

## 目次

コンファレンスプログラム	2
発表演題及び講演時間	3
特別講演要旨	14
シンポジウム講演要旨	15
一般講演要旨	25
ポスター発表講演要旨	35
代表発表者索引	79
糸状菌分子生物学研究会会則	82
糸状菌分子生物学研究会運営委員名簿	83
糸状菌遺伝子研究会賛助会員	84

## 第 12 回糸状菌分子生物学コンファレンス

日時：2012 年 11 月 12 日(月)–13 日(火)

会場：ウインクあいち（名古屋市中村区名駅 4-4-38）

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 12 日 (月)

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

### 11 月 13 日 (火)

- |               |                |
|---------------|----------------|
| 9:30 - 12:30  | シンポジウム         |
| 12:30 - 13:30 | 昼休み            |
| 13:30 - 15:00 | ポスター発表 (偶数番号)  |
| 15:00 - 15:10 | 休憩             |
| 15:10 - 17:10 | 口頭発表 (O-11~20) |
| 17:10 - 17:25 | 休憩             |
| 17:25 - 18:00 | 総会、表彰式、閉会の辞    |

## 発表演題および講演時間

特別講演 11月12日(月) 15:00 - 16:00

**Diversity and evolution of wood decay systems in saprotrophic and mycorrhizal Agaricomycetes (mushroom-forming fungi)**

**Professor David Hibbett (Clark University)**

シンポジウム 11月13日(火) 9:30 - 12:30

「植物と菌類の相互作用」

9:30-10:15

**S-1 「 $\alpha$ -1, 3-グルカンを利用した植物病原性糸状菌の自然免疫回避機構」**  
(独) 農業生物資源研究所 植物・微生物間相互作用研究ユニット  
西村 麻里江

10:15-11:00

**S-2 「植物病原糸状菌の集団適応戦略ーイネいもち病菌を例として」**  
神戸大学大学院 農学研究科 土佐 幸雄

11:00-11:45

**S-3 「ストリゴラクトン: 植物における共生と寄生そして形態形成を司るテルペノイド」**  
大阪府立大学大学院生命環境科学研究科 秋山 康紀

11:45-12:30

**S-4 「牧草共生糸状菌 epichloae エンドファイトの共生に関わる遺伝子群の機能解析」**  
名古屋大学大学院 生命農学研究科 竹本 大吾

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

12:40 O-1 麴菌を用いた脂肪酸等の炭化水素系化合物の生産性向上の研究

玉野孝一<sup>1</sup>, Kenneth Bruno<sup>2</sup>, Sue Karagiosis<sup>2</sup>, David Culley<sup>2</sup>, Shuang Deng<sup>2</sup>, James Collet<sup>2</sup>, 石井智子<sup>1</sup>, 梅村舞子<sup>1</sup>, 小池英明<sup>1</sup>, Scott Baker<sup>2</sup>, 町田雅之<sup>1</sup> (1 産総研・生物プロセス、2 米国パシフィックノースウエスト国立研究所)

12:52 O-2 麴菌必須遺伝子の解析のためのプロモーターシャットオフシステムの開発

寺戸志保<sup>1,2</sup>, 島原明子<sup>1</sup>, 豊浦利枝子<sup>2</sup>, 岩下和裕<sup>1,2</sup> (1 広島大院・先端研, 2 酒総研)

13:04 O-3 *Aspergillus nidulans* のガラクトフラナン合成に関与する遺伝子の機能解析

元松遥<sup>1</sup>, 畠山信太郎<sup>1</sup>, 浴野圭輔<sup>1</sup>, 二神泰基<sup>2</sup>, 竹川薫<sup>2</sup>, 後藤正利<sup>2</sup>, 野村善幸<sup>1</sup>, 岡拓二<sup>1</sup> (1 崇城大学・生物生命・応微工, 2 九大・院・農)

13:16 O-4 *Aspergillus nidulans* septin interactions and post-translational modifications.

Shunsuke Masuo, Yainitza Hernández-Rodríguez and Michelle Momany (Dept. of Plant Biology, Univ. of Georgia)

13:28 O-5 Characterization of Stress Granules in *Aspergillus oryzae*

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

13:40 O-6 ウシグソヒトヨタケの傘成長に必要な *cag1* 遺伝子は、Tup1 相同タンパク質をコードしている。

村口元, 名越貴浩, 煙山和樹 (秋田県立大・生物資源)

13:52 O-7 麴菌が産生する hydrophobin RolA と固体表面間の相互作用機構解析

田邊弘毅<sup>1</sup>, 田中拓未<sup>1</sup>, 大類景子<sup>1</sup>, 上原健二<sup>1</sup>, 高橋徹<sup>2,3</sup>, 富樫貴成<sup>4</sup>, 有田稔彦<sup>4</sup>, 阿部敬悦<sup>1,3</sup> (1 東北大院・生物産業創成, 2 酒総研・基盤, 3 東北大・未来研, 4 東北大・多元研)

14:04 O-8 *Trichoderma reesei* セルラーゼ高生産変異株における *bgl2* 変異の影響

志田洋介<sup>1</sup>, 山口香織<sup>1</sup>, 新田美貴子<sup>2</sup>, 森一樹<sup>3</sup>, 平川英樹<sup>4</sup>, 久原哲<sup>3</sup>, 小笠原渉<sup>1</sup> (1 長岡技科大・生物, 2 JST, 3 九大・生資源, 4 かずさ DNA 研究所)

14:16 O-9 シイタケより精製された新規 GH ファミリーに属する endo- $\beta$ -1,3-グルカナーゼ

坂本裕一, 金野尚武 (岩手生工研)

14:28 O-10 セルラーゼ遺伝子発現制御因子 CibR と相互作用する因子の探索

國武絵美<sup>1,2</sup>, 谷修治<sup>1</sup>, 炭谷順一<sup>1</sup>, 川口剛司<sup>1</sup> (1 阪府大院・生環科, 2 日本学術振興会特別研究員 PD)

一般講演 (O-11~O-20) 11月13日(火) 15:10 - 17:10

- 15:10 O-11 Co-regulation of *A. nidulans* cellulase genes by transcription factors McmA and ManR  
Nuo Li, Miki Aoyama, Kyoko Kanamaru, Makoto Kimura, Tetsuo Kobayashi (Graduate Sch. of Bioagric. Sci., Nagoya Univ.)
- 15:22 O-12 *AtrR* は *Aspergillus fumigatus* においてエルゴステロール合成系遺伝子発現を制御する  
大場歩<sup>1</sup>, 清水公德<sup>2</sup>, 萩原大祐<sup>2</sup>, 新谷尚弘<sup>1</sup>, 川本進<sup>2</sup>, 五味勝也<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>東北大院農・生物産業創成, <sup>2</sup>千葉大・真菌センター)
- 15:34 O-13 *Neurospora crassa* のエルゴステロール合成阻害剤による *erg* 遺伝子の誘導とその制御  
宮下基, 亀井誠之, 高橋正和, 一石昭彦, 藤村真 (東洋大院・生命)
- 15:46 O-14 *Chaetomium globosum* における天然物生合成遺伝子研究からみえてきた特定二次代謝産物による遺伝子発現制御および有性生殖への関与  
中沢威人, 石内勘一郎, 杉本覚, 五反田康孝, 佐藤道大, 野口博司, 渡辺賢二 (静岡県大・薬)
- 15:58 O-15 イネいもち病菌の二成分情報伝達系攪乱によるポリケタイド化合物生産誘導  
本山高幸, 林敏明, 廣田洋, 長田裕之 (理研基幹研・ケミカルバイオロジー)
- 16:10 O-16 *Aspergillus fumigatus* における新規病原因子の探索と機能解析  
酒井香奈江, 大荒田素子, 高橋梓, 五ノ井透 (千葉大・真菌センター)
- 16:22 O-17 イネいもち病菌における HsbA 様タンパク質 Mohsb1, Mohsb2 は病原性に関与する  
坂口歩・西村麻里江 (生物研)
- 16:34 O-18 出芽酵母の Spindle Position Checkpoint (SPOC)構成要素はウリ類炭疽病菌において付着器分化過程における適切な細胞周期の進行に関与する  
深田史美<sup>1</sup>, 坂口歩<sup>2</sup>, 久保康之<sup>1</sup> (京都府大院・生環<sup>1</sup>、生物研<sup>2</sup>)
- 16:46 O-19 イチゴ黒斑病菌の 1.0 Mb 染色体にコードされる AF 毒素生合成遺伝子クラスターの同定  
原歩美<sup>1</sup>, 近藤日佳理<sup>1</sup>, 播本佳明<sup>1</sup>, 間瀬千晶<sup>1</sup>, 張祐介<sup>1</sup>, 山本幹博<sup>2</sup>, 秋光和也<sup>3</sup>, 柘植尚志<sup>1</sup> (<sup>1</sup>名大院・生命農, <sup>2</sup>岡山大・農, <sup>3</sup>香川大・農)
- 16:58 O-20 第2浸透圧センサー経路はトウモロコシごま葉枯病菌 (*Cochliobolus heterostrophus*) の感染器官である付着器の形成を制御する  
泉津弘佐, 北出雄生\*, 住田卓也\*, 湯谷智\*, 森田篤\*, 田中千尋\* (滋賀県大・環境科学, \*京大院農)

ポスター発表            11月12日（月）16:00 – 17:30（奇数番号）  
                                 11月13日（火）13:30 – 15:00（偶数番号）

**P-1** イタコン酸を生産する *Aspergillus oryzae* の分子育種

山田智士<sup>1</sup>, 倉地裕子<sup>2</sup>, 朴龍洙<sup>3</sup>, 荒井基夫<sup>2</sup>, 金政真<sup>2</sup> ( <sup>1</sup>中部大院・応生, <sup>2</sup>中部大・環境生科, <sup>3</sup>静岡大・創科技学院)

**P-2** アミダーゼ高生産麹菌の担体への固定化方法の研究

鈴木晃<sup>1</sup>, 下家拓馬<sup>1</sup>, 奥田拓真<sup>1</sup>, 柳原琢己<sup>1</sup>, 木村遵<sup>1</sup>, 佐野元昭<sup>1</sup>, 尾関健二<sup>1</sup>, 大箸信一<sup>1</sup>, 坪井宏和<sup>2</sup>, 坊垣隆之<sup>2</sup>, 岩井和也<sup>3</sup>, 福永泰司<sup>3</sup> ( <sup>1</sup>金沢工大・ゲノム研, <sup>2</sup>大関・総研, <sup>3</sup>UCC・R&Dセンター)

**P-3** 454 と Illumina の de novo アセンブリーによる糸状菌の新規 cDNA 解析

(ジナリス) 河合文隆、上村泰央、(東大院・農生科) 五十嵐圭日子、堀 千明、鮫島正浩、

**P-4** バイオマス変換酵素探索ツールとしての糸状菌トランスクリプトーム

(東大院・農生科) 五十嵐圭日子、堀 千明、石黒真希、鮫島正浩、(ジナリス) 上村泰央、竹田 綾 (食総研) 金子 哲

**P-5** 麹菌必須遺伝子の解析のためのプロモーターシャットオフシステムの開発

寺戸志保<sup>1,2</sup>, 島原明子<sup>1</sup>, 豊浦 利枝子<sup>2</sup>, 岩下 和裕<sup>1,2</sup> ( <sup>1</sup>広島大院・先端研, <sup>2</sup>酒総研)

**P-6** 麹菌における Cre-loxP 選択マーカーリサイクリングシステムの改良

張斯来, 江原直樹, 水谷治<sup>1</sup>, 田中瑞己, 新谷尚弘, 五味勝也 (東北大院農, 酒総研<sup>1</sup>)

**P-7** 昆虫病原性糸状菌 *Lecanicillium sp.*における自律複製型ベクターを用いた形質転換系の構築

石堂 圭一、木下 浩、井原 史雄<sup>1</sup>、仁平 卓也 (阪大生物工学国際交流セ、<sup>1</sup>農研機構・果樹研)

**P-8** 糸状菌によるフミン酸の分解と還元

中澤奈美, 老沼研一, 高谷直樹 (筑波大院・生命環境)

**P-9** *Aspergillus nidulans* のガラクトフラナン生合成に関与する遺伝子の機能解析

元松遥<sup>1</sup>, 畠山信太郎<sup>1</sup>, 浴野圭輔<sup>1</sup>, 二神泰基<sup>2</sup>, 竹川薫<sup>2</sup>, 後藤正利<sup>2</sup>, 野村善幸<sup>1</sup>, 岡拓二<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>崇城大学・生物生命・応微工、<sup>2</sup>九大・院・農)

**P-10** *Aspergillus nidulans* における *ugeB* 遺伝子の機能解析

田中麻左人<sup>1</sup>、浴野圭輔<sup>1</sup>、二神泰基<sup>2</sup>、竹川薫<sup>2</sup>、後藤正利<sup>2</sup>、野村善幸<sup>1</sup>、岡拓二<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>崇城大学・生物生命・応微工、<sup>2</sup>九大・院・農)

- P-11** *Aspergillus fumigatus* のガラクトフラノース転移酵素遺伝子の探索  
 畠山信太郎<sup>1</sup>, 浴野圭輔<sup>1</sup>, 二神泰基<sup>2</sup>, 竹川薫<sup>2</sup>, 後藤正利<sup>2</sup>, 野村善幸<sup>1</sup>, 岡拓二<sup>1</sup> (<sup>1</sup>崇城大, <sup>2</sup>九大)
- P-12** 糸状菌 *Aspergillus nidulans* の  $\alpha$ -1,3-グルカン合成酵素遺伝子変異株の表現型解析  
 吉見啓<sup>1</sup>, 稲葉梓<sup>2</sup>, 一杉昌玄<sup>2</sup>, 阿部敬悦<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>東北大・未来研, <sup>2</sup>東北大院農・生物産業創成)
- P13** 糸状菌 *Aspergillus nidulans* の  $\alpha$ -グルカン合成酵素遺伝子破壊株における Congo red 感受性と菌糸への Congo red 吸着性との関係  
 稲葉梓<sup>1</sup>, 吉見啓<sup>2</sup>, 阿部敬悦<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>東北大院農・生物産業創成, <sup>2</sup>東北大・未来研)
- P14** *Aspergillus nidulans* におけるプロテインキナーゼ C による細胞壁合成酵素遺伝子群の転写制御についての解析  
 片山琢也, 太田明德<sup>1</sup>, 堀内裕之 (東大院・農生科・応生工, <sup>1</sup>東農大・バイオ)
- P-15** アカパンカビ OS-2 MAP キナーゼによる細胞壁局在タンパク質の制御  
 加賀谷奏, 山下和宏, 高橋正和, 亀井誠之, 一石昭彦, 藤村真 (東洋大院・生命科学)
- P-16** 麹菌における MAP キナーゼ AoFus3 とその相互作用タンパク質の機能解析  
 矢萩大貴, 丸山潤一, Özgür Bayram<sup>1</sup>, Oliver Valerius<sup>1</sup>, Gerhard H. Braus<sup>1</sup>, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工, <sup>1</sup>ゲッティンゲン大学)
- P-17** 麹菌 *A. oryzae* における溶菌に対する細胞修復と再生長の機構の解析  
 川畑絢平, 佐伯圭, 丸山潤一, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)
- P-18** 麹菌におけるエンドサイトーシス関連 Aip タンパク質の機能解析  
 松尾賢人, 樋口裕次郎, 菊間隆志, 有岡 学, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)
- P-19** 麹菌グルコース抑制関連遺伝子 *creD* の MalP のエンドサイトーシスへの関与  
 平本 哲也, 田中 瑞己, 新谷 尚弘, 五味 勝也 (東北大院・農・生物産業創成)
- P-20** *Aspergillus nidulans* におけるパキシリン様タンパク質 PxlA の機能解析  
 二神泰基<sup>1</sup>, 梶原康博<sup>2</sup>, 高下秀春<sup>2</sup>, 大森俊郎<sup>2</sup>, Michelle Momany<sup>3</sup>, 後藤正利<sup>1</sup> (<sup>1</sup>九大院・農, <sup>2</sup>三和酒類, <sup>3</sup>ジョージア大)
- P-21** 糸状菌 *Aspergillus nidulans* における出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* LAS17 オルソログ AN11104 の機能解析  
 星浩臣, 前田隼見, 太田明德<sup>1</sup>, 堀内裕之 (東大院・農生科・応生工, <sup>1</sup>東農大・バイオ)
- P-22** 麹菌 *A. oryzae* における選択的オートファジー関連遺伝子の機能解析  
 田所隆之, 菊間隆志, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)

- P-23 Characterization of Stress Granules in *Aspergillus oryzae***  
Hsiang-Ting HUANG, Jun-ichi MARUYAMA, Katsuhiko KITAMOTO (Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo)
- P-24 黄麹菌の分生子特異的遺伝子の機能解析**  
 辻井雅, 森田寛人, 前田浩, 山形洋平, 竹内道雄 (東農工大院・応生化)
- P-25 菌類の adenosine deaminase-related growth factor 類似遺伝子の機能解析**  
 西川良平<sup>1</sup>, 藤田将幸<sup>1</sup>, 吉田真澄<sup>1</sup>, 関屋秀一<sup>1</sup>, 稲富 聡<sup>2</sup>, 田口悟朗<sup>1</sup>, 下坂 誠<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>信州大・繊維・応生系, <sup>2</sup>ホクトきのご総合研)
- P-26 ウスヒラタケの子実体分化異常に関わる遺伝子の探索**  
 嶋田有宇, 伊藤幹成, 奥田康仁, 松本晃幸 (鳥取大・農)
- P-27 Discovering fundamental mushroom developmental genes.**  
Arend F. van Peer, Yuichi Sakamoto (IBRC)
- P-28 担子菌ウシグソヒトヨタケにおけるセプチンの発現およびインタラクトーム解析**  
 塩谷 達弘, 中村 宏江, 石井 律好, 高橋 直樹, 村口 元 (秋田県大院・生物資源)
- P-29 麹菌が産生する hydrophobin RolA と固体表面間の相互作用機構解析**  
 田邊弘毅<sup>1</sup>, 田中拓未<sup>1</sup>, 大類景子<sup>1</sup>, 上原健二<sup>1</sup>, 高橋徹<sup>2,3</sup>, 富樫貴成<sup>4</sup>, 有田稔彦<sup>4</sup>, 阿部敬悦<sup>1,3</sup>  
 (<sup>1</sup>東北大院・生物産業創成, <sup>2</sup>酒総研・基盤, <sup>3</sup>東北大・未来研, <sup>4</sup>東北大・多元研)
- P-30 麹菌 hydrophobin RolA 多重変異体と cutinase CutL1 間の相互作用解析**  
 對馬裕誠<sup>1</sup>, 村垣 公英<sup>1</sup>, 上原 健二<sup>1</sup>, 高橋 徹<sup>2,3</sup>, 山形 洋平<sup>2,4</sup>, 阿部 敬悦<sup>1,2</sup>  
 (<sup>1</sup>東北大院農・生物産業創成, <sup>2</sup>東北大・未来研, <sup>3</sup>酒類研・基盤, <sup>4</sup>東京農工大院農・応生化)
- P-31 麹菌 *Aspergillus oryzae* の機能性ペプチド融合ハイドロフォービン (HypA) の生産と吸着**  
 堂前圭佑, 加瀬明日香, 中島春紫 (明治大・農・農化)
- P-32 *Aspergillus oryzae* のハイドロフォービン群の機能および局在性の解析**  
 山川結, 石田千絵, 早川英佑華, 水野佑香, 中島春紫 (明治大・農・農化)
- P-33 味噌用麹菌 *A. oryzae* KBN630 株における酸性ホスファターゼ遺伝子多重破壊株の作出**  
 安田 (吉野) 庄子, 長谷川 摂, 小野奈津子, 伊賀 佳美<sup>1</sup>, 白石 洋平<sup>1</sup>, 和久 豊<sup>1</sup>, 杉本 達哉<sup>2</sup>, 楠本 憲一<sup>3</sup>, 北本 則行 (あいち産科総セ・食工技セ, <sup>1</sup>株ビオック, <sup>2</sup>ナカモ(株), <sup>3</sup>食総研)
- P-34 *Aspergillus aculeatus* 由来糖化アミノ酸オキシダーゼホモログ遺伝子の取得と発現**  
 宮武はる香, 谷修治, 炭谷順一, 川口剛司 (阪府大院・生環科)



- P-35** *Aspergillus aculeatus* 由来分泌型  $\beta$ -glucosidase の反応特性  
竹谷俊亮, 谷修治, 炭谷順一, 川口剛司 (阪府大院・生環科)
- P-36** GH3  $\beta$ -グルコシダーゼが $\beta$ -フラクトフラノシダーゼ様活性を持つ  
片山貴之, 谷修治, 炭谷順一, 川口剛司 (阪府大院・生環科)
- P-37** *Aureobasidium pullulans* 由来  $\alpha$ -L-アラビノフラノシダーゼの酵母 *Pichia pastoris* における高発現と酵素化学的性質  
東田知洋, 太田一良 (宮崎大農・応生科)
- P-38** 油面に付着する糸状菌の除去を目的とした真菌細胞壁溶解酵素の適用  
和田朋子<sup>1</sup>, 中右恵理子<sup>2</sup>, 早川典子<sup>1</sup>, 佐藤嘉則<sup>1</sup>, 大河原典子<sup>1</sup>, 五十嵐圭日子<sup>3</sup>, 木島隆康<sup>2</sup>, 木川りか<sup>1</sup> (<sup>1</sup>東京文化財研究所・保修セ, <sup>2</sup>東京芸大院・美術科, <sup>3</sup>東大院・農生科)
- P-39** 担子菌エノキタケの acetyl xylan esterase (*Fv-axe*)様遺伝子の機能解析  
藤田将幸<sup>1</sup>, 西川良平<sup>1</sup>, 吉田真澄<sup>1</sup>, 奥原 徹<sup>1</sup>, 稲富 聡<sup>2</sup>, 田口悟朗<sup>1</sup>, 下坂 誠<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>信州大・繊維・応生系, <sup>2</sup>ホクトきのご総合研)
- P-40** *Aspergillus nidulans* の sirtuin 様タンパク質 SirA の機能解析  
伊藤英里子, 志水元亨, 榊尾俊介, 高谷直樹 (筑波大院・生命環境)
- P-41** フルアジナムにより誘導されるアカパンカビの遺伝子群の同定  
高橋正和, 亀井誠之, 宮下基, 福森文康, 藤村真 (東洋大院・生命科学)
- P-42** 麹菌 *Aspergillus oryzae* 金属プロテアーゼ遺伝子の転写解析  
酒井大介<sup>1</sup>, 竹内道雄<sup>1</sup>, 古崎利紀<sup>2</sup>, 石井一夫<sup>2</sup>, 有江力<sup>2</sup>, 山形洋平<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>東農工大院・応生化, <sup>2</sup>東農工大院・農学系ゲノム科学人材育成プログラム)
- P-43** 麹菌酸性プロテアーゼ遺伝子のイントロンスプライシングに関する研究  
石田健, 久保島恵, 宮本雅史, 森田寛人, 前田浩, 岡本綾子, 山形洋平, 竹内道雄 (東京農工大・応生科)
- P-44** 麹菌転写因子 HapX の高発現はシデロフォア生産を顕著に増大させる  
中村隼人<sup>1</sup>, 林口拓実<sup>1</sup>, 安田 (吉野) 庄子<sup>2</sup>, 北本則行<sup>2</sup>, 志水元亨<sup>1</sup>, 加藤雅士<sup>1</sup> (<sup>1</sup>名城大・農, <sup>2</sup>あいち産科技総セ・食工技セ,)
- P-45** *ligD* 遺伝子破壊による実用麹菌 *hapX* 破壊株の取得とその解析  
増田裕一郎<sup>1</sup>, 安田 (吉野) 庄子<sup>2</sup>, 北本則行<sup>2</sup>, 志水元亨<sup>1</sup>, 加藤雅士<sup>1</sup> (<sup>1</sup>名城大院・農, <sup>2</sup>あいち産科技総セ・食工技セ)

- P-46** 麹菌 *A. oryzae* のデンプン分解酵素生産に関与する転写因子の細胞内局在解析  
鈴木空太, 田中瑞己, 新谷尚弘, 五味勝也 (東北大学院農・生物産業創成)
- P-47** 麹菌における CreA 及び脱ユビキチン化酵素 CreB 破壊によるグルコース抑制の解除  
一瀬桜子, 田中瑞己, 新谷尚弘, 五味勝也 (東北大院農・生物産業創成)
- P-48** 麹菌における CreA タンパク質量の翻訳後過程における制御  
田中瑞己, 新谷尚弘, 五味勝也 (東北大院農・生物産業創成)
- P-49** *Neurospora crassa* の beta-1,3-glucan 合成酵素遺伝子 *fks-1* の転写制御因子の探索  
亀井誠之, 高橋正和, 一石昭彦, 藤村真 (東洋大院・生命科学)
- P-50** *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解析  
日下秀行, 古川隆紀, 深谷英嗣, 志田洋介, 小笠原 渉 (長岡技大・生物)
- P-51** *Trichoderma reesei* のセルラーゼ生産に関与する MFS トランスポーターの機能解析  
古川隆紀, 志田洋介, 小笠原渉 (長岡技大・生物)
- P-52** 糖質加水分解酵素の生産における *Aspergillus aculeatus clbR* 高発現の影響  
川村彩乃, 國武絵美, 谷修治, 炭谷順一, 川口剛司 (阪府大院・生環科)
- P-53** 環境 pH による糸状菌セルラーゼの生産制御  
宮本健太郎, 青山未来, 金丸京子, 木村真, 小林哲夫 (名大院生命農・生物機構)
- P-54** Co-regulation of *A. nidulans* cellulase genes by transcription factors McmA and ManR  
Nuo Li, Miki Aoyama, Kyoko Kanamaru, Makoto Kimura, Tetsuo Kobayashi (Graduate Sch. of Bioagric. Sci., Nagoya Univ.)
- P-55** *Aspergillus nidulans* におけるマンナナーゼ生産制御機構  
渡邊亜也子, 青山未来, 金丸京子, 木村 真, 小林哲夫 (名大院生命農・生物機構)
- P-56** AtrR は *Aspergillus fumigatus* においてエルゴステロール合成系遺伝子発現を制御する  
大場歩<sup>1</sup>, 清水公德<sup>2</sup>, 萩原大祐<sup>2</sup>, 新谷尚弘<sup>1</sup>, 川本進<sup>2</sup>, 五味勝也<sup>1</sup> (<sup>1</sup>東北大院農・生物産業創成, <sup>2</sup>千葉大・真菌センター)

- P-57** *Neurospora crassa* のエルゴステロール生合成阻害剤による *erg* 遺伝子の誘導とその制御  
宮下基, 亀井誠之, 高橋正和, 一石昭彦, 藤村真 (東洋大院・生命)
- P-58** Histone deacetylase *HstD* と *LaeA* のジェネティックインタラクション  
河内護之<sup>1,2</sup>, 廣瀬雅人<sup>1,2</sup>, 岩下和裕<sup>1,2</sup> (1 広島大院・先端研, 2 酒総研)
- P-59** ムギ赤かび病菌におけるトリコテセン生合成制御遺伝子 *Tri6* の分子生物学的解析  
中嶋 佑一, 前田 一行, 市川 雛代, 小林 哲夫, 木村 真 (名大院生命農)
- P-60** 糸状菌 *Coleophoma empetri* F-11899 株への人工アシラーゼ遺伝子の導入  
中谷 和也, 山田 雅人, 大内 卓也, 磯貝 泰弘, 橋本 正治 (富山県大・生物工)
- P-61** 糸状菌の二次代謝産物生合成酵素の細胞内局在解析  
伴曉彦, 田中瑞己, 新谷尚弘, 五味勝也 (東北大院・農・生物産業創成)
- P-62** 糸状菌 *Talaromyces stipitatus* 由来 MT ドメインを有するタイプ I 型 PKS の機能解析  
橋元 誠<sup>1</sup>, 小林大祐<sup>1</sup>, 若菜大悟<sup>2</sup>, 合田幸広<sup>2</sup>, 藤井 勲<sup>1</sup> (1 岩手医科大・薬, 2 国立衛研・生薬)
- P-63** *Penicillium purpurogenum* による *Monascus* 色素同族体生産能の多様性解析  
荻原淳, 梅村彩良, 小嶋涼, 小金井霞, 新居鉄平, 加藤順, 春見隆文 (日大・生物資源・生命化学)
- P-64** *Aspergillus fumigatus* ゲノム解読株 Af293 におけるフミトレモルジン非生産性の原因遺伝子の同定  
加藤直樹<sup>1</sup>, 鈴木宏和<sup>1</sup>, 奥村英夫<sup>2</sup>, 高橋俊二<sup>1</sup>, 長田裕之<sup>1</sup> (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-65** イネいもち病菌の二成分情報伝達系攪乱による PK-NRP 融合化合物生産誘導  
尹忠銖, 本山高幸, 林敏明, 廣田洋, 長田裕之 (理研基幹研・ケミカルバイオロジー)
- P-66** 牧草共生糸状菌 *Epichloë festucae* の宿主植物への全身的感染における低分子量 G タンパク質 Cdc42 の役割  
榎野友香・竹本大吾 (名大院・生命農学)
- P-67** Isolation of a gene involved in the growth inhibition of grass pathogens by fungal grass endophyte *Epichloë festucae*  
Jennifer Niones, Takushi Hashikawa and Daigo Takemoto (Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University)

- P-68** 担子菌酵母 *Cryptococcus neoformans* の DBB 染色反応と *PMT2* 遺伝子の関与  
清水公德, 今西由巳, 川本進 (千葉大・真菌センター)
- P-69** 病原性真菌 *A. fumigatus* を弱毒化するマイコウイルスの探索とその性状解析  
八原美沙<sup>1</sup>, 高橋梓<sup>2</sup>, 森山裕充<sup>3</sup>, 五ノ井透<sup>2</sup> (<sup>1</sup>千葉大学・医学薬学府, <sup>2</sup>千葉大・真菌センター, <sup>3</sup>農工大)
- P-70** イネいもち病菌における DNA 二本鎖切断誘導系を用いた遺伝的変異機構の解析と遺伝子ターゲットング法への応用  
荒添貴之, 用之丸哲也, 大里修一, \*有江力, 桑田茂 (明治大農・\*農工大農)
- P-71** イネいもち病菌を用いたクロラムフェニコールの新規作用点の探索  
西脇綾香, 井上雅高, 後藤麻紀子, 鎌倉高志 (東理大院理工・応生)
- P-72** 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* の機能解析  
吉田翔, 黒木美沙, 大野優子, 中嶋佑一, 鎌倉高志 (東理大院理工・応生科)
- P-73** コムギいもち病菌のエンパクに対する非病原力遺伝子 *PAT1* のマッピング  
森亮太, 井上喜博, 中馬いづみ, 土佐幸雄 (神戸大院・農学研究科)
- P-74** 感染中のいもち病菌が分泌する AVR-Pia タンパク質はごく微量である  
佐藤佑樹<sup>1</sup>, 尾瀬農之<sup>2</sup>, 寺内良平<sup>3</sup>, 曾根輝雄<sup>1</sup> (1 北大農院・応生科, 2 北大薬院・創薬, 3 岩手生工研)
- P-75** イネいもち病菌マイコウイルス由来弱毒化タンパク質が宿主細胞に及ぼす生育阻害メカニズムのパン酵母を利用した解析  
太田智子<sup>1</sup>, 浦山俊一<sup>1</sup>, 福原敏行<sup>1</sup>, 有江力<sup>1</sup>, 寺岡徹<sup>1</sup>, 高橋梓<sup>2</sup>, 東江昭夫<sup>2</sup>, 五ノ井透<sup>2</sup>, 森山裕充<sup>1</sup> (<sup>1</sup>東京農工大院・生物制御科, <sup>2</sup>千葉大・真菌センター)
- P-76** *Alternaria alternata* N18 株に生育阻害を引き起こすマイコウイルスのゲノム解析と AK 毒素産生に及ぼす影響調査  
竹下佳那<sup>1</sup>, 岡田亮<sup>1</sup>, 福原敏行<sup>1</sup>, 有江力<sup>1</sup>, 寺岡徹<sup>1</sup>, 江草真由美<sup>2</sup>, 児玉基一朗<sup>2</sup>, 森山裕充<sup>1</sup> (<sup>1</sup>農工大院・農, <sup>2</sup>鳥取大院・農)
- P-77** キャベツ萎黄病菌における *SIX4* の機能はトマト萎凋病菌と同じか?  
柏毅, 稲見圭悟<sup>1</sup>, 藤永真史<sup>2</sup>, 小木曾秀紀<sup>2</sup>, 寺岡徹, 有江力 (農工大院連農, <sup>1</sup>現ブリヂストン中研, <sup>2</sup>長野野花試)

- P-78** 出芽酵母の Spindle Position Checkpoint (SPOC)構成要素はウリ類炭疽病菌において付着器分化過程における適切な細胞周期の進行に関与する  
 深田史美<sup>1)</sup>, 坂口 歩<sup>2)</sup>, 久保康之<sup>1)</sup> (京都府大院・生環<sup>1)</sup>、生物研<sup>2)</sup>)
- P-79** ウリ類炭疽病菌における低分子量 G タンパク質 CoCdc42, CoRac1 の機能解析  
 河下美都里・幸前有香・野村拓将・久保康之・辻 元人 (京府大院生環)
- P-80** イチゴ黒斑病菌の 1.0 Mb 染色体にコードされる AF 毒素生合成遺伝子クラスターの同定  
 原歩美<sup>1</sup>, 近藤日佳理<sup>1</sup>, 播本佳明<sup>1</sup>, 間瀬千晶<sup>1</sup>, 張祐介<sup>1</sup>, 山本幹博<sup>2</sup>, 秋光和也<sup>3</sup>, 柘植尚志<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>名大院・生命農, <sup>2</sup>岡山大・農, <sup>3</sup>香川大・農)
- P-81** リンゴ斑点落葉病菌の 1.3 Mb 染色体にコードされる AM 毒素生合成遺伝子クラスターの同定  
 川瀬めぐみ, 後藤千保, 播本佳明, 児玉基一朗, 山本幹博, 尾谷浩, 柘植尚志 (名大院生農・鳥取大・岡山大)
- P-82** パイロシーケンス法を用いたキュウリ褐斑病菌の殺菌剤耐性変異検出の構築  
 新福剛、坂野真平、石上陽平、一石昭彦、藤村真 (東洋大院・生命科学)
- P-83** ウリ類炭疽病菌が分泌するエフェクター分子の植物細胞死誘導および抑制能と感染過程における局在解析  
 入枝泰樹, 高野義孝 (京大・院・農)
- P-84** ウリ類炭疽病菌は、植物表層上における *PacC* 依存型の環境認識を介して、適切な侵入様式を選択する  
 吉野香絵、高野義孝 (京大院農)
- P-85** トウモロコシごま葉枯病菌の病原性と有性生殖におけるオートファジーの関与  
 住田卓也, 泉津弘佑, 森田篤, 田中千尋 (京大・院・農)
- P-86** トウモロコシごま葉枯病菌における *PKA* 遺伝子および *PKR* 遺伝子の機能解析  
 湯谷智, 泉津弘佑, 住田卓也, 北出雄生, 田中千尋 (京大・院・農)
- P-87** *Cryphonectria parasitica* の C 末端脂質付加部位を欠く低分子量 GTP 結合タンパク質 RAS3 の性質  
 山内優輝, 高橋拓也, 笠原紳 (宮城大学・食産業・環境)
- P-88** 糸状菌類で保存されている機能未知遺伝子破壊株の特性解析  
 井丸直<sup>1, 2</sup>, 妹尾史子<sup>1, 2</sup>, 寺戸志保<sup>1, 2</sup>, 池田優理子<sup>2</sup>, 岩下和裕<sup>1, 2</sup> (1 広島大院・先端研, 2 酒類研)

## 特別講演

### **Diversity and evolution of wood decay systems in saprotrophic and mycorrhizal Agaricomycetes (mushroom-forming fungi).**

David Hibbett, Clark University, Worcester MA 01610 USA.

The Agaricomycetes includes over 20,000 described species of mushrooms, polypores, puffballs and other macrofungi. This diverse assemblage has both saprotrophic (decomposer) and biotrophic (symbiont or pathogen) modes of obtaining carbon nutrition. Saprotrophic Agaricomycetes include the vast majority of microorganisms that are able to decay wood (a major pool of organic carbon), as well as decomposers of leaf-litter and other substrates. Among the wood-rotting species, two principal modes of decay occur: white rot, in which both lignin and cellulose are decomposed, and brown rot, where cellulose is attacked but lignin remains as a polymeric residue. The most common form of biotrophy is ectomycorrhizal symbiosis (ECM), although the Agaricomycetes also contain plant pathogens, mycoparasites, and mutualistic partners of insects (such as attine ants).

In collaboration with the DOE Joint Genome Institute and an international consortium of partners, we are using phylogenomic approaches to understand the pattern and mechanisms of switches between nutritional modes in Agaricomycetes. To reconstruct the evolution of wood decay mechanisms, we generated and analyzed complete genomes of twelve species of Agaricomycotina, including six white rot, five brown rot, and one mycoparasitic species, and we combined these with existing genome sequences of 19 species. We found that all white rot genomes encode multiple copies of lignin-degrading class II fungal peroxidases (POD), which have been repeatedly lost in brown rot lineages, as have genes encoding many other decay-related oxidoreductases and enzymes attacking crystalline cellulose. The Agaricomycete *Laccaria bicolor* and the Ascomycete *Tuber melanosporum*, both ECM species, also lack PODs and they appear to have lost many enzymes involved in decomposition of cellulose. Nonetheless, each has retained pectinases (GH28) and endoglucanases (GH5), which have been shown to be among the most highly upregulated genes in ectomycorrhizae (presumably aiding in the penetration of the root cortex), demonstrating an adaptation of “decay” enzymes for a symbiotic lifestyle. To further characterize the origins of ECM symbioses, we are currently analyzing ten new whole genome sequences, including members of the Agaricales, Boletales, and Sebaciales. Preliminary analyses suggest that different lineages have differentially retained or lost enzymes associated with wood decay, indicating that there is substantial variation in nutritional capabilities among ECM Agaricomycetes.

