢人	53
松田侑大	74
丸井淳一郎	59
丸山潤一	15

み

緑川裕良	48
宮崎安将	21

む

村口 元	58
------	----

も

森田雄一	84
森本翔太	66

や

安田（吉野）庄子	59
矢萩大貴	26, 49
山内優輝	33, 84
山川 結	35, 60
山岸賢治	40
山崎愛弥	67

ゆ

雪 真弘	69
------	----

よ

吉栄俊秀	63
吉田 翔	77
吉田真澄	61

り

林 紹仔	32, 83
------	--------

わ

和田朋子	64
渡邊 彰	57
和田龍太	29, 64

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