

The 13th Conference on

Fungal Genetics

and

Molecular Biology

第 13 回糸状菌分子生物学コンファレンス

2013 年 11 月 20 - 21 日

つくば国際会議場

糸状菌分子生物学研究会

www.biochem.osakafu-u.ac.jp/~fmbsj/

目次

コンファレンスプログラム	2
発表演題及び講演時間	3
特別講演要旨	14
シンポジウム講演要旨	16
一般講演要旨	29
ポスター発表講演要旨	39
発表者索引	89
糸状菌分子生物学研究会会則	92
糸状菌分子生物学研究会運営委員名簿	93
糸状菌遺伝子研究会賛助会員	95

第 13 回糸状菌分子生物学コンファレンス

日時：2013 年 11 月 20 日(水)-21 日(木)

会場：つくば国際会議場（茨城県つくば市竹園 2-20-3）

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 20 日 (月)

- 9:30 - 受付開始（於：講演会場）
- 10:30 - 10:40 開会の辞
- 10:40 - 13:00 口頭発表（O-1～12）
- 13:00 - 14:20 休憩
- 14:20 - 15:20 特別講演
- 15:20 - 16:40 ポスター発表（奇数番号）
- 18:00 - 懇親会

11 月 21 日 (火)

- 9:00- 受付開始（於：ポスター会場）
- 9:30 - 10:50 ポスター発表（偶数番号）
- 11:00 - 12:40 口頭発表（O-13～20）
- 12:40 - 14:00 昼休み
- 14:00 - 16:00 シンポジウム
- 16:10 - 16:40 総会・表彰式
- 16:40 - 16:50 閉会の辞

発表演題および講演時間

特別講演 11月20日(水) 14:20 - 15:20

糸状菌における菌体外消化システム：分解酵素の分子機構から見えてくるカビ・キノコのバイオマス資化戦略

東京大学 大学院農学生命科学研究科

五十嵐 圭日子

座長：阿部 敬悦 (東北大学)

シンポジウム 11月21日(木) 14:00 - 16:00

「糸状菌の多様性～種、ゲノム、機能」

[座長：S-1, 2：田中 千尋 (京都大学)；S-3, 4：本山 高幸 (理化学研究所)]

14:00-14:30

S-1 「国立科学博物館で進行中のキノコ多様性プロジェクト」

国立科学博物館植物研究部菌類・藻類研究グループ

保坂 健太郎

14:30-15:00

S-2 「*Dictyocatenuata alba* という地衣について分かってきたこと」

理化学研究所 バイオリソースセンター 微生物材料開発室

岡田 元

15:00-15:30

S-3 「菌類バンクとその産業利用」

玉川大学学術研究所 菌学応用研究センター

奥田 徹

15:30-16:00

S-4 「ポストゲノム時代の糸状菌二次代謝物質生合成遺伝子の同定および利用」

大阪大学 生物工学国際交流センター

木下 浩

一般講演 (O-1~O-12) 11月20日(水) 10:40 - 13:00

座長： O-1, 2: 榊尾 俊介 (筑波大) ; O-3, 4, 5: 志水 元亨 (名城大) ; O-6, 7, 8: 谷 修治 (大阪府大)
O-9, 10: 炭谷 順一 (大阪府大) ; O-11, 12: 織田 健 (酒総研) ; O-13, 14, 15: 丸山 潤一 (東京大)
O-16, 17: 小笠原 渉 (長岡科技大) ; O-18, 19, 20: 泉津 弘祐 (滋賀県大)

- 10:40 O-1 糸状菌の細胞質不和合性反応時におけるプログラム細胞死機構の解析
上森喬大¹, 井上加奈子¹, 木田千晶¹, 中屋敷均¹, 兼松聡子², 池田健一¹
(¹神戸大院・農学研究科, ²果樹研)
- 10:52 O-2 麹菌 *A. oryzae* の菌糸損傷後の細胞修復における AoSO の機能解析
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)
- 11:04 O-3 新規二次代謝制御因子としての *Aospt3* の機能解析
廣瀬雅人^{1,2}, 河内護之^{1,2}, 岩下和裕^{1,2} (¹広島大院・先端研, ²酒総研)
- 11:16 O-4 *Chaetomium globosum* における二次代謝とエピジェネティック変動の関連性
中沢威人¹, 石内勘一郎², 五反田康孝, 野口博司, 渡辺賢二
(静岡県大院薬,¹現 京大院農,²現 日本大薬)
- 11:28 O-5 ウリ類炭疽病菌における出芽酵母 RAM ネットワーク構成因子 CoPag1 は植物特異的シグナル受容を介した付着器形成に関与する
小玉紗代, 坂口 歩, 久保康之 (京都府大院・生環)
- 11:40 O-6 *Trichoderma reesei* におけるセルラーゼ生産に関与するトランスポーターの解析
谷口大樹, 日下秀行, 古川隆紀, 志田洋介, 小笠原渉 (長岡技科大・生物)
- 11:52 O-7 *Trichoderma reesei* に存在する 10 種類の β -glucosidase isozyme の酵素化学的性質
郭 博洋, 野崎功一, 水野正浩, 天野良彦 (信州大院・生命機能・ファイバー工学)
- 12:04 O-8 麹菌における自己切断型 *Cle/loxP* 選択マーカーリサイクリングシステムの確立
張斯来, 伴暁彦, 江原直樹, 水谷治¹, 田中瑞己, 新谷尚弘, 五味勝也
(東北大院農, 酒総研¹)
- 12:16 O-9 糸状菌 *Trichoderma reesei* における菌体外繊維状物質合成酵素の探索
田原伸悟¹, 新田美貴子², 志田洋介¹, 堀川祥生³, 杉山淳司³, 大隅正子⁴, 小笠原渉¹
(¹長岡技科大・生物, ²科学技術振興機構, ³京都大学・生存圏研究所, ⁴総合画像研究支援)
- 12:28 O-10 3D モデリングを利用した抗生物質アシラーゼの変異体設計
中山和毅, 山田雅人, 西田洋巳, 磯貝泰弘 (富山県大・生工)

12:40 O-11 多様な糸状菌類の SSH ライブラリー解析によるバイオマス糖化関連遺伝子情報の収集

安善榮, 小口晃央, 市川夏子, 関川智洋, 紙野圭 (NITE)

12:52 O-12 青色光刺激を与えて糸状菌から有用物質を生産する

小嶋政信¹, 三浦竜平¹, 三原聡², 市村昌紀² (¹信州大院農, ²JA 中野市)

一般講演 (O-13~O-20) 11月21日(木) 11:00 - 12:40

11:00 O-13 *A. flavus*・*A. oryzae* 菌株群のゲノムワイドな系統解析

大田 民, 織田 健, 岩下和裕, 後藤奈美

(独立行政法人 酒類総合研究所 醸造技術基盤研究部門)

11:12 O-14 ニトロソチオネインの発見のその NO 耐性化機構の解明

周勝敏, 鳴神寿昭, 枅尾俊介, 高谷直樹 (筑波大院・生命環境)

11:24 O-15 マイタケは, 近紫外光が見える

倉橋敦¹, 下田隆史¹, 佐藤真之^{1,2,3}, 藤森文啓^{2,3}, 平間淳司⁴, 西堀耕三¹ (¹雪国まいたけ,
²ハイファジェネシス, ³東京家政大・環境教育, ⁴金沢工大・電気/光/エネルギー応用セ)

11:36 O-16 選択的白色腐朽菌 *Ceriporiopsis subvermispora* のバニリンに対する細胞応答

渡邊崇人, 森賢一郎, 木戸彩子, 長谷川隆大, 西村裕志, 本田与一, 渡辺隆司

(京大・生存研)

11:48 O-17 麹菌アレスチン様タンパク質 CreD の脱リン酸化によるグルコース抑制の制御

田中瑞己, 平本哲也, 新谷尚弘, 五味勝也 (東北大院農・生物産業創成)

12:00 O-18 いもち病菌におけるヒストンリジンメチルトランスフェラーゼの役割

Kieu Pham Thi Minh, 井上義博, Ba Van Vu, Quoc Bao Nguyen, 池田健一, 中屋敷均

(神戸大・農)

12:12 O-19 病原真菌 *Aspergillus fumigatus* のアゾール剤耐性における AtrR の多様な機能

萩原大祐¹, 大場歩², 清水公德¹, 川本進¹, 五味勝也²

(¹千葉大・真菌センター, ²東北大院・農)