## シンポジウム

### S-1

#### $\alpha$ -1,3-グルカンを利用した植物病原性糸状菌の自然免疫回避機構

西村麻里江

((独) 農業生物資源研究所 植物・微生物間相互作用研究ユニット)

動物や植物には体内に侵入した「非自己」を迅速に認識して排除する自然免疫 (innate immunity) と呼ばれる機構がある。自然免疫により認識される標的として微生物の外界に接する部位 (細胞壁や鞭毛など) の構成成分 (例えば多糖など) などが一般的に知られている。しかし病原性微生物は「非自己」成分を持つにもかかわらず宿主生物に感染することができる。近年、病原性糸状菌における自然免疫回避機構は動物病原菌を中心に徐々に明らかになりつつあるが、植物病原菌では殆ど分かっていない。

本シンポジウムでは著者らが明らかにした植物病原性糸状菌の $\alpha$ -1,3-グルカンを利用した自然免疫回避機構について紹介するとともに、本研究成果の作物保護への応用についての可能性を述べる。

#### 「ステルス機能を備えた鎧」としての $\alpha$ -1,3-グルカン

植物では糸状菌の細胞壁由来のキチンや $\beta$ グルカン (分岐した $\beta$ -1,3-グルカン) オリゴマーが防御応答を誘導することが知られており (1), 実際にイネやシロイヌナズナでキチンオリゴマーを認識するレセプターがクローニングされている (2, 3)。しかし $\beta$ グルカンやキチンが糸状菌の骨格形成に必要な多糖であることから、植物病原性糸状菌にはこれらの細胞壁多糖を宿主植物により認識させないための機構があると考えられてきた。

著者らが抗体やレクチンを用いてイネ感染時のいもち病菌 (*Magnaporthe oryzae*) の細胞壁多糖を観察したところ、感染時特異的に $\alpha$ -1,3-グルカンが細胞壁表層に蓄積され、その結果として細胞壁中の $\beta$ -1,3-グルカンやキチンが覆い隠されていることが明らかになった (4)。また変異株を用いた解析から、いもち病菌では植物表面のクチン (ワックス) 成分の認識により MAP キナーゼ (Mps1 MAPK; cell wall integrity MAP kinase ortholog) が活性化して $\alpha$ -1,3-グルカンの生合成が誘導されることが見出された (4)。

そこで $\alpha$ -1,3-グルカン合成遺伝子 (MoAGS1) を欠損させたいもち病菌 ( $\Delta$ MoAGS1) を作製したところ、 $\Delta$ MoAGS1 は葉上で溶菌して感染に失敗するだけではなく、植物が防御応答の1つとして分泌する抗菌酵素 (キチナーゼ) に対して感受性を示すようになった (5)。さらに興味深いことに、MoAGS1 欠損いもち病菌に対するイネの防御応答が菌の侵入前から誘導されることが見出された (5)。これらの結果と $\alpha$ -1,3-グルカナーゼ遺伝子が植物ゲノム中に見つかっていないことを考え合わせると、いもち病菌は感染時に植物が分解できない $\alpha$ -1,3-グルカンで菌体表層を覆うことにより、イネが生産する (おそらくはイネ表面にも分泌されている) 抗菌酵素などから菌体を保護すると同時にイネの自然免疫による認識を回避していることが推測された。

#### $\alpha$ -1,3-グルカンを標的とした病害防除

そこでバクテリア由来の $\alpha$ -1,3-グルカナーゼ遺伝子をイネに導入して分泌させたところ

ろ、イネの3大糸状菌病害であるいもち病、ゴマ葉枯れ病、紋枯れ病菌に対する抵抗性を示した(5)。ゴマ葉枯れ病菌(*Cochlioborus miyabeanus*)と紋枯れ病菌(*Rhizoctonia solani*)の細胞壁構造を観察したところ、これらの菌でもいもち病菌と同様に感染時特異的な細胞壁表層への $\alpha$ -1,3-グルカンの蓄積が確認された(5)。 $\alpha$ -1,3-グルカナーゼ分泌イネがこれらの病原菌に対して防御応答を迅速に活性化したことから、「 $\alpha$ -1,3-グルカンで菌体表層を覆う」という宿主植物の自然免疫からの回避機構がこれらの菌の間で保存されていることが強く示唆された。

いもち病、ゴマ葉枯れ病が子嚢菌であるのに対して紋枯れ病菌は担子菌であり、これらの菌は進化上相互に遠い関係にある。加えて、 $\alpha$ -1,3-グルカナーゼ遺伝子が植物ゲノム中に見つかっていないことや、紋枯れ病菌が多犯性であり殆どの植物に感染できることなどから、おそらく多くの植物病原性糸状菌が $\alpha$ -1,3-グルカンを利用して自然免疫による認識を回避しているのではないかと想像される。また $\alpha$ -1,3-グルカンが欠損した病原菌に対して宿主植物が侵入前から自然免疫を活性化するという実験データは $\alpha$ -1,3-グルカナーゼやその生産菌を利用した病害防除法の可能性を示唆している。 $\alpha$ -1,3-グルカンを標的とすることにより「植物の自然免疫を利用した」これまでにないタイプの作物保護技術が開発できるのではないかと考えている。

本研究をすすめるにあたり阿部敬悦博士(東北大学)、藤川貴史博士、坂口歩博士、西澤洋子博士(生物研)、矢野成和博士(山形大学)をはじめ多くの方々のご協力に感謝いたします。本研究は農林水産省新農業展開ゲノムプロジェクト(PMI0009)、生研センター異分野融合事業からの援助を受けました。

## 参考文献

- 1) Shibuya N and Minami E (2001) Oligosaccharide signaling for defense responses in plant. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 59: 223-233.
- 2) Kaku H, Nishizawa Y, Ishii-Minami N, Akimoto-Tomiyama C, Dohmae N, Takio K, Minami E, and Shibuya N (2006) Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103: 11086-11091.
- 3) Miya A, Albert P, Shinya T, Desaki Y, Ichimura K, Shirasu K, Narusaka Y, Kawakami N, Kaku H, Shibuya N (2007) CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 104:19613-19618.
- 4) Fujikawa T, Kuga Y, Yano S, Yoshimi A, Tachiki T, Abe K, and Nishimura M (2009) Dynamics of cell wall components of *Magnaporthe grisea* during infectious structure development. *Mol. Microbiol.* 73: 553-570.
- 5) Fujikawa T, Sakaguchi A, Nishizawa Y, Kouzai Y, Minami E, Yano S, Koga H, Meshi T, and Nishimura M (2012) Surface  $\alpha$ -1,3-glucan facilitates fungal stealth infection by preventing innate immunity in plants. *PLoS Pathogens* 8: e1002882.

## $\alpha$ -1,3-glucan functions as a 'stealth armor' in fungal plant pathogens during infection

Marie Nishimura (National Institute of Agrobiological Sciences)



## 植物病原糸状菌の集団適応戦略—イネいもち病菌を例として

土佐幸雄

(神戸大学大学院農学研究科 植物病理学研究室)

糸状菌 *Pyricularia oryzae* (完全世代 *Magnaporthe oryzae*) によって引き起こされるいもち病は、イネの最重要病害である。これを防除するため明治以来抵抗性遺伝子の探索が行われ、それを日本品種に導入する育種事業が展開されてきたが、1960年代初頭、長年の努力の結果完成した新品種が農家圃場にリリースされるや否や、それらを侵すイネいもち病菌新レースが出現し、抵抗性品種が感受性品種に転落するといういわゆる「抵抗性の崩壊」現象が次々と起こった。これは、農家ならびにそれら品種の育成に心血を注いだ育種家に大きな打撃を与えた大事件であった。

植物病原菌は、なぜそれほど素早く抵抗性遺伝子に適応できるのであろうか。植物品種と病原菌レースの間の特異性は、Gene-for-gene 説によって説明できる。それによれば、植物の抵抗性遺伝子座それぞれに対して一対一に対応する病原力遺伝子座が菌の側に存在する。そして、その菌側の遺伝子座における優性アレルは非病原性を支配し、このアレル (非病原力遺伝子) を菌が持っている場合にのみ、抵抗性遺伝子はその効力を発揮できる。そうすると、菌が抵抗性遺伝子に適応するためには、その非病原力遺伝子の機能を損なうような変異を起こせばよい。これは劣性方向への変異であるから、極めて容易であると考えられる。病原菌の素早い適応の理由はこのように理解されてきた。なお、非病原性という自己に不利益な性質を付与する遺伝子を菌が持っている理由は当初不明であったが、現在では、それらの多くは本来病原性の強化に関与する「エフェクター遺伝子」であることが明らかとなっている。

近年、病原性アレルへの変異のメカニズムに関する分子レベルの知見が数多く報告されるようになった。その結果、トランスポゾンの挿入、点突然変異等も散見されるものの、多くの場合は、遺伝子自体の欠失が起こっていることが明らかとなった。この事実から次の疑問が生じる。菌が抵抗性遺伝子に適応するたびに対応する非病原力遺伝子を失っていくと、やがてはすべてを失ってしまうのではないかと思われる。しかし、実際にはそれぞれの非病原力遺伝子は集団の中に維持されている。非病原力遺伝子がエフェクターを支配することを考えれば、菌が非病原力遺伝子を維持しようとするであろうことは予測できるが、どのようにしてそれを可能としているのであろうか。

いもち病菌のレース—品種間特異性に関わる非病原力遺伝子として最初にクローニングされたのは、*Pita* に対応する *AVR-Pita* である (1)。*AVR-Pita* は、*Pita* に認識される *AVR-Pita1*, *AVR-Pita2*、ならびに認識されない *AVR-Pita3* 等のメンバーから成る遺伝子ファミリーを構成している (2)。Orbach et al. (1) がクローニングした *AVR-Pita1* は、第3染色体のテロメアに隣接して座乗していた。その後、世界的な研究の趨勢は、非病原力遺伝子産物と抵抗性産物の相互作用、非病原力遺伝子産物の機能へと移り、座乗染色体には注意が払われなくなった。そのような中、我々は、本遺伝子の座乗染色体をさまざまな菌株を用いて丹念に調べたところ、*AVR-Pita1* が頻繁に座乗染色体を変えていることを見出した (3)。この現象を、**multiple translocation** と呼ぶことにした。この座乗染色体の変異は、イネ菌において特に顕著であった。これは、イネとイネ菌の長く複雑な相互作用の歴史を反映していると考えれば reasonable である。一方、*Pita* に認識されない

*AVR-Pita3* は、菌株に関わらず安定して第7染色体に座乗していた。これらのことから、**multiple translocation** は、*Pita* による認識と密接に関係していると考えた。

なぜ、*Pita* による認識が **multiple translocation** を促進するよう見えるのか、その理由は当初不明であった。**multiple translocation** が本遺伝子の塩基配列レベルの突然変異を誘発し、*Pita* による認識から逃れやすくしているという可能性も考えたが、実際の *AVR-Pita1* の塩基配列は、かなり安定していた。なによりも、いもち病菌が *Pita* の認識から逃れるための最も一般的な方法は、塩基配列の変異ではなく、遺伝子そのものの全欠失であった。

これを説明する手掛かりとなったのは、*AVR-Pita2* の **Horizontal transfer** を示すデータであった。*AVR-Pita2* は、イネ菌 *P. oryzae* とは別種のメヒシバ菌 (*P. grisea*) のゲノム中に存在するメンバーであるが、周辺構造も含めてほぼ同じ *AVR-Pita2* フラグメントがキビ菌 (イネ菌と同種 *P. oryzae* に属する) に存在することが判明した (3)。非病原力遺伝子が種を超えて移動可能ならば、同種内、あるいは同種同菌群内個体間での移動はより容易であろうと考えた。もし、いもち病菌が、そのような個体間移動を介した非病原力遺伝子の再獲得メカニズムを持っているならば、「抵抗性遺伝子への適応のたびに失われていくはずの非病原力遺伝子をどのようにして集団内に維持しているのか」「なぜ、*Pita* による認識が **multiple translocation** を促進するよう見えるのか」という2つの問題は容易に説明できる。非病原力遺伝子の欠失によりいもち病菌が適応し、抵抗性品種が感受性に転落すると、通常、もとの感受性品種の頻度が増えて(復活して)ゆく。抵抗性遺伝子を持たない品種の上ならば、エフェクター遺伝子を持つ菌系の方が有利である。そこで、エフェクター遺伝子を再獲得した個体が増えてゆく。いもち病菌の有性世代は野外ではいまだ確認されていないので、この再獲得を有性生活環を介して行っている可能性は極めて低い。おそらく **anastomosis** 等を介するのだろうと考えているが、この過程で再導入されたエフェクター遺伝子は、元あった位置に関係なく染色体のサブテロメアや脆弱部位に挿入される。この欠失→再獲得のサイクルの結果が、我々に **multiple translocation** として認識されると考える。いもち病菌は、このように「集団」を非病原力遺伝子の **reservoir** として使うことにより、非病原力遺伝子が抵抗性遺伝子から「逃げ回る」ことを可能にしつつ、それを維持しているように思われる。

以上の知見をもとに、我々の考える植物病原菌の適応戦略を整理してみよう。*AVR-Pita* 以外にも、多くのいもち病菌非病原力遺伝子がテロメア近傍に座乗することが知られている。いもち病菌の非病原力遺伝子がテロメア付近 (サブテロメア) に座乗することを好むことが明らかとなってきたとき、多くの研究者が連想したのは、動物病原体との類似性であった。たとえば、マラリア原虫 *Plasmodium falciparum* は抗原を次々と変化させてすばやく宿主免疫機構 (抗体) による認識をかいくぐることが知られているが、それは抗原決定に関わる **var gene** がサブテロメアに座乗するがために、その可塑性 (不安定性) を利用して異所的組み換えを頻繁に起こし、新しい **var** 変異体を次々と創出することによる (4)。しかし、よく見ると、動物病原体の抗原遺伝子と植物病原体の非病原力遺伝子は重要な点で異なっている。第一に、抗原遺伝子は個体の生存に必須で欠損することができないが、非病原力遺伝子は多くの場合生存に必須ではなくゲノムから捨て去ることができる。第二に、抗原遺伝子はゲノム内に多重遺伝子族として存在するが、非病原力遺伝子は1~数コピーしか存在しない。第三に、抗原遺伝子は非常に変異に富むが、それに比べて非病原力遺伝子の塩基配列そのものはきわめて安定である。これらの事実を総合したとき、我々は、動物とその病原体の相互作用が個体対個体の闘いである

のに対し、植物とその病原体の相互作用は集団対集団の闘いなのではないか、と考えるに至った。動物は個体の中に多様な抗体を作り出して病原体に対抗しているが、これに呼応して動物病原体はその個体内に多様な抗原遺伝子を準備して適応している。一方、植物は集団として多様な抵抗性遺伝子を保有して病原体に対抗しているが、これに呼応して植物病原体は集団として多様な非病原性遺伝子を保持しておればよいとする。したがって、持つと不利になるときはこれをゲノムから捨て去り、再度必要になったときは集団の **reservoir** から再獲得する。これは、非病原性遺伝子が生存に必須でないが故に可能となる「集団戦略」であると考えられる。

#### 引用文献

- 1) Orbach MJ, Farrall L, Sweigard JA, Chumley FG, Valent B (2000) A telomeric avirulence gene determines efficacy for the rice blast resistance gene *Pi-ta*. *Plant Cell* 12: 2019-2032.
- 2) Khang CH, Park S-Y, Lee Y-H, Valent B, Kang S (2008) Genome organization and evolution of the *AVR-Pita* avirulence gene family in the *Magnaporthe grisea* species complex. *Mol Plant-Microbe Interact* 21: 658-670.
- 3) Chuma I, Isobe C, Hotta Y, Ibaragi K, Futamata N, Kusaba M, Yoshida K, Terauchi R, Fujita Y, Nakayashiki H, Valent B, Tosa Y (2011) Multiple translocation of the *AVR-Pita* effector gene among chromosomes of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* and related species. *PLoS Pathog* 7:e1002147.
- 4) Freitas-Junior LH, Bottius E, Pirrit LA, Deitsch KW, Scheidig C, et al. (2000) Frequent ectopic recombination of virulence factor genes in telomeric chromosome clusters of *P. falciparum*. *Nature* 407: 1018-1022.

#### **Strategy of plant pathogenic fungi for overcoming resistance genes using a population as a unit of adaptation**

Yukio Tosa (Laboratory of Plant Pathology, Graduate School of Agricultural Sciences, Kobe University)

## S-3

### ストリゴラクトン:植物における共生と寄生そして形態形成を司るテルペノイド

秋山 康紀

(大阪府立大学大学院生命環境科学研究科)

#### アーバスキュラー菌根共生

“菌根”とは菌類と植物根との共生体であり、菌根を形成する菌類を菌根菌と呼ぶ。アーバスキュラー菌根菌(arbuscular mycorrhizal fungi, AM 菌)は80%以上もの陸上植物と共生する菌根菌であり、根の皮層細胞内に樹枝状体(arbuscule)と呼ばれる栄養交換器官を形成することからその名が付けられている。この樹枝状体を介してAM菌は根外に伸ばした菌糸で土壌から吸収したリン酸などのミネラルを宿主植物に与え、自らは宿主から光合成産物である糖を受け取るという相利共生関係を築く。分子系統解析や化石記録からAM菌の起源は約4億6千万年前と考えられている。これは陸上植物の起源と同時期であることから、無機栄養素が乏しい陸上で植物が生存していくのにAM菌が重要な役割を果たしてきたと考えられている。

AM菌は菌単独ではほとんど生育せず、次世代の胞子も形成しない絶対共生菌である。このため、実験生物としては取り扱いが極めて難しく、AM菌と植物とがどのようにして互いの存在を認識し、共生確立に至るのか、その分子機構はあまり分かっていなかった。とりわけ、AM菌と植物との間で取り交わされる共生シグナルはながらく不明のままであった。我々は天然物化学的手法を用いてAM共生における共生シグナルの解明を目標に研究を行い、植物からAM菌に向かって発せられるシグナル物質の解明に世界に先駆けて成功した。

#### AM菌の宿主認識シグナル=ストリゴラクトン

AM菌の菌糸は宿主の根の近傍に達すると激しく分岐する。この菌糸分岐は非宿主であるアブラナ科やアカザ科などの植物では見られないことから、AM菌の宿主認識反応と見なされている。菌糸分岐は根から分泌される脂溶性の低分子化合物により引き起こされることが分かっていた。本物質はbranching factor(BF)と呼ばれ、その単離が試みられてきたが、根から極微量しか分泌されず、化学的にも不安定であるため、ながらく単離されなかった。2005年、我々はマメ科モデル植物であるミヤコグサ(*Lotus japonicus*)の根分泌物から世界で初めてBFの単離に成功し、これを5-deoxystigolと同定した<sup>1)</sup>。本物質はストリゴラクトン(strigolactone, SL)と総称される根寄生雑草の種子発芽刺激物質として単離されていたテルペノイドであった。ストライガやオロバンキなどの根寄生雑草は他の植物の根に寄生して養水分を奪う難防除性の強害雑草であり、世界中で農作物に甚大な被害を与えている。寄生を受けてしまうのにもかかわらず、なぜ植物がSLを根から分泌するのか、ながらく謎であった。本成果により、SLは本来、AM菌に対する共生シグナルとして根から発せられ、根寄生雑草はこれを傍受することにより寄主となる植物の所在を突き止めているということが分かってきた。

#### ストリゴラクトン=シュート分岐抑制ホルモン

1990年代半ば以降にペチュニアやエンドウ、シロイヌナズナ、イネにおいて地上部シュートが過剰に枝分かれする変異体が発見されていた。これらの変異体の一部は、カロテノイド酸化開裂酵素(carotenoid cleavage dioxygenase, CCD)をコードする遺伝子の変異に原因があることから、カロテノイドに由来するシュート分岐抑制ホルモンの存在が予想されていた。カロテノイド生合成阻害剤やカロテノイド生合成変異体を用いた研究からSLがカロテノイドの酸化開裂によ

り生合成されることが分かっていた。そこで、CCD7やCCD8が欠損したイネの枝分かれ過剰変異体についてLC-MS/MSに分析したところ、SLをほとんど生産していないことが分かった。さらに、これらの変異体にSLを投与すると、枝分かれが正常に戻ることを見出した<sup>2)</sup>。このようにして、1966年に寄生シグナル<sup>3)</sup>、2005年には共生シグナルとして同定されたSLは2008年には植物のシュートの分岐を制御する内生ホルモンとして同定されることとなった。ごく最近、LC-MS/MSを用いた植物界におけるSLの分布解析から、水生藻類であるシャジクモがSLを生産していることが明らかになった。このことから、植物進化の歴史においてSLはまず植物ホルモンとして出現した後に、AM菌に対する共生シグナルへと機能分化していったと考えられている<sup>4)</sup>。

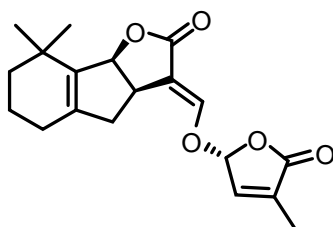


図. 5-Deoxystrigol

### 参考文献

- 1) Akiyama, K., *et al.*, *Nature*, **435**, 824-827 (2005)
- 2) Umehara, M., *et al.*, *Nature*, **455**, 195-200 (2008).
- 3) Cook, C.E., *et al.*, *Science*, **154**, 1189-1190 (1966).
- 4) Delaux P.M., *et al.*, *New Phytologist*, **195**, 857-871 (2012).

**Strigolactones: multifunctional terpene lactones acting as a rhizosphere signal to arbuscular mycorrhizal fungi and root parasitic weeds as well as a shoot branching-inhibiting hormone in plants**

Kohki AKIYAMA (Grad. Sch. of Life and Environ. Sci., Osaka Pref. Univ.)

## S-4

### 牧草共生糸状菌 *epichloae* エンドファイトの共生に関わる遺伝子群の機能解析

竹本大吾

(名古屋大学大学院 生命農学研究科 植物病理学研究分野)

図. *epichloae* エンドファイトが産出する生理活性物質

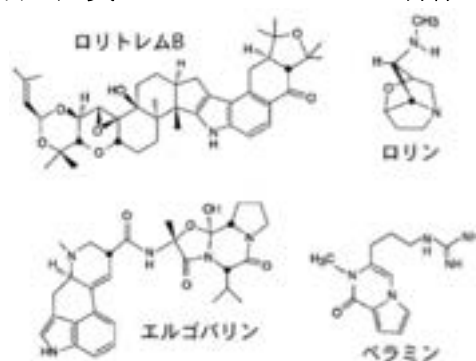
植物体内で共生的に生活している糸状菌や細菌などはエンドファイトと総称されている。*Epichloë/Neotyphodium*属エンドファイト (*epichloae*エンドファイト) は子のう菌門、麦角菌科に属し、牧草や芝草の細胞間隙で生育し、共生関係を保っているエンドファイトである (1)。菌根菌などの良く知られている共生菌が根に感染するのに対し、*epichloae*エンドファイトは宿主植物の地上組織の細胞間隙で生育し、根には殆ど定着しない。*epichloae*エンドファイトは宿主植物内で種々の生理活性物質を生成し、植物に動物や昆虫による補食の抑制、耐乾性、耐病性などの効果をもたらす。一方で、植物細胞間隙で生育することにより外界の微生物から遮断され、植物の細胞間隙から栄養を獲得し、種子を介して次世代の植物に感染することで繁殖しており、両者はお互いに利益を与え合う関係を築いている。本講演では、*Epichloë festucae*とペレニアルライグラスのモデル系を用いてこれまでに取り組んできた、エンドファイトが生成する生理活性物質の生合成遺伝子群の解析、共生の確立に関与する遺伝子群の解析、病害抵抗性に関わる遺伝子単離の試みなどについて紹介する。

#### 1) *epichloae* エンドファイトが生成する生理活性物質ロリトレム B の生合成遺伝子

エンドファイトが生成する生理活性物質として、動物に毒性を示すロリトレム B やエルゴバリン、昆虫に毒性や忌避作用を示すロリン、ペラミンなどが知られている

(図)。これらの物質は *epichloae* エンドファイトが宿主植物に感染している時に特異的に合成され、宿主植物を外敵から防御する際に主導的な役割を果たしていると考えられている (1)。

ロリトレムBは、一部の*epichloae*エンドファイトがペレニアルライグラス感染時に最も多く生産するインドールジテルペノイドで、ニュージーランドで問題になった牧草を食べた羊の中毒症状 (Ryegrass stagger) の原因物質である。ロリトレムBと共通の基本骨格をもつ化合物は、*Penicillium*、*Aspergillus*、*Claviceps*属菌などで知られている。近年、*P. paxilli*が生産するインドールジテルペノイドのマイコトキシンであるパキシリンの生合成遺伝子の配列をもとに、ロリトレムB生合成遺伝子が単離された (2)。パキシリン生合成遺伝子クラスターには、5つの生合成遺伝子*paxG*、*paxM*、*paxC*、*paxP*、*paxQ*が存在するのに対し、ロリトレムB生合成遺伝子クラスターには、5つの*pax*相同遺伝子のほかに、ロリトレムB生合成遺伝子クラスターに特異的な*ltmE* (プレニル基転移酵素)、*ltmJ* (シトクロムP450)、*ltmF* (プレニル基転移酵素)、*ltmK* (シトクロムP450) が見出された (3)。*P. paxilli*において*pax*遺伝子群が恒常的に発現するのに対し、*epichloae*エンドファイトの*ltm*遺伝子群は宿主植物への感染時に特異的に発現することから、エンドファイトが宿主植物への感染を認識して*ltm*遺伝子群の発現調節を行っていると考えられる。



## 2) *epichloae* エンドファイトの共生確立に関与する遺伝子の解析

*epichloae* エンドファイトと植物の関係には宿主特異性があり、例えば *E. festucae* は Pooideae 亜科 Poaceae 連の植物にのみ感染することが出来る。非宿主植物にエンドファイトの人工接種を試みると植物の防御応答の誘導、植物細胞や糸状菌細胞の細胞死、宿主植物の矮化などが起こることが報告されている (4)。これらの観察から、*epichloae* エンドファイトは宿主への感染を確立するために、植物の抵抗性応答を抑制あるいは回避し、さらに宿主にストレスを与えない程度に植物内での菌糸生育を抑制していることが推察される。

*epichloae* エンドファイトの宿主植物との共生確立に必要な遺伝子を単離するため、プラスミド挿入変異法を用いて宿主植物へ正常に感染できない変異株を複数単離した。これらのうち、NADPH 酸化酵素遺伝子 (*NoxA*) を欠損した変異株は、宿主植物に感染すると植物の矮化や分げつ数の増加を引き起し、宿主植物はやがて枯死した (5)。*noxA* 破壊株の宿主植物での生育を観察したところ、野生株に比べ菌糸量が顕著に増加していた。さらに、*NoxA* 活性化因子として *NoxR* や低分子量 G タンパク質 *RacA* を単離した (6, 7)。*noxR* 破壊株の植物内での生育を調べたところ、特に茎頂分裂組織での菌糸分岐の増加が認められ、*E. festucae* による活性酸素生成が宿主植物内での菌糸分岐を制御していることが示唆された (6)。培地上で生育したエンドファイトの菌糸を活性酸素の検出試薬で染色すると、菌糸の伸長先端や菌糸分岐の起こる部位で局在的な活性酸素生成が検出された。一方、*NoxR* 過剰発現株では活性酸素の局在的生成が失われ、菌糸先端成長の遅延と菌糸分岐の異常が認められた。また *Nox* 阻害剤の処理によってもエンドファイトの菌糸分岐が誘導された (6)。これらの結果は、活性酸素の局在的生成が菌糸の先端生長や分岐を制御する因子として機能していることを示している。伸張細胞の先端での活性酸素生成は、植物の根毛細胞の先端での活性酸素生成の例と類似しており、活性酸素が糸状菌と植物の細胞の先端生長において同様の役割を担っていることを示唆している。さらに Yeast two hybrid 法を用いて *NoxR* と結合する因子の探索を行ったところ、酵母の細胞極性決定に中心的役割を担うとされている *Bem1* や *Cdc24* の相同遺伝子が単離された。GFP ラベルにより *NoxR*、*RacA*、*Cdc24*、*BemA* の細胞内局在性を調べたところ、これら因子が全て菌糸先端や分岐部に局在することが明らかとなった (8)。これらの結果から、菌糸末端で局所的に生成される活性酸素が、菌糸の先端生長や分岐を制御していることが示唆された。

## 3) *epichloae* エンドファイトの感染による宿主植物の病害抵抗性の向上

*epichloae* エンドファイトの感染によって宿主植物の病害抵抗性が向上する例が報告されている。しかし、エンドファイト感染による植物の病害抵抗性獲得のメカニズムは全く解っていない。エンドファイト感染が宿主植物に病原菌耐性を付与する報告例がある一方で、全く効果がないとする報告もあり、エンドファイト菌株や病原菌の種類による効果の違いがあると考えられる。そこで、世界の様々な地域から分離された *E. festucae* 菌株群と、ペレニアルライグラスの種々の病原糸状菌との対峙培養を行った結果、斑点病菌 *Drechslera erythrospila* や炭疽病菌 *Colletotrichum graminicola* などの培地上での生育を抑制する *E. festucae* 株 (Ef437 株) が見出された。Ef437 株が感染した植物に斑点病菌を接種したところ、非感染植物と比較して病徴が軽減する傾向が認められた。現在、Ef437 株を用いて斑点病菌への抗菌性を失う変異株群の単離とその原因遺伝子の解析を進めている。

- 1) Tanaka A., Takemoto D., Chujo T. and Scott B (2012) Fungal endophytes of grasses. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15: 462-482.
- 2) Young C.A., Bryant M.K., Christensen M.J., Tapper B.A., Bryan G.T. and Scott B. (2005) Molecular cloning and genetic analysis of a symbiosis-expressed gene cluster for lolitrem biosynthesis from a mutualistic endophyte of ryegrass. *Mol. Genet. Genomics* 274: 13–29.
- 3) Saikia S, Takemoto D, Tapper B.A., Lane G.A., Fraser K and Scott B. (2012) Functional analysis of an indole-diterpene gene cluster for lolitrem B biosynthesis in the grass endosymbiont *Epichloë festucae*. *FEBS Lett.* 586: 2563-2569.
- 4) Koga H., Christensen M.J. and Bennett R.J. (1993). Incompatibility of some grass-*accremonium* endophyte associations. *Mycol. Res.* 97: 1237-1244.
- 5) Tanaka A., Christensen M., Takemoto D., Park P. and Scott B. (2006) Reactive oxygen species play a role in regulating a fungus-perennial ryegrass mutualistic interaction. *Plant Cell* 18: 1052-1066.
- 6) Takemoto D., Tanaka A., and Scott B. (2006) A p67<sup>Phox</sup>-like regulator recruited to control hyphal branching in a fungal-plant mutualistic symbiosis. *Plant Cell* 18: 2807-2821.
- 7) Tanaka A., Takemoto D., Hyon G.S., Park P., and Scott B. (2008) NoxA activation by the small GTPase RacA is required to maintain a mutualistic symbiotic association between *Epichloë festucae* and perennial ryegrass. *Mol. Microbiol.* 68: 1165-1178.
- 8) Takemoto D., Kamakura S., Saikia S., Becker Y., Wrenn R., Tanaka A., Sumimoto H. and Scott B. (2011) Polarity proteins Bem1 and Cdc24 are components of the filamentous fungal NADPH oxidase complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 108: 2861-2866.

### **Functional analysis of genes involved in symbiotic interaction between epichloae endophyte and host plant.**

Daigo Takemoto (Plant Pathol. Lab., Grad. Sch. Bioagricul. Sci., Nagoya Univ.)



## O-1

### 麴菌を用いた脂肪酸等の炭化水素系化合物の生産性向上の研究

玉野孝一<sup>1</sup>, Kenneth Bruno<sup>2</sup>, Sue Karagiosis<sup>2</sup>, David Culley<sup>2</sup>, Shuang Deng<sup>2</sup>, James Collet<sup>2</sup>, 石井智子<sup>1</sup>, 梅村舞子<sup>1</sup>, 小池英明<sup>1</sup>, Scott Baker<sup>2</sup>, 町田雅之<sup>1</sup> (1 産総研・生物プロセス, 2 米国パシフィックノースウエスト国立研究所)

化石燃料の世界的な需要の増加に伴い、バイオマスなどの植物成分から環境への負荷の少ないバイオ燃料を生産する技術が求められている。微生物の合成する炭化水素系化合物はバイオ燃料やその原料に用いられる可能性がある。麴菌の作る炭化水素系化合物のうち、脂肪酸や脂肪（トリグリセリド）はバイオディーゼルの原料として利用が考えられ、そこでそれらの生産性向上に向けた研究を、遺伝子組み換え技術を用いて麴菌で進めてきた。

まず脂肪酸合成に関わる4種類の酵素遺伝子をそれぞれ個別に高発現化した。そして脂肪酸や脂肪の生産性を酵素法により測定した結果、脂肪酸合成酵素複合体の高発現化において単位菌体乾燥重量当たりで脂肪酸は2.1倍、脂肪は2.2倍にそれぞれ生産性が向上した。次に炭素数18以上の長鎖脂肪酸の合成に関わる酵素遺伝子を破壊した結果、脂肪酸の生産性はさらに向上した。一方で脂肪の生産性は野生株と同じ程度であった。

脂肪酸や脂肪の生産性向上に向けて引き続き研究を進めているとともに、それ以外の麴菌の作る炭化水素系化合物の生産系構築も視野に研究を進めている。

#### Research on Increased Production of Hydrocarbons such as Fatty Acids using *Aspergillus oryzae*.

Koichi Tamano<sup>1</sup>, Kenneth Bruno<sup>2</sup>, Sue Karagiosis<sup>2</sup>, David Culley<sup>2</sup>, Shuang Deng<sup>2</sup>, James Collet<sup>2</sup>, Tomoko Ishii<sup>1</sup>, Myco Umemura<sup>1</sup>, Hideaki Koike<sup>1</sup>, Scott Baker<sup>2</sup>, Masayuki Machida<sup>1</sup> (1 AIST, 2 PNNL)

## O-2 (P-5)

### 麴菌必須遺伝子の解析のためのプロモーターシャットオフシステムの開発

寺戸志保<sup>1,2</sup>, 島原明子<sup>1</sup>, 豊浦 利枝子<sup>2</sup>, 岩下 和裕<sup>1,2</sup> (1 広島大院・先端研, 2 酒総研)

麴菌の遺伝子機能の解析には、遺伝子の発現を ON/OFF 出来る事が必要で、これまで *amyB* プロモーター等いくつかの誘導型プロモーターの開発が成されている。しかし、発現抑制時にも発現が見られるものや、誘導、抑制時に細胞内代謝の大幅な変化が見られる等、遺伝子機能解析に使用しにくい点がある。特にプロモーターシャットオフによる必須遺伝子の解析には、発現抑制時に転写がほぼ完全に抑えられる必要があり、このようなプロモーターは開発されていない。そこでグルコース同様に解糖系により代謝されると考えられるソルビトールに着目し、解析を行った。また、*Aspergillus* 属ではソルビトールを単一の C 源として資化できるが、その代謝機構等についてはほとんど研究されていなかった。そこで、ソルビトール誘導下での遺伝子発現についてマイクロアレイ解析を行い、誘導される遺伝子を抽出するとともに機能解析を行うと共に、そのプロモーターについて発現制御に使用可能かどうか検討を行った。

まず、ソルビトールまたはガラクトースを誘導源として、グルコースを抑制条件としてマイクロアレイ解析した。ガラクトースに比べソルビトールを用いた場合の方が遺伝子全体への発現変動が少なく、かつグルコース環境下で発現が検出されず、ソルビトール下で発現が有意に10倍以上増加した遺伝子が2遺伝子見つかった。そこで、プロモーターの下流に EGFP を連結したプラスミドを用いて、形質転換体を作成した。この獲得した形質転換体をグルコースまたはソルビトール存在下で培養し蛍光と EGFP タンパクを確認したところ、ソルビトール存在下でのみ EGFP が発現していることが確認できた。現在、ノーザン解析を行うと共に、複数の環境下での発現誘導について解析を行っている。

#### The development of promoter shutoff system for function analysis of the essential genes in *Aspergillus oryzae*.

Shiho Terado<sup>1,2</sup>, Akiko Shimahara<sup>2</sup>, Rieko Toyoura<sup>2</sup>, Kazuhiro Iwashita<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup> AdSM, Hiroshima Univ, <sup>2</sup> NRIB)

### O-3 (P-9)

#### *Aspergillus nidulans* のガラクトフラナン生合成に関与する遺伝子の機能解析

元松遥<sup>1</sup>, 畠山信太郎<sup>1</sup>, 浴野圭輔<sup>1</sup>, 二神泰基<sup>2</sup>, 竹川薫<sup>2</sup>, 後藤正利<sup>2</sup>, 野村善幸<sup>1</sup>, 岡拓二<sup>1</sup> (<sup>1</sup>崇城大学・生物生命・応微工、<sup>2</sup>九大・院・農)

*Aspergillus* 属の細胞壁構成糖鎖には、 $\alpha$ -グルカン、 $\beta$ -グルカン、キチン、ガラクトマンナン(GM)が含まれる。この GM は、 $\alpha$  1,2-テトラマンノースのユニットが  $\alpha$  1,6 結合した主鎖に、 $\beta$  1,5-ガラクトフラノースの側鎖であるガラクトフラナン(GF)が  $\beta$  1,6 結合する構造である。この GM のうち GF の生合成に関する知見は乏しい。本研究室で逆遺伝学的手法により見出された  $\Delta gfsA$  株では、GF を認識する抗体(EB-A2)によるシグナルが消失しており、細胞壁中のガラクトース量は親株の 60% に減少していた。また、 $\Delta gfsA$  株では菌糸形態の異常や分生子形成能の低下が認められた。*gfsA* 遺伝子は子囊菌門のうちチャワタケ亜門に分布しており、GF 構造を細胞壁中に持つ菌類には全て *gfsA* 遺伝子が存在していた。*GfsA* に関する機能解析を進めるために染色体上の *gfsA* 遺伝子に 3xFLAG タグを挿入した。まず、*in vitro* における GF 合成酵素の活性測定を行った。反応系に、*GfsA*-3xFLAG、糖供与体、 $\Delta gfsA$  由来のマンノプロテインを加え、37°C で保温した。次に、SDS-PAGE に供与し、EB-A2 により解析をおこなった。反応時間とともにシグナル強度が増加し、熱失活させたものや糖供与体を除去したものではシグナルが認められなかったことから、*GfsA*-3xFLAG が GF 合成活性を有することが明らかとなった。また、ゴルジ体に局在する *GlfB*、小胞体に局在する *BipA* をマーカーとしてショ糖密度勾配遠心分離法により局在解析を行ったところ、*GfsA*-3xFLAG はゴルジ体に局在することが示された。以上のことから *GfsA* が GF 合成酵素であり、GF はゴルジ体で合成されることが示唆された。

#### Functional analysis of gene involved in galactofuranan biosynthesis in *Aspergillus nidulans*.

Haruka Motomatsu<sup>1</sup>, Shintaro Hatakeyama<sup>1</sup>, Keisuke Ekino<sup>1</sup>, Taiki Futagami<sup>2</sup>, Kaoru Takegawa<sup>2</sup>, Masatoshi Goto<sup>2</sup>, Yoshiyuki Nomura<sup>1</sup>, Takuji Oka<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup> Univ. of Sojo, <sup>2</sup> Univ. of Kyusyu)

### O-4

#### *Aspergillus nidulans* septin interactions and post-translational modifications.

Shunsuke Masuo, Yainitza Hernández-Rodríguez and Michelle Momany (Dept. of Plant Biology, Univ. of Georgia)

Septins, GTPases first observed at the yeast septum between the mother cell and daughter bud, are increasingly considered to be novel cytoskeletal elements with roles as diverse as those of actin and tubulin. In the filamentous fungus *Aspergillus nidulans* there are five septin genes, *aspA*, *aspB*, *aspC*, *aspD*, and *aspE*. Here, we investigate the interactions among the *A. nidulans* septins using S-tag affinity purification and mass spectrometry. We showed that *AspA*, *AspB*, *AspC* and *AspD* strongly interacts each other at isotropic, unicellular and multicellular stages of early vegetative growth. *AspE* appears to have little or no interaction with the other septins in the isotropic and unicellular stages before septum formation. However after the transition from unicellular to multicellular growth, *AspE* appears to interact more with the other septins, especially *AspB*. LC-MS analysis detected acetylation of lysine residue in *AspA* recovered from the unicellular stage and in *AspC* recovered from the multicellular stage. Western blot analysis with anti-acetylated lysine antibody showed that *AspC* is highly acetylated in multicellular stage. In addition, we found the phosphorylation of *AspD* in multicellular stage. These data suggest that the septin interactions and modifications are altered during their growth stage in *A. nidulans*.

## O-5 (P-23)

### Characterization of Stress Granules in *Aspergillus oryzae*

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

An important part of the cellular responses to stress or environmental stimuli is the modulation of mRNA translation and degradation. Recently, evidences from yeasts to mammalian cells have indicated that one aspect of this process involving the remodeling of translating mRNAs into non-translating mRNPs (mRNA-protein particles) that accumulate in cytoplasmic foci referred to as stress granules. We previously showed that AoSO protein, a homolog of the *Neurospora crassa* SO, accumulates at septal pore in response to stresses<sup>1)</sup>. The stress-inducible behavior makes a possible link between stress granules and AoSO. In the present study, the localization analysis showed that AoSO-EGFP colocalized with the stress granules visualized by AoPab1-mDsRed in response to heat shock. Deletion of *Aoso* altered the localization of the stress granules at the hyphal tip. Furthermore, because the ability to form stress granules seems to correlate with the survival of cells exposed to stress, growth of the disruptant of *Aopubl* gene, encoding one of the major components of stress granules, was being tested under various stress conditions. Finally, the stress granules were often observed in the vicinity of vacuoles at the hyphal tip, and AoPab1-mDsRed colocalized with EGFP-AoAtg8 in response to heat shock, suggesting that autophagy may participate in the cellular stress response.

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

## O-6

ウシグソヒトヨタケの傘成長に必要な *cag1* 遺伝子は、Tup1 相同タンパク質をコードしている。

村口 元, 名越貴浩, 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 *cap-growthless1* を見出した。この突然変異体の子実体原基では、石突上部で傘部分が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。原因遺伝子 *cag1* 座と連鎖する 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% で連鎖していた。形質転換受容菌株#58 (*cag1-1 trp1-1, 1-6*) を構築し、この株に G13-900B マーカー近傍に由来する BAC DNA (*trp1<sup>+</sup>* を持つ) やサブクローンを導入し、相補活性に基づき *cag1* 遺伝子を特定したところ、*cag1* 遺伝子は出芽酵母の Tup1 と相同なタンパク質をコードしていることが分かった。突然変異部位を特定したところ、開始コドンから 234 番目のコドン AAA (K) が TAA (STOP) に変異していた。ウシグソヒトヨタケのゲノムには、もう 1 つの Tup1 相同遺伝子 (*Cc.tupA* と命名) があったので、定量リアルタイム PCR により、2 つの Tup1 相同遺伝子の発現解析を行った。栄養菌糸や子実体の柄では、*Cc.tupA* の方が多く発現しているが、傘組織では *cag1* の方が多く発現していた。出芽酵母の Tup1p はホモ 4 量体を形成し、Cyc8p と相互作用することが知られているので、Cag1, Cc.TupA および Cc.Cyc8 間の相互作用を Yeast two-hybrid 法を使って調べた。Cag1 は N 末領域でそれ自身と相互作用するとともに、Cc.TupA とも相互作用した。出芽酵母の場合とは違って、Cc.Cyc8 の N 末領域は、Cag1 の N 末領域と強い相互作用を示さなかった。これら Yeast two-hybrid 法の結果は、Cag1 が Cc.TupA と相互作用することで傘成長に必要な遺伝子の発現を促している可能性を示唆している。

**The *cag1* gene required for cap growth of *Coprinopsis cinerea* encodes a Tup1 homologue.**

Hajime Muraguchi, Takahiro Nagoshi, Kazuki Kemuriyama

(Dept. of Biotechnology, Akita Prefectural Univ.)

## O-7 (P-29)

### 麹菌が産生する hydrophobin RolA と固体表面間の相互作用機構解析

田邊弘毅<sup>1</sup>, 田中拓未<sup>1</sup>, 大類景子<sup>1</sup>, 上原健二<sup>1</sup>, 高橋徹<sup>2,3</sup>, 富樫貴成<sup>4</sup>, 有田稔彦<sup>4</sup>, 阿部敬悦<sup>1,3</sup> (<sup>1</sup>東北大院・生物産業創成, <sup>2</sup>酒総研・基盤, <sup>3</sup>東北大・未来研, <sup>4</sup>東北大・多元研)

麹菌の産生する界面活性蛋白質 hydrophobin RolA は生分解性ポリエステル PBSA に吸着し, PBSA 分解酵素 CutL1 による PBSA 分解を促進する。一方, 様々な固体表面と hydrophobin 間の相互作用機構やその kinetics は不明である。これまでに, 1. RolA の Leu137, Leu142 が PBSA への結合に重要, 2. pH4-10 での PBSA への RolA の親和性は pH4 で最大, 3. pH4-10 における PBSA 微粒子のゼータ電位は中性で負, 酸性で 0 になる結果を得た。以上の結果と, RolA の pI=5~6 という結果から, RolA の PBSA への吸着には, 両者の“疎水的相互作用”が正に, “負電荷の静電反発”が負に働く可能性が推察された。本報告は, 様々な固体表面への RolA の吸着様式の解析を目的とした。

異なる化学的性質を付与した表面への RolA の吸着を, pH7 の条件で QCM により評価した。疎水度が異なる表面に対する RolA の親和性は, 表面の疎水度と正の相関を示した。正・負電荷表面に対する親和性は変わらず, 負電荷表面で最大結合量が半減した。従って, 固体表面の負電荷が最大結合量に対し負に働く可能性が示唆された。RolA は両親媒性であるため, 固体表面の電荷により吸着様式が異なる可能性を推察した。また RolA は pH4 で固体表面に高い親和性を示し, RolA 濃度上昇に伴う急激な吸着量の増加と rodlet 状重合構造形成が確認された。現在, 電荷・極性を持つ表面に対し, pH の異なる条件下での親和性解析を行っている。

#### Analysis of the interaction between *Aspergillus oryzae* hydrophobin RolA and solid surfaces

Hiroki Tanabe<sup>1</sup>, Takumi Tanaka<sup>1</sup>, Keiko Orui<sup>1</sup>, Kenji Uehara<sup>1</sup>, Toru Takahashi<sup>2,3</sup>, Takanari Togashi<sup>4</sup>, Toshihiko Arita<sup>4</sup>, Keietsu Abe<sup>1,3</sup> (<sup>1</sup>Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., <sup>2</sup>NRIB., <sup>3</sup>NICHe., Tohoku Univ., <sup>4</sup>IMRAM., Tohoku Univ.)

## O-8

### *Trichoderma reesei* セルラーゼ高生産変異株における *bgl2* 変異の影響

志田洋介<sup>1</sup>, 山口香織<sup>1</sup>, 新田美貴子<sup>2</sup>, 森一樹<sup>3</sup>, 平川英樹<sup>4</sup>, 久原哲<sup>3</sup>, 小笠原渉<sup>1</sup> (<sup>1</sup>長岡技科大・生物, <sup>2</sup>JST, <sup>3</sup>九大・生資源, <sup>4</sup>かずさ DNA 研究所)

【目的】セルラーゼ高生産糸状菌である *Trichoderma reesei* においてセルラーゼ遺伝子群の発現は誘導的であり、セルロースやその誘導體、 $\beta$ -グルコシダーゼ (BGL) の有する糖転移活性によってセロビオースから生じた  $\alpha$ -ソホロースが存在するときのみ観察される。本研究室では、世界標準株 QM9414 から派生した我が国独自の *T. reesei* 変異株系統樹を保有しており、次世代シーケンサーを用いた変異株間の比較ゲノム解析を進めている。QM9414 から 6 代の変異を経て得られた PC-3-7 株は、セロビオースおよび L-ソルボースによるセルラーゼ誘導生産能が高められた菌株であるが、本菌において細胞内  $\beta$ -グルコシダーゼである BGLII 遺伝子 (*bgl2*) に SNP が生じていることが明らかとなった。そこで、本研究では *bgl2* に生じた SNP の影響を解析することで、セルラーゼの誘導発現に関する新たな知見を得ることを目的としている。

【結果】PC-3-7 株を宿主として野生型 *bgl2* 導入株 (WT*bgl2*)、*bgl2* 破壊株 ( $\Delta$ *bgl2*) を構築し、セルラーゼの誘導生産性に関して種々の解析を行った。菌体内の BGL 活性は WT*bgl2* において大幅な回復がかんさつされ、PC-3-7 株および  $\Delta$ *bgl2* 株の活性がほぼ同程度であったため、SNP によって BGLII の機能が失われていると考えられた。しかしながら、セロビオースによるセルラーゼ遺伝子の転写応答は PC-3-7 株が最も高く破壊株と異なる挙動を示したことから、PC-3-7 において BGLII は完全に機能を失ってはならず、セルラーゼ誘導生産に有利な機能を残していることが示唆された。現在 *bgl2* 以外の SNP の影響を排除するため、QM9414 株において同様の解析を進めている。

#### Effect of the SNP in *bgl2* in *Trichoderma reesei* cellulase hyper-producing strain

Yosuke Shida<sup>1</sup>, Kaori Yamaguchi<sup>1</sup>, Mikiko Nitta<sup>2</sup>, Kazuki Mori<sup>3</sup>, Hideki Hirakawa<sup>4</sup>, Satoru Kuhara<sup>3</sup>, Wataru Ogasawara<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Nagaoka Univ. of Tech., <sup>2</sup>JST, <sup>3</sup>Kyushu Univ., <sup>4</sup>Kazusa DNA Inst.)

## O-9

### シイタケより精製された新規 GH ファミリーに属する endo- $\beta$ -1,3-グルカナーゼ

坂本裕一, 金野尚武 (岩手生工研)

シイタケは、収穫後急速に老化し、自己分解を起こす。自己分解過程では、主に細胞壁の溶解が起こっている。シイタケの細胞壁成分は、主にキチンと $\beta$ -1,3-1,6-グルカンからなっており、収穫後に起きる自己分解過程で、細胞壁分解酵素により分解される。そこで、シイタケ収穫後に発現している $\beta$ -1,3-グルカナーゼの解析を行った。シイタケ保存4日目の子実体からは、2種類のエンド型 $\beta$ -1,3-グルカナーゼ(TLG1及びGLU1)が精製され、両酵素をコードする遺伝子をクローニングした結果、それぞれ既知の糖質加水分解酵素と相同性を持たないことが明らかになった。TLG1は植物の抗菌タンパク質であるThaumatin-like proteinと相同性が高かったが、GLU1は機能既知タンパク質とは高い相同性を示さなかった。一方、多くの菌類などのゲノム配列に存在するhypothetical proteinと低いながらも相同性を示した。それら一群の遺伝子配列中には $\beta$ -1,3-グルカナーゼと関連するモチーフは検出されなかった。しかしながら、精製したGLU1、*Phichia pastoris*で発現させた組換え酵素ともに明らかに $\beta$ -1,3-グルカナーゼ活性を示した。そこで、GLU1を含む酵素群は、糖質関連酵素データベース(CAZy)に新たな糖質加水分解酵素(GH128)として登録された。両酵素は、既知のGHファミリーとは相同性が低く、ゲノム情報からは酵素機能は推定されていなかったことから、今後もゲノム情報だけでなく、酵素学的な解析が重要であることが示唆された。

### Novel endo- $\beta$ -1,3-glucanase purified from *Lentinula edodes*

Yuichi Sakamoto Naotake Konno

(IBRC)

## O-10

### セルラーゼ遺伝子発現制御因子 ClbR と相互作用する因子の探索

國武絵美<sup>1,2</sup>, 谷修治<sup>1</sup>, 炭谷順一<sup>1</sup>, 川口剛司<sup>1</sup> (<sup>1</sup>阪府大院・生環科, <sup>2</sup>日本学術振興会特別研究員 PD)

*Aspergillus aculeatus* ではセルラーゼ・ヘミセルラーゼ遺伝子発現は、XlnR を介した機構と XlnR 非依存的な機構の少なくとも2種類の経路により誘導される。我々が同定した Zn(II)<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub> 型転写因子 cellobiose response regulator ClbR は、セルロース性基質を誘導物質とした際の両遺伝子群の発現を制御している。これまでに、*clbR* 破壊株においても制御下の遺伝子発現は完全に消失しないこと、リコンビナント ClbR タンパク質が *in vitro* で制御下の遺伝子プロモータ領域に特異的に結合しなかったことから、ClbR はコアクチベータとして他の因子と協調的にセルラーゼ・ヘミセルラーゼ遺伝子発現を調節していると仮定した。そこで本研究では ClbR と相互作用する因子の探索を試みたので報告する。

既知の糖質加水分解酵素遺伝子の転写因子と ClbR パラログからなる Prey ライブラリを作製し、Yeast Two Hybrid 法により ClbR と相互作用する因子をスクリーニングした。その結果、ClbR と相同性42%のパラログが取得された(Clbr2 とする)。Clbr2 の機能は未知であるため、まずその機能を調べることを目的として *clbr2* 単独破壊株、*clbR* との二重破壊株、及び *clbr2* 高発現株を作製した。現在その表現型を解析している段階である。また、*in vivo* における ClbR と Clbr2 の相互作用についても確認しているところである。

### Screening for interaction factors with transcription factor ClbR involved in cellulase gene expression in *Aspergillus aculeatus*

Emi Kunitake<sup>1,2</sup>, Shuji Tani<sup>1</sup>, Jun-ichi Sumitani<sup>1</sup>, Takashi Kawaguchi<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Grad. Sch. Life & Env. Sci., Osaka Pref. Univ., <sup>2</sup>JSPS Research Fellow (PD))

## O-11 (P-54)

### Co-regulation of *A. nidulans* cellulase genes by transcription factors McmA and ManR

Nuo Li, Miki Aoyama, Kyoko Kanamaru, Makoto Kimura, Tetsuo Kobayashi (Graduate Sch. of Bioagric. Sci., Nagoya Univ.)

In *A. nidulans*, a MADS box protein McmA regulates at least two endoglucanase genes (*eglA* and *eglB*) and two cellobiohydrolase genes (*cbhA* and *cbhD*). As a MADS box protein generally requires an interacting partner to regulate gene expression, identification of the McmA partner is the key to understanding the regulatory mechanisms underlying cellulase regulation. One of the candidate cofactors is ManR because it is essential for expression of the above cellulase genes. This study focuses on the clarification of the cooperative regulatory mechanisms by McmA and ManR.

RNA sequencing analysis revealed that most cellulase genes were regulated by both ManR and McmA, implying that ManR is one of the partners of McmA. Previous studies have proved the existence of two binding sites for McmA on the 50 bp region of the *eglA* promoter. To detect the binding of ManR to the region, electrophoretic mobility shift assay was applied in the presence and absence of McmA. His-tagged McmA and Flag-tagged ManR were purified and utilized in the experiments. While ManR alone showed very weak binding, McmA alone bound to the probe with two shift bands corresponding to the single and double occupation of the binding sites. When both ManR and McmA were applied, the slower migrating DNA-protein complex with enhanced affinity appeared. Supershift assay using anti-Flag tag and anti-His tag antibodies confirmed that the complex contained both ManR and McmA. The results illustrated that McmA played a key role in the regulation of cellulase genes by assisting recruitment of ManR to the promoter.

This work was supported by the Programme for Promotion of Basic and Applied Researches for Innovations in Bio-oriented Industry.

### Co-regulation of *A. nidulans* cellulase genes by transcription factors McmA and ManR

Nuo Li, Miki Aoyama, Kyoko Kanamaru, Makoto Kimura, Tetsuo Kobayashi

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

## O-12 (P-56)

### AtrR は *Aspergillus fumigatus* においてエルゴステロール合成系遺伝子発現を制御する

大場歩<sup>1</sup>, 清水公德<sup>2</sup>, 萩原大祐<sup>2</sup>, 新谷尚弘<sup>1</sup>, 川本進<sup>2</sup>, 五味勝也<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>東北大院農・生物産業創成, <sup>2</sup>千葉大・真菌センター)

当研究室では、これまでに麹菌においてアゾール系薬剤排出に関与する複数の ABC トランスポーター遺伝子の発現を同時に制御する Zn<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub> 型の転写因子 AtrR を見いだしている。AtrR は *Aspergillus* 属に幅広く保存されており、病原性真菌 *Aspergillus fumigatus* においても、*atrR* を破壊することでアゾール系薬剤に関して超感受性を示すことを明らかにしている。

本研究では、*A. fumigatus* の *atrR* 破壊株における遺伝子発現プロファイルを網羅的に調べるために、RNA-seq を用いてトランスクリプトーム解析を行った。*A. fumigatus* の野生株と破壊株を DMSO, fluconazole, miconazole で各々処理したサンプルに異なるインデックスを付加することでマルチプレックスな RNA-seq を行い、各サンプルから 1.91~2.45 M read の配列、約 10000 遺伝子の発現プロファイルを得た。発現量を比較した結果、破壊株では薬剤無添加において ABC トランスポーター遺伝子だけでなく複数のエルゴステロール合成系遺伝子の発現量が極めて低く、薬剤を添加した際には野生株でそれらの発現量が上昇する一方、破壊株ではほとんど変動しない、あるいは僅かな上昇しか示さないことが明らかになった。このことから AtrR は ABC トランスポーター遺伝子のみならず、エルゴステロール合成系遺伝子の発現も制御していると考えられる。*A. fumigatus* では bHLH 型転写因子 SrbA がエルゴステロール合成系遺伝子の発現を制御することが知られていたが、Zn<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub> 型転写因子 AtrR もこれと協調して遺伝子発現を制御している可能性が示唆された。

### AtrR regulates the expression of ergosterol biosynthesis genes in *Aspergillus fumigatus*.

Ayumi Ohba<sup>1</sup>, Kiminori Shimizu<sup>2</sup>, Daisuke Hagiwara<sup>2</sup>, Takahiro Shintani<sup>1</sup>, Susumu Kawamoto<sup>2</sup>, Katsuya Gomi<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Div. Biosci. Biotechnol. Future Bioind., Grad Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., <sup>2</sup>MMRC, Chiba Univ.)

## O-13 (P-57)

### *Neurospora crassa* のエルゴステロール生合成阻害剤による *erg* 遺伝子の誘導とその制御

宮下基, 亀井誠之, 高橋正和, 一石昭彦, 藤村真 (東洋大院・生命)

Ergosterol は糸状菌の細胞膜の成分で、その生合成経路は農業用殺菌剤や抗真菌剤の標的である。Morpholine 系剤 Fenpropimorph (FEN)は、C-14 sterol reductase (ERG-24)と C-8 sterol isomerase (ERG-2)の二点の酵素を阻害し、Azole 系剤 Fluconazole (FLC)は Lanosterol 14-alpha-demethylase (ERG-11)を阻害し殺菌活性を発現する。Ergosterol 生合成阻害剤により *erg* 遺伝子が誘導される事が知られているが、薬剤の阻害点と誘導遺伝子の関係は不明な点が多い。そこで、*N. crassa* に FEN と FLC を処理し、メバロン酸経路から Ergosterol に至る 21 種類の *erg* 遺伝子の発現様式を qRT-PCR を用いて比較解析した。その結果、FEN により阻害点の *erg-24* と *erg-2* 及びその下流の *erg-25* と *erg-3* が誘導された。一方、FLC では阻害点の *erg-11* 及びその下流の *erg-6* が誘導され、薬剤の阻害点により誘導される遺伝子が異なる事を明らかにした。興味深いことに両剤を混合処理すると、FEN 応答遺伝子の誘導のみが顕著に低下した。合成経路の阻害で蓄積する異常ステロールにより、誘導される遺伝子を決定している可能性が考えられた。*N. crassa* の Ergosterol 生合成経路は少なくとも二種類の異なる制御を受けていると推測し、その転写因子を同定するため、転写因子破壊株ライブラリーから、FEN 及び FLC 感受性株をスクリーニングした。その結果、sterol binding element regulator protein である *sah-2* 破壊株が顕著な FEN 感受性を示し、FEN 応答遺伝子の誘導もほぼ完全に消失した。一方、*sah-2* 破壊株は FLC 感受性及び FLC による *erg-11* 誘導は野生株と同様に認められた。以上の事から、*N. crassa* では、転写因子 SAH-2 が Morpholine 系剤により誘導される遺伝子を制御する事を明らかにした。

### Regulation of ergosterol biosynthetic genes in response to azole and morpholine fungicides in *Neurospora crassa*.

Moto Miyashita, Masayuki Kamei, Masakazu Takahashi, Akihiko Ichiishi and Makoto Fujimura  
(Fac. of Life Sci., Toyo Univ.)

## O-14

### *Chaetomium globosum* における天然物生合成遺伝子研究からみえてきた 特定二次代謝産物による遺伝子発現制御および有性生殖への関与

中沢威人, 石内勘一郎, 杉本覚, 五反田康孝, 佐藤道大, 野口博司, 渡辺賢二 (静岡県大・薬)

糸状菌 *Chaetomium globosum* は、強力な生物活性を有する多様な天然物(二次代謝産物)を、興味深い生合成機構によって産生する。我々は本菌における分子遺伝学実験システムの構築を通じ、そのような興味深い天然物の生合成機構について研究を行っている。本発表では、一連の生合成研究の過程で明らかとなった、本菌における二次代謝産物の遺伝子発現制御および有性生殖への関与について報告する。

二次代謝産物である aureonitol および chaetoviridin 類生合成遺伝子の破壊株において、それぞれ異なる複数の天然物(新規化合物を含む)の顕著な産生変動が観察された。これら天然物について、NMR スペクトル解析による構造決定を行い、続いて遺伝子破壊実験を通じて生合成遺伝子クラスターを特定した。これら生合成遺伝子の転写発現は、それぞれの天然物の産生変動に対応する形で顕著に変動していた。以上から、aureonitol および chaetoviridin 類によって、他の二次代謝産物の生合成を転写レベルで制御する機構の存在が明らかになった。また、chaetoglobosin 類生合成遺伝子の破壊株において、子のう殻形成は確認できるが、有性胞子が形成されない表現型が観察された。

これらの結果について、過去の天然物化学研究から報告されている上記天然物およびそれらの類縁体の生物活性・作用機序に関する知見、および本菌におけるエピジェネティック制御因子類との遺伝子多重破壊株の解析結果を踏まえて議論する。

### Effects of secondary metabolites on transcriptional regulation and sexual development in *Chaetomium globosum*

Takehito Nakazawa, Kan'ichiro Ishiuchi, Satoru Sugimoto, Yasutaka Gotanda, Michio Sato, Hiroshi Noguchi,  
Kenji Watanabe (School of Pharmaceutical Sciences, Univ. of Shizuoka)

## O-15

### イネいもち病菌の二成分情報伝達系攪乱によるポリケタイド化合物生産誘導

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

【目的】糸状菌ゲノム中に予想以上に膨大な数の二次代謝遺伝子が存在することが明らかになってきたが、ほとんどは実験室条件では休眠状態にある。二次代謝遺伝子はある特定の環境でのみ発現するように厳密な制御を受けていることが想定されている。それならば、環境応答を攪乱することにより、休眠遺伝子覚醒が可能ではある。今回、モデル植物病原糸状菌であるイネいもち病菌 *Magnaporthe oryzae* を用いて、環境応答に関与する二成分情報伝達系の攪乱により二次代謝産物生産誘導が可能であることを見出し、生合成遺伝子を同定した。

【方法と結果】HPt遺伝子 *MoYPD1* を破壊することにより二成分情報伝達系を攪乱した。HPt遺伝子破壊による致死性を回避するために、下流で働く *p38 MAPキナーゼ Osm1* の遺伝子破壊株を作製した後に、HPt遺伝子破壊を行った。HPt遺伝子破壊株の培養液中で二つの二次代謝産物の生産が誘導されていることを見出した。一つは、イネいもち病菌と近縁の植物内共生菌（エンドファイト）などで生産が報告されているポリケタイド化合物 *nectriapyrone* であり、もう一つはその類縁体で新規物質であった。DNAマイクロアレイ解析により、生産誘導パターンと一致する発現パターンを示すPKS遺伝子を1個見出した。遺伝子破壊により、二つの代謝物の生産が認められなくなったことから、このPKS遺伝子が生合成に関与することが明らかとなった。

本研究の一部は、生研センターイノベーション創出事業による支援を受けた。

### Induced production of polyketide compounds by disturbance of the two-component signal transduction system in the rice blast fungus

Takayuki Motoyama, Toshiaki Hayashi, Hiroshi Hirota, Hiroyuki Osada

(Chem. Biol., RIKEN ASI)

## O-16

### *Aspergillus fumigatus* における新規病原因子の探索と機能解析

酒井香奈江, 大荒田素子, 高橋梓, 五ノ井透 (千葉大・真菌センター)

アスペルギルス症はアスペルギルス属菌によって引き起こされる日和見感染症で、臓器移植患者や AIDS 患者など免疫機能の低下したヒトに重大な疾病を引き起こす。この主な原因菌として知られているのが *A. fumigatus* であり、治療が遅れた場合の致死率は高い。現在、いくつかの抗生物質が治療薬として用いられているが、耐性菌の出現が報告されており新規治療薬の開発が求められている。

これまでに宿主であるヒトや動物モデルにおいて、感染菌の細胞表面多糖とそれを認識するレセプターが感染防御において重要な働きをしていることが報告されてきた。しかし、そのほとんどが宿主側のレセプターについての研究で、真菌側のレセプターがどのような働きをしているのか明らかとなっているものは少ない。そこで本研究では、糖鎖を認識するレセプタータンパク質であるレクチンに焦点をあて、*A. fumigatus* のレクチンと病原性との関わりを調べることにした。

*A. fumigatus* のゲノム配列よりレクチンと思われる遺伝子を選択し、破壊株を作製、マウスへの感染実験を行ったところ、病原性が顕著に昂進した株が見つかった。この破壊株では病原性だけではなく病理組織においても野生型株と異なる挙動を示しており、破壊した遺伝子が病原性発現において何らかの働きをしていると考えられる。現在、この遺伝子機能についてさらに解析を進めているところであり、病原性が昂進した原因を知ることでアスペルギルス症の発症や播種の機構の解明が進むことが期待される。

### Screening and functional analysis of the virulence factor in *Aspergillus fumigatus*.

Kanae Sakai, Motoko Ooarada, Azusa Takahashi, Thoru Gono

(MMRC, Univ. of Chiba)



## O-17

### イネいもち病菌における HsbA 様タンパク質 Mohsb1, Mohsb2 は病原性に関与する

坂口歩・西村麻里江 (生物研)

イネいもち病菌は感染過程において様々な分泌タンパク質を生産し感染を成立させる。これまでに本研究室では、植物のクチン分解産物がいもち病菌の  $\alpha$ -1,3-グルカン合成を誘導し、本菌の感染に必須であることを明らかにしてきた。今回、クチナーゼのリクルート活性を持つ麴菌 HsbA タンパク質に着目し、いもち病菌における HsbA 様タンパク質の病原性への関与を検討した。最初に、いもち病菌が保持する 8 個の HsbA 様タンパク質コード遺伝子破壊株を作成し、大麦に対する病原性検定を行った。その結果、2 つの破壊株で顕著な病原性の低下が見られ、これら遺伝子を *MoHSB1*、*MoHSB2* と命名した。*MoHSB1* または *MoHSB2* プロモーター下流に GFP を連結し、各生育ステージでの観察を行ったところ、メラニン化した成熟付着器および侵入菌糸でのみに GFP シグナルが検出されたことから、*MoHSB1*、*MoHSB2* は付着器分化から植物侵入時に発現誘導されることが示唆された。*mohsb1*、*mohsb2* 破壊株は親株と比較し付着器形成および侵入菌糸形成能に差異は見られなかったことから、*MoHSB1*、*MoHSB2* は感染器官分化には必須でないことが考えられた。分泌シグナルコード領域を欠いた *MoHSB1*、*MoHSB2* では *mohsb1*、*mohsb2* 破壊株の病原性欠損を相補できなかった。このことから、*Mohsb1*、*Mohsb2* はイネいもち病菌の感染過程において分泌され病原性に寄与していることが示唆された。

#### **HsbA-like proteins Mohsb1 and Mohsb2 are involved in pathogenicity in *Magnaporthe oryzae*.**

Ayumu Sakaguchi, Marie Nishimura.

(NIAS)

## O-18 (P-78)

### 出芽酵母の Spindle Position Checkpoint (SPOC)構成要素はウリ類炭疽病菌において付着器分化過程における適切な細胞周期の進行に関与する

深田史美<sup>1)</sup>、坂口 歩<sup>2)</sup>、久保康之<sup>1)</sup> (京都府大院・生環<sup>1)</sup>、生物研<sup>2)</sup>)

ウリ類炭疽病菌はウリ科植物に炭疽病を引き起こす植物病原系状菌である。本菌は感染過程において分生胞子の先端部での付着器形成、侵入菌糸の宿主内成長といった一連の形態形成を伴い、感染を成立させる。我々はこれまでにアグロバクテリウム形質転換法により、ウリ類炭疽病菌の付着器形成欠損変異株 *coQ-1* を得ている。*coQ-1* の破壊候補遺伝子における推定コードアミノ酸配列は、出芽酵母の *BUB2* と高い相同性を示し、このホモログ遺伝子を *CoBUB2* と命名した。出芽酵母の *BUB2* は、細胞分裂制御に関与する Spindle Position Checkpoint (SPOC) の構成要素である。*CoBUB2* の遺伝子破壊実験を行った結果、*cobub2* 破壊株は付着器の形態異常、宿主植物への病原性低下を示した。そこで、*cobub2* 破壊株における核分裂の挙動を解析するため、付着器分化過程での核局在および紡錘体観察を行った。その結果、野生株では培養開始4時間後、付着器形成に伴い紡錘体が出現し核分裂が行われるのに対し、*cobub2* 破壊株では培養開始2時間後の未発芽胞子において核分裂が行われ、2核となる胞子の割合が顕著に増加した。そこで、付着器分化過程における細胞周期を検討するため、S期阻害剤およびM期阻害剤を用いて核分裂を観察した結果、破壊株でのG1/S期の移行時期が、野生株と比較して約2時間早まることが認められた。以上より、ウリ類炭疽病菌の付着器分化過程において、*CoBUB2* はG1期の維持、あるいはS期の適切な開始時期に関与しており、M期の制御因子である出芽酵母の *BUB2* とは異なる機能を有する可能性が示唆された。

#### **Spindle Position Checkpoint (SPOC) component in *Saccharomyces cerevisiae* is involved in proper cell cycle progression during appressorium development in *Colletotrichum orbiculare***

Fumi Fukada<sup>1)</sup>, Ayumu Sakaguchi<sup>2)</sup>, Yasuyuki Kubo<sup>1)</sup>

(<sup>1)</sup>Life and Environmental Sciences, Kyoto Prefectural Univ., <sup>2)</sup>National Institute of Agrobiological S

## O-19 (P-80)

### イチゴ黒斑病菌の 1.0 Mb 染色体にコードされる AF 毒素生合成遺伝子クラスターの同定

原歩美<sup>1</sup>, 近藤日佳理<sup>1</sup>, 播本佳明<sup>1</sup>, 間瀬千晶<sup>1</sup>, 張祐介<sup>1</sup>, 山本幹博<sup>2</sup>, 秋光和也<sup>3</sup>, 柘植尚志<sup>1</sup> (<sup>1</sup>名大院・生命農, <sup>2</sup>岡山大・農, <sup>3</sup>香川大・農)

イチゴ黒斑病菌 NAF8 株の AF 毒素生合成遺伝子 (AFT) クラスターは、1.0 Mb の conditionally dispensable 染色体にコードされている。先に、本染色体の塩基配列を決定し、両腕に対応する 2 つのコンティグ (F1 および F2) からそれぞれ 158 個、127 個の遺伝子を同定した。なお、AFT 遺伝子群はコンティグ F2 の 392 kb 領域にクラスターとして存在し、この領域には 24 個の推定 AFT 遺伝子が 2~7 コピー分布する。これら 24 遺伝子のうち 17 個については、すでに AF 毒素生産における機能を同定した。今回、この領域にコードされる、AF 毒素生産に不可欠な転写制御因子 AftR によって制御される遺伝子の同定を試みた。1.0 Mb 染色体の全遺伝子について、野生株と AFTR サイレンシング株における転写レベルをリアルタイム RT-PCR 法によって比較解析した。その結果、AFTR サイレンシング株では、24 個の AFT 遺伝子すべての転写レベルが顕著に低下し、これら遺伝子が AftR によって正に制御されることが明らかとなった。さらに、遺伝子破壊によって、機能未解析の 7 遺伝子について AF 毒素生合成における機能を解析した。その結果、7 遺伝子のうち 4 個が AF 毒素生産に不可欠であり、残り 3 個は毒素生産を抑制する遺伝子であることが明らかとなった。

### Identification of AF-toxin biosynthetic genes cluster encoded by the 1.0-Mb chromosome in the strawberry pathotype of *Alternaria alternata*

Ayumi Hara<sup>1</sup>, Hikari Kondou<sup>1</sup>, Yoshiaki Harimoto<sup>1</sup>, Chiaki Mase<sup>1</sup>, Yusuke Cho<sup>1</sup>, Mikihiro Yamamoto<sup>2</sup>, Kazuya Akimitsu<sup>3</sup>, Takashi Tsuge<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Grad. Sch. Bioagric. Sci., Nagoya Univ., <sup>2</sup>Fac. Agr., Okayama Univ., <sup>3</sup>Dept. Agr., Kagawa)

## O-20

### 第 2 浸透圧センサー経路はトウモロコシごま葉枯病菌 (*Cochliobolus heterostrophus*) の感染器官である付着器の形成を制御する

泉津弘佑, 北出雄生\*, 住田卓也\*, 湯谷智\*, 森田篤\*, 田中千尋\* (滋賀県大・環境科学, \*京大院農)

モデル生物である出芽酵母では MSB2 や SHO1 から構成される第 2 浸透圧センサー経路が知られている。この経路は高浸透圧ストレス時に MAPKK キナーゼ STE11 を介して MAP キナーゼ HOG1 を活性化することで高浸透圧ストレス適応を制御している。一方で、糸状菌類においては酵母のモデルと異なり、STE11 型 MAPKK キナーゼが HOG1 型 MAP キナーゼの活性化に寄与しないことが示唆されている。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、第 2 浸透圧センサー経路に関与する因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。STE11 および STE50 遺伝子の破壊株は、高浸透圧ストレスへの感受性は示さなかったが、孢子形成、メラニン化、偽子嚢殻形成、および付着器の形成に著しい不全を示した。こうした形質は全て HOG1 型 MAP キナーゼ遺伝子の破壊株では認められず、CHK1 型 MAP キナーゼの破壊株において認められた。第 2 浸透圧センサー経路の主要構成因子である MSB2 および SHO1 遺伝子の破壊株は、高浸透圧ストレスへの感受性は一切示さなかったが、疎水表面 (ポリスチレン) における付着器の形成に著しい不全を示した。一方で、MSB2 および SHO1 の破壊株では正常なメラニン化や孢子形成が認められた。以上の結果から、トウモロコシごま葉枯病菌の第 2 浸透圧センサー経路は高浸透圧ストレス適応ではなく、感染器官である付着器の形成を制御する上流因子として機能していることが示唆された。

### The secondary osmotic sensor pathway regulates appressorium formation in *Cochliobolus heterostrophus*.

\*Kosuke Izumitsu, Yuki Kitade, Takuya Sumita, Satoshi Yutani, Atsushi Morita, Chihiro Tanaka

(Grad. School of Environmental Science, Shiga Prefecture Univ, \* Grad. School of Agriculture, Kyoto Univ.)