12:24 O-20 ウリ類炭疽病菌と宿主キュウリ間に形成されるリング状インターフェイスに向けたエフェクター輸送に関する解析

入枝泰樹, 前田 瞳, 高野義孝 (京大・院・農)

ポスター発表 11月20日(水) 15:20 – 16:40 (奇数番号)

11月21日(木) 9:30 – 10:50 (偶数番号)

- P-1** 出芽酵母 *Sln1p* 温度感受性株における植物-真菌融合ヒスチジンキナーゼの機能相補とエチレン応答
中山真由美^{1,2}, 古川健太郎³, 吉見啓¹, 阿部敬悦^{1,2} (¹東北大・未来研,²東北大・院農・生物産業創成,³Univ. of Gothenburg, Dept. of Chemistry and Molecular Biology)
- P-2** 竹材オガコの堆積処理が細菌群集構造に与える影響
¹中田裕治,¹吉田 誠,²高島幸司 (¹農工大・農,²富山県農林水産総合技術センター森林研究所)
- P-3** 11種の白色および褐色木材腐朽 *Polyporales* のゲノムおよびセクレトーム解析
堀 千明 (理研・CSRS), 五十嵐圭日子, 鮫島正浩 (東大院・農), David Hibett (クラーク大), Bernard Henrissat(CNRS), Jill Gaskel, Dan Cullen (IMBT, FPL)
- P-4** 麹菌における自己切断型 *Cle/loxP* 選択マーカーリサイクリングシステムの確立
張斯来, 伴暁彦, 江原直樹, 水谷治¹, 田中瑞己, 新谷尚弘, 五味勝也 (東北大院農, 酒総研¹)
- P-5** 極微量試料を用いた文化財に潜在する糸状菌のモニタリング
和田朋子¹, 五十嵐圭日子², 藤原裕子³, 藤井義久³, 岡田 健¹
(¹東京文化財研究所・保修セ,²東大院・農生科,³京大院・農科)
- P-6** 糸状菌由来の免疫回避機能性素材を用いた新規医療用ナノ粒子の開発
佐藤大貴¹, 松村香菜², 高橋慎太郎³, 高橋徹, 村垣公英¹, 石井恵子², 川上和義², 富樫貴成⁴, 高見誠一⁵, 阿尻雅文⁵, 福本学³, 阿部敬悦^{1,6}
(¹東北大院農,²東北大院医,³東北大・加齢研,⁴山形大理,⁵東北大・多元研,⁶東北大・未来研)
- P-7** ヒラタケ菌糸に青色光刺激を与えて抗癌活性物質を生産する
三浦童平¹, 戸田一弥¹, 藤井博¹, 小嶋政信¹, 三原聡², 市村昌紀² (¹信州大院農,²JA 中野市)
- P-8** アグロバクテリウム法による菌根菌ホンシメジの遺伝子組換え株の作出
山本真弓¹, 泉津弘佑², 北出雄生¹, 羽當加奈子¹, 田中千尋¹
(¹京大院・農,²滋賀県大・環境科学)
- P-9** 麹菌 *Aspergillus oryzae* オートファジー欠損株における異種タンパク質生産性の向上
寺本 寛, 各務 清美, 小島 海平, 宇田川 裕晃, 高木 忍, 丸山 潤一¹, 北本 勝ひこ¹
(ノボザイムズ ジャパン (株),¹東大院・農生科・応生工)
- P-10** 麹菌を用いた同時糖化発酵によるデンプンからの L-乳酸生産
若井 暁¹, 吉栄俊秀², 浅井菜々実¹, 山田亮祐¹, 荻野千秋², 堤 浩子³, 秦 洋二³, 近藤昭彦²
(¹神戸大・自然科学,²神戸大・工,³月桂冠・総研)
- P-11** 糸状菌 PKC の新規阻害剤に対する酵母スクリーニング系の構築
庄司郁央¹, 中山真由美², 吉見啓², 藤岡智則³, 河合清³, 堀内裕之⁴, 梅山秀明⁵, 阿部敬悦^{1,2}
(¹東北大院農・生物産業創成,²東北大・未来研,³クミアイ化学工業,⁴東大院農,⁵中央大理工)

- P-12 麹菌総合ゲノムデータベースの開発と公開
織田健¹, 上田泰央³, 岩下和裕^{1,2} (¹酒総研, ²広島大・先端研, ³株式会社ジナリス)
- P-13 *Aspergillus oryzae* の機能性ペプチド融合ハイドロフォービン (HypB) による細胞表層工学システムの構築
大橋信太郎, 堂前圭佑, 中間聖, 加瀬明日香, 中島春紫 (明治大・農・農化)
- P-14 麹菌 *A. oryzae* を用いた植物由来オスモチンの生産および精製
伊藤大修, 丸山潤一, 永田宏次¹, 田之倉優¹, 北本勝ひこ
(東大院・農生科・応生工, ¹東大院・農生科・応生化)
- P-15 糸状菌 *Aspergillus nidulans* α -1,3-グルカン欠損株の培養特性と物質生産性の評価
一杉昌玄¹, 吉見啓², 稲葉梓¹, 阿部敬悦^{1,2} (¹東北大院農・生物産業創成, ²東北大・未来研)
- P-16 油糧微生物 *Mortierella alpina* 1S-4 の *lig4* 遺伝子破壊株の作製
菊川寛史¹, 櫻谷英治¹, 安藤晃規^{1,2}, 落合美佐³, 清水 昌⁴, 小川 順¹ (¹京大院農・応用生命,
²京大・生理化学ユニット, ³サントリーグローバルイノベーションセンター株式会社, ⁴京都学園大・バイオ環境)
- P-17 *Aspergillus* 属菌の細胞壁 α -1,3-グルカンのオリゴ糖化とその機能性評価
吉見啓¹, 稲葉梓², 矢野成和³, 佐々木宏明⁴, 後藤智生⁴, 川上和義⁵, 阿部敬悦^{1,2}
(¹東北大未来研, ²東北大院農, ³山形大院理工 ⁴株式会社セラク製造所, ⁵東北大院医)
- P-18 麹菌で異種発現させたアフィディコリン生合成酵素の細胞内局在解析
伴曉彦, 田中瑞己, 藤居瑠彌¹, 南篤志¹, 及川英秋¹, 新谷尚弘, 五味勝也
(東北大院・農・生物産業創成, 北大院・理)
- P-19 Involvement of lectin-type cargo receptors in heterologous protein secretion in *Aspergillus oryzae*
Dung Huy Hoang, Jun-ichi Maruyama, Katsuhiko Kitamoto (Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo)
- P-20 麹菌で確認された 6 個のアシル CoA 合成酵素ホモログの生育における役割の解析
玉野孝一¹, Kenneth Bruno², 小池英明¹, 石井智子¹, 三浦愛¹, 梅村舞子¹, Scott Baker², 町田雅之¹
¹(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)
- P-21 麹菌 *A. oryzae* におけるストレス応答調節タンパク質 AoRim15 の機能解析
中村英淳, 菊間隆志, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)
- P-22 糸状菌 *Aspergillus nidulans* による土壌フミン酸の代謝機構
中澤奈美, 老沼研一, 高谷直樹 (筑波大院・生命環境)
- P-23 麹菌の菌糸融合能力の解析方法の確立と培地成分が与える影響の検討
塚崎和佳子, 丸山潤一, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)
- P-24 *Aspergillus oryzae* における 331-25 sense RNA, 331-25 antisense RNA の機能解析
辻井雅, 森田寛人, 前田浩, 山形洋平, 竹内道雄 (東京農工大・応生科)

- P-25 麹菌 *A. oryzae* における菌核形成抑制因子 EcdR 欠損による有性生殖発見の試み
田中 勇氣, 金 鋒杰, 丸山 潤一, 北本 勝ひこ (東大院・農生科・応生工)
- P-26 麹菌 *A. oryzae* におけるオートファジー関連膜タンパク質 AoAtg9 の局在および機能解析
藤木耕平, 菊間隆志, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)
- P-27 *Aspergillus oryzae* の細胞壁ストレス耐性に関わる機能未知遺伝子の解析
徳永奈央¹, 妹尾史子^{3,4}, 二神泰基², 竹川薫², 岩下和裕^{3,4}, 後藤正利²
(¹九大院・生資環, ²九大院・農, ³広大院・先端研, ⁴酒総研)
- P-28 麹菌アミノ酸トランスポーターの機能解析
浜中大夢, 金子明裕, 北川治恵, 佐野元昭, 尾関健二, 大箸信一 (金沢工大・ゲノム研)
- P-29 *Aspergillus nidulans* におけるプロテインキナーゼ C の sterigmatocystin 合成制御に関わる機能の解析
片山琢也, 堀内裕之 (東大院・農生科・応生工)
- P-30 *Aspergillus nidulans* における分生子特異的低分子タンパク質 CON ホモログの解析
鈴木聡^{a, b}, Özlem Sarikaya Bayram^a, Özgür Bayram^a, Gerhard H. Braus^a
(^aゲッティンゲン大学, ^b食総研)
- P-31 *Aspergillus nidulans* のグリコーゲン代謝とステリグマトシスチン生合成
小松崎愛里, 上村曜介, 高谷直樹 (筑波大院・生命環境)
- P-32 麹菌マルトースパーミターゼ分解における HECT ユビキチンリガーゼ HulA の関与
松浦優佳, 田中瑞己, 平本哲也, 新谷尚弘, 五味勝也 (東北大院・農・生物産業創成)
- P-33 糸状菌の細胞質不和合性反応時におけるプログラム細胞死機構の解析
¹上森喬大, ¹井上加奈子, ¹木田千晶, ¹中屋敷均, ²兼松聡子, ¹池田健一
(¹神戸大院・農学研究科, ²果樹研)
- P-34 麹菌 *A. oryzae* における 2 つの acyl-CoA binding protein (AoAcb1, AoAcb2) の解析
川口航平, 菊間隆志, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)
- P-35 麹菌 *A. oryzae* の菌糸損傷後の細胞修復における AoSO の機能解析
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-36 *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, 早川芙佑華, 水野佑香, 中島春紫 (明治大・農・農化)
- P-37 麹菌 *Aspergillus oryzae* のポリリン酸代謝とストレス応答
多田 功生, 大口 ひかる, 楠本 憲一 (農研機構 食総研)
- P-38 Roles of AoLAH in regulating Woronin body position and function in *Aspergillus oryzae*
Pei HAN, Feng Jie JIN, Jun-ichi MARUYAMA, Katsuhiko KITAMOTO
(Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo)

- P-39** アカパンカビにおける外来 DNA のランダム導入様式の解析
鎌田竜平, 田中秀逸, 畠山晋 (埼玉大・理・遺伝)
- P-40** 麹菌 *A. oryzae* におけるオートファジー関連ステロールグルコシルトランスフェラーゼ AoAtg26 の機能解析
菊間隆志, 田所隆之, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)
- P-41** 麹菌 (*A. oryzae*) General amino acid permease (*Gap A*) 遺伝子破壊株の生育への影響
金子明裕, 浜中大夢, 佐野元昭, 尾関健二, 大箸信一 (金沢工大・ゲノム研)
- P-42** 麹菌由来新規 MOA レダクターゼ高発現株の作製とロイシン酸生産能の解析
山本竜也, 小出恵美理, 森千明, 竹浦賢吾, 大穀未来, 志水元亨, 加藤雅士 (名城大・農)
- P-43** 糸状菌 *Trichoderma reesei* における菌体外繊維状物質合成酵素の探索
田原伸悟¹, 新田美貴子², 志田洋介¹, 堀川祥生³, 杉山淳司³, 大隅正子⁴, 小笠原渉¹
(¹長岡技科大・生物, ²科学技術振興機構, ³京都大学・生存圏研究所, ⁴総合画像研究支援)
- P-44** 糸状菌の Poly(ADP-ribose) glycohydrolase の探索及びその働き
平野滯¹, 須藤美穂¹, 枡尾俊介², 高谷直樹², 志水元亨¹, 加藤雅士¹
(¹名城大・農, ²筑波大院・生命環境)
- P-45** 麹菌 *Aspergillus oryzae* 菌体内金属プロテアーゼ ADAM の機能解析
小林拓嗣, 前田浩, 竹内道雄, 山形洋平 (東農工大院・応生化)
- P-46** 麹菌が産生する hydrophobin RolA と固体表面間の相互作用に関する研究
田中拓未¹, 田邊弘毅¹, 高橋徹², 富樫貴成³, 有田稔彦⁴, 阿部敬悦^{1,2} (¹東北大院農・生物産業創成, ²東北大・未来研, ³山形大理・物質生命化学, ⁴東北大・多元研)
- P-47** 麹菌ペプスタチン非感受性プロテアーゼの酵素学的性質の解析
竹内真理衣, 岡本綾子, 阿保春花, 前田浩, 山形洋平, 竹内道雄 (農工大院・応生化)
- P-48** 3D モデリングを利用した抗生物質アシラーゼの変異体設計
中山和毅, 山田雅人, 西田洋巳, 磯貝泰弘 (富山県大・生工)
- P-49** 麹菌の凝乳酵素の機能解析
田久陽子, 岡本綾子, 前田浩, 山形洋平, 竹内道雄 (農工大院・応生化)
- P-50** *Aureobasidium pullulans* に由来する安息香酸-4-水酸化酵素遺伝子の解析
東田知洋, 太田一良 (宮崎大農・応生科)
- P-51** *Aspergillus nidulans* の GfsA は O-グリカンの Galf を合成する糖転移酵素である
元松遥¹, 二神泰基², 浴野圭輔¹, 竹川薫², 後藤正利², 野村善幸¹, 岡拓二¹
(¹崇城大学・生物生命・応微工, ²九大・院・農)
- P-52** ヒラタケのリポキシゲナーゼ遺伝子の機能解析
小林大記, 小黒健太, 田崎裕二 (長岡高専・物質工)

- P-53** アミノリシス活性及び好塩性を示す麹菌 *Aspergillus oryzae* の D-アミノ酸特異的アミノペプチダーゼ(DamA)の解析
 松下(森田)真由美¹, 中川博之¹, 多田功生¹, 丸井淳一郎^{1,5}, 鈴木聡¹, 服部領太¹, 天野仁², 石田博樹³, 山形洋平⁴, 竹内道雄⁴, 楠本憲一¹
 (¹農研機構・食総研, ²天野エンザイム, ³月桂冠, ⁴東京農工大・院, ⁵JIRCAS)
- P-54** 麹菌 *Aspergillus oryzae* *pepO* 遺伝子欠損株の菌体外エンド型プロテアーゼについて
 上野絢子, 前田浩, 山形洋平, 竹内道雄 (農工大院・農)
- P-55** *Aspergillus oryzae* の菌体内金属プロテアーゼ *saccharolysin homolog* の機能解析
 石川 雄一朗, 前田 浩, 竹内 道雄, 山形 洋平 (農工大院・農)
- P-56** *Trichoderma reesei* に存在する 10 種類の β -glucosidase isozyme の酵素化学的性質
 郭 博洋, 野崎功一, 水野正浩, 天野良彦 (信州大院・生命機能・ファイバー工学)
- P-57** マツタケのフェニルアラニンアンモニアリアーゼ遺伝子の構造と機能の解析
 宮川駿人, 勝田尚樹, 田崎裕二 (長岡高専・物質工)
- P-58** 麹菌 hydrophobin RolA と cutinase CutL1 間の相互作用に関与する RolA の塩基性残基
 對馬 裕誠¹, 佐藤 大貴¹, 金 允卿¹, 村垣 公英¹, 上原 健二¹, 高橋 徹², 山形 洋平³, 阿部 敬悦¹
 (¹東北大院・生物産業創成, ²東北大・未来研, ³東京農工大・応用生物科学)
- P-59** 麦麹の製造過程における白麹菌のトランスクリプトーム解析
 二神泰基¹, 森一樹¹, 和田正太郎², 梶原康博², 高下秀春², 大森俊郎², 田代康介,¹ 久原哲¹, 後藤正利¹ (¹九大院・農,²三和酒類)
- P-60** 静置培養系による白色腐朽担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* のキシラン成分応答に関する研究
 中村友紀, 堀 千明, 五十嵐圭日子, 鮫島正浩 (東大院・農生化)
- P-61** 麹菌のカーボンカタボライト抑制関連因子 CreA・CreB 二重破壊によるアミラーゼ高生産
 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-62** キシラン誘導型キメラ転写因子 AmyR::XlnR によるアミラーゼ生産
 金子優平¹ 田中寿基² 丸井淳一郎² 志水元亨¹ 小林哲夫² 加藤雅士¹
 (¹名城大院・農, ²名大院生命農)
- P-63** *Trichoderma reesei* におけるセルラーゼ生産に関与するトランスポーターの解析
 谷口大樹, 日下秀行, 古川隆紀, 志田洋介, 小笠原渉 (長岡技科大・生物)
- P-64** *Aspergillus nidulans* 転写因子 ManS の機能
 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-65** ヒラタケのリグニン分解酵素発現調節機構におけるカルモデュリンの役割
 末富高志¹, 阪本鷹行¹, 徳永祥孝¹, 本田与一², 泉津弘佑¹, 鈴木一実¹, 入江俊一¹
 (¹滋賀県大・環, ²京大・農)