## P-1

### イタコン酸を生産する *Aspergillus oryzae* の分子育種

山田智士<sup>1</sup>, 倉地裕子<sup>2</sup>, 朴龍洙<sup>3</sup>, 荒井基夫<sup>2</sup>, 金政真<sup>2</sup> (<sup>1</sup>中部大院・応生, <sup>2</sup>中部大・環境生科, <sup>3</sup>静岡大・創科技院)

【目的】イタコン酸は2価のカルボン酸を持つ有機酸で、安全性が高いことから合成樹脂や接着剤などの原料として幅広く利用されている。現在、イタコン酸は *Aspergillus terreus* により生産されているが、本菌は同じ *Aspergillus* 属糸状菌である麹菌 *A. oryzae* などに比べ生育が遅く、常在菌とはいえ日和見感染菌であるといった問題がある。*A. oryzae* は古来より醸造に利用されており、生育速度が *A. terreus* よりも速いだけでなくヒトへの安全性が極めて高いことが知られている。本研究は、イタコン酸合成酵素であるシス-アコニット酸デカルボキシラーゼをコードする *CAD1* を *A. oryzae* に導入し、イタコン酸生産能を有する *A. oryzae* の育種を目的とした。

【方法と結果】*A. terreus* 由来 *CAD1* を大関(株)により開発された糸状菌用高発現ベクター pNENU2512 に挿入し、*CAD1* 高発現ベクターを構築した。本ベクターを *niaD* を選択マーカーとして *A. oryzae* に導入し、*CAD1* 導入株を得た。液体培養して解析したところ、コントロール株ではイタコン酸の生産が認められなかったのに対し、*CAD1* 導入株ではイタコン酸生産が認められた。

### Molecular breeding of *Aspergillus oryzae* for itaconic acid production

Satoshi Yamada<sup>1</sup>, Yuko Kurachi<sup>2</sup>, Enoch Yongsoo Park<sup>3</sup>, Motoo Arai<sup>2</sup>, Shin Kanamasa<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Grad. Sch. Biosci. Biotech., Univ. of Chubu; <sup>2</sup>Dept. Envi. Biol., Univ. of Chubu; <sup>3</sup>Grad. Sch. Sci. Technol., Univ. of Shizuoka)

## P-2

### アミダーゼ高生産麹菌の担体への固定化方法の研究

鈴木晃<sup>1</sup>, 下家拓馬<sup>1</sup>, 奥田拓真<sup>1</sup>, 柳原琢己<sup>1</sup>, 木村遵<sup>1</sup>, 佐野元昭<sup>1</sup>, 尾関健二<sup>1</sup>, 大箸信一<sup>1</sup>, 坪井宏和<sup>2</sup>, 坊垣隆之<sup>2</sup>, 岩井和也<sup>3</sup>, 福永泰司<sup>3</sup> (<sup>1</sup>金沢工大・ゲノム研, <sup>2</sup>大関・総研, <sup>3</sup>UCC・R&Dセンター)

【目的】これまでモデル飲料中のアクリルアミド(AA)を分解するために、アミダーゼ高生産麹菌を用いる菌体処理法が有効であることを報告した。また、麹菌を吸着させる担体として4mm角のヘチマを使用してきたが、ヘチマは環境に優しくメリットもあるが、準備に時間がかかるなどデメリットも多い。そこで、各種担体を用い麹菌菌体量の測定およびコーヒーのAA低減化を従来のヘチマ吸着菌体と比較し、担体の変更およびその担体での最適な菌体吸着条件の検討を行ったので報告する。

【方法・結果】麹菌は、アミダーゼ高生産麹菌(4コピー株)を用い、担体はセルロース担体(東レ社製)が最大の菌体量及び洗浄操作での菌体の脱落が少ないことが分かった。担体を事前に18個100mlの容器に入れて滅菌し、YPD培地入りの4コピー株の胞子懸濁液( $1.5 \times 10^5$ /ml), 1mlを10回に分けて全体に撒き、25°C・1日間静置培養を行なった。その後、50mlのYPD液体培地を入れ、更に30°C・3日間・70rpmで振とう培養を行ない、その後菌体量、アミダーゼ活性の測定およびコーヒーのAA低減化試験で良好な結果が得られた。このとき、YPD液体培地のpHを6.5から4に変えて培養を行なった結果、pH4の培地において菌体量の増加が認められた。現在、従来のヘチマ吸着菌体と比較して、今回開発した方法などでのアミダーゼ遺伝子の発現量、アミダーゼ活性およびコーヒーのAAの低減化効率を検討している。

### Study on the immobilization of the amidase producing *Aspergillus oryzae* with cellulosic support.

Akira Suzuki<sup>1</sup>, Takuma Shitaya<sup>1</sup>, Takuma Okuda<sup>1</sup>, Takumi Yanagihara<sup>1</sup>, Jun Kimura<sup>1</sup>, Mtoaki Sano<sup>1</sup>, Kenji Ozeki<sup>1</sup>, Shinichi Ohashi<sup>1</sup>, Hirokazu Tsuboi<sup>2</sup>, Takayuki Bogaki<sup>2</sup>, Kazuya Iwai<sup>3</sup>, Taiji Fukunaga<sup>3</sup> (<sup>1</sup>KIT, <sup>2</sup>Ozeki, <sup>3</sup>UCC)

## P-3

### 454 と Illumina の de novo アセンブリーによる糸状菌の新規 cDNA 解析

(ジナリス) 河合文隆、上村泰央、(東大院・農生科) 五十嵐圭日子、堀 千明、鮫島正浩、

次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析は、参照ゲノム配列が存在する生物種において、遺伝子発現量を解析する RNA-Seq と、参照ゲノム配列が存在しない生物種において、発現遺伝子配列を de novo アセンブリー解析により取得する新規 cDNA 解析の 2 種類に大別できる。前者においては、リードが短い、数の多い Illumina シーケンサーが、後者においては、比較的長いリードの 454 シーケンサーが利用されることが多い。一般に、Illumina シーケンサーによる RNA-seq 解析においては、ゲノム配列が利用できない非モデル生物の遺伝子発現解析を行うことができず、454 シーケンサーによる新規 cDNA 解析においては、アセンブリー解析の技術的限界から、精度の高い完全長 cDNA 配列を獲得することは困難であった。

本研究では、454 シーケンサーにより得られたリードデータと Illumina シーケンサーによって得られたリードデータを組み合わせることで、ゲノム配列を利用することなく、どれだけ完全な cDNA 配列が取得できるかを検討したので、その結果について報告したい。解析には、ゲノム配列が既に決定されている *Phanerochaete chrysosporium* のトランスクリプトーム解析を行い、454 シーケンサーのリードデータとして約 58 万リード総塩基数 228 Mb、Illumina シーケンサーからのリードデータとして約 1.9 億リード総塩基数 14 Gb の配列データを取得し、de novo アセンブリー解析を実施した。さらに、得られたコンティグ配列を参照配列として、RNA-seq データをマッピング解析することで、ゲノム配列の利用できない生物種における遺伝子発現量比較の可能性についても考察する。

#### De novo transcriptome assembly of Filamentous Fungi using 454 and Illumina sequencing data

Fumitaka Kawai<sup>1</sup>, Yasuo Uemura<sup>1</sup>, Kiyohiko Igarashi<sup>2</sup>, Chiaki Hori<sup>2</sup>, Masahiro Samejima<sup>2</sup>, (<sup>1</sup>Genaris, Inc., <sup>2</sup>Dept. of Biomaterial and Science, Univ. of Tokyo)

## P-4

### バイオマス変換酵素探索ツールとしての糸状菌トランスクリプトーム

(東大院・農生科) 五十嵐圭日子、堀 千明、石黒真希、鮫島正浩、(ジナリス) 上村泰央、竹田 綾 (食総研) 金子 哲

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。

本研究では、担子菌 *Flammulina velutipes* (エノキタケ) および *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 世代シーケンサーによって配列解析するとともに、得られたトランスクリプトーム配列データの解析を試みた。エノキタケのトランスクリプトーム配列はデータベース化し、セルロース系バイオマスの変換に関わる酵素のプロテオーム解析に用いた。その結果 19 種類の新規バイオマス変換酵素の同定に成功し、そのうちの 12 種類が糖関連酵素 (CAZyme) であることが明らかとなった。*P. chrysosporium* に関しては、トランスクリプトーム配列を用いて、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 11,398 遺伝子に増え、その中には 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 (PcCel145A) などの遺伝子も予測されていた。さらに、アノテーションの精度が高くなったことで、イントロンの予測精度も向上し、本菌のイントロン長がユニークな分布を示すことも明らかとなった。

#### Fungal Transcriptome as a Tool to Search for Biomass-Converting Enzymes

Kiyohiko Igarashi<sup>1</sup>, Chiaki Hori<sup>1</sup>, Masahiro Samejima<sup>1</sup>, Yasuo Uemura<sup>2</sup>, Aya K. Takeda<sup>2</sup>, Satoshi Kaneko

(<sup>1</sup>Dept. of Biomaterial and Science, Univ. of Tokyo, <sup>2</sup>Genaris, Inc., <sup>3</sup>National Food Research Institute)

## P-5 (O-2)

### 麴菌必須遺伝子の解析のためのプロモーターシャットオフシステムの開発

寺戸志保<sup>1,2</sup>, 島原明子<sup>1</sup>, 豊浦 利枝子<sup>2</sup>, 岩下 和裕<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>広島大院・先端研,<sup>2</sup>酒総研)

麴菌の遺伝子機能の解析には、遺伝子の発現を ON/OFF 出来る事が必要で、これまで *amyB* プロモーター等いくつかの誘導型プロモーターの開発が成されている。しかし、発現抑制時にも発現が見られるものや、誘導、抑制時に細胞内代謝の大幅な変化が見られる等、遺伝子機能解析に使用しにくい点がある。特にプロモーターシャットオフによる必須遺伝子の解析には、発現抑制時に転写がほぼ完全に抑えられる必要があり、このようなプロモーターは開発されていない。そこでグルコース同様に解糖系により代謝されると考えられるソルビトールに着目し、解析を行った。また、*Aspergillus* 属ではソルビトールを単一の C 源として資化できるが、その代謝機構等についてはほとんど研究されていなかった。そこで、ソルビトール誘導下での遺伝子発現についてマイクロアレイ解析を行い、誘導される遺伝子を抽出するとともに機能解析を行うと共に、そのプロモーターについて発現制御に使用可能かどうか検討を行った。まず、ソルビトールまたはガラクトースを誘導源として、グルコースを抑制条件としてマイクロアレイ解析した。ガラクトースに比べソルビトールを用いた場合の方が遺伝子全体への発現変動が少なく、かつグルコース環境下で発現が検出されず、ソルビトール下で発現が有意に 10 倍以上増加した遺伝子が 2 遺伝子見つかった。そこで、プロモーターの下流に EGFP を連結したプラスミドを用いて、形質転換体を作成した。この獲得した形質転換体をグルコースまたはソルビトール存在下で培養し蛍光と EGFP タンパクを確認したところ、ソルビトール存在下でのみ EGFP が発現していることが確認できた。現在、ノーザン解析を行うと共に、複数の環境下での発現誘導について解析を行っている。

#### The development of promoter shutoff system for function analysis of the essential genes in *Aspergillus oryzae*.

Shiho Terado<sup>1,2</sup>, Akiko Shimahara<sup>2</sup>, Rieko Toyoura<sup>2</sup>, Kazuhiro Iwashita<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup> AdSM, Hiroshima Univ.、<sup>2</sup> NRIB)

## P-6

### 麴菌における *Cre-loxP* 選択マーカーリサイクリングシステムの改良

張斯来, 江原直樹, 水谷治<sup>1</sup>, 田中瑞己, 新谷尚弘, 五味勝也 (東北大院農, 酒総研<sup>1</sup>)

麴菌は多数の二次代謝関連遺伝子を有しているものの、その多くは極めて僅かにしか発現していないため、二次代謝化合物生産のクリーンホストとしての利用が期待されている。しかし、麴菌は利用出来る選択マーカーに限られているため、二次代謝化合物の生合成マシナリー構成遺伝子を全て導入することが困難である。我々はこれまでに、変異型 *loxP* を用いた *Cre/loxP* システムによる多重遺伝子導入法の開発を行ってきた(1)。現在までに、*thiA* プロモーターによって *Cre* を細胞内で条件的に発現させ、ウラシル要求性マーカーを効率的にリサイクリングするシステムを構築している。しかし、ウラシル要求性株の選択に用いる 5-フルオロオロチン酸が高価である点や、*thiA* プロモーターによる *Cre* の発現抑制が完全ではない点が問題となっている。そこで、本研究ではこれらの問題点を解決可能な *Cre/loxP* システムの開発を目指すこととした。

リサイクリングに用いる選択マーカーとしてアデニン要求性マーカーを用いることとし、はじめに *adeA* 破壊株の取得を試みた。*ptrA* マーカーを形質転換マーカーとし、置換破壊法により *adeA* の破壊を行った。取得した *adeA* 破壊株はアデニン要求性を示し、YPD 寒天培地上でコロニーが赤色を呈した。このことから、コロニーの色のみで *adeA* 脱落株が選択可能であると考えられる。次に、*adeA* と *Cre* 発現カセットの両者を変異型 *loxP* 配列で挟んだ断片を搭載したプラスミドの構築を行い、完成したプラスミドを *adeA* 破壊株に導入し、*adeA* と *Cre* 発現カセットの同時脱落を試みているところである。

(1)江原直樹、水谷治、五味勝也 (2012) 生物工学会誌、90(6): 298-301

#### Improvement of the *Cre-loxP* selection marker recycling system in *Aspergillus oryzae*.

Silai Zhang, Naoki Ebara, Osamu Mizutani<sup>1</sup>, Mizuki Tanaka, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi

(Grad.Sch, Agric.Sci., Tohoku Univ., NRIB<sup>1</sup>)

## P-7

### 昆虫病原性糸状菌 *Lecanicillium* sp.における自律複製型ベクターを用いた形質転換系の構築

石堂 圭一、木下 浩、井原 史雄<sup>1</sup>、仁平 卓也 (阪大生物工学国際交流セ、<sup>1</sup>農研機構・果樹研)

【目的】*Lecanicillium* 属糸状菌はアブラムシ等の害虫だけでなく、うどんこ病菌やサビ病菌等の植物病原菌に効果を示すことから微生物農薬、土壌改良剤として用いられている。本菌の病原性発現、寄生機構を分子生物学的に解明するため、我々はこれまでに *Lecanicillium* sp. においてウリジン要求性変異株を宿主、また *pyrG* 遺伝子をマーカー遺伝子とする宿主-ベクター系を構築した。今回我々は、効率よく遺伝子の機能解析を行うために、自律複製型プラスミドベクターを用いた形質転換系の構築を目指した。

【方法および結果】pAUR316のARSであるAMA1配列、及び *Lecanicillium* sp. の *pyrG* 遺伝子を制限酵素により切り出し、pUC19にクローニングしたプラスミドpLSPYRG+AMA1を作成した。AMA1配列を持たない組込み型ベクターとの形質転換効率の比較を行ったところ、pLSPYRG+AMA1は3倍以上の形質転換効率を示した。pLSPYRG+AMA1の内部一カ所を切断する *Hind* IIIを用いてサザン解析を行ったところ、得られた形質転換体8株中5株で、プラスミド型に由来する13.2kbpのバンドが検出されたことから、pLSPYRG+AMA1は *Lecanicillium* sp.内で自律複製型ベクターとして機能していることが示された。

#### Construction of transformation system using autonomously replicating vector in *Lecanicillium* sp.

Kei-ichi Ishido, Hiroshi Kinoshita, Fumio Ihara<sup>1</sup>, Takuya Nihira

(ICBiotech, Osaka Univ., <sup>1</sup>Nat. Inst. Fruit Tree Sci.)

## P-8

### 糸状菌によるフミン酸の分解と還元

中澤奈美、老沼研一、高谷直樹 (筑波大院・生命環境)

土壌に豊富に含まれるフミン酸は、芳香環を多く含む難分解性の高分子化合物であり、自然界では白色腐朽菌等によるフミン酸分解が地球上の炭素循環の維持に大きく寄与しているとされている。また、一部の鉄還元細菌が、有機物の酸化によって生じた電子を不溶性の酸化鉄へ伝達する際に、細胞外に存在するフミン酸を媒体として利用することが示されている。一方、糸状菌によるフミン酸の分解や電子伝達についての多くは未解明であり、本研究では、これについて解析した。

研究室保有の土壌分離菌を含む糸状菌(188種)を、フミン酸を添加した Potato dextrose 固体培地を用いて培養したところ、26種が褐色のフミン酸を強く脱色した。これらのうち少なくとも15種については、液体培地中でも有意なフミン酸脱色活性が確認された。また、その培養液を、ゲルろ過法を用いて分析したところ、脱色活性を示した菌の多くがフミン酸の分子量分布を変化させていた。一方、糸状菌によるフミン酸およびフミン酸のモデル化合物である anthraquinone-2,6-disulfate (AQDS)への電子伝達活性を、電子供与体としてグルコースを加えた嫌気条件下で、不溶性の酸化鉄(Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)の還元活性を指標として測定した。その結果、*Aspergillus nidulans*を含む複数の菌株が、フミンやAQDSの存在下でのみFe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>の顕著な還元活性を示し、フミン酸への細胞外電子伝達が行われることが示された。また、呼吸鎖阻害剤は本活性を著しく低下させたことから、フミン酸は呼吸鎖電子伝達鎖を介して還元されると考えられた。これらの結果は、土壌環境中に棲息する幅広い糸状菌種が、フミン酸を分解および還元することによって土壌生態や炭素循環の恒常性の維持に重要である可能性を示す点で、これまでの常識を覆すものであろう。

#### Analysis of humic acid degradation and reduction by filamentous fungi

Nami Nakazawa, Ken-Ichi Oinuma, Naoki Takaya

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

## P-9 (O-3)

### *Aspergillus nidulans* のガラクトフラナン生合成に関与する遺伝子の機能解析

元松遥<sup>1</sup>, 畠山信太郎<sup>1</sup>, 浴野圭輔<sup>1</sup>, 二神泰基<sup>2</sup>, 竹川薫<sup>2</sup>, 後藤正利<sup>2</sup>, 野村善幸<sup>1</sup>, 岡拓二<sup>1</sup> (<sup>1</sup> 崇城大学・生物生命・応微工、<sup>2</sup> 九大・院・農)

*Aspergillus* 属の細胞壁構成糖鎖には、 $\alpha$ -グルカン、 $\beta$ -グルカン、キチン、ガラクトマンナン(GM)が含まれる。この GM は、 $\alpha$  1,2-テトラマンノースのユニットが  $\alpha$  1,6 結合した主鎖に、 $\beta$  1,5-ガラクトフラノースの側鎖であるガラクトフラナン(GF)が  $\beta$  1,6 結合する構造である。この GM のうち GF の生合成に関する知見は乏しい。本研究室で逆遺伝学的手法により見出された  $\Delta gfsA$  株では、GF を認識する抗体(EB-A2)によるシグナルが消失しており、細胞壁中のガラクトース量は親株の 60% に減少していた。また、 $\Delta gfsA$  株では菌糸形態の異常や分生子形成能の低下が認められた。*gfsA* 遺伝子は子囊菌門のうちチャワソウ門に分布しており、GF 構造を細胞壁中に持つ菌類には全て *gfsA* 遺伝子が存在していた。*GfsA* に関する機能解析を進めるために染色体上の *gfsA* 遺伝子に 3xFLAG タグを挿入した。まず、*in vitro* における GF 合成酵素の活性測定を行った。反応系に、*GfsA*-3xFLAG、糖供与体、 $\Delta gfsA$  由来のマンノプロテインを加え、37°C で保温した。次に、SDS-PAGE に供与し、EB-A2 により解析をおこなった。反応時間とともにシグナル強度が増加し、熱失活させたものや糖供与体を除去したものではシグナルが認められなかったことから、*GfsA*-3xFLAG が GF 合成活性を有することが明らかとなった。また、ゴルジ体に局在する *GlfB*、小胞体に局在する *BipA* をマーカーとしてショ糖密度勾配遠心分離法により局在解析を行ったところ、*GfsA*-3xFLAG はゴルジ体に局在することが示された。以上のことから *GfsA* が GF 合成酵素であり、GF はゴルジ体で合成されることが示唆された。

#### Functional analysis of gene involved in galactofuranan biosynthesis in *Aspergillus nidulans*.

Haruka Motomatsu<sup>1</sup>, Shintaro Hatakeyama<sup>1</sup>, Keisuke Ekino<sup>1</sup>, Taiki Futagami<sup>2</sup>, Kaoru Takegawa<sup>2</sup>, Masatoshi Goto<sup>2</sup>, Yoshiyuki Nomura<sup>1</sup>, Takuji Oka<sup>1</sup> (<sup>1</sup> Univ. of Sojo, <sup>2</sup> Univ. of Kyusyu)

## P-10

### *Aspergillus nidulans* における *ugeB* 遺伝子の機能解析

田中麻左人<sup>1</sup>, 浴野圭輔<sup>1</sup>, 二神泰基<sup>2</sup>, 竹川薫<sup>2</sup>, 後藤正利<sup>2</sup>, 野村善幸<sup>1</sup>, 岡拓二<sup>1</sup> (<sup>1</sup> 崇城大学・生物生命・応微工、<sup>2</sup> 九大・院・農)

*Aspergillus nidulans* のゲノム上には UDP-グルコース(Glc)/UDP-ガラクトース(Gal) 4-エピメラーゼ (UGE) をコードしている出芽酵母の *Gal10p* と類似したアミノ酸配列を有する遺伝子 (*ugeA* および *ugeB*) が 2 つ存在する。これら 2 つのタンパク質は、出芽酵母の *Gal10p* とそれぞれ 58.7% および 37.8% の相同性を有していた。*ugeA* は 1116 塩基 371 アミノ酸からなり、*ugeB* は 1287 塩基 428 アミノ酸からなるタンパク質 (*UgeA* および *UgeB*) をコードしており、互いにアミノ酸レベルで 38.8% の相同性を保持していた。これらのうち *UgeA* に関しては UGE 活性を持つことが既に報告されている (El-Ganiny AM, 2010)。しかしながら、*UgeB* の酵素機能については明らかにされていない。そこで、*UgeB* の機能解析について解析を進めた。

出芽酵母の  $\Delta gal10$  株において *ugeB* 遺伝子を高発現させ機能相補性試験を行ったところ  $\Delta gal10$  株の Gal 資化性がわずかであるが回復することが明らかになった。また、発現させた *UgeB* を用いて *in vitro* における糖ヌクレオチドの変換活性を測定したところ、わずかな UGE 活性の他に、強い UDP-N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)/UDP-N-アセチルガラクトサミン(GalNAc) 4-エピメラーゼ活性を有することが明らかになった。次に  $\Delta ugeB$  株を作製し、親株とのコロニー形態の比較を行った。炭素源を Glc, Gal, Glc+Gal, GlcNAc および GalNAc、培養温度を 30°C, 37°C および 42°C と変化させて培養を行ったが顕著な差異は認められなかった。UDP-GalNAc は、糸状菌細胞壁構成糖鎖のうちガラクトサミノガラクトサンの合成に必要であることが予想される。よって、ガラクトサミノガラクトサンは、糸状菌の正常な細胞壁形成には必要でないことが示唆された。

#### Functional analysis of *ugeB* gene in *Aspergillus nidulans*

Masato Tanaka<sup>1</sup>, Ekino Keisuke<sup>1</sup>, Taki Hutagami<sup>2</sup>, Kaoru Takekawa<sup>2</sup>, Masatoshi Gotou<sup>2</sup>, Yoshiyuki Nomura<sup>1</sup>, Oka Takuji<sup>1</sup> (<sup>1</sup> Univ of Sojo, <sup>2</sup> Univ of Kyusyu)

## P-11

### *Aspergillus fumigatus* のガラクトフラノース転移酵素遺伝子の探索

畠山信太郎<sup>1</sup>, 浴野圭輔<sup>1</sup>, 二神泰基<sup>2</sup>, 竹川薫<sup>2</sup>, 後藤正利<sup>2</sup>, 野村善幸<sup>1</sup>, 岡拓二<sup>1</sup> (1崇城大, 2九大)

*Aspergillus fumigatus* は日和見感染症を引き起こす病原菌である。*A. fumigatus* のタンパク質に結合する N-型糖鎖及び O-型糖鎖の非還元末端にはガラクトフラノース(Galf)糖鎖が付加されている。これら Galf 糖鎖は、細菌類や線虫等に存在が認められているが、高等生物には存在しないことが知られている。近年 *A. fumigatus* において UDP-Galp から UDP-Galf を合成する *glfA* 遺伝子が同定され、 $\Delta glfA$  株において糖鎖構造の非還元末端に Galf が付加しないことが報告されている。また、 $\Delta glfA$  株では親株に比べ病原性の低下が報告されている。以上のことから UDP-Galf が Galf 糖鎖の糖供与体であり、Galf 糖鎖が病原性に関与していることが示唆されている。しかし、UDP-Galf を糖供与体とした N-型糖鎖及び O-型糖鎖の生合成に関与する Galf 転移酵素遺伝子については明らかにされておらず、研究進捗の妨げとなっている。そこで、*A. fumigatus* の Galf 転移酵素遺伝子の同定を逆遺伝学的手法により試みた。初めに、ゲノム情報より 15 種類の Galf 転移酵素候補遺伝子を選抜し、フュージョン PCR 法を用いて候補遺伝子上流、ピリチアミン耐性マーカーである *ptrA* 遺伝子、候補遺伝子下流の各断片を挟み込むような形で遺伝子破壊用 DNA 断片を作製した。次に、作製した遺伝子破壊用 DNA 断片をプロトプラスト-PEG 法を用いて親株に導入し、13 種類の遺伝子破壊株を構築した。取得した遺伝子破壊株のコロニー表現型を観察したところ、顕著な差異は認められなかった。さらに、各遺伝子破壊株より細胞壁タンパク質を抽出し、HPLC により N-型糖鎖及び O-型糖鎖の構造を解析した。その結果、いくつかの遺伝子破壊株で親株との糖鎖構造の差異が確認された。

#### Exploration of genes that encode a galactofuranosyltransferase in *Aspergillus fumigatus*

Shintaro Hatakeyama<sup>1</sup>, Keisuke Ekino<sup>1</sup>, Taiki Futagami<sup>2</sup>, Kaoru Takekawa<sup>2</sup>, Masatoshi Goto<sup>2</sup>, Yoshiyuki Nomura<sup>1</sup>, Takuji Oka<sup>1</sup> (1 Univ of Sojo, 2 Univ of Kyushu)

## P-12

### 糸状菌 *Aspergillus nidulans* の $\alpha$ -1,3-グルカン合成酵素遺伝子変異株の表現型解析

吉見啓<sup>1</sup>, 稲葉梓<sup>2</sup>, 一杉昌玄<sup>2</sup>, 阿部敬悦<sup>1,2</sup> (1東北大・未来研, 2東北大院農・生物産業創成)

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。本菌の MpkA 経路は、出芽酵母とは大きく異なり、 $\beta$ -1,3-グルカンおよびキチン合成酵素遺伝子群の転写は制御しておらず、出芽酵母には存在しない  $\alpha$ -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。近年、ヒト病原性真菌や植物病原菌において、 $\alpha$ -1,3-グルカン (AG) が感染過程で重要な役割を担うことが明らかになり、糸状菌における AG の重要性が認識されつつある。これらの背景から、我々は *A. nidulans* において種々の AGS 遺伝子変異株 (*agsA* 破壊株, *agsB* 破壊株, *agsAagsB* 二重破壊株, コンディショナル *agsB* 株) を造成し、AGS 遺伝子の機能を解析してきた。これまでに、本菌における AG の合成には主として *agsB* が機能していること、細胞壁中の AG が欠損すると Congo red への感受性が上昇することを明らかにしている。

今回、*A. nidulans* における AG の役割をより深く理解するため、AGS 遺伝子変異株について更なる表現型解析を行ったので、その結果について報告する。まず、AGS 遺伝子変異株について、 $\beta$ -1,3-グルカナーゼおよびキチナーゼ活性を有する Lyzing enzymes に対する感受性を評価したところ、AG 欠損株の細胞壁は Lyzing enzymes によって容易に分解されることが明らかになった。野生株の細胞壁が  $\alpha$ -1,3-グルカナーゼ処理によって同様に分解されたことから、細胞壁 AG は細胞壁分解酵素に対する感受性に関与すると考えられた。さらに、AGS 遺伝子変異株の最小培地や富栄養培地など種々の培養条件における培養性状を比較したので、その結果についても考察した。(本研究は生研センターの支援を受けた。)

#### The phenotypic analysis of the $\alpha$ -1,3-glucan synthase gene mutants in *Aspergillus nidulans*

Akira Yoshimi<sup>1</sup>, Azusa Inaba<sup>2</sup>, Masahiro Hitosugi<sup>2</sup>, Keietsu Abe<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>NICHe, Tohoku Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku, Univ.)



## P-13

### 糸状菌 *Aspergillus nidulans* の $\alpha$ -グルカン合成酵素遺伝子破壊株における Congo red 感受性と菌糸への Congo red 吸着性との関係

稲葉梓<sup>1</sup>, 吉見啓<sup>2</sup>, 阿部敬悦<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup> 東北大院農・生物産業創成, <sup>2</sup> 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 キナーゼカスケード 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  $\alpha$ -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 遺伝子の機能を解析するため、これら 2 遺伝子の破壊株を用いた表現型解析を進めてきた。昨年の本大会において、*agsB* 破壊株および *agsAagsB* 破壊株 (二重破壊株) の取得に成功したことを報告している。細胞壁の生化学的解析の結果、これらの AGS 遺伝子破壊株の細胞壁からは、 $\alpha$ -1,3-グルカン (AG) が消失しており、本菌の AG 合成には主として *agsB* が機能していることが明らかになっている。さらに、これら破壊株は Congo red (CR) に対して高い感受性を示すことも明らかになった。

今回、細胞壁中の AG が欠損した株における CR 感受性上昇の原因を究明するため、菌体に対する CR の吸着性を評価した。まず、液体培養菌体を CR 溶液に入れ、共振盪することで菌体に CR を吸着させた。その後、菌体を除去し、上清の CR 残量から菌体への CR 吸着量を算出した。その結果、AG 欠損株では、菌体への CR 吸着量が増加していた。また、細胞壁構成多糖に対する CR の吸着性を評価したところ、AG と比較して  $\beta$ -グルカンやキチンは CR に対する吸着性が高いことが明らかになった。これらのことから、細胞壁から AG が消失すると CR に親和性の高い  $\beta$ -グルカンやキチンが露出し、菌体への CR 吸着量が増大することによって CR 感受性が上昇することが強く示唆された (本研究は生研センターの支援を受けた)。

#### The relationship between the congo red-sensitivity and the adsorption of congo red to the hyphae in *Aspergillus nidulans* alpha-1,3-glucan synthase gene disruptants.

Azusa Inaba<sup>1</sup>, Akira Yoshimi<sup>2</sup>, Keietsu Abe<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup> Grad. Sch. Agric. Sci., <sup>2</sup> Tohoku Univ., NICHe., Tohoku Univ.)

## P-14

### *Aspergillus nidulans* におけるプロテインキナーゼ C による細胞壁合成酵素遺伝子群の転写制御についての解析

片山琢也, 太田明徳<sup>1</sup>, 堀内裕之 (東大院・農生科・応生工,<sup>1</sup> 東農大・バイオ)

*Saccharomyces cerevisiae* のプロテインキナーゼ C (PKC) である Pkc1p は細胞壁の完全性維持に関わるシグナル伝達経路 (cell wall integrity (CWI) 経路) において中心的な役割を担う。*Aspergillus nidulans* において CWI 経路の構成因子のオルソログが保存されていることなどから、*A. nidulans* にも CWI 経路が存在し、*A. nidulans* の PKC である PkcA も CWI 経路で機能すると考えられている。そこで、PkcA の細胞壁合成酵素遺伝子群の転写制御への関与について検討した。これまでに当研究室で作製された *pkcA* 温度感受性株 (*pkcA-ts* 株) に加え、新たに活性化型 PkcA (PkcA (R429A)) を *alcA* プロモーター制御下で生産できる株 (R429A 株) を作製し、PkcA 失活条件下、PkcA 活性化条件下における細胞壁合成酵素遺伝子群の転写解析を行った。*pkcA-ts* 株を用いた解析では、非制限温度 (30°C) で培養した菌体を制限温度 (42°C) に移してさらに培養した場合、野生型株では  $\alpha$ -1,3-グルカン合成酵素遺伝子 *agsB*, キチン合成酵素遺伝子 *chsD*, *csmA*, *csmB* の転写が誘導されたのに対し、*pkcA* 温度感受性株ではこれらの遺伝子の転写誘導がほとんど起こらなかった。また、R429A 株を用いた解析では、37°C, PkcA (R429A) 発現誘導条件で 16 時間培養した場合、*agsB*,  $\beta$ -1,3-グルカン合成酵素遺伝子 *fksA*, キチン合成酵素遺伝子 *chsB*, *chsC*, *chsD*, *csmA*, *csmB* の転写が誘導された。さらに、37°C, PkcA (R429A) 発現抑制条件で培養した R429A 株を PkcA (R429A) 発現誘導条件に移して 1 時間培養した場合、*agsB*, *chsB*, *chsC*, *chsD*, *csmA*, *csmB* の転写が誘導された。これらのことから、PkcA がグルカン合成、キチン合成に関与する細胞壁合成酵素遺伝子の転写制御に関与することが示唆された。

#### Transcriptional regulation of cell wall related genes by PkcA in *Aspergillus nidulans*

Takuya Katayama, Akinori Ohta<sup>1</sup>, and Hiroyuki Horiuchi (Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo, <sup>1</sup>Dept. of Biosci., Tokyo Univ. of Agric.)

## P-15

### アカパンカビ OS-2 MAP キナーゼによる細胞壁局在タンパク質の制御

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

アカパンカビの浸透圧シグナル伝達 (OS) 経路は、浸透圧応答と殺菌剤フルジオキシニル感受性に重要な役割を果たしている。これまでに我々は、OS-2 MAP キナーゼが発現制御する遺伝子群を特定してきており、グリセロール合成系遺伝子 (*gcy-3*) や糖新生鍵酵素遺伝子 (*fbp-1*) だけでなく、カタラーゼ遺伝子 (*cat-1*) や clock-controlled 遺伝子 (*ccg-1*, *ccg-13*) など、様々な機能をもつ遺伝子が制御されていることを明らかにしてきた。また、アレイ解析により約 650 遺伝子が制御される可能性を示してきたが、アレイ解析結果の精度や制御される遺伝子群の検証は必ずしも十分に行われていない。そこで、本研究では、アレイデータの検証とともに、制御遺伝子から OS 経路の未知の機能の探索を行った。その結果、アレイ解析で OS-2 により制御される約 50 遺伝子についてリアルタイム定量 PCR 法を用いて検証したところ、一部の例外を除き、野生株で顕著なフルジオキシニル誘導が認められ、その誘導が *os-2* 変異株で消失・低下した。このことから、アレイ選抜の遺伝子群は精度の高いリストであると考えられた。さらに、顕著に誘導される遺伝子群の中には、non-anchored cell wall protein である *ncw-3* や *ncw-6*, GPI-anchored protein である *gel-1*, 細胞壁に局在すると推定される *phiA* や O-結合型糖タンパク質遺伝子などが含まれていた。また、*os-2* 変異株は、高浸透圧下で細胞壁のない肥大化細胞となることが知られており、OS 経路は細胞壁の維持やその調節に重要な役割をもつと考えられる。これらのフルジオキシニル誘導遺伝子について、糸状菌間の共通性について検証するため、赤かび病菌 (*Fusarium graminearum*) との比較解析を行っている。

#### OS-2 MAP kinase regulates various cell wall proteins in *N. crassa*

Sou Kagaya, Kazuhiro Yamashita, Masakazu Takahashi, Masayuki Kamei, Akihiko Ichiishi, Makoto Fujimura

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

## P-16

### 麹菌における MAP キナーゼ AoFus3 とその相互作用タンパク質の機能解析

矢萩 大貴, 丸山 潤一, Özgür Bayram<sup>1</sup>, Oliver Valerius<sup>1</sup>, Gerhard H. Braus<sup>1</sup>, 北本 勝ひこ (東大院・農生科・応生工, <sup>1</sup>ゲッティンゲン大学)

【目的】酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の MAP キナーゼのひとつ Fus3p 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。以前、我々の研究で麹菌 *Aspergillus 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隣接する細胞に溶菌が伝播する割合が上昇することを見出したことから、AoFus3 が隔壁孔を介した細胞間連絡に関係することが示唆された。その機構の解析を目的として、我々は TAP (Tandem Affinity Purification) タグを用いた精製により、AoFus3 と相互作用するタンパク質の候補を 2 つ (AO090003000834, AO090012000718) 同定した<sup>1)</sup>。これらのタンパク質は菌糸先端と隔壁孔に局在し、その遺伝子破壊株では隣接する細胞に溶菌が伝播する割合が上昇した<sup>1)</sup>。今回、AoFus3 とその相互作用タンパク質との機能的関係を解析した。

【方法・結果】AoFus3 とこれと相互作用する 2 つのタンパク質に関して 2 重遺伝子破壊株を取得し、溶菌が伝播する割合をそれぞれの単独破壊株と比較した。その結果、2 重破壊株は *Aofus3* 遺伝子破壊株とほぼ同等の割合を示した。一方で、AoFus3 と相互作用するタンパク質の単独遺伝子破壊株において溶菌が伝播する割合は野生型株よりは上昇するものの、前述の破壊株と比較してその上昇する割合は低いことがわかった。また、AoFus3 非存在下での細胞内局在の観察から、AoFus3 が相互作用する 2 つのタンパク質の局在に影響を与えている可能性が示唆され、反対に AoFus3 の局在は両タンパク質の有無による影響を受けなかった。以上の結果より、AoFus3 がその相互作用するタンパク質の上流で働く可能性が示唆された。現在、AoFus3 が相互作用するタンパク質自体に及ぼすリン酸化などの作用を解析するとともに、これらのタンパク質が溶菌後にも隔壁孔に局在することから、溶菌後の再生長 (regrowth) における役割を解析している。

1) 矢萩ら、平成 24 年度日本農芸化学会 大会講演要旨集 p. 2292

#### Functional analysis of AoFus3 MAP kinase-interacting proteins in *Aspergillus oryzae*

Daiki YAHAGI, Jun-ichi MARUYAMA, Özgür BAYRAM<sup>1</sup>, Oliver VALERIUS<sup>1</sup>, Gerhard H. BRAUS<sup>1</sup>, Katsuhiko KITAMOTO (Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, <sup>1</sup>Georg-August-Universit

## P-17

### 麴菌 *A. oryzae* における溶菌に対する細胞修復と再生長の機構の解析

川畑純平, 佐伯圭, 丸山潤一, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)

【目的】 *A. oryzae* が属するチャワソウ門 (真正子囊菌綱) の糸状菌において, 菌糸は隔壁によって多くの細胞に区切られている。隣接する細胞は隔壁孔を介して細胞間連絡を行うが, この性質はある細胞が溶菌した際に隣接する細胞に溶菌が伝播する危険を伴う。我々は以前, *A. oryzae* において寒天培地上のコロニーに水を添加して溶菌を誘導する低浸透圧ショック実験を確立し, Woronin body と呼ばれるオルガネラが溶菌の伝播を防ぐことを明らかにした<sup>1)</sup>。しかし, この方法では細胞のダメージが大きいため再生長の効率が悪く, さらに溶菌前後の変化を経時的に追跡することが困難である。また, これまでに糸状菌全般に溶菌時の細胞修復と再生長の分子機構はあまりわかっていない。本研究では, 細胞に過大な負担をかけずに溶菌し, 再生長まで観察できる新たな実験系を確立し, その分子機構の解明を試みた。

【方法・結果】 まず, 寒天培地上に生育させた菌糸をパルスレーザーにより切断し, 溶菌した細胞に隣接する細胞を観察した。その結果, 隣接する細胞の約 8 割が新たな菌糸先端を形成し, 再生長することがわかった。ストレスに応答して隔壁孔に蓄積する AoSO タンパク質<sup>2)</sup>をコードする遺伝子の破壊株では, 再生長を行う菌糸の割合が野生株に比べて低下した。また, AoSO の局在変化を調べたところ, 菌糸切断後から数秒で隔壁孔に AoSO が凝集する様子が観察された。以上の結果から, AoSO は溶菌後の初期段階で細胞修復に働くことで再生長に関わっているという可能性が考えられた。現在, 細胞修復と再生長に関与すると考えられる他の因子についてさらなる解析を進めている。

1) Maruyama *et al.* (2005) *Biochem Biophys Res Commun* Vol. 331: 1081-8.

2) Maruyama *et al.* (2010) *Biochem Biophys Res Commun* Vol. 391: 868-73.