- P-66** *Aspergillus aculeatus* セルロース系バイオマス分解酵素遺伝子の発現制御因子の同定
遊亀翔太, 國武絵美, 谷修治, 炭谷順一, 川口剛司 (阪府大院・生環科)
- P-67** Expression cluster analysis of the transcriptomes at sequential growth stages in the white-rot fungus, *Phanerochaete carnosa*, grown on aspen and spruce woods.
Hitoshi Suzuki (RIKEN, CSRS), Philip Wong, Chi-Yip Ho, Yunchen Gong, Kin Chan, Elisabeth Tillier and Emma Master (Univ. of Toronto)
- P-68** 麹菌の転写因子 AmyR と MalR の翻訳後修飾と安定性
鈴木空太, 田中瑞己, 新谷尚弘, 五味勝也 (東北大院・農・生物産業創成)
- P-69** pH 応答転写因子 PacC による糸状菌セルラーゼ遺伝子発現制御
國武絵美¹, 萩原大祐², 宮本健太郎¹, 金丸京子¹, 木村真¹, 小林哲夫¹
(¹名大院生命農・生物機構, ²千葉大・真菌センター)
- P-70** 麹菌 *xyrA* 及び *larA* 遺伝子の XlnR と AraR による協調的発現制御
石川香南, 川瀬智美, 野口佑司, 金丸京子, 木村真, 小林哲夫 (名大院生命農・生物機構)
- P-71** *Aspergillus aculeatus* セロビオース応答因子 CibR とそのパラログ因子 CibR2 の作用機序解析
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-72** Molecular basis that divides ManR-dependent and ManR/McmA-dependent genes in *Aspergillus nidulans*
Nuo Li, Miki Aoyama, Kyoko Kanamaru, Makoto Kimura, Tetsuo Kobayashi
(Grad. Sch. Bioagric. Sci., Nagoya Univ.)
- P-73** 糸状菌 *Aspergillus niger* 由来 PKS-NRPS 遺伝子クラスターの強制発現
淡川孝義, 楊小龙, 脇本敏幸, 阿部郁朗 (東大院薬)
- P-74** トリコテセン生合成遺伝子の転写因子をコードする *Tri6* の機能解析
中嶋 佑一, 鬼頭 良幸, 前田 一行, 市川 雛代, 小林 哲夫, 木村 真 (名大院・生命農)
- P-75** かび毒テルペンドールの生産制御メカニズム
本山高幸, 長田裕之 (理研・抗生物質)
- P-76** イネいもち病菌におけるテヌアゾン酸の生産制御メカニズム及び生理活性
尹忠鉄, 本山高幸, 二村友史, 長田裕之 (理研・抗生物質)
- P-77** 新規二次代謝制御因子としての *Aosp13* の機能解析
廣瀬雅人^{1,2}, 河内護之^{1,2}, 岩下和裕^{1,2} (¹広島大院・先端研, ²酒総研)
- P-78** *Emericella varicolor* におけるセスタテルペン合成酵素の探索
三橋隆章, 松田侑大, 淡川孝義, 阿部郁朗 (東大院・薬)

- P-79** 糸状菌由来メロテルペノイド **anditomin** の生合成研究
松田侑大, 淡川孝義, 阿部郁朗 (東大院・薬)
- P-80** *Aspergillus fumigatus* 由来 **pseurotin A** 生合成機構の解明
下村康一郎, 松田侑大, 淡川孝義, 阿部郁朗 (東大院薬)
- P-81** 糸状菌 *Fusarium* sp. FN080326 株由来フサリセチン A 生合成遺伝子クラスターの同定
加藤直樹¹, Jun-Pil JANG², Jae-Hyuk JANG², 高橋俊二¹, Jong Seog AHN², 長田裕之¹
(¹理研・CSRS, ²KRIBB)
- P-82** 糸状菌 *Fusarium* sp. RK97-94 のルシラクタエン生合成遺伝子クラスター中のメチル基転移酵素遺伝子 *luc1* とトランスポーター遺伝子 *luc4* の機能解析
加藤翔^{1,2}, 本山高幸¹, 廣田洋¹, 鎌倉高志², 長田裕之² (¹理研・抗生物質, ²東京理科大)
- P-83** 麹菌 *hstD* 破壊による二次代謝物生産系の活性化
河内護之^{1, 2}, 豊浦利枝子², 岩下和裕^{1, 2} (¹広島大院・先端研, ²酒総研)
- P-84** 麹菌 *Aspergillus oryzae* 由来タイプ III 型ポリケタイド合成酵素 CsyB による 3-acetyl-6-alkyl- α -pyrone の生成
橋元 誠¹, 高橋宏明¹, 高圓 宰¹, 須田千尋¹, 北本勝ひこ², 藤井 勲¹
(岩手医科大・薬, 東大院・農生科・応生工)
- P-85** DNA 二本鎖切断によるイネいもち病菌の標的遺伝子改変法
用之丸哲也¹, 荒添貴之¹, 大里修一¹, 有江力², 桑田茂¹ (¹明治大院農・²農工大院農)
- P-86** 真菌を用いた Roxithromycin の新規作用点の探索
熊坂茉佑, 石井晶, 紙透伸治, 倉持幸司, 菅原二三男, 奈良 (成川) 恵, 鎌倉高志
(東理大院理工・応生科)
- P-87** トウモロコシごま葉枯病菌における cAMP シグナル伝達経路関連遺伝子の機能解析
湯谷智, 住田卓也, 北出雄生, 泉津弘佑, 田中千尋 (京大・院・農)
- P-88** *Aspergillus fumigatus* の病原性に関わる因子の機能解析
酒井香奈江, 大荒田素子, 五ノ井透 (千葉大・真菌センター)
- P-89** 病原真菌 *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¹, 高橋梓², 森山裕充³, 五ノ井透² (¹千葉大学・医学薬学府, ²千葉大・真菌センター, ³農工大)
- P-90** いもち病菌のヘテロ 3 量体 G タンパク質 γ サブユニットの解析
風間静花^{1,2}, 川崎寿¹, 西村麻里江² (¹電大院・物質工学, ²生物研)

- P-91 トウモロコシごま葉枯病菌の *ChSte20* および *ChCla4* 遺伝子の機能解析**
北出雄生¹, 泉津弘佑², 住田卓也¹, 湯谷智¹, 田中千尋¹ (¹京大・院・農、²滋賀県大・環境科学)
- P-92 ウリ類炭疽病菌における Ras GTPase 活性化タンパク質 *CoIra1* は *CoRas2* を介して cAMP シグナル伝達経路と *CoMekk1-Cmk1* MAPK 経路の上流制御因子として関与する**
原田 賢, 久保康之 (京府大院・生環)
- P-93 イネいもち病菌マイコウイルス *MoCV1* と *MoCV1-B* のゲノム構造の比較**
高井遼子, 浦山俊一, 迫田紘史, 加藤優, 木村優里, 福原敏行, 有江力, 寺岡徹, 森山裕充 (農工大院・農)
- P-94 植物病原性 *Alternaria alternata* における global regulator *LaeA* の機能解析**
高尾和実¹, 赤木靖典¹, 播本佳明², 石原亨¹, 柘植尚志², 難波栄二³, 児玉基一郎¹
(¹鳥取大・²名大院生農・³鳥大医)
- P-95 灰色かび病菌のオートファジー関連遺伝子 *BcAtg1* の機能解析**
住田卓也¹, 泉津弘佑², 田中千尋¹ (¹京大・院・農、²滋賀県大・環境科学)
- P-96 ウリ類炭疽病菌における出芽酵母 RAM ネットワーク構成因子 *CoPag1* は植物特異的シグナル受容を介した付着器形成に関与する**
小玉紗代, 坂口 歩, 久保康之 (京都府大院・生環)
- P-97 トマトアルターナリア茎枯病菌が保有する病原性染色体の構造解析**
赤木靖典¹, 多賀正節², 柘植尚志³, 難波栄二⁴, 児玉基一郎¹
(¹鳥取大農・²岡山大理・³名大院生農・⁴鳥取医)
- P-98 セプチン動態を制御する出芽酵母の *RTS1* のホモログ *CoRTS1* はウリ類炭疽病菌において適切な孢子形成、付着器形態形成に必要である**
川端 昂, 深田史美, 坂口 歩, 久保康之 (京府大院・生環)
- P-99 ミトコンドリア局在型の *Enoyl-CoA hydratase* はウリ類炭疽病菌の病原性発現に必須である**
泉津弘佑, 多々良康香, 小松香織, 横山綾, 谷口拓矢, 丸山麻美, 入江俊一, 鈴木一実
(滋賀県大・環)
- P-100 ウリ類炭疽病菌の推定細胞極性因子 *CoTEA4* および *CoMOD5* の機能解析**
河下美都里, 坂口 歩, 久保康之, 辻 元人 (京府大院生環)

Special Lecture

特別講演

糸状菌における菌体外消化システム：分解酵素の分子機構から見えてくる

カビ・キノコのバイオマス資化戦略

五十嵐 圭日子

東京大学 大学院農学生命科学研究科 生物材料科学専攻

カビやキノコなどの糸状菌がセルロースを分解するとき、セロビオヒドロラーゼ (CBH) やセロビオース脱水素酵素 (CDH) などの様々な糖質関連酵素を菌体外に生産する。CBH の多くは、セルロースをセロビオース (β -1,4 結合したグルコース二量体) 単位で加水分解する活性ドメインと、セルロース結合性ドメインからなることが知られており、セルロース系バイオマスの変換に必須な酵素として昨今注目を集めている。一方で CDH は、補欠分子族としてフラビンとヘムを含む二つのドメインからなるフラボヘムタンパク質であり、セロビオースやセロオリゴ糖などの還元末端を酸化して対応する δ -ラクトンを生成し、その際にキノンや Fe^{3+} を含む化合物を電子受容体として利用する酸化還元酵素である。これら二つの酵素はともに基質であるセルロースに吸着する機能を有することが報告されているが、これは固体基質の表面に酵素を局在させるための重要な機能であると言える。さらに、これらの酵素を詳細にキャラクタライズしていくと、細胞から離れたところで狙った通りの反応をさせるための仕組みが備わっていることが明らかとなってきた。そこで本発表では、糸状菌が生産する菌体外酵素の巧妙な機能に関して紹介させていただきたい。

1. セロビオース脱水素酵素¹⁻⁵

担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* が菌体外に生産する CDH の、分子内および分子間の電子伝達速度をストップフロー分光光度計を用いて測定したところ、本酵素による酸化還元反応の律速段階は、セロビオースの酸化や電子受容体の還元といった分子間の酸化還元反応ではなく、分子内におけるフラビンからヘムへの電子伝達速度にあることが明らかとなった。さらにこの分子内電子伝達反応は、pH によって大きく変動するとともに、基質阻害を受けることがあきらかとなったことから、本酵素は菌体外という開放系において電子伝達 (酸化還元) 速度を制御できる仕組みを分子内に有していると考えられた。

2. セロビオヒドロラーゼ⁶⁻⁹

子囊菌 *Trichoderma reesei* が菌体外に生産する糖質加水分解酵素ファミリー7に属する CBH (*TrCel7A*) が、結晶性セルロースを分解する様子を高速原子間力顕微鏡によって可視化したところ、本酵素は活性サイトに取り込んだ基質を 1 μm (1,000 セロビオース残基) 以上にもわたって連続的に加水分解しながら、基質表面を動く様子が観察された。

さらに、不活性化した変異酵素 (E212Q) および活性サイトの入り口に位置する Trp の変異酵素 (W40A) の動きを野生型酵素と比較した結果から、活性ドメインの基質結合サイト (サブサイト-7 から-1) および生成物結合サイト (サブサイト+1 から+2) のアンバランスさが連続的な加水分解 (プロセスシビティ) に重要な役割を果たしていると考えられた。

3. まとめ

両酵素のこのような特徴は、生体による直接的な制御が効かない菌体外という環境で、酵素反応を制御する (CDH) または効率よく反応させる (*TrCel7A*) ための仕組みが酵素そのものに組み込まれていることを示しており、酵素の性質から糸状菌による栄養獲得戦略の一端が垣間見られる例であると演者は考えている。

1. Igarashi, K. *et al. Fung. Genet. Biol.* (1997)
2. Igarashi, K. *et al. Eur. J. Biochem.* (1998)
3. Igarashi, K. *et al. J. Biol. Chem.* (1999)
4. Igarashi, K. *et al. Biochem. J.* (2002)
5. Igarashi, K. *et al. FEBS J.* (2005)
6. Igarashi, K. *et al. FEBS J.* (2006)
7. Igarashi, K. *et al. FEBS J.* (2007)
8. Igarashi, K. *et al. J. Biol. Chem.* (2009)
9. Igarashi, K., Uchihashi, T. *et al. Science* (2011)

Extracellular digesting-system in filamentous fungi: Fungal strategy for the biomass utilization “visualized” from molecular mechanisms of degrading enzymes

Kiyohiko Igarashi

(Department of Biomaterial Sciences, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo)

Symposium

シンポジウム

S-1

国立科学博物館で進行中のキノコ多様性プロジェクト

保坂健太郎

(国立科学博物館植物研究部菌類・藻類研究グループ)

本発表では、菌類のうちキノコ類の多様性に焦点をあて、国立科学博物館および筑波実験植物園で進行中のプロジェクトの進捗状況について報告する。

菌類は既知種より未知種の数のほうがはるかに多く存在する。推定によると、地球上の菌類総数は150万種を超えるとされ、そのうち既知種（学名が付いている種）はわずか10万に満たない。単純計算で約30万種とされる植物に対し菌類は150万種であるので、植物1種に対して5種の菌類が存在することになる。キノコ類は菌類の一部に過ぎないが、その総種数は植物に匹敵すると考えられる。近年のメタゲノム解析などを中心とするDNAレベルの研究によると、菌類の総種数は500万を超える、との推定もなされており、これが本当だとすると、現在のペース（年間1000種程度）で新種を発表し続けていても、全菌類に名前が付くまでには軽く1000年以上かかってしまうことになる。

このように異常なほどの多様性を示す菌類であるので、広範囲にわたる調査を行うのは容易ではない。例えば、日本全域における菌類の多様性を明らかにするためには膨大な予算と人員が必要になる。しかし、日本全域のキノコ多様性を調べるために、全国に広がる研究者とキノコ愛好会のネットワークを活用することで、くまなく調査を行うことができるはずである。また反対に、一定の限られた範囲におけるキノコ類の多様性を集中的に調査することで、日本および世界の菌類総数を推定することもできるはずである。いずれにしても、個人レベルで成し遂げられるものではなく、人と人とのネットワークが重要であることには変わりがない。キノコ関係者ネットワークを活かした、キノコ分類・多様性プロジェクトをいくつか紹介する：

①絶滅危惧種調査

キノコは環境省のレッドデータブックにも掲載されている。しかし、ほとんどのキノコは発生時期が限られているため、確実に発見できる保証は無い。それが絶滅危惧種であればなおさらである。絶滅危惧種の実体を知るために、どのような調査が行われているかを紹介する。

②エキシカータとエピタイプ化プロジェクト

「エキシカータ」とは本来乾燥標本を意味するが、博物館や収蔵庫では特別な意味を持ち、同じ場所で採れた複数の重複標本のセット、のことを指す場合が多い。これを海外の博物館同士で交換する伝統がある。交換により、それぞれの国の標本が手に入るわけである。しかし、エキシカータを定期的に発行することには非常にエネルギーが必要である。エピタイプ化も含めた、現在の状況を報告する。

③植物園の全きのこバーコーディング化プロジェクト

筑波実験植物園（茨城県つくば市）には3000種を超える植物が存在する。園内では、

ブナ林帯にはブナと共生するキノコ、モミ林帯にはモミと共生するキノコが存在するはずであり、植物園全体ではかなりの種数のキノコが存在していると予想される。2011年4月より、週1回のペースで調査継続している。これまでに年間1000点以上、累計3500点を超える標本を得たが、その現状を報告する。

④きのこ展

関西地方では京都府立植物園の「きのこ展」が歴史もあり有名であるが、関東地方では大規模なきのこ展が行われてこなかった。これをふまえ、2010年より筑波実験植物園で「きのこ展」を開催している。新鮮なキノコを大量に集めて展示する、その裏側について紹介する。

⑤菌類の放射能汚染調査その他の提言

福島第一原子力発電所の事故を受け、放射性物質を蓄積しやすいキノコ類への関心が高まっている。菌類の放射能濃度モニタリングは、今後（超）長期的に行っていく必要があると考えられるが、それには関係者の大規模ネットワークが必要である。これだけでなく、菌類の研究全般に人のネットワークが必要であることは明らかで、今後菌類学をどのように発展させるかの提言を行いたい。