### Investigation of molecular mechanisms mediating cell repair and regrowth upon hyphal wounding in *A. oryzae*

Junpei KAWABATA, Kei SAEKI, Jun-ichi MARUYAMA, Katsuhiko KITAMOTO

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

## P-18

### 麴菌におけるエンドサイトーシス関連 Aip タンパク質の機能解析

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

エンドサイトーシス部位に局在する AoAbp1 を bait とした yeast two-hybrid スクリーニングにより見出されたタンパク質 AipA~D (AoAbp1 interacting protein) のうち, AipC と AipD の EGFP 融合タンパク質は菌糸先端において AoAbp1 と共局在しており, エンドサイトーシスにおいて何らかの機能を有していることが示唆された。しかし, これまでの解析では *aipC*, *aipD* の破壊株ともに通常条件下での生育や FM4-64 の取り込みに異常は見られなかった<sup>1)</sup>。そこで, これらのタンパク質のエンドサイトーシスにおける機能を解明することを目的としてさらなる解析を行うとともに, AipB についても機能解析を行った。

今回新たに, 細胞膜上の MCC (membrane compartment of Can1p) の構成因子であるアルギニンパーミアーゼ AoCan1 に着目し, エンドサイトーシスの解析を行った。その結果, *aipC* 破壊株, *aipD* 破壊株のそれぞれでエンドサイトーシスに遅延が生じることが明らかとなった。出芽酵母とは異なり, AoCan1-EGFP は主に菌糸基部の細胞膜上に偏って局在していたことから, 高度に極性化した細胞において菌糸の先端と基部で異なるエンドサイトーシスの機構が存在することが示唆された。*aipB* は class I myosin 重鎖をコードしており, 他の糸状菌においても高度に保存されている。*aipB* 破壊株は得られなかったため, *thiA* プロモーター制御で *aipB* の発現を抑制したところ, コロニー周縁部の形態異常および分生子の発芽率の低下が観察された。また, EGFP-AipB は菌糸先端や細胞膜上において AoAbp1 と共局在しており, AipB が myosin I としてエンドサイトーシスに機能するという *A. nidulans* での知見が支持された。

1) 松尾ら, 第 11 回糸状菌分子生物学コンファレンス要旨集

### Functional analysis of Aip proteins related to endocytosis in *Aspergillus oryzae*

Kento MATSUO, Yujiro HIGUCHI, Takashi KIKUMA, Manabu ARIOKA, Katsuhiko KITAMOTO

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

## P-19

### 麹菌グルコース抑制関連遺伝子 *creD* の MalP のエンドサイトーシスへの関与

平本 哲也, 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ゼ(MalP)遺伝子はグルコースにより転写レベルで抑制を受けることをすでに明らかにしている。一方、出芽酵母で報告されているように、タンパク質レベルでエンドサイトーシス依存的に分解を受ける機構が存在するかを調べるため、GFP-MalP 融合タンパク質を MalP プロモーター制御下で発現させたところ、マルトース誘導条件下では主として GFP-MalP は細胞膜に局在が観察された。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。そこで、本研究ではグルコース存在下における MalP のエンドサイトーシス依存的な液胞への移行の確認と、グルコース抑制に関わる遺伝子変異株における MalP のエンドサイトーシスへの影響について解析を行った。

エンドサイトーシスはアクチンの重合阻害により抑制を受けるため、アクチン重合阻害剤である Latrunculin B を用いて GFP-MalP の液胞への移行に対する影響を解析した。その結果、Latrunculin B 処理を行ったものではグルコース添加後も細胞膜上の GFP 蛍光が消失しないことが明らかとなり、GFP-MalP の細胞膜上から液胞への移行はエンドサイトーシス依存的な機構によるものであることが示された。次にグルコース抑制転写因子(CreA)のエピキチン化に関与する CreD の遺伝子破壊株を作製し、GFP-MalP のエンドサイトーシスに及ぼす影響を解析した。*creD* 破壊株においてはマルトース誘導後、グルコースを添加しても GFP-MalP の液胞への移行が認められなかったことから、CreD は MalP のエンドサイトーシス依存的な取込みに関与する制御因子である可能性が示唆された。

### Involvement of a carbon catabolite repression-related gene, *creD*, in endocytosis of MalP in *Aspergillus oryzae*.

Tetsuya Hiramoto, Mizuki Tanaka, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi

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

## P-20

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

二神泰基<sup>1</sup>, 梶原康博<sup>2</sup>, 高下秀春<sup>2</sup>, 大森俊郎<sup>2</sup>, Michelle Momany<sup>3</sup>, 後藤正利<sup>1</sup> (<sup>1</sup>九大院・農, <sup>2</sup>三和酒類, <sup>3</sup>ジョージア大)

パキシリンはシグナル伝達経路の構成因子の足場や細胞間接着因子として機能するタンパク質の一種で、真核生物において広く保存されている。例えば、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* には1つのパキシリン様タンパク質 (Pxl1) が存在し、極性成長部位の決定と維持に関与することが明らかにされている。一方、糸状菌 *Aspergillus nidulans* のゲノムには2つのパキシリン様タンパク質が見出されており、そのうち PxlA は、出芽酵母の Pxl1 とは異なるクレードに分類される。そこで、PxlA は糸状菌特有の形態形成やシグナル伝達に重要な役割をもつと推定し、その機能を解明することを目的とした。

まず、*pxlA* 遺伝子破壊株 ( $\Delta pxlA$ ) の表現型を観察した。YG 培地における  $\Delta pxlA$  のコロニー成長速度は、野生株の 86% に低下した。また、メトレおよびフィアライドに異常が観察され、分生子形成能が顕著に低下 (7%) した。次に、GFP 融合タンパク質の発現による局在解析の結果、細胞質に局在することが示唆された。また、 $\Delta pxlA$  はタンパク質合成阻害剤であるハイグロマイシン B に対して野生株と同等の感受性を示したが、細胞壁合成系を阻害する Calcofluor white, Congo red, およびミカファンギンに対して高感受性を示した。さらに、 $\Delta pxlA$  の細胞壁構成多糖成分のうち、GlcNAc 含量が野生株の 60% に低下した。以上の結果より、*A. nidulans* において、PxlA は分生子の形成および細胞壁合成に関与すると考察した。

### Functional analysis of paxillin like protein PxlA in *Aspergillus nidulans*

Taiki Futagami<sup>1</sup>, Yasuhiro Kajiwara<sup>2</sup>, Hideharu Takashita<sup>2</sup>, Toshiro Omori<sup>2</sup>, Michelle Momany<sup>3</sup>, Masatoshi Goto<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Kyushu Univ., <sup>2</sup>Sanwa Shurui Co. Ltd., <sup>3</sup>Univ. of Georgia)

## P-21

### 糸状菌 *Aspergillus nidulans* における出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* LAS17 オルソログ AN11104 の機能解析

星浩臣, 前田隼見, 太田明德<sup>1</sup>, 堀内裕之 (東大院・農生科・応生工,<sup>1</sup>東農大・バイオ)

*Aspergillus nidulans* において、クラスVキチン合成酵素 CsmA は、N末端側にミオシンと相同性を有するドメイン (myosin motor-like domain; MMD) を持つ特徴的なタンパク質であり、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。一方、その細胞内における局在化及び機能の制御機構については未解明な点が多く、CsmA と相互作用してその機能に関与する因子の同定と解析が望まれる。今回、酵母ツーハイブリッドスクリーニングにより、CsmA と相互作用するタンパク質の候補として AN11104 を同定し、その機能解析を行った。AN11104 は *Saccharomyces cerevisiae* においてクラスリン介在型のエンドサイトーシスに必須の機能を有するタンパク質をコードする LAS17 のオルソログである。まず RACE 解析により、翻訳開始点及び終止点、イントロンの位置がゲノムデータベースで予想されたものと一致することを確認した。次に AN11104 破壊株を作製したところ、野生型株と比較して生育の著しい遅延、菌糸先端の形態異常及び後方での異常な多分岐等が観察された。生育の著しい遅延から、AN11104 破壊株を用いた AN11104 の詳細な機能解析は困難であると考えられたため、チアミン存在下で遺伝子発現抑制の可能な *thiF* プロモーターにより AN11104 の発現制御可能な株を作製したところ、発現抑制条件下では破壊株と類似の表現型を示した。また AN11104 の予想された C 末端に EGFP を繋いだ AN11104-EGFP は菌糸先端や後方の形質膜上に局在が観察された。現在、CsmA と AN11104 との細胞内局在比較、及び *in vivo* における両者の物理的相互作用について検討中である。

#### Functional analysis of a *Saccharomyces cerevisiae* LAS17 ortholog in *Aspergillus nidulans*

Hiroomi Hoshi, Hayami Maeda, Akinori Ohta<sup>1</sup>, and Hiroyuki Horiuchi (Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo, <sup>1</sup>Dept. Biosci., Tokyo Univ. of Agric.)

## P-22

### 麹菌 *A. oryzae* における選択的オートファジー関連遺伝子の機能解析

田所隆之, 菊間隆志, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)

【目的】オートファジーは真核生物における細胞内分解機構であり、細胞質成分やオルガネラを液胞に輸送し分解する。オートファジーは非選択的および選択的オートファジーに分類され、選択的オートファジーは特定タンパク質やオルガネラを特異的に認識し、液胞へ輸送することが酵母などで知られている。しかし、*A. oryzae* など糸状菌でその存在は確認されていない。酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の Atg11 は選択的に認識した基質の pre-autophagosomal structure (PAS) への輸送に機能することが報告されている。前回そのホモログである AoAtg11 の遺伝子破壊株を作製したところ、非選択的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形成の阻害は見られなかった。また、選択的オートファジーの標的基質であると考えられるタンパク質やオルガネラを標識し、局在観察を行ったところ、AoAtg11 はペルオキシソームの液胞への取込みに関与していることが示唆された。本研究では、*A. oryzae* における AoAtg11 の選択的オートファジーへの関与をより明らかにすることを目的とし、AoAtg11 の局在解析やマーカータンパク質の更なる観察を行った。

【方法・結果】AoAtg11-EGFP とオートファジーのマーカーである mDsRed-AoAtg8 を共発現し局在観察を行ったところ、ドット状に共局在を示し、AoAtg11-EGFP は PAS に局在することが明らかとなった。また、*Aoatg11* 破壊株でペルオキシソームの液胞への輸送を定量的に解析することにより、野生株と統計的に有意な差があることが確認された。さらに、*S. cerevisiae* においてオートファジーにより優先的に液胞へ輸送されることが知られている Ald6 のホモログ AoAld6 の局在解析を行ったところ、*Aoatg11* 破壊株においても液胞への輸送に影響が見られなかった。この結果より、AoAtg11 は AoAld6 の選択的認識に関与していないと考えられる。現在、Yeast two-hybrid 法を用いて AoAtg11 結合タンパク質の解析を進めている。

#### Functional analysis of genes related to selective autophagy in *Aspergillus oryzae*

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

## P-23 (O-5)

### Characterization of Stress Granules in *Aspergillus oryzae*

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

An important part of the cellular responses to stress or environmental stimuli is the modulation of mRNA translation and degradation. Recently, evidences from yeasts to mammalian cells have indicated that one aspect of this process involving the remodeling of translating mRNAs into non-translating mRNPs (mRNA-protein particles) that accumulate in cytoplasmic foci referred to as stress granules. We previously showed that AoSO protein, a homolog of the *Neurospora crassa* SO, accumulates at septal pore in response to stresses<sup>1)</sup>. The stress-inducible behavior makes a possible link between stress granules and AoSO. In the present study, the localization analysis showed that AoSO-EGFP colocalized with the stress granules visualized by AoPab1-mDsRed in response to heat shock. Deletion of *Aoso* altered the localization of the stress granules at the hyphal tip. Furthermore, because the ability to form stress granules seems to correlate with the survival of cells exposed to stress, growth of the disruptant of *Aopub1* gene, encoding one of the major components of stress granules, was being tested under various stress conditions. Finally, the stress granules were often observed in the vicinity of vacuoles at the hyphal tip, and AoPab1-mDsRed colocalized with EGFP-AoAtg8 in response to heat shock, suggesting that autophagy may participate in the cellular stress response.

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

## P-24

### 黄麹菌の分生子特異的遺伝子の機能解析

辻井雅, 森田寛人, 前田浩, 山形洋平, 竹内道雄 (東農工大院・応生化)

【背景と目的】黄麹菌の分生子及び発芽分生子の EST 解析の結果、331-25 遺伝子から転写される mRNA は分生子にのみ見出され、528 の EST のうち 43 回という高頻度で読まれた。本研究は 331-25 遺伝子から転写され、分生子特異的に存在する mRNA の機能を明らかにすることを目的として解析を行った。

【方法及び結果】3'-RACE 法、5'-RACE 法、シーケンス解析により、転写開始点と転写終結点、スプライシング部位を明らかにした。RT-PCR により、分生子、発芽分生子、菌糸及び分生子着生直前における 331-25 遺伝子から転写される RNA の存在量について比較したところ、ゲノム解析により予測された 331-25 遺伝子からの RNA は分生子に特異的に存在しており、分生子を 2 時間液体培養した発芽分生子には僅かにしか存在しておらず、6 時間液体培養した菌糸には存在していないことを明らかにした。さらに、長期固体培養によって得た褐色の分生子、短期固体培養によって得た黄緑色の分生子においても 331-25 遺伝子からの RNA の存在量について比較したところ、331-25 遺伝子からの RNA は成熟分生子において存在していないことを明らかにした。また、adapter-primer を用いた RT-PCR により、331-25 遺伝子からの RNA はゲノム解析により予測された方向に対して正方向と逆方向から転写されており、正鎖 RNA、逆鎖 RNA の二種類の RNA が分生子に存在していることを明らかにした。さらに、破壊株の作製を行ったところ、固体培養と液体培養における表現形の観察では、ホスト株と破壊株において発芽率、表現形に差は認められなかった。

### Identification of conidia specific mRNA in *Aspergillus oryzae*

Masaru Tsujii, Hiroto Morita, Hiroshi maeda, Yohei Yamagata, Michio Takeuchi

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

## P-25

### 菌類の adenosine deaminase-related growth factor 類似遺伝子の機能解析

西川良平<sup>1</sup>, 藤田将幸<sup>1</sup>, 吉田真澄<sup>1</sup>, 関屋秀一<sup>1</sup>, 稲富 聡<sup>2</sup>, 田口悟朗<sup>1</sup>, 下坂 誠<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>信州大・繊維・応生系, <sup>2</sup>ホクトきのこ総合研)

昆虫などで報告されている adenosine deaminase-related growth factor (ADGF) は, adenosine deaminase (ADA) 活性中心配列を保持し, ADA 活性を介して細胞増殖や分化を制御する新規の増殖因子である。ADGF 類似遺伝子は菌類に広く存在しているが, その機能は不明である。これまでにエノキタケ細胞より子実体特異的に発現する ADGF 類似遺伝子 (*Fv-ada*) を単離し, *Pichia* 酵母で発現させた組換えタンパク質が ADA 活性を有することを確認した。本研究では, エノキタケ *Fv-ada* 遺伝子の機能解析を目指すとともに, 他の菌類の ADGF 類似遺伝子について調査した。

当研究室で開発した RNA 干渉 (RNAi) および高発現用バイナリーベクターを用いて, エノキタケ *Fv-ada* 遺伝子の発現抑制株と高発現株を作出した。発現抑制株では, 抑制の程度に応じて複核菌糸体の生育速度が遅延したことから, 本遺伝子産物が菌糸体の生育に関与することが明らかとなった。

*Aspergillus nidulans* および *Neurospora crassa* のゲノム中には, それぞれ 2 個の ADGF 様遺伝子が存在した。各遺伝子の cDNA を RT-PCR により獲得し塩基配列を確認したところ, 両株ともに 1 個の遺伝子のみが ADA 活性中心配列を完全に保存していた。現在, これらの遺伝子の機能について解析中である。

### Characterization of fungal genes coding for a putative adenosine deaminase-related growth factor

Ryohei Nishikawa<sup>1</sup>, Masayuki Fujita<sup>1</sup>, Masumi Yoshida<sup>1</sup>, Syuichi Sekiya<sup>1</sup>, Satoshi Inatomi<sup>2</sup>, Goro Taguchi<sup>1</sup>, Makoto Shimosaka<sup>1</sup>

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

## P-26

### ウスヒラタケの子実体分化異常に関わる遺伝子の探索

嶋田有宇, 伊藤幹成, 奥田康仁, 松本晃幸 (鳥取大・農)

きのこ類の子実体形成に関わる分子レベルでのメカニズムは関与する遺伝子を含め十分には解明されていない。このため, 子実体形成過程の突然変異体は子実体形成のメカニズムに関する有益な知見を提供する材料となる。本研究室ではウスヒラタケ (*Pleurotus pulmonarius*) TMIC-30058 株由来の単孢子分離株を用いた自殖株の中に, 正常な子実体分化が認められない突然変異体を偶然見出した。調査の結果, 本変異は単一の劣性遺伝子によるものであることが推定され, さらに AFLP (Amplified fragment length polymorphism) マーカーとの連鎖解析によりその遺伝子から 0 cM の近傍に座上する AFLP マーカー (CTTT91) を取得した<sup>1)</sup>。

本研究では, この近傍マーカーCTTT91の配列情報に基づき, ウスヒラタケのゲノムライブラリーおよびドラフトシーケンスデータを利用してCTTT91座上位置の前後140 kbにわたる周辺配列を推定した。この領域について遺伝子予測プログラムAugustusにより座上遺伝子を推定し, 野生型と変異型子実体より調製したRNAを用いてそれらの遺伝子について発現解析を行った。その結果, 9遺伝子で野生型と変異型間に発現差が認められた。これらの遺伝子はいずれも塩基配列レベルで顕著な多型が認められ, このうち6遺伝子についてはアミノ酸レベルにおいても異なった。以上の結果より, これら6遺伝子のうちどれかが本変異に関わっている可能性が大きいと考えられる。今後, これらを標的とした遺伝子破壊を行い, 表現型への影響を調査することで本変異の原因遺伝子を特定する予定である。

<sup>1)</sup> 伊藤ら, 2010年度日本菌学会第54回大会講演要旨集, p63

### Search for gene causes a defect in fruiting body differentiation in *Pleurotus pulmonarius*.

Yu Shimada, Mikinari Ito, Yasuhito Okuda, Teruyuki Matsumoto (Tottori, Univ. of Agri)

## P-27

### Discovering fundamental mushroom developmental genes.

Arend F. van Peer (IBRC), Yuichi Sakamoto (IBRC).

Mushrooms are important sources of food, medicinal compounds, for industrial applications, waste recycling and environmental health. However, cultivation of most mushrooms is difficult or yet impossible. A major obstacle for improvement of mushroom cultivation technology is the lack of knowledge on molecular genetic mechanisms that underlie mushroom development. Available information is highly scattered, describing specific, unrelated studies in model mushrooms and more recently including individual studies on major cultivated mushrooms.

Despite the high variations in shape, color, composition, substrate and triggers for fruiting induction, mushroom life cycles follow a general course. Within the developmental stages of the mushroom, especially the formation of hyphal knots and primordia seem highly similar between species. We decided to ‘access’ the general developmental pathway through interspecies comparison of primordium specific gene expression patterns, including model as well as major cultivated species. Promising universal, primordium specific genes will be studied in detail in the model organisms *Coprinopsis cinerea* and *Schizophyllum commune* by means of gene deletion, fusion to fluorescent markers and quantitative PCR. Once confirmed to play a role in mushroom development, these genes will serve as foundation for compilation of a general mushroom development model in two directions; stages preceding and stages following primordium formation.

At the moment of writing, superSAGE datasets are being assembled and many mushroom species are still under cultivation. We just started comparison of our first four datasets (dikaryotic mycelium versus primordia) in *C. cinerea* and *Polyporus brumalis*. Considering the effectiveness of other expression-based studies for identification of stage specific developmental genes in mushrooms, we expect to reveal several universal genes to start our model in the near future.

**Keywords:** superSAGE, transcriptome, mushroom, basidiomycete, bioinformatics, developmental genetics.

## P-28

### 担子菌ウシグソヒトヨタケにおけるセプチンの発現およびインタラクトーム解析

塩谷 達弘, 中村 宏江, 石井 律好, 高橋 直樹, 村口 元 (秋田県大院・生物資源)

担子菌ウシグソヒトヨタケの柄伸長欠損突然変異体の原因遺伝子の1つである *eln8* は出芽酵母セプチン Cdc3 様タンパク質(Cc.Cdc3)をコードしていることが判明した。セプチンとは酵母からヒトまで保存された GTP 結合タンパク質ファミリーであり、最初に出芽酵母の細胞質分裂異常突然変異体の原因遺伝子として同定され、動物細胞においては神経組織での発現や、細胞膜での小胞融合との関連が知られている。そこで Cc.Cdc3 が柄細胞の伸長にどのように関わっているのかを明らかにするために、Cc.Cdc3-EGFP をウシグソヒトヨタケで発現させたところ、柄細胞では細胞長軸に沿って繊維状に存在し、栄養菌糸先端では小球状に存在していた。本菌には、セプチンが 5 種類 (Cc.Cdc3, Cc.Cdc10, Cc.Cdc11a, Cc.Cdc11b, Cc.Cdc12) 存在し、栄養菌糸、原基、傘、柄、*eln8* 柄における各セプチン遺伝子の発現を定量 PCR により解析したところ、柄で各セプチンの発現が増加していたが、*eln8* 柄において、Cc.Cdc10 の発現が野生型の柄に比べて著しく低下していることが分かった。また、セプチンの多様な局在様式は、他のタンパク質がセプチンと相互作用して制御されていると考えられるため、Yeast two hybrid 法を用いて Cc.Cdc3 と相互作用するタンパク質を柄細胞 cDNA から探索したところ、Cc.Cdc10 および Cc.Cdc12 がほぼ同数で検出できた。さらに、セプチン以外のタンパク質として、ATP-dependent DNA helicase、SUMO 化 E2 酵素である Ubc9、細胞壁を緩める expansin、GMF (Glia maturation factor) を発現している酵母をそれぞれ 1 クローン検出できた。さらに本菌の 5 種類のセプチン同士の相互作用を、同手法によって調べたところ、Cc.Cdc3 と Cc.Cdc3、Cc.Cdc3 と Cc.Cdc10、Cc.Cdc3 と Cc.Cdc12、Cc.Cdc12 と Cc.Cdc12 の間で相互作用が見られた。

### Septin gene expression and interactome analyses in *Coprinopsis cinerea*.

Tatsuhiko Shioya, Hiroe Nakamura, Noriyoshi Ishii, Naoki Takahashi, Hajime Muraguchi

(Grad. Sch. of Bioresource Sci., Akita Prefectural Univ.)



## P-29 (O-7)

### 麹菌が産生する hydrophobin RolA と固体表面間の相互作用機構解析

田邊弘毅<sup>1</sup>, 田中拓未<sup>1</sup>, 大類景子<sup>1</sup>, 上原健二<sup>1</sup>, 高橋徹<sup>2,3</sup>, 富樫貴成<sup>4</sup>, 有田稔彦<sup>4</sup>, 阿部敬悦<sup>1,3</sup> (<sup>1</sup>東北大院・生物産業創成, <sup>2</sup>酒総研・基盤, <sup>3</sup>東北大・未来研, <sup>4</sup>東北大・多元研)

麹菌の産生する界面活性蛋白質 hydrophobin RolA は生分解性ポリエステルの PBSA に吸着し, PBSA 分解酵素 CutL1 による PBSA 分解を促進する。一方, 様々な固体表面と hydrophobin 間の相互作用機構やその kinetics は不明である。これまでに, 1. RolA の Leu137, Leu142 が PBSA への結合に重要, 2. pH4-10 での PBSA への RolA の親和性は pH4 で最大, 3. pH4-10 における PBSA 微粒子のゼータ電位は中性で負, 酸性で 0 になる結果を得た。以上の結果と, RolA の pI=5~6 という結果から, RolA の PBSA への吸着には, 両者の“疎水的相互作用”が正に, “負電荷の静電反発”が負に働く可能性が推察された。本報告は, 様々な固体表面への RolA の吸着様式の解析を目的とした。

異なる化学的性質を付与した表面への RolA の吸着を, pH7 の条件で QCM により評価した。疎水度が異なる表面に対する RolA の親和性は, 表面の疎水度と正の相関を示した。正・負電荷表面に対する親和性は変わらず, 負電荷表面で最大結合量が半減した。従って, 固体表面の負電荷が最大結合量に対し負に働く可能性が示唆された。RolA は両親媒性であるため, 固体表面の電荷により吸着様式が異なる可能性を推察した。また RolA は pH4 で固体表面に高い親和性を示し, RolA 濃度上昇に伴う急激な吸着量の増加と rodlet 状重合構造形成が確認された。現在, 電荷・極性を持つ表面に対し, pH の異なる条件下での親和性解析を行っている。

#### Analysis of the interaction between *Aspergillus oryzae* hydrophobin RolA and solid surfaces

Hiroki Tanabe<sup>1</sup>, Takumi Tanaka<sup>1</sup>, Keiko Orui<sup>1</sup>, Kenji Uehara<sup>1</sup>, Toru Takahashi<sup>2,3</sup>, Takanari Togashi<sup>4</sup>, Toshihiko Arita<sup>4</sup>, Keietsu Abe<sup>1,3</sup> (<sup>1</sup>Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., <sup>2</sup>NRIB., <sup>3</sup>NICHe., Tohoku Univ., <sup>4</sup>IMRAM., Tohoku Univ.)

## P-30

### 麹菌 hydrophobin RolA 多重変異体と cutinase CutL1 間の相互作用解析

對馬裕誠, 村垣 公英<sup>1</sup>, 上原 健二<sup>1</sup>, 高橋 徹<sup>2,3</sup>, 山形 洋平<sup>2,4</sup>, 阿部 敬悦<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>東北大院農・生物産業創成, <sup>2</sup>東北大・未来研, <sup>3</sup>酒類研・基盤, <sup>4</sup>東京農工大院農・応生化)

hydrophobin は糸状菌に広く分布する両親媒性の分泌蛋白質で, 糸状菌の菌糸表面に局在する。*A. oryzae* を生分解性ポリエステルである polybutylene succinate-co-adipate(PBSA) を唯一の炭素源として培養すると, hydrophobin RolA と PBSA 分解酵素である cutinase CutL1 を共発現する。PBSA に吸着した RolA は CutL1 と相互作用することで PBSA に CutL1 を濃縮し, PBSA 分解を促進する。RolA の固液界面への酵素濃縮機能は hydrophobin の新たな性質である[1]。

これ迄の研究で, RolA と CutL1 の相互作用には, RolA 側では His32, Lys34 が, CutL1 側では Glu31, Asp142, Asp171 が重要であり, イオン結合の関与を見出した[2]。しかし, RolA-H32SK34S 二重変異体は野生型 RolA と比較して CutL1 に対する親和性が大幅に低下したが, 親和性は残っていた。そこで本研究では RolA 二重変異体に残存する CutL1 に対する相互作用部位の解明を目的とした。相互作用部位と推定される RolA-N 末端近傍の正電荷アミノ酸をさらに置換した RolA 三重変異体を作製した。また RolA 二重変異体を第一級アミン修飾試薬で処理し, 正電荷アミノ酸修飾 RolA 二重変異体を調製した。本報告では, QCM による RolA 三重変異体および化学修飾 RolA 二重変異体と CutL1 との分子間相互作用解析について議論する。

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

[2]村垣ら, 日本農芸化学会 2011 年度大会要旨集 p164

#### Analysis of the interaction between *Aspergillus oryzae* hydrophobin RolA and cutinase CutL1

Yusei Tsushima, Kimihide Muragaki, Kenji Uehara, toru Takahashi, Youhei Yamagata, Keietsu Abe

(<sup>1</sup>Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., <sup>2</sup>NICHe., Tohoku Univ., <sup>3</sup>NRIB., <sup>4</sup>Tokyo Univ. of Agric. and Technol.,)

## P-31

### 麹菌 *Aspergillus oryzae* の機能性ペプチド融合ハイドロフォービン (HypA) の生産と吸着

堂前圭佑, 加瀬明日香, 中島春紫 (明治大・農・農化)

Hydrophobin (ハイドロフォービン) は糸状菌・担子菌の空気中に露出した細胞表層に普遍的に存在する両親媒性の低分子量タンパク質である。単量体として細胞外に分泌された後、細胞表層で疎水性領域を外側に向けて自己集合して強固な単層を形成することにより、気中菌糸や孢子・分生子に撥水性を与える。一方、Hydrophobin は各種の基材の表面に吸着する性質を有し、Hydrophobin のコーティングにより、基材の疎水性度が大きく変化することが報告されている。

清酒・醤油・味噌の製造に用いられる麹菌 (*Aspergillus oryzae*) から Hydrophobin をコードすると考えられる遺伝子 (*hypA* ~*D*) を単離している。このうち固体培養時には *hypA* 遺伝子が最も多く発現し、コードされる HypA タンパク質は主として分生子に局在することを観察している。

HypA タンパク質の物質表面への吸着性について解析する目的で、麹菌を宿主として単量体の HypA および重金属吸着ペプチドを結合した機能性ペプチド融合 HypA を生産し、親水性および疎水性の各種基材への吸着性と機能性の付与について検討を行なった。*enoA* プロモーター制御下で液体培養により HypA および機能性 HypA を生産し、液体クロマトグラフィーにより精製した。各々の水溶液を各種基材上に滴下して乾燥することにより吸着させた。その結果、HypA および機能性 HypA は特に疎水性の基材表面に強く吸着することが観察された。

#### Expression and adsorption of functional peptide fusion hydrophobin (HypA) of *Aspergillus oryzae*

Keisuke Domae, Asuka Kase, Harushi Nakajima

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

## P-32

### *Aspergillus oryzae* のハイドロフォービン群の機能および局在性の解析

山川結, 石田千絵, 早川美佑華, 水野佑香, 中島春紫 (明治大・農・農化)

ハイドロフォービン (hydrophobin) は、空気中に菌糸を伸長させる糸状菌・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.) の両親媒性タンパク質であり、菌体外に分泌された後、菌糸や分生子の表層に自己集合して単層を形成し、撥水性の付与や疎水性基材表面など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ハイドロフォービン遺伝子を複数有しているが、その使い分けについてはほとんど解明されていない。

本研究室では麹菌 *Aspergillus oryzae* に注目し、ハイドロフォービン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。これまで、*hypA,B,C* について単独、二重および三重破壊株を作製し、HypA は主として分生子に、HypB は菌糸に局在し、HypC は通常の条件下では発現量が少ないことを観察している。さらに、*hypA* 遺伝子は分生子形成期に転写量が増加するが、*hypB* 遺伝子は菌糸の伸長期に転写され、分生子形成期には転写量が減少することを見出している。*hypA* 遺伝子または *hypB* 遺伝子の欠失によるコロニーの撥水性および細胞表層微細構造への影響は、他方の遺伝子により相補されないことから、それぞれ独立して機能していると考えられる。そこで、HypA と HypB の局在性と発現の関連を明らかにする目的で、*hypB* 遺伝子を *hypA* プロモーター、*hypA* 遺伝子を *hypB* プロモーターにより発現させ、その下流に蛍光タンパク質 eGFP を融合して、それぞれ *hypA,hypB* 二重破壊株に導入した株を作製した。蛍光顕微鏡観察により、ハイドロフォービンの局在性はプロモーターが支配することを示唆する結果が得られている。

#### Characterization and localization of hydrophobins in *Aspergillus oryzae*

Yui Yamakawa, Chie Ishida, Fuyuka Hayakawa, Yuka Mizuno, Harushi Nakajima

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

## P-33

### 味噌用麹菌 *A. oryzae* KBN630 株における酸性ホスファターゼ遺伝子多重破壊株の作出

安田 (吉野) 庄子, 長谷川 摂, 小野奈津子, 伊賀 佳美<sup>1</sup>, 白石 洋平<sup>1</sup>, 和久 豊<sup>1</sup>, 杉本 達哉<sup>2</sup>, 楠本 憲一<sup>3</sup>, 北本 則行 (あいち産科総セ・食工技セ,<sup>1</sup> ㈱ビオック,<sup>2</sup> ナカモ(株),<sup>3</sup> 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。我々はこれまでに麹菌ゲノム情報から推定した *aph* 遺伝子候補 13 個の遺伝子破壊株を作出し、豆麹における Aph 活性を測定した。その結果、 $\Delta$ *aphC* 株、 $\Delta$ *aphA* 株および  $\Delta$ *aphE* 株の Aph 活性が低下した。そこで、Aph 活性のより低下した株を取得するために、*aphC*、*aphA* および *aphE* 遺伝子の二重・三重破壊株の作製を試みた。

【方法・結果】*pyrG* 遺伝子をマーカーとして作製した *aphC* 遺伝子削除用ベクター pDelaphC を用いて *A. oryzae* KBN630-17K3 株を形質転換し、5-FOA・ウリジン含有ツァペック寒天培地を用いて *aphC* 遺伝子削除株を取得した。次に *aphA* 遺伝子削除用ベクター pDelaphA を用いて *aphC* 遺伝子削除株を形質転換し、*aphC*・*aphA* 遺伝子二重削除株を取得した。さらに *aphE* 遺伝子破壊用ベクター pDisaphE を用いて *aphC*・*aphA* 遺伝子二重削除株を形質転換し、*aphC*・*aphA*・*aphE* 遺伝子の三重破壊株を取得した。破壊株の Aph 活性を測定した結果、豆麹では  $\Delta$ *aphC* 株が最も低下し (親株の約 4%)、米麹では  $\Delta$ *aphC* $\Delta$ *aphA* 株が最も低下した (親株の約 24%)。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。

#### Multiple disruption of acid phosphatase (Aph) genes in the miso koji mold, *A. oryzae* KBN630

Shoko YOSHINO-YASUDA, Osamu HASEGAWA, Natsuko ONO, Yoshimi IGA<sup>1</sup>, Yohei SHIRAIISHI<sup>1</sup>, Yutaka WAGU<sup>1</sup>, Tatsuya SUGIMOTO<sup>2</sup>, Ken-Ichi KUSUMOTO<sup>3</sup>, Noriyuki KITAMOTO ( Food Res. Center, ACIST,<sup>1</sup> Bio'c CO.,LTD,<sup>2</sup> NAKAMO CO.,LTD,<sup>3</sup> Nat'l Food Res. Inst.)

## P-34

### *Aspergillus aculeatus* 由来糖化アミノ酸オキシダーゼホモログ遺伝子の取得と発現

宮武はる香, 谷修治, 炭谷順一, 川口剛司 (阪府大院・生環科)

糖化アミノ酸オキシダーゼ (FAOD) は、糖化アミノ酸を酸化的に加水分解し、 $H_2O_2$  を生成する酵素であり、糖尿病の指標となる糖化タンパク量の測定に利用可能である。当研究室にてゲノム情報が明らかとなった糸状菌 *Aspergillus aculeatus* は FAOD ホモログ遺伝子を 5 つ持つことが判明した。そこで、ホモログ遺伝子 *fao1-5* を大腸菌で発現させ、発現産物の基質特異性について明らかにすることを目的とした。

ホモログ遺伝子 *fao1-5* について、発現プラスミドや発現条件を検討することで、全て可溶性タンパクとして発現させることに成功した。発現産物の基質特異性について、反応性が期待される糖化アミノ酸 ( $N^{\epsilon}$ -fructosyl  $N^{\alpha}$ -Z-lysine, fructosyl valine), L-proline, D-proline, L-hydroxy proline, sarcosine, saccharopine を対象に調べたところ、FAO2 は pipercolinic acid, L-proline, D-proline, FAO3 は  $N^{\epsilon}$ -fructosyl  $N^{\alpha}$ -Z-lysine, FAO5 は  $N^{\epsilon}$ -fructosyl  $N^{\alpha}$ -Z-lysine, fructosyl valine に反応することが明らかとなった。FAO1 と FAO4 については、調べた限りではどのような基質に反応するか判明しなかった。

現在、FAO3 と FAO5 について、基質認識に関与すると推定されるアミノ酸に変異を導入し、基質特異性の変化について調べているところである。

#### Expression of fructosyl amino acid oxidase homolog genes from *Aspergillus aculeatus*

Haruka Miyatake, Shuji Tani, Jun-ichi Sumitani, Takashi Kawaguchi

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

## P-35

### *Aspergillus aculeatus* 由来分泌型 $\beta$ -glucosidase の反応特性

竹谷俊亮, 谷修治, 炭谷順一, 川口剛司 (阪府大院・生環科)

*Aspergillus aculeatus* は、単糖生成力に優れたセルラーゼ剤を生産する。この特徴は、本菌の $\beta$ -glucosidase1 (BGL1) が、セロオリゴ糖に対する比活性が高く、糖転移活性が低いことに起因していることが明らかにされているが、その他の内在の $\beta$ -glucosidase に関する知見は得られていない。本研究では、*A. aculeatus* のゲノムにコードされている7種の推定分泌型 $\beta$ -glucosidase (BGLA, B, C, D, E, I, J と称す) を *A. oryzae* を宿主として発現し、精製した酵素の諸性質について解析、比較を行った。BGL1, BGLB, BGLC は比活性で laminaribiose ( $\beta$ -1,3) > gentiobiose ( $\beta$ -1,6) > cellobiose ( $\beta$ -1,4) となる基質特異性を示した。しかしながら、BGLA は cellobiose にはまったく活性を示さず、gentiobiose に高い分解活性を示し、GH family 3 に属する酵素ではユニークな性質を持つ BGL であった。また、*p*-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (pNPG) に対しては分解活性を持つため、配糖体をより認識する BGL であることも示唆された。BGL1 の立体構造が糸状菌の GH family 3 で初めて解明されたため、BGL1 を基に BGLA の立体構造をモデリングした。BGL1 の +1 サブサイトは芳香族アミノ酸によってスタッキングされているのに対して、BGLA では上記の芳香族アミノ酸がなく +1 サブサイトが自由度の高い構造となっていた。+1 サブサイトの自由度の高さが pNPG のような配糖体の受け入れやすさに寄与すると推測された。gentiobiose を分解し、cellobiose を分解できない原因に関しては予測された構造を基に部位特異的の変異を加えることで解析を進めている。

### The hydrolytic property of extracellular $\beta$ -glucosidases from *Aspergillus aculeatus*

Shunsuke Taketani, Shuji Tani, Jun-ichi Sumitani, Takashi Kawaguchi

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

## P-36

### GH3 $\beta$ -グルコシダーゼが $\beta$ -フラクトフラノシダーゼ様活性を持つ

片山貴之, 谷修治, 炭谷順一, 川口剛司 (阪府大院・生環科)

【背景・目的】*Aspergillus aculeatus* 由来 $\beta$ -グルコシダーゼ 1 (BGL1) は、Glycosyl Hydrolase family 3 (GH3) に属し、セロオリゴ糖を非還元末端側からグルコース単位で加水分解する酵素である。GH3 には BGL の他に、キシラン 1,4- $\beta$ -キシロシダーゼ、グルカン 1,3- $\beta$ -グルコシダーゼなどが属しており、その一次構造は類似している。一方、 $\beta$ -フラクトフラノシダーゼ ( $\beta$ -FFase) は、GH32, 68, 100 に属し、フルクトース残基を認識してスクロースの加水分解を触媒する酵素である。GH3 と GH32, 68, 100 の酵素は、いずれも一次構造の類似性は低く、GH3 の酵素が $\beta$ -FFase 活性を持つという報告も無い。しかし、本研究において、GH3 の BGL1 が $\beta$ -FFase 様活性を持つことが見出されたので、詳細に検討を加えた。

【方法・結果】BGL1 と様々な二糖を一晩反応させた後、TLC によって解析したところ、スクロースを用いた場合に、転移反応産物及び単糖と思われる位置に新たなスポットが検出された。また、HPAEC によって解析したところ、生成する単糖はグルコースであることが判明したため、転移反応産物はスクロースにフルクトースが付加したものと考えられた。そこで、スクロースに対するカイネティクスを解析したところ、 $K_m = 11.36$  mM,  $k_{cat} = 0.05$  /s であり、転移反応効率、スクロースに対して 36.2% (mol/mol) であった。現在、この転移反応産物を精製し、NMR による構造解析を行っている。

### $\beta$ -Fructofranosidase activity of the GH3 $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus aculeatus*

Takayuki Katayama, Shuji Tani, Jun-ichi Sumitani, Takashi Kawaguchi

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

## P-37

### *Aureobasidium pullulans* 由来 $\alpha$ -L-アラビノフラノシダーゼの酵母 *Pichia pastoris* における高発現と酵素化学的性質

東田知洋, 太田一良 (宮崎大農・応生科)

【目的】真菌 *A. pullulans* ATCC 20524 株から既に GH family 51 に属する  $\alpha$ -L-アラビノフラノシダーゼ遺伝子 *abfB* をクローニングした。本報は, *A. pullulans* ATCC 20524 株の本酵素を大量生産するために, メタノール資化酵母 *P. pastoris* での発現と分泌を検討し, 酵素化学的諸性質を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】Oatpelt 由来キシランを炭素源として培養した *A. pullulans* ATCC 20524 株から全 RNA を抽出し, cDNA を合成した。その cDNA を鋳型として *abfB* 領域を PCR で増幅して, ベクターに挿入後 *P. pastoris* に導入した。*abfB* 遺伝子のシグナルペプチドを含む全 ORF (2,097 bp) を分泌シグナル配列を含まない pPIC3.5 に挿入して作製した株を pABF115 由来株, *abfB* 遺伝子の成熟酵素領域を酵母  $\alpha$  型接合因子の分泌シグナルを含む pPIC9 に挿入して作製した株を pABF116 由来株とした。30°C で 120 時間, 液体振とう培養した結果, *A. pullulans* ATCC 20524 株が菌体外に 0.043 U / ml の酵素活性を示したことに對し, pABF115 由来株が 8.4 U / ml, pABF116 由来株が 4.7 U / ml と高い酵素活性を示した。次に, より酵素活性の高い pABF115 由来株の液体培養上清から, ゲル濾過クロマトグラフィーにより本酵素を電気泳動的に単一に精製した。精製酵素は分子量が約 116 kDa であり, *N*-glycosidase 処理で *N* 結合型糖鎖を除去することで分子量が約 70 kDa に減少した。また, 最適 pH は 4.5, 最適温度は 75°C であった。本研究は文部科学省特別教育研究経費研究推進事業の一環として行われた。

#### Characterization of *Aureobasidium pullulans* $\alpha$ -L-arabinofuranosidase expressed in *Pichia pastoris*.

Chihiro Higashida, Kazuyoshi Ohta

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

## P-38

### 油画に付着する糸状菌の除去を目的とした真菌細胞壁溶解酵素の適用

和田朋子<sup>1</sup>, 中右恵理子<sup>2</sup>, 早川典子<sup>1</sup>, 佐藤嘉則<sup>1</sup>, 大河原典子<sup>1</sup>, 五十嵐圭日子<sup>3</sup>, 木島隆康<sup>2</sup>, 木川りか<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>東京文化財研究所・保修セ, <sup>2</sup>東京芸大院・美術科, <sup>3</sup>東大院・農生科)

糸状菌は, 木材, 紙, 綿, 絹, 皮革, 膠, 澱粉糊などの様々な文化財の構成材料や修復材料に付着し, 分解や変質といった劣化を引き起こすことが知られている。さらに, 菌種によっては低湿度下 (65~70%RH 程度) でも生育可能であるため, 博物館・美術館の収蔵品にも深刻な被害をもたらす。また, これらの菌は文化財に一旦発生すると, クリーニングの際に除去が非常に難しい場合もある。発表者らは, 物理的なクリーニング等で除去が難しい場合に対応するために, 真菌細胞壁溶解酵素を適用し, 油画に付着する糸状菌の除去を行う試験を実施した。本発表では, 文化財に強固に付着しクリーニングが困難な糸状菌の除去に上記の酵素を適用するため, 酵素の反応条件の検討を行ったので報告する。

はじめに真菌細胞壁溶解酵素を用いて, 文化財等の汚損原因菌の細胞壁の溶解を試みた。その結果, 生菌, 死菌ともに顕微鏡下で菌体が溶解することを確認した。つぎに, 様々な酵素濃度で菌体細胞壁の減少量を定量的に評価した。現在, 油画などの文化財の構成材料や修復材料への影響について確認を行い, これらの条件を基に真菌細胞壁溶解酵素を文化財に適用する方法を検討するとともに, 油画に付着した菌糸の除去効果について実地試験を行っている。

#### Removal of filamentous fungi from oil painting using fungal cell wall lytic enzymes.

Tomoko Wada<sup>1</sup>, Eriko Nakau<sup>2</sup>, Noriko Hayakawa<sup>1</sup>, Yoshinori Sato<sup>1</sup>, Noriko Ohkawara<sup>1</sup>, Kiyohiko Igarashi<sup>3</sup>, Takayasu Kijima<sup>2</sup>, Rika Kigawa<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Nat. Res. Ins. for Cultural Properties, <sup>2</sup>Tokyo, Tokyo Univ. of Arts, <sup>3</sup>Univ. of Tokyo)

## P-39

### 担子菌エノキタケの *acetyl xylan esterase (Fv-axe)* 様遺伝子の機能解析

藤田将幸<sup>1</sup>, 西川良平<sup>1</sup>, 吉田真澄<sup>1</sup>, 奥原 徹<sup>1</sup>, 稲富 聡<sup>2</sup>, 田口悟朗<sup>1</sup>, 下坂 誠<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>信州大・繊維・応生系, <sup>2</sup>ホクトきのこ総合研)

Acetyl xylan esterase (Axe) はキシラン中のキシロース残基にエステル結合したアセチル基を加水分解する酵素であり、担子菌が木質素材を分解し栄養を獲得する際にはたらくと考えられる。これまでにエノキタケ細胞から Axe に相同性を示し、養菌糸体特異的に発現する遺伝子 (*Fv-axe*) を単離した。本研究では、*Fv-axe* 遺伝子産物の機能を調査した。

*Fv-axe* ORF (361 アミノ酸残基) は N 末端側よりシグナル配列、セルロース結合ドメイン、family 1 carbohydrate esterase 活性ドメインからなるマルチドメイン構造を有していた。シグナル配列を除去した cDNA 断片を発現用ベクター pPICZ  $\alpha$  A に挿入し、メタノール性資化性酵母 *Pichia pastoris* を宿主に用いて発現させ、組換えタンパク質 Fv-Axe が合成基質 *p*-nitrophenyl acetate に対する分解活性を示すことを確認した。現在、詳細な酵素学的性質を調査中である。

当研究室で開発した RNA 干渉 (RNAi) および高発現用バイナリーベクターを用いて、エノキタケ *Fv-axe* 遺伝子の発現抑制株と高発現株を作出した。発現抑制株のおがくず培地における増殖が著しく遅延したことから、Fv-Axe は木質素材中のキシランの分解利用に強く関わっていることが明らかとなった。

### Characterization of acetyl xylan esterase-like gene (*Fv-axe*) from the basidiomycete *Flammulina velutipes*

Masayuki Fujita<sup>1</sup>, Ryohei Nishikawa<sup>1</sup>, Masumi Yoshida<sup>1</sup>, Toru Okuhara<sup>1</sup>, Satoshi Inatomi<sup>2</sup>, Goro Taguchi<sup>1</sup>, Makoto Shimosaka<sup>1</sup>

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

## P-40

### *Aspergillus nidulans* の sirtuin 様タンパク質 SirA の機能解析

伊藤英里子, 志水元亨, 榊尾俊介, 高谷直樹 (筑波大院・生命環境)

sirtuin はヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) クラス III に分類される NAD<sup>+</sup> 依存的 HDAC であり生物界に広く保存されている。sirtuin はヒストン H4 の脱アセチル化を促進することによって、ヘテロクロマチン構造の形成の促進と当該遺伝子のジーンサイレンシングを行う。また、sirtuin がヒストン以外のタンパク質を脱アセチル化する役割ももつことや他のタンパク質と複合体を形成して機能することも報告されている。一方、カビにおける sirtuin の役割はほとんど未解明であり、その標的タンパク質や複合体を形成するタンパク質は明らかになっていない。

酵母の Sir2p やヒトの SIRT1 とアミノ酸配列が類似した *Aspergillus nidulans* のタンパク質を探索し分子系統樹を作製したところ、AN10449 (SirA) が Sir2p と同一のクラスターを形成した。SirA の組換えタンパク質が sirtuin 活性を有していたことおよび *sirA* 遺伝子破壊株 ( $\Delta$ SirA) の無細胞抽出液のアセチルリジンレベルが野生株 (WT) のそれよりも高かったことから SirA が *A. nidulans* の sirtuin として機能することが示された。また、 $\Delta$ SirA ではテロメア近傍の生合成遺伝子クラスターによって生合成されるステリグマトシスチンとペニシリン G の生産量が増加した。細胞内 NAD<sup>+</sup>が増加した条件下ではこれらの生産量が減少したことから、SirA は NAD<sup>+</sup>濃度依存的にこれらの生合成を抑制すると考えられた。*A. nidulans* には、Sir2p や SIRT1 と複合体を形成するタンパク質のホモログが存在しない。tandem affinity purification と MALDI-TOF/TOF-MS の手法を用い SirA に結合するタンパク質を探索したところ、Elongation factor 2, メチオニン合成酵素, 熱ショックタンパク質 (Hsp70, Hsp40) が得られたことから、これらが SirA の標的タンパク質であるか、または、SirA と複合体を形成している可能性が考えられる。

### Analysis of *Aspergillus nidulans* sirtuin A

Eriko Ito, Motoyuki Shimizu, Shunnsuke Masuo, Naoki Takaya (Grad. Sch. of Life and Environmental Sci., Univ. of Tsukuba)

## P-41

### フルアジナムにより誘導されるアカパンカビの遺伝子群の同定

高橋正和, 亀井誠之, 宮下基, 福森文康, 藤村真 (東洋大院・生命科学)

フルアジナムは、ミトコンドリアの電子伝達系の共役反応を阻害するアンカプラー型の殺菌剤であり、幅広い作物病害の防除に使用されている。本研究では、アンカプラーによる損傷に対してどのように細胞応答が起こるかを明らかにするために、アカパンカビにフルアジナム(5mg/L)を1時間処理してマイクロアレイ法を用いて応答遺伝子を網羅的に解析した。その結果、ミトコンドリア電子伝達系複合体 III の阻害剤(QoI 剤)で誘導されることが知られている *alternative oxidase(aod-1)* および酸化剤メナジオンで誘導されることが知られている *glutathione S-transferase(gst)* や *oxidoreductase(mig)* などの遺伝子群がフルアジナムにより誘導された。*aod-1* 遺伝子は転写因子 AOD-5 により制御され、*gst* および *mig* 遺伝子は転写因子 NAP-1 により制御される。これらの遺伝子が実際にフルアジナムで誘導されることを qRT-PCR 法を用いて確認したところ、ほとんどの遺伝子で4倍以上の発現量の増加が認められた。さらに、*nap-1* 破壊株を用いて解析したところ、フルアジナムによる *aod-1* 遺伝子の誘導は保持されたが、*gst* や *mig* 遺伝子のほとんどの遺伝子の誘導が消失した。同様の傾向は、異なるアンカプラーである CCCP でも認められた。さらに、GFP を用いた NAP-1 の局在解析から、フルアジナムはメナジオンと同様に、NAP-1 を細胞質から核に移行させることが明らかになった。これらのことから、フルアジナムは、ミトコンドリアに損傷を与え、*aod-1* を誘導するとともに、活性酸素を発生させて NAP-1 を活性化し、酸化ストレス応答遺伝子を誘導すると考えられた。

### Fluazinam induced the alternative oxidase, glutathione S-transferase and oxidoreductase genes in *Neurospora crassa*

Masakazu Takahashi, Masayuki Kamei, Moto Miyashita, Fumiyasu Fukumori, Makoto Fujimura (Grad.Sch.of Life Sci.,Toyo Univ)

## P-42

### 麹菌 *Aspergillus oryzae* 金属プロテアーゼ遺伝子の転写解析

酒井大介<sup>1</sup>, 竹内道雄<sup>1</sup>, 古崎利紀<sup>2</sup>, 石井一夫<sup>2</sup>, 有江力<sup>2</sup>, 山形洋平<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>東農工大院・応生化, <sup>2</sup>東農工大院・農学系ゲノム科学人材育成プログラム)

麹菌 *Aspergillus oryzae* のゲノム解析の結果、*A. fumigatus* や *A. nidulans* などの他の *Aspergillus* 属と比べてプロテアーゼをコードする遺伝子が約4割多く、*A. oryzae* のゲノム中にのみ認められるプロテアーゼ遺伝子が存在することが明らかとなった。さらに、それらのプロテアーゼ遺伝子は窒素源によって転写量が異なることが示唆された。そこで、本研究では麹菌 *A. oryzae* の産生する金属プロテアーゼを中心とした遺伝子に着目して転写解析を行い、*A. oryzae* の窒素代謝がどのように制御されているのか調べることを目的としている。

半定量的 PCR によって、*A. oryzae* の金属プロテアーゼ遺伝子の転写量が、窒素源や培養時間の違いによって異なることが明らかとなった。そこで、より詳細に窒素源と培養時間の変化による金属プロテアーゼ遺伝子の転写量変動を調べるため、次世代シーケンサーを用いた解析を行った。解析には、窒素源を硝酸ナトリウムとゼラチンとし、それぞれの培養時間を48時間と72時間とした4条件を用いた。その結果、半定量的 PCR と同様に複数の金属プロテアーゼ遺伝子で窒素源、培養時間による転写量の変化が見られ、さらに培養時間によるものよりも窒素源によるものの方が転写量の変化する遺伝子が多いことが明らかとなった。現在、解析を継続しており、今後ヒートマップの作製やクラスター解析を行い、*A. oryzae* の窒素代謝制御について述べる予定である。

### Gene transcriptional analysis of metalloproteases in *Aspergillus oryzae*

Daisuke Sakai<sup>1</sup>, Michio Takeuchi<sup>1</sup>, Toshinori Kozaki<sup>2</sup>, Kazuo Ishii<sup>2</sup>, Tsutomu Arie<sup>2</sup>, Youhei Yamagata<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Dept. of Applied Biol. Chem., Tokyo Univ. of Agri. and Tech., <sup>2</sup> Tokyo Univ. of Agri. and Tech.)

## P-43

### 麹菌酸性プロテアーゼ遺伝子のイントロンスプライシングに関する研究

石田健, 久保島恵, 宮本雅史, 森田寛人, 前田浩, 岡本綾子, 山形洋平, 竹内道雄 (東京農工大・応生科)

麹菌ゲノムには 126 個のプロテアーゼ遺伝子が存在する。この遺伝子群の mRNA の塩基配列とゲノム配列の比較から、オルタナティブスプライシングが起きている遺伝子が複数存在することが予測された。本研究ではゲノム解析で予測されたプロテアーゼ遺伝子と cDNA の配列を比較することにより、麹菌プロテアーゼ遺伝子のオルタナティブスプライシングについて検討した。

麹菌 RIB40 株を様々な条件で培養し mRNA を精製して cDNA ライブラリを作製した。この cDNA ライブラリより各プロテアーゼ遺伝子 cDNA を PCR により増幅し、これらの配列とアノテーションで予測された配列を比較した。その結果、セリンタイプカルボキシペプチダーゼ遺伝子 AOEXE103 では培養条件によりそのスプライシングパターンに変化が認められ、成熟型 mRNA の他、イントロンを部分的に含む mRNA も存在することが明らかとなった。また、アスパルティックプロテアーゼ遺伝子 AOEXE007 は、ゲノム解析による予測では活性中心モチーフが存在したが、今回検討した条件では予測とは異なった位置でスプライシングが起こることにより翻訳が途中で終了し、酵素活性をもたないプレプロ配列が翻訳される可能性が示唆された。

#### Intron splicing of acid protease genes in *Aspergillus oryzae*

Ken Ishida, Megumi Kuboshima, Masashi Miyamoto, Hiroto Morita, Hiroshi Maeda, Ayako Okamoto, Youhei Yamagata, Michio Takeuchi (Dept. of Applied Biological Science, Tokyo Univ. of Agriculture and Technology)

## P-44

### 麹菌転写因子 HapX の高発現はシデロフォア生産を顕著に増大させる

中村隼人<sup>1</sup>, 林口拓実<sup>1</sup>, 安田 (吉野) 庄子<sup>2</sup>, 北本則行<sup>2</sup>, 志水元亨<sup>1</sup>, 加藤雅士<sup>1</sup> (<sup>1</sup>名城大・農, <sup>2</sup>あいち産科技総セ・食工技セ,)

【目的】デフェリフェリクリシン (DFF) は *Aspergillus oryzae* が生産するシデロフォアで、鉄欠乏時に DFF 生合成系の初発酵素遺伝子 *dffA* 産物が誘導され、生産が開始される。DFF は鉄と結合し変色することから、清酒醸造において品質劣化の原因となっている。一方、麹菌シデロフォアは鉄の補給剤としての利用が期待されている<sup>1)</sup>。HapX の機能解析の研究から、HapX は麹菌シデロフォア生産制御遺伝子 *sreA* を抑制することが明らかとなっており、*SreA* を介して *dffA* を間接的に制御することが予想されるが、近縁の *Aspergillus nidulans* における研究ではシデロフォアの生産に HapX がほとんど関与しないことが報告されている<sup>2)</sup>。本研究では、HapX 高発現の DFF への影響を調べることで、シデロフォア生産に関する HapX の機能の解明を目的とした。

【方法と結果】*taaG2* プロモーターの制御下に HapX 遺伝子を連結したプラスミドを作製し、*Aspergillus oryzae* KBN616 に導入し高発現株とした。野生株および高発現株をデンプンを炭素源としたツァペックドックス液体培地に植菌し、鉄を添加・非添加条件で培養を行った。それぞれの菌体から mRNA を抽出し、RT-PCR による測定で、高発現株は野生株に比べ *dffA* 遺伝子発現強度が高くなることが確認された。また培地中の DFF 濃度を測定した結果、遺伝子発現と同様に高発現株の方が高いことが確認された。これらの結果から HapX は *dffA* 遺伝子の発現制御に関与し、HapX 高発現株はシデロフォアの生産に有効であることが示された。

1) 入江ら、日本農芸化学会 2005 年度大会講演要旨集 p. 286

2) Hortschansky P. et al. EMBO J, 26, 3157 (2007)

#### Overexpression of the *A. oryzae* transcription factor HapX significantly increases siderophore production.

Hayato Nakamura<sup>1</sup>, Takumi Hayashiguchi<sup>1</sup>, Shouko Yasuda<sup>2</sup>, Noriyuki Kitamoto<sup>2</sup>, Motoyuki Shimizu<sup>1</sup>, Masashi Kato<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Fac. Agric., Meijo Univ., <sup>2</sup>Food Res. Center, ACIST)



## P-45

### *ligD* 遺伝子破壊による実用麹菌 *hapX* 破壊株の取得とその解析

増田裕一郎<sup>1</sup>, 安田(吉野) 庄子<sup>2</sup>, 北本則行<sup>2</sup>, 志水元亨<sup>1</sup>, 加藤雅士<sup>1</sup> (<sup>1</sup>名城大院・農、<sup>2</sup>あいち産科  
技総セ・食工技セ)

HapX は糸状菌や一部の酵母に存在し、プロモーター上の CCAAT 配列に結合する Hap 複合体と相互作用し、転写を制御する転写因子である。環境中の鉄の量によって *hapX* 遺伝子の発現および HapX と Hap 複合体の親和性が調節され、その結果、鉄を補酵素として含むような酵素や鉄の取り込み系に関わる遺伝子の発現をコントロールする。そこで本研究では *hapX* 遺伝子破壊株の有効利用も考慮し、実用菌株 *A. oryzae* KBN616 で *hapX* 遺伝子破壊を計画した。DNA の非相同末端結合反応に関する *ligD* 遺伝子の破壊により、相同組換え効率が顕著に上昇することが知られている<sup>1)</sup>。今回はまず実用菌株 KBN616 の *ligD* 破壊株を取得し、得られた *ligD* 遺伝子破壊株を用いて、形質転換を行った。その結果、相同組換え効率は 85% と高い値を示し、*hapX* 破壊株を取得することができた。デフェリフェリクリシン生産系の初発酵素をコードする遺伝子 *affA* の発現は、近縁の *A. nidulans* では、ほとんど HapX の影響を受けないとの報告があるが、<sup>2)</sup>リアルタイム PCR で *hapX* 破壊株と野生株とで発現量を比較したところ、麹菌では野生株に比べて *affA* 遺伝子の発現量が低下していることが分かった。現在、HapX が制御すると予想される他の遺伝子の発現に関しても解析を進めている。

3) Mizutani O. et al. *Fungal Genet. Biol.*, 45, 878 (2008)

4) Hortschansky P. et al. *EMBO J*, 26, 3157 (2007)

### **Deletion of the *hapX* gene using a *ligD* disruptant of an industrial strain of *Aspergillus oryzae* and analysis of the *hapX* deletion mutant.**

Yuichiro Masuda<sup>1</sup>, Shoko YOSHINO-YASUDA<sup>2</sup>, Noriyuki Kitamoto<sup>2</sup>, Motoyuki Shimizu<sup>1</sup>, Masashi Kato<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Faculty of Agr., Meijo Univ., <sup>2</sup>Food Res. Center, ACIST.)

## P-46

### 麹菌 *A. oryzae* のデンプン分解酵素生産に関する転写因子の細胞内局在解析

鈴木空太, 田中瑞己, 新谷尚弘, 五味勝也 (東北大学院農・生物産業創成)

麹菌のデンプン分解酵素生産には、デンプン分解酵素遺伝子群を直接制御する転写因子 AmyR とマルトース取り込み系を制御する MalR の 2 種の転写因子が関与している。*A. nidulans* においては AmyR が活性化と協調的に核移行することが報告されている (1)。麹菌において MalR は AmyR に先行して活性化すると予想されるが、その活性化機構は明らかとなっていない。本研究では AmyR と MalR の活性化機構を解析するため、グルコース抑制制御因子 (CreA) 破壊株における発現解析および sGFP-AmyR と sGFP-MalR の細胞内局在解析を行った。

*creA* 破壊株における発現をノーザン解析により調べた結果、AmyR 制御下の遺伝子はグルコースによっても発現が誘導されたのに対し、MalR の制御下の遺伝子は発現が誘導されなかった。このことから、AmyR と MalR は異なる活性化機構を有していることが示唆された。次に、各種炭素源における sGFP-MalR の細胞内局在観察を行ったところ、興味深いことに sGFP-MalR は調べた全ての炭素源培養時において核局在していた。このことから、MalR は誘導基質依存的に核内で何らかの修飾を受けることにより活性化されるものと推定される。現在、sGFP-AmyR についても各種炭素源培養時における細胞内局在解析を進めている。

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。

1) Murakoshi et al., *Appl Microbiol Biotechnol.* 94: 1629-1635 (2012)

### **Intracellular localization of transcription factors involved in starch degradation in *Aspergillus oryzae***

Kuta Suzuki, Mizuki Tanaka, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi

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

## P-47

### 麹菌における CreA 及び脱ユビキチン化酵素 CreB 破壊によるグルコース抑制の解除

一瀬桜子, 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。糸状菌におけるグルコース抑制は広域制御型転写因子 CreA によって制御されることが知られている。モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* では、CreA のユビキチン・脱ユビキチン化によりグルコース抑制が制御されることが示唆されており、グルコース存在条件下では、脱ユビキチン化酵素である CreB によって CreA が脱ユビキチン化されると考えられている。そこで、麹菌において *creA* 及び *creB* 破壊株を作製し、グルコース抑制への影響を解析した。

麹菌において *creA* 及び *creB* 破壊株を作製し、その生育を宿主株と比較した結果、*creA* 破壊株では生育の悪化が観察されたが、*creB* 破壊株では生育への影響は観察されなかった。次に、デンプンとグルコースを混合した培地におけるハロー形成能を比較した結果、野生株ではハロー形成が見られないのに対し、*creA* 及び *creB* 破壊株では明瞭なハロー形成が観察された。また、デンプン・グルコース混合条件下における  $\alpha$ -アミラーゼ及びグルコアミラーゼの発現をノーザン解析により調べた結果、*creA* 及び *creB* 破壊株ではグルコース存在条件下でもこれらの遺伝子が強く発現していた。以上の結果から、*creA* 及び *creB* 破壊株ではグルコース抑制が解除されていることが示された。現在、*creA* 及び *creB* 破壊株の  $\alpha$ -アミラーゼ生産性への効果を比較している。(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。)

#### Glucose derepression by gene disruption for CreA and ubiquitin C-terminal hydrolase CreB in *Aspergillus oryzae* Sakurako Ichinose, Mizuki Tanaka, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi

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

## P-48

### 麹菌における CreA タンパク質量の翻訳後過程における制御

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。糸状菌におけるグルコース抑制は、広域制御型転写因子 CreA によって制御されることが知られている。*A. nidulans* では、グルコース抑制に関わる他の因子としてユビキチン化・脱ユビキチン化に関与すると推定される因子が同定されている。このことから、グルコース抑制は CreA のユビキチン化・脱ユビキチン化を介して制御されていると予想されている。しかし、CreA のタンパク質レベルでの挙動についてはほとんど解析がなされていない。そこで、本研究では N 末端に 4xHA タグを融合した CreA を麹菌で発現させ、ウェスタン解析により CreA タンパク質の炭素源に対する挙動を解析した。

*creA* のプロモーター領域に 4xHA-CreA を連結した発現コンストラクトを *creA* 破壊株に導入した。各種炭素源での培養時における定常状態の発現量を比較した結果、マルトースを炭素源とした場合に CreA タンパク質量が減少した。次に、フルクトースを炭素源とした培地で培養後、菌体をグルコースおよびマルトースを炭素源とした培地に移して CreA の挙動を調べた。その結果、マルトースを炭素源とした培地に移した場合に CreA タンパク質量の急速な減少が観察された。また、マルトース依存的な CreA の減少は、構成的に発現するエノラーゼ遺伝子のプロモーターを用いて 4xHA-CreA を発現させた場合にも観察された。以上の結果から、CreA タンパク質量が炭素源依存的に翻訳後の過程において制御されることが示唆された。

(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。)

#### The amount of CreA protein is regulated at the post-translational level in *Aspergillus oryzae*.

Mizuki Tanaka, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi

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

## P-49

### *Neurospora crassa* の beta-1,3-glucan 合成酵素遺伝子 *fks-1* の転写制御因子の探索

亀井誠之, 高橋正和, 一石昭彦, 藤村真 (東洋大院・生命科学)

出芽酵母の beta-1,3-glucan 合成酵素遺伝子 *FKS1*, *FKS2* は細胞壁の損傷によって転写量が上昇し、この誘導は *Slit2* MAP キナーゼ及びその下流の転写調節因子 *Rlm1* によって制御されている。酵母との比較ゲノム解析の結果から、モデル糸状菌 *Neurospora crassa* には1つの beta-1,3-glucan 合成酵素遺伝子 *fks-1* の存在が明らかになっているが、*fks-1* を発現制御するシグナル因子については不明である。

そこで、*Neurospora crassa* の *fks-1* の発現を制御する因子を明らかにするため、qRT-PCR による *fks-1* の発現解析を行った。*fks-1* は基礎的な栄養生育条件下において発現量が恒常的に高く、培養菌糸体に Micafungin (beta-1,3-glucan 合成酵素阻害剤)による細胞壁損傷処理を行っても、発現量に顕著な変動は認められなかった。さらに、その発現量は *mak-1* (出芽酵母 *Slit2* ortholog)破壊株や *rlm-1* (出芽酵母 *Rlm1* ortholog)破壊株においても完全に消失しなかった。これらのことから、*Neurospora crassa* の *fks-1* の発現制御には *MAK-1* MAP キナーゼ及び転写調節因子 *RLM-1* は関与していないことが明らかになり、酵母の *FKS1*, *FKS2* の発現制御機構とは大きく異なることが推定された。*gfp* をレポーター遺伝子として利用した *fks-1* のプロモーターアッセイを行ったところ、推定プロモーター領域 1500bp のうち、開始コドン上流 -1500~-300 領域の欠損によって *gfp* 発現量が顕著に減少した。このことから、*fks-1* の開始コドン上流 -1500~-300 領域に結合するアクチベータータイプの転写調節因子の存在が示唆された。現在、*fks-1* プロモーター領域に結合する DNA 結合タンパク質について解析を行っている。

#### Attempt to identify a transcriptional regulator of *fks-1*, beta-1,3-glucan synthase gene, in *Neurospora crassa*.

Masayuki Kamei, Masakazu Takahashi, Akihiko Ichiishi, and Makoto Fujimura

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

## P-50

### *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解析

日下秀行, 古川隆紀, 深谷英嗣, 志田洋介, 小笠原 渉 (長岡技大・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ふ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。これまでに当研究室では、セルラーゼ誘導基質の取込みおよび認識に関与するトランスポーターの同定を試みている。網羅的な遺伝子発現応答解析によりセルラーゼと同調して発現する推定トランスポーター遺伝子を選抜し、それぞれの遺伝子破壊株の表現型を評価した結果、推定トランスポーター-MFS031 の破壊に伴い著しいセルラーゼ活性の低下が観察された。本研究では推定トランスポーター-MFS031 の生理学的役割の解明を目的として、この遺伝子の破壊が基質の取込みやセルラーゼ遺伝子発現に与える影響について詳細な解析を行った。その結果、セロオリゴ糖を炭素源として使用した場合、MFS031 破壊株は野生株と同等の基質取込み能を示したが、セルラーゼ遺伝子の誘導発現能を欠損していることが明らかとなった。この結果より、推定トランスポーター-MFS031 はセロオリゴ糖の基質認識に関与している可能性が高いと推定された。現在、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いて MFS031 の異種宿主発現株の構築を行い、各種炭素源に対する基質取込み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-51

## ***Trichoderma reesei* のセルラーゼ生産に関与する MFS トランスポーターの機能解析**

古川隆紀, 志田洋介, 小笠原渉 (長岡技大・生物)

【目的】糸状菌 *Trichoderma reesei* は、細胞外のセルロースやその分解産物の存在に反応して誘導的にセルラーゼを生産する。古くから *T. reesei* はセルラーゼ生産のモデル生物として様々な研究の対象となっており、そのセルラーゼ生産制御機構に関しても無数の報告がなされている。しかし、細胞外セルロースの認識機構やセルラーゼ誘導物質の取り込み系に関してはほとんど知見が得られておらず、セルラーゼ生産制御機構の解明における大きなブラックボックスとなっている。本研究では、セルラーゼ生産に関与する糖トランスポーターの同定を目的として、遺伝子発現プロファイリングに基づく推定トランスポーター遺伝子の選抜と遺伝子破壊による糖トランスポーターの機能解析を行った。

【方法および結果】セルラーゼ生産および非生産条件下での網羅的な遺伝子発現応答解析を行い、セルラーゼ生産に関与すると推定される推定糖トランスポーター遺伝子の選抜を行った。選抜遺伝子についてその遺伝子破壊株の構築を行い、結晶性セルロース培養におけるセルラーゼ生産性を指標に表現型の解析を行った。その結果、ある推定トランスポーター遺伝子の破壊に伴い、大幅なセルラーゼ生産の遅延と菌体生育の遅れが観察された。また、セロピオースおよびラクトース培養においても同様にセルラーゼ生産性と生育能の低下が観察された。現在、遺伝子破壊株を用いて様々な糖類に対する取り込み挙動の解析を行っている。

### **Identification and functional analysis of a MFS transporter gene involving cellulase production in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*.**

Takanori Furukawa, Yosuke shida, Wataru Ogasawara (Dept. of Bioeng., Nagaoka Univ. of Tech.)

## **P-52**

### **糖質加水分解酵素の生産における *Aspergillus aculeatus clbR* 高発現の影響**

川村彩乃, 國武絵美, 谷修治, 炭谷順一, 川口剛司 (阪府大院・生環科)

糸状菌 *Aspergillus aculeatus* においてセルロースによる遺伝子発現誘導を正に制御する因子 cellobiose response regulator (ClbR) は、セルロースに反応して XlnR 非依存的に誘導される cellobiohydrolase I (*cbhl*), carboxymethyl cellulase 2 (*cmc2*), Fla-xylanase (*xyn1a*) 遺伝子及び XlnR により誘導される carboxymethyl cellulase 1 (*cmc1*), Flb-xylanase (*xyn1b*) 遺伝子の発現を亢進する。そこで我々はこの ClbR を翻訳伸長因子遺伝子 (*tefl*) プロモーター制御下で構成的に高発現させた株を作製し、そのセルロース系バイオマス分解酵素生産に与える影響を解析した。

ClbR 高発現株とコントロール株を小麦ふすまを炭素源として培養した際の Xylanase, Endoglucanase 活性を測定したところ、Xylanase 活性においては ClbR 高発現株で培養初期での酵素生産量が約 3 倍に増加しており、培養後期でも高い活性を維持していた。一方、Endoglucanase 活性においては、コントロール株と比べて酵素生産量に顕著な差は見られなかったものの、培養後期での活性の低下は緩やかであった。これらの活性に起因する各酵素成分を調べるため、培養 4 日目と 8 日目の培養上清中の分泌タンパク質をペプチドマスフィンガープリント法を用いて同定した。その結果、ClbR 高発現株では ClbR 制御下にある酵素のうち Xyn1a の分泌量が劇的に増加していたことから、Xyn1a が Xylanase 活性の上昇に影響していると考えられたが、Endoglucanase 活性に影響すると思われる酵素の分泌量に顕著な差は観察されなかった。

現在は、各酵素生産量と各転写産物量の相関を調べるため、ClbR 制御下にある遺伝子発現量をノーザンブロット法を用いて定量している。

### **The effect of *Aspergillus aculeatus clbR* overexpression on cellulosic biomass-degrading-enzyme-production**

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

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

## **P-53**

### **環境 pH による糸状菌セルラーゼの生産制御**

宮本健太郎, 青山未来, 金丸京子, 木村真, 小林哲夫 (名大院生命農・生物機構)

【目的】 クロモソームIVマッピング用変異株である *Aspergillus nidulans* A517 は, CMC を含む培地で生育させてもセルラーゼ生産の指標となるハローがほとんど観察されない。これまでの研究で、本セルラーゼ生産変異株の原因遺伝子は、クロモソームIV上に存在していることが示唆されているが、その同定に至っていなかった。本研究では、原因遺伝子が *palC* であることを同定し、これを受けて pH シグナリングとセルラーゼ生産の関連を解析したので報告する。

【方法・結果】 掛け合せにより A517 における原因遺伝子と各種マーカー遺伝子とのリンケージを検討した結果、*palC* 遺伝子周辺にマップされた。そこで、*palC* あるいはその近傍に存在する *xlnR* について原因遺伝子である可能性を検討した。その結果、*xlnR* の導入は A517 の変異を相補せず、野生株における *xlnR* の破壊も主要エンドグルカナナーゼ EglA, EglB の生産に全く影響を与えなかったのに対し、*palC* の導入により A517 のセルラーゼ生産性が回復した。*PalC* は pH シグナリングに関与する因子で、転写因子 *PacC* の上流に位置する。*PacC* DNA 結合配列は EglA, EglB を含む数種類のセルラーゼ及びその生産に関与する転写因子 *ManR* のプロモーター領域に存在していた。CMC を単一炭素源とする酸性、中性液体培地でのセルラーゼ誘導を Zymography により解析したところ、酸性条件では野生株と *palC* 変異株における EglA, EglB 誘導に大きな違いはなかった。一方、野生株は中性条件で酸性条件より多量の EglA, EglB を生産するのに対し、*palC* 変異株では激減していた。現在、*pacC* の破壊を試みており、これについても併せ報告する予定である。

本研究は、生研センターのイノベーション創出基礎的研究推進事業の一環として行われたものである。

### Regulation of fungal cellulase synthesis by ambient pH.

Kentaro Miyamoto, Miki Aoyama, Kyoko Kanamaru, Makoto Kimura, Tetsuo Kobayashi

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

## P-54 (O-11)

### Co-regulation of *A. nidulans* cellulase genes by transcription factors *McmA* and *ManR*

Nuo Li, Miki Aoyama, Kyoko Kanamaru, Makoto Kimura, Tetsuo Kobayashi (Graduate Sch. of Bioagric. Sci., Nagoya Univ.)

In *A. nidulans*, a MADS box protein *McmA* regulates at least two endoglucanase genes (*eglA* and *eglB*) and two cellobiohydrolase genes (*cbhA* and *cbhD*). As a MADS box protein generally requires an interacting partner to regulate gene expression, identification of the *McmA* partner is the key to understanding the regulatory mechanisms underlying cellulase regulation. One of the candidate cofactors is *ManR* because it is essential for expression of the above cellulase genes. This study focuses on the clarification of the cooperative regulatory mechanisms by *McmA* and *ManR*.

RNA sequencing analysis revealed that most cellulase genes were regulated by both *ManR* and *McmA*, implying that *ManR* is one of the partners of *McmA*. Previous studies have proved the existence of two binding sites for *McmA* on the 50 bp region of the *eglA* promoter. To detect the binding of *ManR* to the region, electrophoretic mobility shift assay was applied in the presence and absence of *McmA*. His-tagged *McmA* and Flag-tagged *ManR* were purified and utilized in the experiments. While *ManR* alone showed very weak binding, *McmA* alone bound to the probe with two shift bands corresponding to the single and double occupation of the binding sites. When both *ManR* and *McmA* were applied, the slower migrating DNA-protein complex with enhanced affinity appeared. Supershift assay using anti-Flag tag and anti-His tag antibodies confirmed that the complex contained both *ManR* and *McmA*. The results illustrated that *McmA* played a key role in the regulation of cellulase genes by assisting recruitment of *ManR* to the promoter.

This work was supported by the Programme for Promotion of Basic and Applied Researches for Innovations in Bio-oriented Industry.