Dictyocatenulata alba という地衣について分かってきたこと

岡田 元

理化学研究所 バイオリソースセンター 微生物材料開発室 (RIKEN BRC-JCM)

演者は微生物資源としての糸状菌類の収集保存の業務に携わっている。しかし、糸状菌類に限らず、難培養の微生物は大変多く、科学や産業の広い分野に対して、十分に多様で利用しやすい状態で遺伝子資源を供給できているとは、残念ながら現時点では言えない。本日は、生育が遅いながらも培養可能な地衣の1種について、研究史の概要を含めて、最近の知見を紹介したい。

Dictyocatenulata alba Finley & E.F. Morris は白色の分生子柄束（菌糸が束状に立ち上がった糸状菌類の子実体; 図1）と白色小菌核様の分生子（不定形の多細胞無性孢子; 図2）を生きた広葉樹の幹などに形成する1属“1種”の“糸状不完全菌 (hyphomycete)”^[1,2]として Morris and Finley^[3]により設立された。近年では「地衣化したアナモルフ菌 (anamorphic fungus)」として扱うべきであると考えられるようになったが^[4]、地衣としての基本特性はほとんど分かっていない。また、その系統的位置は長年不明であった^[2]。さらに、本菌は汎世界的に分布しているが^[1,4]、分離株は演者らが得た数株しかない^[1,5]。そこで、*D. alba* の実体をより明らかにするために、日本産標本とそれらより得た分離株を用いて形態・生態観察や分子系統解析などを試みた。その結果、以下の様な興味深い知見を得た^[5]。

材料と方法：

- 1) *D. alba* の日本産標本 11 点と日本産分離株 5 株を供試した。
- 2) 分離株 (JCM 5358, 5359, 5360, 8401, 12918) よりゲノム DNA を抽出し、既知プライマーを用いて PCR を行い、リボソーム遺伝子 [nuSSU, nuLSU (D1/D2), ITS] の塩基配列を決定した。これらの配列とデータベースの登録配列を基に、近隣結合法により各々の遺伝子について分子系統解析を行った。
- 3) nuSSU において挿入配列の存在が判明したため、その位置と配列を決定するために、プライマーを設計して RT-PCR を行った。

結果と考察：

- 1) 3つのリボソーム遺伝子の分子系統解析から、*D. alba* の日本産分離株 5 株は単系統群を形成した。それらは子囊菌門 チャワソウ目 Lecanoromycetes Ostropomycetidae に帰属することが判明したが、目レベルの確定はできなかった。
- 2) nuLSU と ITS の系統解析により、分離株は地域ごとに沖縄 (JCM 5359, 5360)、鹿児島・長崎 (JCM 8401, 12918)、三重 (JCM 5358) の 3 群に分かれた。
- 3) nuSSU の挿入配列について (図 7) :
 - a. 全分離株で複数の挿入配列が認められ、そのいくつかはグループ I イントロンと考えられた。

- b. 真核生物における新たな5つの挿入位置が *D. alba* において明らかとなった。また、2つの挿入位置は全5株に共通していた。
 - c. 全ての挿入配列は生物における既知の配列とは類似性が低かった。
 - d. イントロンの挿入パターンから分離株5株は3群に分かれ、それらは nuLSU と ITS の系統解析におけるグループ分けと一致した。
 - e. *D. alba* における挿入位置や配列は生物系統とは相関がなく、独立に生じたものと考えられる。
- 4) 分離株5株（子実体や胞子は白色だが、分離株は淡いピンク～オレンジ色）を用いた nuLSU と ITS の系統解析・nuSSU の挿入配列パターン・培養コロニーの色調（図4-6; JCM 5358, 5359, 8401）から、*D. alba* は3つの隠蔽種 (cryptic species) よりなる種複合体 (species complex) と考えられる。
 - 5) 分離株は生育が非常に遅く（図4-6; PDA, 20C で12ヶ月培養）、コロニーはコンパクトで固い。これらの培養性状と、地衣化していると思われる樹木やほぼ無機質な岩石の上（図1）に生育することから、*D. alba* は地衣 (lichenized fungus) であることが強く示唆される。しかし、共生藻類は緑藻スミレモに近縁なものと言われているが（図3; 小石上で *D. alba* と共存していた唯一の緑藻）、本研究では地衣体構造の解明と共生藻類の厳密な特定には至らなかった。
 - 6) 日本産標本3点において、*D. alba* の色調と類似した *Gyalecta* (Ostropales, Ostropomycetidae) 様の未熟な盤菌が共存していた。この内、長野県上田市で採取した標本 (KPM-NC0017988) において、*D. alba* の分生子柄束ならびに共存する盤菌の未熟な子嚢盤よりそれぞれ得た nuLSU と ITS の部分塩基配列が一致した。従って、両者のテレオモルフ-アナモルフ関係（有性-無性関係）が強く示唆された。
 - 7) 今後、基準産地 (Chocorua, NH, USA) からの *D. alba* の採集分離を行い、リボゾーム遺伝子に基づく系統解析ならびに挿入配列構造を決定したい。そして、それらの形態/生態についても再検討し、真の *D. alba* を特定し、エピタイプ選定や種分化の検討などを行いたい。

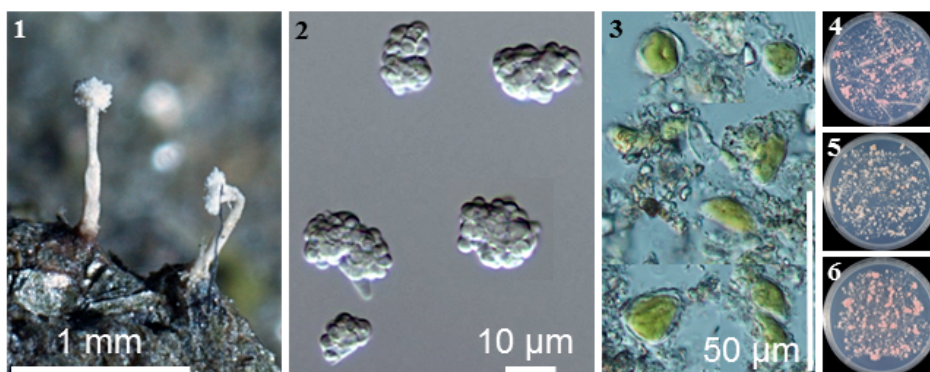
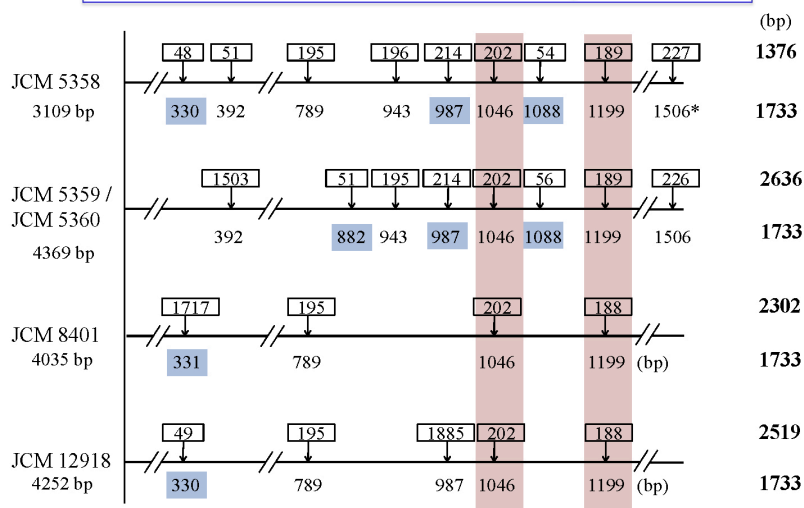


図 1-6

Exon/intron structure of nuSSU in the isolates of *Dictyocatenulata alba*



* The positions are based on the 5' flanking nucleotide in *Escherichia coli*.

□ Insertion length (bp) ■ Unique insertion positions in *D. alba* ■ Common insertion positions in lichenized fungi

☒ 7

引用文献：

- [1] Seifert et al. 1987. Mycologia 79: 459–462.
- [2] Seifert et al. 2011. The genera of hyphomycetes. CBS biodiversity series, vol. 9 (ISBN 978-90-70351-85-4; <http://www.generaofhyphomycetes.org/>).
- [3] Morris and Finley. 1967. Am Midl Nat 77: 200–204.
- [4] Diederich et al. 2008. Sauteria 15: 205–214.
- [5] An et al. 2012. Fung Biol 116: 1134–1145.

菌類バンクとその産業利用

奥田 徹

玉川大学学術研究所 菌学応用研究センター

1. 伝統的発酵食品から近代発酵産業へ

シュメール人によるビール醸造とワイン生産は、それぞれ紀元前 4000～3000 年、紀元前 4000 年頃まで遡り、製パン技術への酵母の利用は、紀元前 3500～3000 年の古代エジプトにて行われていたという証拠がある。発酵技術の活用は有史以前から知られていたが、それぞれの国々で、気候風土の違いに根ざした特徴ある発酵食品が発達し、文化となった。各民族の固有の酒は、その原料の多くがその民族の主食と一致し、製法もその主食の加工法と一致する。すなわちヨーロッパの麦・パン・ビールと、わが国の米・ご飯（つまり炊いた米）・日本酒の関係を説明できる（坂口、1986）。

東洋の醸造酒製造の糖化工程では、*Rhizopus* や *Absidia* などの混合培養が用いられるが（奥田、2008）、日本酒の醸造には *Aspergillus oryzae* の純粋培養「種麴」が用いられてきた。種麴は、「もやし」とも呼ばれ、文字通り麴造りのための「タネ」であり、蒸した米に木灰を添加して *A. oryzae* を生育させてつくる。木灰は広葉樹の葉を焼いたものが用いられるが、カリウム、マグネシウム、リンなど無機栄養を含むため分生子着生能を促進し、*A. oryzae* の生存率が高まり、木灰が蒸米をアルカリ性に保つため、他の微生物群の侵入や繁殖を押さえることになる（小泉、1990）。純粋培養技術の確立は 1876 年、ローベルト・コッホによってなされたと、微生物の教科書では述べられているが（Black、2005）、実はわが国では 1000 年前から経験的に「純粋培養」を行ってきたわけである。*Aspergillus oryzae* は味噌、醤油の生産にも使われているが、それは糖化酵素だけでなくタンパク分解活性もあるからなのである。こうして *A. oryzae* は日本の伝統的発酵食品に不可欠の菌類となっている。

明治時代になって、高峰譲吉は *A. oryzae* のデンプン糖化能力に注目した。彼は、アメリカでウイスキー製造に革命を起こそうとし、これには失敗したが、その後、*A. oryzae* に関連した特許を立て続けに申請した。中でも、「デンプンの糖化酵素の製造法」は世界初の微生物酵素の特許である。彼は、これを医薬に応用できると考え、消化酵素製剤「タカジアスターゼ」の商品名でパーク・デイヴィス社から販売し、大成功を収めた（奥田、2009）。これが近代発酵産業の幕開けとなる。興味深いことに、高峰が設立したタカミネ・ラボラトリーで使った菌株は、現在でもアメリカの公的菌株保存機関 NRRL（農務省の Northern Regional Research Laboratories）に保存されている。これは驚異的であり重要なことである。

<i>A.oryzae</i> 菌株	取得年	分譲者	由来
NRRL 467	1920	K. Oshima	TL Ao 5c, Ueda, Osaka = Thom 290-4429-Ao 5c
NRRL 466	1920	K. Oshima	TL Ao 5b, Ueda, Osaka = Thom 290-4429-Ao 5b
NRRL 460	1920	K. Oshima	TL Ao 1, (株) 菱六・京都 = Thom 290-4429-Ao 1
NRRL 1911	1943	S.A. Waksman	TL 高峰譲吉のタカジアスターゼ生産オリジナル菌株 No.35
NRRL 461	1920	K. Oshima	TL Ao N, 国立醸造試験所、現（独）酒類総

			合研究所 = Thom 290-4429-AoN
NRRL 462	1920	K. Oshima	TL Ao P、国立醸造試験所、現（独）酒類総合研究所 = Thom 290-4429-Ao P
NRRL 455	1920	K. Oshima	TL、国立醸造試験所、現（独）酒類総合研究所 = Thom 290-4429-A
NRRL 456	1920	K. Oshima	TL、= Thom 290-4429-Ao
NRRL 457	1920	K. Oshima	TL、日本醸造工業（株） = Thom 290-4429-Ao 6
NRRL 458	1920	K. Oshima	TL、= Thom 290-4429-Ao-Old
NRRL 459	1920	K. Oshima	TL、国立醸造試験所、現（独）酒類総合研究所 = Thom 290-4429-Ao K
NRRL 463	1920	K. Oshima	TL、坪井仙太郎 = Thom 290-4429-Ao 2a
NRRL 464	1920	K. Oshima	TL、（株）樋口松之助商店・大阪 = Thom 290-4429-Ao 4a
NRRL 1919	1943	S.A. Waksman	TL 高峰譲吉のタカジアスターゼ生産オリジナル菌株 No.42

表1 タカミネ・ラボラトリー（TLと略）の *Aspergillus oryzae* 株
（Wicklow ら、2002 を改変）

2. 天然物創薬、その夜明けから黄昏

ペニシリンの発見は、あまりに有名なので繰り返さないが、第二次大戦中の開発史は臨場感があり興味深い。Elander (2002) は SIM News にウィスコンシン大学や英米企業コンソシアムの活躍ぶりを描き、わが国の碧素委員会の奮闘は、角田 (1978) に詳しい。いずれも国家プロジェクトであったわけだ。抗生物質スクリーニングは、1948年に発見された“*Cephalosporium acremonium*”が生産するセファロスポリンを最後に、生産菌の探索は放線菌に移った。

余談だが、セファロスポリンの生産菌の学名は転々としている。当初 *Cephalosporium acremonium* と呼ばれたが、属名に分類学上の問題があり、*Cephalosporium* 属は *Acremonium* 属に変更された。また生産菌の種名は *Acremonium strictum* と同定されが、その後 *A. chrysogenum* と再同定され、*A. strictum* とは別種であるとされた (Gams, 1971)。ちなみに本当の *A. strictum* はセファロスポリンを生産しない。さらに、*A. strictum* は分子系統解析の結果、別属に移され、*Sarocladium strictum* に変更された (Summerbell et al., 2011)。一方、菌類の命名規約変更（メルボルン規約）により、菌類の例外措置であった二重命名法が外され、2013年1月1日付で、1種には1つの学名のみが許されることになり、現在、その作業が国際的枠組みの中で進行している。*Acremonium* 属は形態が単純なため多系統だと言われており、学名の取り扱いの帰結が注視されている (Rossman et al., 2013)。分類学者以外の方々は、以上の点について「分類が混乱している」という印象を持たれるかもしれないが、そうではなく、上記には分類の問題と命名の問題の両方が含まれているのである。

さて、菌類が再び探索されるようになるのは、サイクロスポリンが *Tolypocladium inflatum* から、メバロチンの原料が *Penicillium citrinum* から、ロバスタチンが *Aspergillus terreus* から、ミカフンジンの出発物質が *Coleophoma* sp. から発見された 1970年～1990年にかけてである。ミカフンジン以外、いずれもいわゆる抗生物質ではなく、他の領域の医薬であった。とくにスタチン系の医薬は、売れ行きからブロックバスターと呼ばれ、製薬企業のドル箱となり、このころ天然物創薬は最盛期を迎えた。奇しくも、これと生物多様性条約が時を同じくして発効した (1993年)。しかし、今世紀に入る前後から、

様々な理由で欧米製薬企業各社は、天然物創薬から撤退し、わが国の大手でも自社で関与しているところは激減してしまった。同時に天然物由来のブロックバスターは姿を消した。

3. 世の中の動向と我々の活動

いまや医薬業界は、切れの良い抗体医薬、核酸医薬による遺伝子レベルでの治療の本格化、そしてわが国が先鞭を取っている iPS 細胞では、加齢黄斑変性の臨床研究が開始されている。これにワクチンを加えれば、いずれも高分子の医薬と言える。しかし低分子医薬品が不要になったわけではなく、まったく新しい低分子医薬の創製が、手詰まりになっているのが現状だ。

Bills (2013)によれば、あまり探索されていない糞生菌に期待が持てるという。自然界での草食動物の糞の分解過程で微生物コミュニティがひしめいて競合しており、糞生菌は抗生物質を含む豊富な二次代謝産物のソースである。事実、筆者らの経験でも多くの新規物質を発見することができた。しかも、全ゲノム中の二次代謝に関与する遺伝子のマッピングからも、未知の多くの代謝産物が予測できるとされている。今後の天然物創薬には、その重要性の認識と長期間の資金投下が欠かせないと結論している。