### Co-regulation of *A. nidulans* cellulase genes by transcription factors *McmA* and *ManR*

Nuo Li, Miki Aoyama, Kyoko Kanamaru, Makoto Kimura, Tetsuo Kobayashi

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

## P-55

### *Aspergillus nidulans* におけるマンナナーゼ生産制御機構

【目的】 *A. oryzae* において同定された転写因子 ManR は, マンナーゼ・セルラーゼ生産に必須の因子である。一方, *A. nidulans* では *manR* 遺伝子の破壊がマンナーゼ生産性に大きな影響を与えない。*A. nidulans* は *manR* ホモログである *manS* を有していたため, 本研究では *A. nidulans* における *manR* と *manS* のマンナーゼ生産制御への寄与を調べた。

【方法・結果】  $\Delta manR$ ,  $\Delta manS$ ,  $\Delta manR/\Delta manS$  の三種の破壊株におけるエンドマンナーゼ生産性を野生株と比較した。konjac glucomannan (KG)を基質とするプレートアッセイでは,  $\Delta manR$  株でのエンドマンナーゼ生産性がわずかに低下し,  $\Delta manS$  株では大幅に低下した。 $\Delta manR/\Delta manS$  株では生産性が完全に消失した。CMC, KG, 及び locust bean gum 由来 galactomannan (GM)を単一炭素源として液体培養した培養上清を, KG を基質とするザイモグラフィーにより解析した。野生株では CMC で 2 種, GM で 2 種のエンドマンナーゼ活性が検出され, KG ではこれらを合わせた 4 種となった。また, CMC 誘導型の 2 種は *manR* 破壊で消失, GM 誘導型の 2 種は *manS* 破壊で消失した。CMC 誘導型の 2 種は GM を基質とせず, ザイモグラフィー上の移動度は主要エンドグルカナーゼ EglA, EglB と完全に一致した。以上から ManR 依存のかつ CMC 誘導型の 2 種は EglA, EglB であり, KG のグルコースストレッチを切断していることが示唆された。従って, 純粋な意味でのエンドマンナーゼは ManS により制御されていると考えられる。本研究は, 生研センターのイノベーション創出基礎的研究推進事業の一環として行われたものである。

### Regulation of mannanase synthesis in *Aspergillus nidulans*

Ayako Watanabe, Miki Aoyama, Kyoko Kanamaru, Makoto Kimura, Tetsuo Kobayashi

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

## P-56 (O-12)

### AtrR は *Aspergillus fumigatus* においてエルゴステロール合成系遺伝子発現を制御する

大場歩<sup>1</sup>, 清水公德<sup>2</sup>, 萩原大祐<sup>2</sup>, 新谷尚弘<sup>1</sup>, 川本進<sup>2</sup>, 五味勝也<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>東北大院農・生物産業創成, <sup>2</sup>千葉大・真菌センター)

当研究室では, これまでに麹菌においてアゾール系薬剤排出に関与する複数の ABC トランスポーター遺伝子の発現を同時に制御する Zn<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub> 型の転写因子 AtrR を見いだしている。AtrR は *Aspergillus* 属に幅広く保存されており, 病原性真菌 *Aspergillus fumigatus* においても, *atrR* を破壊することでアゾール系薬剤に関して超感受性を示すことを明らかにしている。

本研究では, *A. fumigatus* の *atrR* 破壊株における遺伝子発現プロファイルを網羅的に調べるために, RNA-seq を用いてトランスクリプトーム解析を行った。*A. fumigatus* の野生株と破壊株を DMSO, fluconazole, miconazole で各々処理したサンプルに異なるインデックスを付加することでマルチプレックスな RNA-seq を行い, 各サンプルから 1.91~2.45 M read の配列, 約 10000 遺伝子の発現プロファイルを得た。発現量を比較した結果, 破壊株では薬剤無添加において ABC トランスポーター遺伝子だけでなく複数のエルゴステロール合成系遺伝子の発現量が極めて低く, 薬剤を添加した際には野生株でそれらの発現量が上昇する一方, 破壊株ではほとんど変動しない, あるいは僅かな上昇しか示さないことが明らかになった。このことから AtrR は ABC トランスポーター遺伝子のみならず, エルゴステロール合成系遺伝子の発現も制御していると考えられる。*A. fumigatus* では bHLH 型転写因子 SrbA がエルゴステロール合成系遺伝子の発現を制御することが知られていたが, Zn<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub> 型転写因子 AtrR もこれと協調して遺伝子発現を制御している可能性が示唆された。

### AtrR regulates the expression of ergosterol biosynthesis genes in *Aspergillus fumigatus*.

Ayumi Ohba<sup>1</sup>, Kiminori Shimizu<sup>2</sup>, Daisuke Hagiwara<sup>2</sup>, Takahiro Shintani<sup>1</sup>, Susumu Kawamoto<sup>2</sup>, Katsuya Gomi<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Div. Biosci. Biotechnol. Future Bioind., Grad Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., <sup>2</sup>MMRC, Chiba Univ.)

## P-57 (O-13)

### *Neurospora crassa* のエルゴステロール生合成阻害剤による *erg* 遺伝子の誘導とその制御

宮下基, 亀井誠之, 高橋正和, 一石昭彦, 藤村真 (東洋大院・生命)

Ergosterol は糸状菌の細胞膜の成分で、その生合成経路は農業用殺菌剤や抗真菌剤の標的である。Morpholine 系剤 Fenpropimorph (FEN)は、C-14 sterol reductase (ERG-24)と C-8 sterol isomerase (ERG-2)の二点の酵素を阻害し、Azole 系剤 Fluconazole (FLC)は Lanosterol 14-alpha-demethylase (ERG-11)を阻害し殺菌活性を発現する。Ergosterol 生合成阻害剤により *erg* 遺伝子が誘導される事が知られているが、薬剤の阻害点と誘導遺伝子の関係は不明な点が多い。そこで、*N. crassa* に FEN と FLC を処理し、メバロン酸経路から Ergosterol に至る 21 種類の *erg* 遺伝子の発現様式を qRT-PCR を用いて比較解析した。その結果、FEN により阻害点の *erg-24* と *erg-2* 及びその下流の *erg-25* と *erg-3* が誘導された。一方、FLC では阻害点の *erg-11* 及びその下流の *erg-6* が誘導され、薬剤の阻害点により誘導される遺伝子が異なる事を明らかにした。興味深いことに両剤を混合処理すると、FEN 応答遺伝子の誘導のみが顕著に低下した。合成経路の阻害で蓄積する異常ステロールにより、誘導される遺伝子を決定している可能性が考えられた。*N. crassa* の Ergosterol 生合成経路は少なくとも二種類の異なる制御を受けていると推測し、その転写因子を同定するため、転写因子破壊株ライブラリーから、FEN 及び FLC 感受性株をスクリーニングした。その結果、sterol binding element regulator protein である *sah-2* 破壊株が顕著な FEN 感受性を示し、FEN 応答遺伝子の誘導もほぼ完全に消失した。一方、*sah-2* 破壊株は FLC 感受性及び FLC による *erg-11* 誘導は野生株と同様に認められた。以上の事から、*N. crassa* では、転写因子 SAH-2 が Morpholine 系剤により誘導される遺伝子を制御する事を明らかにした。

### Regulation of ergosterol biosynthetic genes in response to azole and morpholine fungicides in *Neurospora crassa*.

Moto Miyashita, Masayuki Kamei, Masakazu Takahashi, Akihiko Ichiishi and Makoto Fujimura

(Fac. of Life Sci., Toyo Univ.)

## P-58

### Histone deacetylase *HstD* と *LaeA* のジェネティックインタラクション

河内護之<sup>1,2</sup>, 廣瀬雅人<sup>1,2</sup>, 岩下和裕<sup>1,2</sup> (1 広島大院・先端研, 2 酒総研)

【背景】糸状菌は、多種多様な二次代謝物 (SM) を生産する為、SM 生産遺伝子やその制御機構が注目されている。この SM 生産遺伝子クラスターの制御に、ヒストン修飾遺伝子が関与することが近年示された。このような背景から、*Aspergillus oryzae* を用いて Histone deacetylase (HDAC) 遺伝子の破壊株を作成し、コウジ酸・ペニシリンをモデルとして SM 生産遺伝子クラスターの発現並びに SM 生産性への影響を解析した。その結果、酵母の *Hst4* ホモログである *HstD* が、SM 生産の抑制制御に関与することを新規に見出した。また、近年織田等により糸状菌の主要な SM 生産制御因子である *LaeA* が、コウジ酸生産を正に制御にすることが報告された。そこで、コウジ酸・ペニシリン生産制御をモデルに、二次代謝制御における *HstD* と *LaeA* のジェネティックインタラクションについて解析を行った。

【方法・結果】*HstD* と *LaeA* のジェネティックインタラクションの有無を明らかとするため、 $\Delta HstD \Delta LaeA$  株を作成し解析した。その結果、 $\Delta HstD$  バックグラウンドであるにも関わらず、 $\Delta LaeA$  株と同様のコウジ酸及びペニシリン生産性を示した。したがって、*HstD* は *LaeA* の制御を介し SM 生産を制御している事が示唆された。そこで、*HstD* と *LaeA* のエピスタティックな関係についてさらに検討するため、*LaeA* 高発現並びに  $\Delta HstD$  バックグラウンドでの *LaeA* の高発現を行った。その結果、 $\Delta HstD$  バックグラウンドでも、*OE::LaeA* 株と同様のコウジ酸及びペニシリン生産性を示した。したがって、*HstD* は *LaeA* 上流で作用することが明らかとなった。これまでに、*LaeA* のレギュレーターに関する報告はないことから、本研究は *LaeA* の制御因子に関する最初の報告である。

### Analysis of genetic interaction between *HstD* and *LaeA*

Moriyuki Kawauchi<sup>1,2</sup>, Masato Hirose<sup>1,2</sup>, Kazuhiro Iwashita<sup>1,2</sup>

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

## P-59

### ムギ赤かび病菌におけるトリコテセン生合成制御遺伝子 *Tri6* の分子生物学的解析

中嶋 佑一, 前田 一行, 市川 雛代, 小林 哲夫, 木村 真 (名大院生命農)

ムギ赤かび病菌 *Fusarium graminearum* はコムギなどの重要穀類に感染し赤かび病を引き起こすだけでなく、収穫後の穀粒を二次代謝産物のトリコテセン系毒素などのマイコトキシンで汚染する。本菌のトリコテセン生合成に関与する遺伝子群はクラスターを形成しており、これらの遺伝子群の発現はクラスター内遺伝子の *Tri6* によって制御される。現在ではトリコテセン生合成経路を構成する遺伝子群の大部分が同定され、また機能解析も進んでいるものの、制御因子である *TRI6* の諸性質に関してはいまだ不透明な部分が多い。

*F. graminearum* の遺伝子組み換えには抗生物質耐性遺伝子を選択マーカーとして利用する手法が一般的であるが、多重の遺伝子組み換えを行う際に選択マーカーの種類による制限を受ける点や、目的とする配列以外に選択マーカー発現カセットなどの外来遺伝子配列を組換え体の染色体上に残してしまうといった問題があった。そこで今回 *Tri6* を解析するにあたり、選択マーカー配列を染色体上に残さない組換え株の取得を目指し、*F. graminearum* において *HSV-tk* 遺伝子を用いたネガティブセレクション系を適用した。本ネガティブセレクション系を用いることで改変 *Tri6* のみが導入された変異株を作出することに成功し、トリコテセン生合成への影響を中心に *TRI6* 発現状況や翻訳語修飾の有無の調査など各種解析を行っている。

#### **Molecular analysis of *Tri6*, trichothecene biosynthesis regulatory gene in *Fusarium graminearum*.**

Yuichi Nakajima, Kazuyuki Maeda, Hinayo Ichikawa, Tetsuo Kobayashi, Makoto Kimura.

(Nagoya Univ.)

## **P-60**

### **糸状菌 *Coleophoma empetri* F-11899 株への人工アシラーゼ遺伝子の導入**

中谷 和也, 山田 雅人, 大内 卓也, 磯貝 泰弘, 橋本 正治 (富山県大・生物工)

深在性真菌症治療薬 micafungin (アステラス製薬) は糸状菌 *Coleophoma empetri* F-11899 株が生産する FR901379 のアシル側鎖を放線菌由来のアシラーゼを用いて脱アシル化し、最適化されたアシル側鎖を有機合成により化合させて生産されている。この製造工程は、*C. empetri* F-11899 株と放線菌の発酵培養と、脱アシル体を原料にした多段階工程で行われている。この多段階工程を簡略・効率化することができれば環境負荷やコスト削減が期待できる。そこで、これまでに本研究室では脱アシル体を直接生産できる *C. empetri* F-11899 株の取得を目的として、放線菌からアシラーゼ遺伝子をクローニングし、*C. empetri* F-11899 株に導入し、脱アシル体直接生産株の取得を試みた。しかしながら、脱アシル体の生産は確認できなかった。この原因として、放線菌由来アシラーゼ遺伝子配列は GC 含量が糸状菌のそれらと比べて高く、またコドンの選択性が放線菌とカビでは異なると考えられた。そこで、放線菌由来のアシラーゼ遺伝子配列を *C. empetri* F-11899 株のコドンに最適化した人工アシラーゼ遺伝子を作成し *C. empetri* F-11899 株に導入した。人工アシラーゼ遺伝子を発現プラスミドに導入し ATMT (*Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation) 法により形質転換した。現在、脱アシル体直接生産株のスクリーニングとアシラーゼの発現・活性について調査している。

#### **Gene transfer of artificial acylase gene into fungus *Coleophoma empetri* F-11899.**

Kazuya Nakaya, Masato Yamada, Takuya Ouchi, Yasuhiro Isogai, Seiji Hashimoto

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

## **P-61**



## 糸状菌の二次代謝産物生合成酵素の細胞内局在解析

伴 曉彦, 田中 瑞己, 新谷 尚弘, 五味 勝也 (東北大院・農・生物産業創成)

近年, 糸状菌や放線菌の生産する多種の二次代謝産物生合成に関わる遺伝子クラスターが次々に同定され, その中でも特に有用なものを高生産させようという動きが活発になっている。実際に麹菌 *Aspergillus oryzae* に異種の二次代謝産物遺伝子クラスターを導入することで目的の最終産物を生産できることも報告されている<sup>1)</sup>。一方, 効率的な二次代謝産物の生合成反応を考えると, 糸状菌のような真核生物では生合成が細胞質ではなく何らかのオルガネラ内で行われている可能性を考慮する必要がある。今後, 麹菌に異種の二次代謝系を導入し, 高生産させるためにはオルガネラ局在化の制御が重要であると考えられる。そこで本研究では, モデルとして植物病原菌 *Phoma betae* の生産する DNA polymerase 阻害剤であるアフィディコリンの生合成遺伝子クラスターの局在を解析することを目的とした。

各生合成酵素に GFP を融合させたタンパク質を麹菌で発現させ, 蛍光顕微鏡観察を行い, 融合タンパク質の局在を観察した。また, *P. betae* によるアフィディコリン生合成経路には微生物から動植物に至る生物界に広く分布するモノオキシゲナーゼである Cytochrome P450 が 2 種類存在するが, そのうち最終段階に関わる P450-1 の N 末端側にはシグナルペプチド様配列が存在することから, これらの除去による融合タンパク質の局在の変化についても観察を行った。続いて, 各オルガネラ特異的に存在するオルガネラマーカータンパク質等に RFP を融合させたタンパク質を麹菌内で共発現させ, 各生合成酵素の局在部位を同定した。

1) Fujii et al. *Biosci. Biotechnol. Biochem* (2011)

### Subcellular localization of biosynthetic enzymes for secondary metabolite in the filamentous fungus.

Akihiko Ban, Mizuki Tanaka, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi

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

## P-62

### 糸状菌 *Talaromyces stipitatus* 由来 MT ドメインを有するタイプ I 型 PKS の機能解析

橋元 誠<sup>1</sup>, 小林大祐<sup>1</sup>, 若菜大悟<sup>2</sup>, 合田幸広<sup>2</sup>, 藤井 勲<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>岩手医科大・薬, <sup>2</sup>国立衛研・生薬)

スチピタチン酸生産菌 *Talaromyces stipitatus* には, スチピタチン酸前駆体である 3-methylorcinaldehyde (MO) 生産のポリケタイド合成酵素 (PKS) をコードする Ts0002pks 遺伝子に加え, Ts0002PKS と同様にメチルトランスフェラーゼ (MT) ドメインをもつ非還元型 NR-PKS をコードする 3 つの遺伝子が存在することがゲノム解析より明らかになっている。このうち, Ts0021pks は  $\alpha$ -アセチル MO を合成する NR-PKS をコードする遺伝子であることをすでに報告した<sup>1)</sup>。今回, 残された機能未確認の 2 つの MT 含有 NR-PKS 遺伝子のうち, Ts0058pks について, *Aspergillus oryzae* での異種発現による機能解析を試みたので報告する。

Gateway 法により Ts0058pks 遺伝子を *amyB* プロモーター下に組み込んだ発現プラスミド pTA-Ts0058pks を構築し, *A. oryzae* M-2-3 に形質転換, 導入した。形質転換体を 3 日間誘導培養後, 培養液を HPLC にて分析した結果, pTA-Ts0058pks 形質転換体においてコントロールには見られない化合物の生産が確認された。その単離, 構造解析を行った結果, トリヒドロキシナフタレン環にアセチル基とメチル基をもつ新規ヘキサケタイドとその酸化体であることが確認された。Ts0058PKS は, Ts0002PKS や Ts0021PKS と同様のドメイン構成をもつ NR-PKS でありながら, 炭素鎖長がさらに伸長した生成物を与える PKS と考えられ, これらの PKS における炭素鎖長およびメチル基導入の制御機構に興味を持たれる。

1) 橋元誠, 藤井勲, 第 10 回糸状菌分子生物学コンファレンス要旨集, p.34

### Functional analysis of type I polyketide synthase genes containing MT domain from *Talaromyces stipitatus*

Makoto Hashimoto<sup>1</sup>, Daisuke Kobayashi<sup>1</sup>, Daigo Wakana<sup>2</sup>, Yukihiro Goda<sup>2</sup>, Isao Fujii<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>School of Pharmacy, Iwate Med. Univ., <sup>2</sup>Natl. Inst. Health Sci.)

## P-63

### *Penicillium purpurogenum* による *Monascus* 色素同族体生産能の多様性解析

荻原淳, 梅村彩良, 小嶋涼, 小金井霞, 新居鉄平, 加藤順, 春見隆文 (日大・生物資源・生命化学)

我々は、東アジアにて発酵微生物として利用されてきた子の菌 *Monascus* と不完全子の菌 *Penicillium* の生産する共通した二次代謝産物について解析している。不完全菌 *Penicillium* の有性世代は次第に明らかにされつつあるが、*Penicillium* と子の菌 *Monascus* の間の生殖世代と代謝産物生合成遺伝子の水平伝播との関連性は不明である。そこで、本研究では *Penicillium purpurogenum* における *Monascus* 色素同族体生産能の多様性を解析した。また、*Penicillium purpurogenum* のもつ *Monascus* 色素同族体生合成関連遺伝子およびその遺伝子産物の検索を行った。さらに、これら遺伝子の *Penicillium*, *Monascus* 間における水平伝播の可能性を検証するために *Penicillium purpurogenum* における交配型遺伝子の検索を行った。8 種類の *Penicillium purpurogenum* を用いて色素生産能を確認した。その結果、色素生産量に違いがあるものの 6 菌株において 12-carboxyl-monascorubramine, 12-carboxyl-monascorubrin の生産を確認した。色素生産しないものや、特徴的な窒素代謝能を持つ 2 菌株を確認した。当研究室において解析した *Penicillium purpurogenum* のゲノムドラフトシーケンスを用いて *Aspergillus*, *Penicillium* 等の糸状菌から見出されている既知の polyketide synthases の塩基配列情報を基に、本糸状菌の polyketide synthases 遺伝子の検索を local BLAST search により検索した。その結果、約 20 個の polyketide synthases 遺伝子の存在を確認した。さらに、同様に本糸状菌のゲノムドラフトシーケンスを用いて既知の糸状菌由来交配型遺伝子塩基配列情報を基に、交配型遺伝子の検索を行った。その結果、MAT 1-2 遺伝子と相同性の高い遺伝子の存在を確認した。

#### Analysis of the diversity of *Monascus* pigment homologues productivity by *Penicillium purpurogenum*

Jun Ogihara, Sara Umemura, Ryo Kojima, Kasumi Koganei, Teppei Arai, Jun Kato and Takafumi Kasumi (Dept. of Chem. Life Science, Nihon Univ.)

## P-64

### *Aspergillus fumigatus* ゲノム解読株 Af293 におけるフミトレモルジン非生産性の原因遺伝子の同定

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

フミトレモルジンは病原性糸状菌 *Aspergillus fumigatus* の生産するマイコトキシンである。ゲノム解読が契機となり、その生合成遺伝子 (*fm*) クラスターが同定された。しかしながら、ゲノム解読株 Af293 株において *fm* クラスターは不活性化していると報告された。このため、生合成経路の全貌解明が困難であった。そこで、我々はフミトレモルジン生産株である BM939 株を用いることで、生合成経路の解析を行ってきた。

本研究では、Af293 株で報告されているフミトレモルジン生産欠損の遺伝的要因の同定を目的として、*fm* クラスターの塩基配列比較、発現解析、および Af293, BM939 の両株の代謝産物プロファイル比較を行った。遺伝子発現に大差の無いことから、代謝産物生産の違いを引き起こす遺伝的要因として、メチル基転移酵素をコードしている *fmD* 遺伝子中の点変異に着目した。BM939 株由来の *fmD* を含む DNA 断片を Af293 株に導入したところ、フミトレモルジン生産の回復が認められた。大腸菌で発現させた組換え FtmD を用いた生化学的解析から、点変異によって引き起こされるアミノ酸置換により、FtmD の酵素活性が生理的条件下では機能できないまでに低下しており、結果として Af293 株ではフミトレモルジン生合成経路が FtmD のステップで遮断されていることを明らかにした。

#### A point mutation of *fmD* blocks the fumitremorgin biosynthetic pathway in *Aspergillus fumigatus* Af293

Naoki Kato<sup>1</sup>, Hirokazu Suzuki<sup>1</sup>, Hideo Okumura<sup>2</sup>, Shunji Takahashi<sup>1</sup>, Hiroyuki Osada<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Chemical Biology Dept., RIEKN ASI, <sup>2</sup>JASRI)

## P-65

### イネいもち病菌の二成分情報伝達系攪乱による PK-NRP 融合化合物生産誘導

尹忠鉄, 本山高幸, 林敏明, 廣田洋, 長田裕之 (理研基幹研・ケミカルバイオロジー)

【目的】糸状菌ゲノム中に予想以上に膨大な数の二次代謝遺伝子が存在することが明らかになってきたが、ほとんどは実験室条件では休眠状態にあり、利用することができない。情報伝達系を攪乱することにより、二次代謝遺伝子を活性化して、膨大な数の二次代謝遺伝子を活かすことを可能にすることを目指している。今回、二成分情報伝達系を攪乱することにより、固体培養条件では液体培養条件とは異なる化合物の生産誘導が可能であることを報告する。

【方法と結果】二成分情報伝達系下流で働く p38 MAPキナーゼ Osm1 の遺伝子破壊株および、Osm1 と二成分情報伝達系の HPt の二重遺伝子破壊株を用いて解析を行った。Osm1 遺伝子破壊株の固体培養条件で、ポリケタイド-非リボソームペプチド (PK-NRP) 融合化合物であるテヌアゾン酸の生産が誘導された。テヌアゾン酸は *Alternaria* 属糸状菌等が生産するマイコトキシンであり、タンパク質合成を阻害する。また、抗腫瘍活性などの生理作用も報告されている。Osm1 遺伝子破壊によるテヌアゾン酸生産誘導とエピジェネティックな制御との関連を解析するために、野生型株をヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (SAHA) と DNA メチル化阻害剤 (5-azacytidine) で処理したが、生産誘導は認められなかった。この結果から、Osm1 遺伝子破壊株では、これらの化合物による生産誘導とは異なるメカニズムで生産誘導されていることが示唆された。

本研究の一部は、生研センターイノベーション創出事業による支援を受けた。

### Induced production of a PK-NRP hybrid compound by disturbance of the two-component signal transduction system in the rice blast fungus

Choong-Soo Yun, Takayuki Motoyama, Toshiaki Hayashi, Hiroshi Hirota, Hiroyuki Osada

(Chem. Biol., RIKEN ASI)

## P-66

### 牧草共生糸状菌 *Epichloë festucae* の宿主植物への全身的感染における低分子量 G タンパク質 Cdc42 の役割

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育成し、共生関係を確立する糸状菌エンドファイトである。本菌は宿主植物内において、菌糸先端ではなく菌糸の中間が伸長することで、宿主植物と同調した菌糸育成を可能としていることが報告されている。これまでに、エンドファイトの活性酸素生成酵素 NoxA が宿主との共生関係を確立するために必要であること、NoxR と低分子量 G タンパク質 RacA が NoxA の活性化因子として共生確立に関与していることが解っている。noxA, noxR および racA 破壊株は宿主植物内で過剰な菌糸育成を示して植物を枯死させてしまうため、宿主植物との同調した菌糸生育に必要であると考えられる。これまでに、RacA と高い相同性を示す Cdc42 の機能を RacA と比較解析し、RacA と Cdc42 がそれぞれ NoxR と BemA という異なる Nox 複合体構成因子と結合すること、racA 破壊株が感染した宿主植物は矮化・枯死するのに対し、cdc42 破壊株が感染した植物は健全に生育できることを報告してきた。今回、cdc42 破壊株に GFP を発現させ、宿主植物内での菌糸生育を詳細に観察したところ、野生株では宿主植物と同調した菌糸の進展が宿主植物の全身で観察されるのに対し、cdc42 破壊株では葉身基部において菌糸が断片化しており、葉身上部において菌糸が検出されなかった。この結果より、cdc42 破壊株は菌糸細胞の中間伸長を行うことができなくなったことで、宿主植物への全身的な感染能を失っていることが示唆された。

### Function of small G protein Cdc42 in intercalary hyphal growth of fungal endophyte *Epichloë festucae* in host plant

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

## P-67

### Isolation of a gene involved in the growth inhibition of grass pathogens by fungal grass

## endophyte *Epichloë festucae*

Jennifer Niones, Takushi Hashikawa and Daigo Takemoto (Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University)

While much has been reported on the ability of endophyte to protect its host from pathogens, the mechanisms of fungal endophyte in plant protection against pathogens are least understood. In this study, we screened for *Epichloë festucae* isolates, which could inhibit the mycelial growth of grass pathogens in axenic culture. One of the isolates, Ef437, significantly inhibits the mycelial growth of several grass pathogens. Through restriction enzyme-mediated integration (REMI) mutagenesis of this isolate, we identify several mutants that have lost its ability to inhibit the pathogen. One of the mutants, 830, contains plasmid insertion in the promoter region of a transcription factor Vib-1. In *Neurospora crassa*, Vib-1 is known as a transcriptional regulator that is essential for the expression of the genes involved in non-self recognition and promotion of cell death. Confocal microscopy of GFP under the control of *vib-1* promoter introduced in *E. festucae* revealed that expression of *vib-1* is induced only in endophyte mycelia, which has an encounter with the pathogens.

## P-68

### 担子菌酵母 *Cryptococcus neoformans* の DBB 染色反応と *PMT2* 遺伝子の関与

清水公徳, 今西由巳, 川本進 (千葉大・真菌センター)

担子菌酵母と子嚢菌酵母は, ジアゾニウムブルーB (DBB) 染色により区別される。すなわち, DBB の添加により担子菌酵母のコロニーは赤色を呈するのに対し子嚢菌酵母のそれは染色されないが, そのメカニズムは不明である。本研究では, DBB による染色メカニズムについて分子遺伝学的アプローチを試みた。

病原性担子菌酵母 *Cryptococcus neoformans* 野生型株 B4500 に *Agrobacterium* ランダム挿入変異処理を施した。出現したハイグロマイシン耐性コロニーおよそ 10,000 個から DBB 染色陰性あるいは呈色減弱株 20 個を選抜した。戻し交配によりハイグロマイシン耐性と DBB 染色に関する表現型が連鎖した株をスクリーニングした結果, DBB 染色陰性を示す DBB14 株を得た。TAIL-PCR 法により DBB14 株のゲノムに挿入された T-DNA 断片の周辺部位を増幅し, その塩基配列を決定, 解析したところ, CNJ01930 (*PMT2*) とタグされた遺伝子に T-DNA の挿入が認められた。本遺伝子の翻訳産物は protein-O-mannosyltransferase と高い相同性を有していた。*PMT2* 遺伝子破壊株を構築し DBB 染色試験を行ったところ, DBB14 株と同様に DBB 染色陰性を示したことから, *C. neoformans* において *PMT2* 遺伝子は DBB 染色反応に不可欠であることが明らかとなった。

### *Cryptococcus neoformans* *PMT2* gene is required for DBB staining

Kiminori Shimizu, Yumi Imanishi, Susumu Kawamoto

(Medical Mycology Res. Cent., Chiba Univ.)

## P-69

### 病原性真菌 *A. fumigatus* を弱毒化するマイコウイルスの探索とその性状解析

八原美沙<sup>1</sup>, 高橋梓<sup>2</sup>, 森山裕充<sup>3</sup>, 五ノ井透<sup>2</sup> ( <sup>1</sup>千葉大学・医学薬学府, <sup>2</sup>千葉大・真菌センター, <sup>3</sup>農工大)

アスペルギルス症は、主に *Aspergillus fumigatus* によって引き起こされる。同菌は呼吸器疾患およびアレルギーの原因となるほか、全身に感染して重篤化する。しかし医薬用抗真菌薬は種類が極端に少なく、薬剤耐性菌の出現といった問題を抱えており、新たな薬剤の開発が強く望まれている。そこで *A. fumigatus* の弱毒化に関与することが期待されるマイコウイルスを探索し、抗真菌薬として応用を目指す。これまでに、*A. fumigatus* のマイコウイルスは *partitivirus* (AfuPV-1) と *chrysovirus* (AfuCV) の 2 種がすでに報告されているが、病原性抑制効果のあるウイルス株は見つかっていない。

我々は、国内で分離された *A. fumigatus* 44 株(臨床分離株および環境分離株)から、dsRNA を精製することにより、4 株のマイコウイルス保有株を検出した。得られたウイルスはそのバンドパターンから、1. *partitivirus*, 2. 配列未決定種, 3. *chrysovirus* と配列未決定種の 2 重感染株, 4. *chrysovirus* に近い新種、であることが推測された。そこで次世代シーケンサー(Roche 社 GS junior)を用い、ウイルスのゲノム配列の決定を試みた。

次に、単胞子分離法によりウイルスフリー株の作製を行った。得られたウイルスフリー株はウイルス保有株と、形態・生育速度・浸透圧耐性・薬剤耐性などの表現型を比較した。最後に、マウスにそれぞれの株を経気道感染させ、ウイルスフリー株とウイルス保有株との病原性を比較した。当日は、これらの結果について報告する。

### Isolation and characterization of 4 Mycoviruses in opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus*

Misa Yahara<sup>1</sup>, Azusa Takahashi-Nakaguchi<sup>2</sup>, Hiromitsu Moriyama<sup>3</sup>, Tohru Gono<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Grad. School of Medical and Pharm. Sci., Chiba Univ., <sup>2</sup>MMRC, Chiba Univ., <sup>3</sup>Tokyo Univ. of Agric. & Tech.)

## P-70

### イネいもち病菌における DNA 二本鎖切断誘導系を用いた遺伝的変異機構の解析と遺伝子ターゲティング法への応用

荒添貴之, 用之丸哲也, 大里修一, \*有江力, 桑田茂 (明治大農・\*農工大農)

イネいもち病菌 (*Magnaporthe oryzae*) はイネの重要病原菌であり、本菌の進化機構の解明や病原性関連遺伝子の探索は重要な課題である。DNA 二本鎖切断 (DSBs) 修復経路の一つである非相同末端結合 (NHEJ) の関連遺伝子を破壊した変異株は、分生子形成能や病原性を保持したまま非常に高い頻度で遺伝子破壊が可能となることが報告されている (Fungal Genet. Biol. 2007 45; 68-75)。このことは、破壊株のもう一つの DSBs 修復経路である相同組換え (HR) 修復系が本病菌の病原性や遺伝子ターゲティング機構において重要な役割を担うことを示唆している。我々は現在までに本菌の HR がストレス環境下におけるゲノム応答として機能すること、新たな病原性獲得に寄与することを実証しており、18 塩基認識の制限酵素遺伝子 I-Sce I を用いた人為的 DSBs 導入系の確立に成功している (平成 23, 24 年度)。そこで相同配列の有無による DSBs 修復様式の解析をおこない、その知見を遺伝子ターゲティング法へ応用した。相同配列を持たない系統において DSBs の導入により広範囲 (約 4000 bp ~) の欠失が高い割合で生じるのに対して、相同配列を有する系統では欠失の割合が減少し、大幅に HR 修復の割合が上昇することを見出した。また、約 15 bp 間隔で silent mutation を挿入し、印をつけた相同配列を用いることで、本菌の HR は切断部位近傍 (約 100 bp) において生じ易いことを明らかにした。以上の結果から、本菌の HR は DSBs により誘導され、ゲノム内に散在するエクソピックな相同配列を鋳型とすることで、ゲノムの安定化と多様性の創出との双方に貢献していることが考えられた。遺伝子ターゲティング法への応用では、標的遺伝子内に DSBs を導入することでその効率が約 100 倍程度まで向上し、供給する相同配列は環状プラスミドを用いてもその効率を維持できることを確認した。

### Artificial DSBs induce various genetic variations and their application in gene targeting in Rice blast fungus

Takayuki Arazoe, Tetsuya Younomaru, Shuichi Ohsato, \*Tutomu Arie, Shigeru Kuwata

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

## P-71

### イネいもち病菌を用いたクロラムフェニコールの新規作用点の探索

西脇綾香, 井上雅高, 後藤麻紀子, 鎌倉高志 (東理大院理工・応生)

イネいもち病菌は感染の際に必須な器官である付着器を形成する。この付着器形成という現象は、真核生物において最も単純な細胞分化のモデルの一つであると考えられる。細胞分化プロセスには一般に多くの遺伝子が関与しており、それだけ阻害されるポイントも多いことが知られている。そのため、本菌の付着器形成が各種の細胞内因子を阻害する化合物に対して非常に鋭敏に反応する実験系として利用が可能であると考えた。本研究は、このような実験系を用いて、各種化合物の新たな作用を探索し、その分子標的を同定することを目的としている。本菌に様々な既知の薬剤を作用させたところ、原核生物のタンパク質合成を阻害する抗生物質クロラムフェニコール (Chloramphenicol : Cm) が、付着器形成を特異的に阻害した。本菌は真核生物であることから、本菌に対する Cm の新規作用点が存在することが示唆された。また、Cm はヒトに対しても作用点未知の強い副作用を示すことから、Cm が真菌とヒトとで共通の作用点に作用している可能性も考えられる。そこで新規作用点の探索を目的として、Cm と結合すると思われる標的候補ペプチドの T7 フェージディスプレイ法による取得を試みた。その結果、ホスファターゼ様タンパク質の一部と相同性の高い標的候補ペプチド配列を取得した。このタンパク質をコードしている遺伝子を本菌において過剰発現させ、野生株では付着器形成を阻害する濃度の Cm を作用させたところ、付着器形成能が回復した。この回復が Cm の濃度依存的に弱まったことから、このタンパク質が本菌における Cm の標的であることが示唆された。現在、この遺伝子に注目しさらに解析を進めている。

#### **Search for the novel molecule target(s) of Chloramphenicol in *Magnaporthe oryzae*.**

Ayaka Nishiwaki, Masataka Inoue, Makiko Goto, Takashi kamakura (Tokyo Univ. of Sci.)

## **P-72**

### **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* の機能解析**

吉田翔, 黒木美沙, 大野優子, 中嶋佑一, 鎌倉高志 (東理大院理工・応生科)

イネいもち病菌 *Magnaporthe oryzae* は宿主植物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や、クチクラワックスなどの植物由来成分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。*CBPI* の機能を探るため遺伝子破壊株を作製しその形質を調べたところ、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野生株と比べ顕著に低下したが、植物由来成分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ため、*CBPI* は物理的シグナルの認識に関与すると考えられた。また、極親水性人工固体基質上において野性株では植物由来成分存在下で付着器を形成するのにに対し、*CBPI* 遺伝子破壊株では付着器をほとんど形成しなかった。このことから、*CBPI* は物理的シグナルのうち、疎水性ではなく硬度によって誘導される付着器形成シグナルに関与していると推測された。さらに、PKC の活性化因子であるジアシルグリセロールによる付着器形成への影響の観察の他、キチンデアセチラーゼとしての機能の検証を行った結果、*CBPI* は細胞壁成分であるキチンを脱アセチル化する働きを持ち、硬度の認識によって PKC 経路を活性化することによって付着器形成を誘導する、という可能性が示された。

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

Sho Yoshida, Misa Kuroki, Yuko Ohno, Yuichi Nakajima, Takashi Kamakura

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

## **P-73**

### **コムギいもち病菌のエンバクに対する非病原力遺伝子 *PAT1* のマッピング**

森亮太, 井上喜博, 中馬いづみ, 土佐幸雄 (神戸大院・農学研究科)

イネ科栽培植物いもち病菌(*Magnaporthe oryzae*)には、植物属レベルで寄生性が分化したいくつかの菌群が存在する。我々はこれまでに、コムギ菌・エンバク菌がコムギ・エンバクに対して示す特異的寄生性の解析を行い、エンバク菌のコムギに対する非病原性遺伝子 *PWT3*, *PWT4* の座乗領域を約 30kb 以下の領域に絞り込むことに成功している。一方、逆方向の非病原性、すなわち、コムギ菌のエンバクに対する非病原性は、単一非病原性遺伝子 *PATI* によって支配されていることが明らかとなっている (Oh et al. 2002)。今回は、*PATI* の単離に向けて、そのマッピングを試みたので報告する。まず、*PATI* をもつコムギ菌 Br48 と *PATI* をもたないエンバク菌 Br58 を交配して得た F<sub>1</sub> 集団から *PATI* 保有菌系 (菌系 76Q1) を選抜し、Br58 と戻し交雑することにより *PATI* 分離 BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 集団 (80 菌系) を作出した。これらをエンバク品種 (cv. Shokan, Pc-38) に接種したところ、非病原性菌系と病原性菌系の分離比が 1:1 に適合した。この結果をもとに、BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 80 菌系における *Pat1* 座の遺伝子型を決定した。続いて、SSR マーカーを用いた bulked segregant analysis を行い、四つの *PATI* リンクマーカー (MGM82, MGM83, MGM224, MGM433) を見出した。80 菌系からなる *PATI* 分離集団を用いて分離分析を行った結果、これらが *PATI* と連鎖することが確認された。SSR マーカー MGM82, MGM83, MGM224, MGM433 は、Zheng et al. (2008) において第三染色体にマッピングされていることから、*PATI* は第三染色体に座乗することが示唆された。

#### **Molecular mapping of *PATI*, an avirulence gene of *Triticum* isolates of *Magnaporthe oryzae* on oat.**

Ryota Mori, Yoshihiro Inoue, Izumi Chuma, Yukio Tosa (Graduate School of Agricultural Science, Kobe Univ.)

## **P-74**

### **感染中のいもち病菌が分泌する AVR-Pia タンパク質はごく微量である**

佐藤佑樹<sup>1</sup>, 尾瀬農之<sup>2</sup>, 寺内良平<sup>3</sup>, 曾根輝雄<sup>1</sup> (1 北大農院・応生科, 2 北大薬院・創薬, 3 岩手生工研)

イネいもち病菌は感染時にエフェクタータンパク質や非病原性タンパク質を分泌するが、その分泌量やイネ側の認識に必要な量などについての報告はなされていない。そこで、非病原性タンパク質 AVR-Pia の分泌量を定量するため、組換えタンパクと特異的な抗体の作成を試みた。大腸菌を用いて発現させた組換え AVR-Pia (rAVR-Pia) を、抵抗性遺伝子 *Pia* を持つイネの葉に有傷接種したところ、過敏反応様の褐変が観察された。また、rAVR-Pia を接種した *Pia* イネ葉で処理後 24 時間までに抵抗性関連遺伝子 *PR12* (Mitsuhashi I. et al., 2008) の発現誘導が認められた。

rAVR-Pia を利用して作成した抗 AVR-Pia 抗体の特異性を検証した。その結果、抗 AVR-Pia 抗体はいもち病菌由来の天然 AVR-Pia を特異的に認識した。また、ECL 法によって検出されたバンドの発光量からいもち病菌が感染時に分泌する AVR-Pia を定量したところ、葉鞘新鮮重 1g あたり約 0.47ng ( $6.45 \times 10^{-2}$  pmol) であった。

これらの結果から rAVR-Pia は *Pia* イネに認識されうる正しい構造を持ち、抵抗反応を誘導することが示唆された。親和性イネ感染時の AVR-Pia 分泌量が定量できたことで *Pia* イネが感染初期のごく微量の AVR-Pia を認識し、抵抗反応を誘導していることが明らかとなった。また、抗 AVR-Pia 抗体が天然 AVR-Pia を特異的に認識することから、これまで観察が困難だった、非親和性イネにおける抵抗反応誘導時の AVR-Pia の動態や局在を、免疫染色によって可視化できる可能性が示された。

#### **A trace amount of AVR-Pia protein is secreted from *Magnaporthe oryzae* during infection**

Yuki Sato<sup>1</sup>, Toyoyuki Ose<sup>2</sup>, Ryouhei Terauchi<sup>3</sup> and Teruo Sone<sup>1</sup>

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

## **P-75**

イネいもち病菌マイコウイルス由来弱毒化タンパク質が宿主細胞に及ぼす生育阻

## 害メカニズムのパン酵母を利用した解析

太田智子<sup>1</sup>, 浦山俊一<sup>1</sup>, 福原敏行<sup>1</sup>, 有江力<sup>1</sup>, 寺岡徹<sup>1</sup>, 高橋梓<sup>2</sup>, 東江昭夫<sup>2</sup>, 五ノ井透<sup>2</sup>, 森山裕充<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>東京農工大院・生物制御科, <sup>2</sup>千葉大・真菌センター)

*Magnaporthe oryzae* chrysovirus1 (MoCV1)はイネの重要病害菌であるイネいもち病菌に感染し、生育阻害や弱毒化を引き起こすマイコウイルスである。MoCV1の5つのタンパク質をそれぞれパン酵母で発現させると、dsRNA4 ORFを過剰発現した酵母細胞では、液胞の肥大化や細胞質の顆粒化といった形態異常や、生育不良が観察された。さらに微生物培養装置を用いて、ORF4単独のコンストラクトと、dsRNA4全長のコンストラクトをそれぞれ導入した酵母を培養し、細胞数を表す吸光度の増加速度や生菌細胞数の推移、細胞形態の異常をそれぞれ観察したところ、ORF4単独導入株よりもdsRNA4全長導入株の方がより強い生育阻害を示した。微生物培養装置で18時間、30時間培養した酵母サンプルからそれぞれRNAを抽出し、次世代シーケンサー(Illumina社 MiSeq)を用いてORF4導入による酵母細胞の遺伝子発現変化を調べた。その結果、各培養時間のORF4、dsRNA4全長導入酵母でそれぞれ発現量が上昇・下降している遺伝子が多数認められた。そこでdsRNA4配列に含まれる5'及び3'UTR配列中に、転写や翻訳促進領域、またはmRNA安定化領域などが存在するかについても解析を進めている。

### Analysis of growth inhibition mechanism caused by the ORF4 protein of *Magnaporthe oryzae* chrysovirus1.

Tomoko Ohta<sup>1</sup>, Syunichi Urayama<sup>1</sup>, Toshiyuki Fukuhara<sup>1</sup>, Tsutomu Arie<sup>1</sup>, Tohru Teraoka<sup>1</sup>, Azusa Takahashi-Nakaguchi<sup>2</sup>, Tohru Gono<sup>2</sup>, Akio Tohe<sup>2</sup>, Hiromitsu Moriyama<sup>1</sup>.

(<sup>1</sup>Dept. Appl. Biol. Sci., Tokyo Univ. of Agric. and Tech., <sup>2</sup>MMRC, Chiba Univ.)

## P-76

### *Alternaria alternata* N18株に生育阻害を引き起こすマイコウイルスのゲノム解析とAK毒素産生に及ぼす影響調査

竹下佳那<sup>1</sup>, 岡田亮<sup>1</sup>, 福原敏行<sup>1</sup>, 有江力<sup>1</sup>, 寺岡徹<sup>1</sup>, 江草真由美<sup>2</sup>, 児玉基一朗<sup>2</sup>, 森山裕充<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>農工大院・農, <sup>2</sup>鳥取大院・農)

*Alternaria alternata* N18株はニホンナシに病原性で、胞子発芽時にAK毒素(デカトリエン酸エステル)を分泌して感染葉に黒斑症状を引き起こす。N18株は二本鎖RNAをゲノムとするマイコウイルスに感染しており、ウイルス感染株はウイルスフリー化株と比べて顕著な生育阻害を示す。ウイルス感染株とフリー化株の病原性を検定したところ、感染株はフリー化株よりも激しい病斑をナシ葉に引き起こした。そこで宿主菌に生育阻害を引き起こす因子の同定を目的に、N18株マイコウイルスの塩基配列を解析した。本ウイルスは5分節のゲノムを有し、RdRp領域における分子系統解析の結果、イネいもち病菌弱毒化マイコウイルスMoCV1(*Magnaporthe oryzae* chrysovirus 1)と近縁であることが判明した。また、RNA2のORFタンパク質は、MoCV1において宿主に生育阻害を引き起こすORF4タンパク質と高い相同性を示したことから、このタンパク質がN18株の生育阻害に関与していることが示唆された。さらに、ウイルス感染のAK毒素産生量に及ぼす影響を調べるため、HPLCを用いてウイルス感染株とフリー化株の分生子発芽液中のAK毒素の定量を試みている。

### Sequence analysis of mycovirus attenuating *A.alternata* strain N 18 and analysis of AK toxin production

Kana Takeshita<sup>1</sup>, Ryo Okada<sup>1</sup>, Toshiyuki Fukuhara<sup>1</sup>, Tsutomu Arie<sup>1</sup>, Tohru Teraoka<sup>1</sup>, Mayumi Egusa<sup>2</sup>, Motoichiro Kodama<sup>2</sup>, Hiromitsu Moriyama<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Faculty of Agric., Tokyo Univ. of Agric.& Tech. <sup>2</sup> Faculty of Agric., Tottori Univ.)

## P-77

キャベツ萎黄病菌におけるSIX4の機能はトマト萎凋病菌と同じか？



柏 毅, 稲見 圭悟<sup>1</sup>, 藤永 真史<sup>2</sup>, 小木曾秀紀<sup>2</sup>, 寺岡 徹, 有江 力 (農工大院連農,<sup>1</sup>現ブリヂストン中研,<sup>2</sup>長野野花試)

*SIX4* はトマト萎凋病菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol*) レース 1 とキャベツ萎黄病菌 f. sp. *conglutinans* (*Foc*) のみが保持し、宿主植物への感染時に発現される (柏ら 2010)。*Fol* レース 1 の *SIX4* を破壊すると、萎凋病抵抗性品種 (*I*) に感染できるようになることから、*Fol* では *SIX4* は非病原力遺伝子として機能している (Houterman 2008)。*Fol* と *Foc* の *SIX4* は、遺伝子周辺を含む約 2 kb の塩基配列が 99% 一致しており、いずれの *SIX4* も約 2 Mb の小型染色体に座乗していた。そこで、*Foc* の *SIX4* が *Fol* の *SIX4* と同様の機能を有するのか、*Foc* の *SIX4* (*FocSIX4*) を二回相同組換え法によって破壊して解析した。 $\Delta FocSIX4$  株は萎黄病抵抗性 (YR) キャベツ品種の抵抗性を打破せず、逆に YR 品種だけでなく感受性品種でも病原力が低下した。また、 $\Delta FocSIX4$  株の病原力は *FocSIX4* の相補によって復帰した。以上から、*FocSIX4* はキャベツ萎黄病菌では病原力に関与することが明らかとなり、トマト萎凋病菌における機能 (非病原力) とは異なった。緑色蛍光タンパク質遺伝子を導入してキャベツ根部での感染挙動を観察すると、 $\Delta FocSIX4$  株のキャベツ根部への侵入は親株 Cong:1-1 株よりも遅延したことから、*FocSIX4* が感染初期段階における病原力に関与していることが示唆された。

#### ***SIX4* in the cabbage yellows fungus plays different role than in the tomato wilt fungus**

Takeshi Kashiwa, Keigo Inami<sup>1</sup>, Masashi Fujinaga<sup>2</sup>, Hideki Ogiso<sup>2</sup>, Tohru Teraoka, Tsutomu Arie

(Grad. Sch. Agric. Sci., Tokyo Univ. of Agric. & Tech.,<sup>1</sup>Present address: Central Res. Bridgestone Corp.,<sup>2</sup>Nagano Veg. and Ornam. Crop. Exp. Stn.)

## **P-78 (O-18)**

### **出芽酵母の Spindle Position Checkpoint (SPOC)構成要素はウリ類炭疽病菌において付着器分化過程における適切な細胞周期の進行に関与する**

深田史美<sup>1</sup>, 坂口 歩<sup>2</sup>, 久保康之<sup>1</sup> (京都府大院・生環<sup>1</sup>、生物研<sup>2</sup>)

ウリ類炭疽病菌はウリ科植物に炭疽病を引き起こす植物病原糸状菌である。本菌は感染過程において分生胞子の先端部での付着器形成、侵入菌糸の宿主内成長といった一連の形態形成を伴い、感染を成立させる。我々はこれまでにアグロバクテリウム形質転換法により、ウリ類炭疽病菌の付着器形成欠損変異株 *coQ-1* を得ている。*coQ-1* の破壊候補遺伝子における推定コードアミノ酸配列は、出芽酵母の *BUB2* と高い相同性を示し、このホモログ遺伝子を *CoBUB2* と命名した。出芽酵母の *BUB2* は、細胞分裂制御に関与する Spindle Position Checkpoint (SPOC) の構成要素である。*CoBUB2* の遺伝子破壊実験を行った結果、*cobub2* 破壊株は付着器の形態異常、宿主植物への病原性低下を示した。そこで、*cobub2* 破壊株における核分裂の挙動を解析するため、付着器分化過程での核局在および紡錘体観察を行った。その結果、野生株では培養開始4時間後、付着器形成に伴い紡錘体が出現し核分裂が行われるのに対し、*cobub2* 破壊株では培養開始2時間後の未発芽胞子において核分裂が行われ、2核となる胞子の割合が顕著に増加した。そこで、付着器分化過程における細胞周期を検討するため、S期阻害剤およびM期阻害剤を用いて核分裂を観察した結果、破壊株でのG1/S期の移行時期が、野生株と比較して約2時間早まることが認められた。以上より、ウリ類炭疽病菌の付着器分化過程において、*CoBUB2* はG1期の維持、あるいはS期の適切な開始時期に関与しており、M期の制御因子である出芽酵母の *BUB2* とは異なる機能を有する可能性が示唆された。

#### **Spindle Position Checkpoint (SPOC) component in *Saccharomyces cerevisiae* is involved in proper cell cycle progression during appressorium development in *Colletotrichum orbiculare***

Fumi Fukada<sup>1</sup>, Ayumu Sakaguchi<sup>2</sup>, Yasuyuki Kubo<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Life and Environmental Sciences, Kyoto Prefectural Univ.,<sup>2</sup>National Institute of Agrobiological S

## **P-79**

### **ウリ類炭疽病菌における低分子量 G タンパク質 CoCdc42, CoRac1 の機能解析**

分裂酵母において細胞端マーカータンパク質 TEA1 が細胞極性の制御に関与することが知られている。これまでにウリ類炭疽病菌において TEA1 ホモログ CoKEL2 の破壊株が人工基質上で側部発芽をする異常な付着器を形成することを明らかにしている。本菌の感染器官分化と細胞極性制御の関連について明らかにすることを目的として今回、酵母における極性形成の主要な制御因子である低分子量 G タンパク質 Cdc42 のホモログ遺伝子をウリ類炭疽病菌より 2 種単離 (*CoCdc42*, *CoRac1* と命名) し、その破壊株の性状解析を行った。*cocdc42* 破壊株は培地上でのコロニー生育にやや遅延が見られ、また分生子形成量も低下した。宿主キュウリ葉への接種試験の結果、野生株と比較して病斑形成能の低下が認められた。そこで破壊株の感染器官形成能について調べたところ、胞子は長楕円型の異常形態を示し、発芽の遅延や発芽部位の異常が認められた。しかしながら、発芽後は宿主への侵入能を有する付着器を形成した。以上のことから *CoCdc42* は細胞極性の制御に必須の因子ではないが、欠損により多面的な異常が生じることが明らかとなった。一方、*corac1* 破壊株のコロニー生育は野生株や *cocdc42* 破壊株と比較して顕著に遅延し、異常なコロニー形態を示した。現在、*CoCdc42* と *CoRac1* の局在や破壊株における細胞骨格の挙動について調べている。

#### Functional analysis of small GTPases, *CoCdc42* and *CoRac1*, from *Colletotrichum orbiculare*.

Kawashimo Midori, Kozen Yuka, Nomura Takumasa, Kubo Yasuyuki, Tsuji Gento (Grad.sch.of Life and Environ. Sci.of Kyoto Prefectural Univ.)

### P-80 (O-19)

#### イチゴ黒斑病菌の 1.0 Mb 染色体にコードされる AF 毒素生合成遺伝子クラスターの同定

原歩美<sup>1</sup>, 近藤日佳理<sup>1</sup>, 播本佳明<sup>1</sup>, 間瀬千晶<sup>1</sup>, 張祐介<sup>1</sup>, 山本幹博<sup>2</sup>, 秋光和也<sup>3</sup>, 柘植尚志<sup>1</sup> (<sup>1</sup>名大院・生命農, <sup>2</sup>岡山大・農, <sup>3</sup>香川大・農)

イチゴ黒斑病菌 NAF8 株の AF 毒素生合成遺伝子 (*AFT*) クラスターは、1.0 Mb の conditionally dispensable 染色体にコードされている。先に、本染色体の塩基配列を決定し、両腕に対応する 2 つのコンティグ (F1 および F2) からそれぞれ 158 個、127 個の遺伝子を同定した。なお、*AFT* 遺伝子群はコンティグ F2 の 392 kb 領域にクラスターとして存在し、この領域には 24 個の推定 *AFT* 遺伝子が 2~7 コピー分布する。これら 24 遺伝子のうち 17 個については、すでに AF 毒素生産における機能を同定した。今回、この領域にコードされる、AF 毒素生産に不可欠な転写制御因子 *AftR* によって制御される遺伝子の同定を試みた。1.0 Mb 染色体の全遺伝子について、野生株と *AFTR* サイレンシング株における転写レベルをリアルタイム RT-PCR 法によって比較解析した。その結果、*AFTR* サイレンシング株では、24 個の *AFT* 遺伝子すべての転写レベルが顕著に低下し、これら遺伝子が *AftR* によって正に制御されることが明らかとなった。さらに、遺伝子破壊によって、機能未解析の 7 遺伝子について AF 毒素生合成における機能を解析した。その結果、7 遺伝子のうち 4 個が AF 毒素生産に不可欠であり、残り 3 個は毒素生産を抑制する遺伝子であることが明らかとなった。

#### Identification of AF-toxin biosynthetic genes cluster encoded by the 1.0-Mb chromosome in the strawberry pathotype of *Alternaria alternata*

Ayumi Hara<sup>1</sup>, Hikari Kondou<sup>1</sup>, Yoshiaki Harimoto<sup>1</sup>, Chiaki Mase<sup>1</sup>, Yusuke Cho<sup>1</sup>, Mikihiro Yamamoto<sup>2</sup>, Kazuya Akimitsu<sup>3</sup>, Takashi Tsuge<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Grad. Sch. Bioagric. Sci., Nagoya Univ., <sup>2</sup>Fac. Agr., Okayama Univ., <sup>3</sup>Dept. Agr., Kagawa

### P-81

#### リンゴ斑点落葉病菌の 1.3 Mb 染色体にコードされる AM 毒素生合成遺伝子クラス

## ターの同定

川瀬めぐみ, 後藤千保, 播本佳明, 児玉基一郎, 山本幹博, 尾谷浩, 柘植尚志 (名大院生農・鳥取大・岡山大)

リンゴ斑点落葉病菌 IFO8984 株の AM 毒素生合成遺伝子 (AMT) クラスターは, 1.3 Mb の小型染色体にコードされている。先に, 本染色体の塩基配列を決定し, 両腕に対応する 2 つのコンティグ (M1 および M2) からそれぞれ 146 個, 184 個の遺伝子を同定した。さらに, コンティグ M2 にそれぞれ 1~4 コピー存在する 17 個の推定 AMT 遺伝子を同定した。今回, IFO8984 株を毒素生産培地 (MCD) と非生産培地 (PDB) で培養し, 1.3 Mb 染色体にコードされる全遺伝子の転写レベルをリアルタイム RT-PCR 法によって比較解析した。その結果, 17 個の推定 AMT 遺伝子の転写レベルは MCD 培養時に上昇することが明らかとなり, これら遺伝子が AM 毒素生合成に関与することがさらに示唆された。一方, 他のほとんどの遺伝子はむしろ PDB 培養時に転写が誘導された。さらに, 遺伝子破壊によって, 推定 AMT 遺伝子の AM 毒素生合成における機能を解析し, 17 遺伝子のうち 13 個が毒素生合成に関与することを明らかにした。

### Identification of AM-toxin biosynthetic gene cluster encoded by the 1.3-Mb chromosome in the apple pathotype of *Alternaria alternata*

Megumi Kawase, Chiho Goto, Yoshiaki Harimoto, Motoichiro Kodama, Mikihiro Yamamoto, Hiroshi Otani, Takashi Tsuge  
(Univ. of Nagoya, Univ. of Tottori, Univ. of Okayama)

## P-82

パイロシークエンス法を用いたキュウリ褐斑病菌の殺菌剤耐性変異検出の構築  
新福剛、坂野真平、石上陽平、一石昭彦、藤村真 (東洋大院・生命科学)

作物病害の防除に農業用殺菌剤が果たす役割は大きいですが, 近年開発されている殺菌剤は, 耐性菌の出現リスクが高く, ほとんどの種類の殺菌剤で耐性菌の報告がある。しかし, 耐性菌の分布は圃場単位で異なっており, 有効な薬剤の選抜には迅速かつ簡便な圃場単位のモニタリング手法が必要となる。多くの殺菌剤の主要な耐性変異が特定塩基の置換であることから, 蛍光ハイブリプローブ法を用いて, 融解温度曲線解析から耐性変異を同定する手法を採用してきた。この方法では, 混合サンプルから耐性菌の比率を融解温度曲線ピーク比として簡単に算出できる。しかし, ベンズイミダゾール剤やボスカリド剤のように, 複数種の耐性変異が存在する薬剤では, 蛍光プローブ法で各耐性変異の比を求めることには限界がある。そこで, 本研究では, パイロシークエンス法による診断について検討した。パイロシークエンス法は, 塩基配列の決定により変異を同定してゆくが, 取り込まれる塩基量をルシフェラーゼによる発光量として定量できる。キュウリ褐斑病菌のベンズイミダゾール耐性変異 (beta-tubulin の E198A, E198K および F200Y 変異) を検出するために, PCR 増幅プライマー, 1 本鎖 DNA を回収するためのビオチン化プライマーおよびシークエンスプライマーを設計した。その結果, それぞれの耐性変異を明確に検出できると同時に, 混合サンプルから複数種の変異の比を概算できることが明らかになった。同様にボスカリド耐性変異 (コハク酸脱水酵素 SdhB の H278R と H278Y 変異) を検出する系を構築した。現在, 圃場サンプルを用いて, キュウリ栽培施設ごとの耐性菌分布を解析中である。

### Fungicide resistance monitoring using pyrosequencing in cucumber corynespora leaf spot fungus *Corynespora cassiicola*

Tsuyoshi Shimpuku, Shinpei Banno, Yohei Ishigami, Akihiko Ichiishi, Makoto Fujimura  
(Fac. of Life Sci., Toyo Univ.)

## P-83

ウリ類炭疽病菌が分泌するエフェクター分子の植物細胞死誘導および抑制能と感

## 染過程における局在解析

入枝泰樹, 高野義孝 (京大・院・農)

ウリ類炭疽病菌 *Colletotrichum orbiculare* はウリ科植物に加えて, *Nicotiana benthamiana* にも感染する植物病原糸状菌である。当研究室では, これまでに *N. benthamiana* に細胞死を誘導する本菌のエフェクター分子 NIS1 を同定している。以前の報告において, 多犯性炭疽病菌 *C. gloeosporioides* の CgDN3 は過敏感細胞死の抑制に関与する可能性が示唆されていたが, 今回, ウリ類炭疽病菌の CgDN3 オルソログ (CoDN3) が, NIS1 誘導型細胞死の抑制能を持つエフェクター分子であることを報告する。さらに, CoDN3 遺伝子のプロモーター活性に関して, GFP を用いたレポーター解析をおこなった結果, CoDN3 プロモーターは, NIS1 と同様に活物寄生段階において高い活性を示し, 本段階における NIS1 誘導型細胞死の抑制が強く示唆された。また, 両エフェクターと蛍光タンパク質の融合タンパク質を発現させ, 本菌の植物感染過程における局在観察を行った。その結果, 両エフェクターの局在は, 付着器が形成する活物寄生型侵入菌糸の基部周辺において, リング状シグナルとして観察された。一方, エフェクターのリング状シグナルはセロファン膜への侵入菌糸の基部周辺では観察されなかった。さらに, 付着器を除去した結果, エフェクターシグナルは, 侵入菌糸基部周辺に存在する構造体において, その局在を示した。現在, このリング状シグナルについて, 更に解析を行っている。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。

### The abilities of effectors, secreted by *Colletotrichum orbiculare*, to induce or suppress plant cell death and their subcellular localization during infection

Hiroki Irieda, and Yoshitaka Takano (Grad. School of Agriculture, Kyoto Univ.)

## P-84

### ウリ類炭疽病菌は, 植物表層上における *PacC* 依存型の環境認識を介して, 適切な侵入様式を選択する

吉野香絵, 高野義孝 (京大院農)

ウリ炭疽病菌はシロイヌナズナの傷口周辺で従来型のメラニン化した付着器に依存しない侵入様式 (HTE; hyphal tip-based entry) を選択する。今回, ウリ類炭疽病菌がどのようなシグナル認識を介して HTE 型侵入様式を選択するかを検討した。まず, 植物傷口の漏出液が, プラスチック上において HTE 様の形態分化を誘導する活性を持つこと, さらに漏出液の pH を下げることで活性が失われることを発見した。この結果に基づき, pH 応答転写因子である *PacC* のオルソログ遺伝子 (*CoPacC*) の遺伝子破壊解析を行った結果, 破壊株は, シロイヌナズナ傷口周辺における HTE 型への選択率を大幅に低下させた。さらに, *CoPacC* 遺伝子およびその推定下流遺伝子の発現解析を行なった結果, *CoPacC* および当該下流遺伝子は中性 pH に加えて高イオンが存在するとより強く誘導された。この結果を支持するかたちで, 無傷な植物体表面においても, 高イオン存在下で培養すると HTE 型が誘導された。抵抗性の低下したシロイヌナズナ変異体において, HTE 型侵入様式は, メラニン化付着器による様式よりも, 侵入菌糸を高率で形成する。これらより, 植物の傷口周辺において, ウリ類炭疽病菌は *CoPacC* を介し漏出イオンおよび外界 pH を感知することにより, 適切な侵入様式を選択することが示唆された。さらに, 細胞骨格マーカーを導入した本菌の形質転換体を作成し, HTE 型の形態形成と従来型のメラニン化付着器の形成について細胞骨格動態の比較観察を行なった。その結果, HTE 誘導条件下では, 発芽管において付着器型と異なる動態が観察され, 発芽後の等方性型の菌糸伸長が推定された。

### *Colletotrichum orbiculare* selects appropriate entry modes via *PacC*-dependent environmental recognition on plant surface

Kae Yoshino, Yoshitaka Takano (Grad. School of Agriculture, Kyoto Univ.)

## P-85

### トウモロコシごま葉枯病菌の病原性と有性生殖におけるオートファジーの関与

住田卓也, 泉津弘佑, 森田篤, 田中千尋 (京大・院・農)

オートファジーは真核生物に保存された細胞内での自己構成成分の主要な分解系の一つであり, 植物病原性糸状菌においては宿主への病原性との関連性が注目を集めている。今回我々は, 出芽酵母においてオートファジーの開始に関与するとされるキナーゼをコードする遺伝子 *Atg1*, オートファゴソームの形成に必要とされるユビキチン様タンパクをコードする遺伝子 *Atg8* のトウモロコシごま葉枯病菌におけるオルソログ遺伝子 *ChAtg1*, *ChAtg8* の破壊菌株を作出した。これらの破壊株の分生子をトウモロコシ葉に接種すると, 著しい病原性の低下が観察された。*ChAtg1* 破壊株ではわずかに葉への侵入が認められたが, *ChAtg8* 破壊株では全く認められなかった。これらの破壊株では分生子の発芽率が低下し, その程度は *ChAtg8* 破壊株において著しかった。また, *ChAtg8* 破壊株は野生型株や *ChAtg1* 破壊株と比べ酸化ストレスに対して強い感受性を示した。*ChAtg1* 破壊株及び *ChAtg8* 破壊株の野生型株との交配試験を行ったところ, これらの破壊株由来の偽子嚢殻は形成されず, 雌性不稔を示した。また, 野生型株由来の偽子嚢殻中には本来 8 本形成されるはずの子嚢胞子がおおよそ 4 本しか観察されなかった。*ChAtg1* 破壊株を用いた交配によって得られた子嚢胞子はそのほとんどが野生型であり, *ChAtg8* 破壊株を用いた交配によって得られた子嚢胞子は全て野生型であった。即ち, これらの遺伝子の突然変異は子嚢胞子形成過程において致死性的であり, トウモロコシごま葉枯病菌ではオートファジーが有性生殖に必須であることが明らかとなった。

### Autophagy is involved in pathogenicity and sexual reproduction in *Cochliobolus heterostrophus*

Takuya Sumita, Kosuke Izumitsu, Atsushi Morita, Chihiro Tanaka

(Grad. School of Agriculture, Kyoto Univ.)

## P-86

### トウモロコシごま葉枯病菌における *PKA* 遺伝子および *PKR* 遺伝子の機能解析

湯谷智, 泉津弘佑, 住田卓也, 北出雄生, 田中千尋 (京大・院・農)

cAMP 依存的タンパクキナーゼ A (*PKA*) は, cAMP シグナル伝達経路の中で最も重要な因子の一つであり, 様々な植物病原菌の病原性に関与することが報告されている。しかし, トウモロコシの主要病原菌の一つであるトウモロコシごま葉枯病菌 (*Cochliobolus heterostrophus*) ではそれら因子の情報はほとんど得られていない。そこで, 我々は本菌の二種類の *PKA* 遺伝子 (*PKA1*, *PKA2*) と *PKR* 遺伝子 (*PKR*) の破壊株を作出し, 本菌生活史におけるそれらの役割を明らかにしようとした。まず, *PKA* 欠損株の表現型についての調査を行った。*PKA2* 欠損株は菌叢様相や生育等において野生株と何ら区別出来なかったが, *PKA1* 欠損株では生育速度が有意に遅くなった。しかし, いずれの欠損株でも付着器形成能などの病原性に関与する重要な能力は野生株と同等で差は見られなかった。他植物病原菌の既知事例では *PKA1* ホモログが一般に病原性を支配すると報告されているが, 本菌では *PKA1* が単独で病原性に対して支配的な役割をもたないことが判明した。さらに, 本菌における *PKA* の機能をより詳細に明らかにする為, *PKA1* *PKA2* 二重変異株の作出を試みた。交配により得られた二重変異株の子嚢胞子は発芽可能であったが, 24 時間以内に生育が完全に停止し, 以後, 再伸長することはなく致死となった。本結果は, *PKA1* ならびに *PKA2* が本菌の基本的生育に必須の役割を重複して担っていることを示唆している。次に, *PKR* 欠損株について調べた。本欠損株は, 野生株と比較して生育速度ならびに胞子形成能が著しく低下していた。さらに, 付着器形成能ならびに病原性も喪失した。以上の結果から, 本菌の *PKR* 遺伝子は本菌の病原性に関与し, また, 先の *PKA* 遺伝子の結果も併せて考慮すると, 本菌では *PKA1* ならびに *PKA2* 両遺伝子が重複して病原性に関与していることが明らかとなってきた。

### Characterizations of *PKA* genes and *PKR* gene of *Cochliobolus heterostrophus*

Satoshi Yutani, Kosuke Izumitsu, Takuya Sumita, Yuuki Kitade, Chihiro Tanaka

(Grad. School of Agriculture, Kyoto Univ.)

## P-87

### *Cryphonectria parasitica* の C 末端脂質付加部位を欠く低分子量 GTP 結合タンパク質

## RAS3 の性質

山内優輝, 高橋拓也, 笠原紳 (宮城大学・食産業・環境)

クリ胴枯病 (chestnut blight) は、世界三大植物病の一つとして有名で、特に米国アパラチア地方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への貨物に付着して移入されたといわれている。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が解析され、またその制御方法が検討されている。

*C. parasitica* の低分子量 GTP 結合タンパク質 RAS に関しては、これまでに 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 について構造・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* 遺伝子の破壊と過剰発現を行い、特に *ras3* 欠損変異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、細胞表層 (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、細胞質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。

### Properties of *Cryphonectria parasitica* small GTP-binding protein RAS3 which lacks C-terminal lipidation site.

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

P-88

### 糸状菌類で保存されている機能未知遺伝子破壊株の特性解析

井丸直<sup>1,2</sup>, 妹尾史子<sup>1,2</sup>, 寺戸志保<sup>1,2</sup>, 池田優理子<sup>2</sup>, 岩下和裕<sup>1,2</sup> (1 広島大院・先端研, 2 酒類研)

麹菌 (*Aspergillus oryzae*) のゲノムシーケンス解析によって大半の遺伝子が、機能未知遺伝子であり、その多くが糸状菌類に広く、保存されているとともに米麹などで高発現することが明らかになっている。これらの遺伝子群の解析によって、麹菌を含む糸状菌に特異的かつ新規の生物分子システムが発見できると考えられる。我々はこれまでに、糸状菌類に保存されている機能未知遺伝子群 (*cff* 遺伝子) より、米麹での発現等の 147 遺伝子を対象に遺伝子破壊を行った結果、ホモ・ヘテロを含む 130 遺伝子の破壊成功株を得ており、最小培地による固体培地・液体培地の表現型の解析を行っている。

本研究では、得られた麹菌の機能未知遺伝子破壊株ライブラリーを用いて、更なる様々な条件でのフェノタイプの状態観察を行った。米麹等のモデルアッセイとして天然物 (米粉・小麦粉・大豆粉) 培地プレートによるコロニーおよびハローの解析を行った。その結果、最少培地と比較して菌糸生育や分生子形成、ハローが減少する破壊株など特徴的な表現型を示す遺伝子が見出された。また、Hydroxyl urea, Camptothecin, Tunicamycin, Dithiothreitol 等といった特定の合成や機構を阻害する阻害剤耐性試験等を行った結果、感受性の変化した破壊株等を見出しているので報告する。現在、浸透圧や pH 等のストレス応答試験等を行っており、これらのスクリーニング試験において明らかな表現型が見られたものについては、今後より詳しい遺伝子機能解析を進める予定としている。

### Analysis of phenotype of the *cff* (conserved among filamentous fungi and function unknown) gene disruptants in *Aspergillus oryzae*.

Nao Imaru<sup>1,2</sup>, Fumiko Senoo<sup>1,2</sup>, Shiho Terado<sup>1,2</sup>, Yuriko Ikeda<sup>2</sup>, Kazuhiro Iwashita<sup>1,2</sup>

(1 Hiroshima Univ., 2 NRIB)

# 代表発表者索引

## A

Arend F. van Peer ..... 48

## D

David Hibbett ..... 14

## H

Hsiang-Ting Huang ..... 27, 46

## J

Jennifer Niones ..... 68

## N

Nuo Li..... 30, 61

## S

Shunsuke Masuo ..... 26

## あ

秋山康紀 ..... 20

荒添貴之 ..... 69

## い

五十嵐圭日子 ..... 36

石田 健 ..... 56

石田千絵 ..... 50

石堂圭一 ..... 38

一瀬桜子 ..... 58

伊藤英里子 ..... 54

稲葉 梓 ..... 41

入枝泰樹 ..... 76

尹 忠鉄 ..... 67

## お

太田智子 ..... 72

大場 歩 ..... 30, 62

荻原 淳 ..... 66

## か

加賀谷奏 ..... 42

柏 毅 ..... 73

片山貴之 ..... 52

片山琢也 ..... 41

加藤直樹 ..... 66

亀井誠之 ..... 59

榎野友香 ..... 67

河合文隆 ..... 36

河内護之 ..... 63

河下美都里 ..... 74

川瀬めぐみ ..... 75

川畑絢平 ..... 43

川村彩乃 ..... 60

## く

日下秀行 ..... 59

國武絵美 ..... 29

## さ

酒井香奈江 ..... 32

酒井大介 ..... 55

坂口 歩 ..... 33

坂本裕一 ..... 29

佐藤佑樹 ..... 71

し

塩谷達弘 ..... 48  
 志田洋介 ..... 28  
 嶋田有宇 ..... 47  
 清水公德 ..... 68  
 新福 剛 ..... 75

す

鈴木 晃 ..... 35  
 鈴木空太 ..... 57  
 住田卓也 ..... 77

せ

泉津弘佑 ..... 34

た

高橋正和 ..... 55  
 竹下佳那 ..... 72  
 竹谷俊亮 ..... 52  
 竹本大吾 ..... 22  
 田所隆之 ..... 45  
 田中麻左人 ..... 39  
 田中拓未 ..... 28, 49  
 田中瑞己 ..... 58  
 玉野孝一 ..... 25

ち

張 斯来 ..... 37

つ

辻井 雅 ..... 46  
 對馬裕誠 ..... 49

て

寺戸志保 ..... 25, 37

と

堂前圭佑 ..... 50  
 土佐幸雄 ..... 17

な

中沢威人 ..... 31  
 中澤奈美 ..... 38  
 中嶋佑一 ..... 64  
 中谷和也 ..... 64

に

西川良平 ..... 47  
 西村麻里江 ..... 15  
 西脇綾香 ..... 70

は

橋元 誠 ..... 65  
 畠山信太郎 ..... 40  
 林口拓実 ..... 56  
 原 歩美 ..... 34, 74  
 伴 暁彦 ..... 65

ひ

東田知洋 ..... 53  
 平本哲也 ..... 44

ふ

深田史美 ..... 33, 73  
 藤田将幸 ..... 54  
 二神泰基 ..... 44  
 古川隆紀 ..... 60

ほ

星 浩臣 ..... 45



## ま

増田裕一郎.....	57
松尾賢人.....	43

## み

宮下 基.....	31, 63
宮武はる香.....	51
宮本健太郎.....	61

## む

村口 元.....	27
-----------	----

## も

元松 遥.....	26, 39
本山高幸.....	32
森 亮太.....	71

## や

安田（吉野）庄子.....	51
矢萩大貴.....	42
八原美沙.....	69
山内優輝.....	78
山田智士.....	35

## ゆ

湯谷 智.....	77
-----------	----

## よ

吉田 翔.....	70
吉野香絵.....	76
吉見 啓.....	40

## わ

和田朋子.....	53
渡邊亜也子.....	62

## 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。
  2. 研究会及び総会の開催。
  3. 会報の発行。
  4. 関連研究団体との協力事業。
  5. その他、必要と思われる事業。
4. 本会はその目的に賛同して入会した個人会員及び総会において承認された名誉会員を持って構成する。
5. 本会入会希望者は所定の入会申込書を提出し、別に定める入会金を納入するものとする。
6. 本会はその運営のため、会長、運営委員若干名および会計監査 1~2 名をおく。任期は 2 年とし、改選は運営委員の推薦と総会の承認による。
  - (1) 会長は本会を代表し、会務を統括する。
  - (2) 運営委員は運営委員会を構成し会務を審議する。運営委員には庶務、会計、編集担当、広報担当をおく。
  - (3) 本会の会計事務局は会長が指名する会計担当の運営委員の所属する施設に置く。
  - (4) 会計監査は本会の会計を監査する。
7. 本会は事業運営に必要な実費を年会費として個人会員から徴収する。
8. 本会の事務年度は 7 月 1 日から 6 月 30 日までとする。
9. 前事務年度の庶務、会計については、これを総会において報告し、承認を得るものとする。
10. 本会則の改定には総会出席者過半数の賛成を必要とする。

以上

### 補則

- (1) 本会則は 2001 年 7 月 1 日より発効する。
- (2) 本会入会金は 1,000 円とする。
- (3) 年会費は一般会員 2,000 円、学生会員 1,000 円とする。
- (4) 研究会の通知及び会報は、当該年度までの会費を納入した会員に送付する。
- (5) 2 年度にわたって会費納入のない会員は、その資格を失うものとする。
- (6) 研究会の発表者は、会員に限るものとする。新入会員の演題申し込みは会費納入の確認を持って受理する。

(平成 23 年 11 月 16 日改正)

## 糸状菌分子生物学研究会運営委員会名簿（2012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  
有岡 学 東京大学大学院 農学生命科学研究科  
五十嵐圭日子 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 バイオ・化学部  
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  
高木 忍 ノボザイムズジャパン株式会社 研究開発部  
高野 義孝 京都大学大学院 農学研究科  
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  
山形 洋平 東京農工大学大学院 農学研究院  
山田 修 独立行政法人 酒類総合研究所

### 会計監査

竹内 道雄 東京農工大学大学院 農学研究院

## 糸状菌遺伝子研究会賛助会員（50音順）

アサヒビール株式会社  
天野エンザイム株式会社  
イチビキ株式会社  
大関株式会社  
菊正宗酒造株式会社  
キッコーマン株式会社  
月桂冠株式会社  
合同酒精株式会社  
三和酒類株式会社  
新日本化学工業株式会社  
寶酒造株式会社  
株式会社東洋発酵  
公益財団法人日本醸造協会  
公益財団法人野田産業科学研究所  
ノボザイムズ・ジャパン株式会社  
白鶴酒造株式会社  
株式会社ビオック  
ヒガシマル醤油株式会社  
株式会社樋口松之助商店  
ヒゲタ醤油株式会社  
株式会社フジワラテクノアート  
マルキン忠勇株式会社  
Meiji Seika ファルマ株式会社  
名糖産業株式会社  
ヤマサ醤油株式会社  
株式会社雪国まいたけ