わが国でも、天然物由来の化合物は必要であるという声は大きく、そのために、大学やベンチャー企業が独自の戦略で天然物創薬を目指す例や、組織同士が協力してコンソシアムを作って活動する例があり、また、学会レベルでのコンソシアムの提案も行われている。中でも古くから成果を出している、もっとも活動的なのは北里研究所の北里生命科学研究所 (<http://www.kitasato.ac.jp/>) であり、そのほか、理研の化合物ライブラリ (NP Depo <http://www.npd.riken.jp/npd/ja/>)、国家プロジェクトの成果として誕生した産総研の次世代天然物化学技術研究組合 (http://www.meti.go.jp/policy/tech_promotion/kenkyuu/saishin/42.pdf) などがある。日本化学療法学会・日本感染症学会からの抗菌薬研究開発のための新しい仕組み作りの提言 (平井、2012) もなされている。ベンチャー企業は浮き沈みが激しく、この分野で現在も活動しているのは、沖縄に拠点があるオーピーバイオファクトリー株式会社 (<http://www.opbio.com/>) と株式会社ハイファジェネシス (<http://www.hyphagenesis.co.jp>) くらいかもしれない。

(株) ハイファジェネシス (HGI) は、玉川大学発の初めてのベンチャー企業として 2006 年に発足した。玉川大学学術研究所菌学応用研究センター (TAMA) で 10 年以上にわたり採集分離してきた菌類を用いて、菌株バンク StrMyco 22,000 株とその培養抽出物ライブラリ ExMyco 41,000 サンプル、およびきのこ子実体粉末 PowKinoco 1,200 サンプルを維持管理、利用している。TAMA では、自然界で他の生物と密接に情報伝達をしていると考えられる菌類、すなわち植物内生菌、植物病原菌、菌類寄生菌、昆虫寄生菌、土壌小動物寄生菌、もしくは子嚢菌の中でも非常に分化している Hypocreales と未利用担子菌にターゲットを絞り、国内で採集分離を行ってきた。分離株はすべて顕微鏡下で観察し、可能な限り属レベルまで仮同定をしている。現在、15,000 株 700 属近くに達しており、1 属で全保有菌株数の 10% を越えるものはなく、逆に全菌株数の 0.5% に満たない属が 600 属以上あることから、分類学的には非常に多様性に富んだライブラリと断言できる。また少々おこがましい比較ではあるが、TAMA が保有していて、わが国の代表的な微生物資源センターである NBRC にない属が 252 属もある (もちろん、逆は 587 属もある)。

HGI ではこれらの菌株を異なった培地で培養し、そのブタノール抽出物を濃縮乾固し、ExMyco として複数対保管している。より効率よい利用を目指すために、過去の天然物創薬の成功例では、ほとんどのリード化合物に弱い抗カビ活性があるという事実にもとづき、多くの感受性酵母や糸状菌を用いた抗カビアッセイ、ならびに数種の抗バクテリアアッ

セイ、アポトーシス誘導活性、細胞毒性、抗酸化作用などを測定し、MS ACCESS を用いたデータベースに、すべてのデータを登録し、利用者の便宜を図っている。

これらの豊富なデータを伴った付加価値の高い ExMyco を、共同研究を通じ、あるいは企業の方々に利用してもらい、いくつかの成果を出してきた。そのうち、*Fusarium incarnatum* から見出されたスフィンゴ脂質に作用する C 型肝炎阻害剤、NA 255 はその誘導体が臨床第 1 相後期に達した (Nagahashi et al., 2009)。昆虫病原菌としても知られる *Pochonia suchlasporia* から発見された新規物質 pochonicine は、強い N アセチル・グルコサミニダーゼ阻害活性を示し (Usuki et al., 2009)、殺虫剤としての可能性を期待して現在、岡山県下で試験中である。新種発表した *Hypomyces pseudocorticicola* は多孔菌類寄生菌として知られ、新規抗カビ抗生物質、F 2928-1 と F 2928-2 が発見された (Kanai et al., 2005)。昆虫病原菌としても知られる *Mariannaea* 属の *M. camptospora* からは、初めての二次代謝産物 mariannin A と B が見出され、弱い抗グラム陽性菌活性を示した (Fukuda et al., 2011)。昆虫病原菌として知られる *Simplicillium lanosoniveum* からは新規 preussin 誘導体が見つかり、弱い抗カビ活性を示した (福田ら、2012)。

2009 年以降、神奈川県から委託された「微生物からの抗がん剤候補化合物のスクリーニング」プロジェクトを、木原記念生命化学振興財団とバイオベンチャー企業合計 4 社とコンソシアムを組んで行い、ExMyco 38,800 サンプルからキナーゼ阻害活性のある化合物 2 種を同定、その中で、NH1 は、大腸癌、黒色腫由来細胞に対して強い増殖抑制効果を示し、糖尿病との関連性も指摘された。また in silico 解析の結果、誘導体にも酵素阻害仮性が認められた。一方、NH4 は新規骨格の化合物で、乳がん、大腸癌由来細胞に増殖抑制効果を示し、卵巣癌、膵臓がんに関与する別の酵素に対しても阻害活性を示した。これは経済産業省の平成 25 年度グローバル技術連携支援事業にトップで採択され (<http://www.chusho.meti.go.jp/keiei/sapoin/2013/0731globalkoubo.pdf>)、「国内産カビ由来の新規成分を応用して線維症治療を目指した医薬品原料に試作開発と海外製薬企業への販路開拓」を行っている。

4. 生物資源としての菌類の今後

2010 年には、生物多様性条約 (CBD) の国連締約国会議が名古屋で開催され (COP10)、会期末の土壇場で名古屋議定書が採択され、当時はマスコミ報道も盛んであった。それから 3 年が経過し、現在、わが国では名古屋議定書の締結に向けて、国内措置のあり方について環境省を中心に検討が重ねられている。そもそも CBD の重要性については、経済産業省が、発効前後の 1992 年頃から (財) バイオインダストリー協会 (JBA) を通じて検討を重ねてきた。その結果、CBD、法的拘束力のないボンガイドライン、そして昨今の名古屋議定書の内容も、多くの国内企業に理解され、重要性が充分認識された結果、企業における海外遺伝資源の取り扱いには懸念材料がなくなった。一方、大学の先生方の認識は一般的に低く、「海外の大学や研究所と共同研究をしているのだから、植物防疫法を遵守しているし、海外遺伝資源を国内に持ってきて研究してもよいのだ」程度の理解度である (この考えは全くの誤りである)。そのため環境省のみならず、文科省でもヒアリングなどを通じて対応を検討しており、啓発活動も盛んになってきた。

一方、海外各国は生物遺伝資源の囲い込みを行っている。たとえば、中国は生物に関する最重要政策として、自国 (とくに雲南省、四川省、青海省など) の生物資源 (パンダ、蘭、作物の原種、微生物、そして中国生薬) を重視し、国内での研究を推進奨励している。中国科学院微生物学研究所には中核的研究機関としての使命が下され、大量の資金が投入されている。例として、中国全土の自然界および伝統的発酵食品からの *Saccharomyces cerevisiae* の分離 (数千株に及ぶ) と系統進化の研究がある (Wang et al., 2012)。中国ではゲノム解析のみならず、微生物の分類学を勉強すると就職先には困ら

ないという話も聞いた。

あまり知られていないが、オランダ王立の菌類多様性センター (CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Centraalbureau voor Schimmelcultures, CBS) でも、国を挙げて微生物資源の研究に注力している。CBS は、わが国の中核的微生物資源センターに相当するところである。2012年に、この研究所から、長らく見つからない子囊菌 *Stagonospora paludosa* の生きた標本を求むという 300 ユーロの懸賞金付き広告が出された (<http://connect.barcodeoflife.net/forum/topics/at-the-cbs-we-are-looking-for-the-type-of-stagonospora-to-barcode>)。

すでに述べたとおり、玉川大学学術研究所菌学応用研究センターの菌類バンク、TAMA は大変ユニークで、これまでも商売を離れて、共同研究の打診などを受けてきた。そこで我々のバンクは、2012年に日本微生物資源学会によって、わが国の23の公的カルチャーコレクションの1つとして認知された。私立大学では、東京農業大学の乳酸菌、抵抗大学の医真菌、石巻専修大学のヒゲカビ類に続いて4番目である。我々は、今後も、わが国の微生物資源を収集保存、そして利用するために、TAMA を維持発展管理していく所存である。

引用文献

- Bills GF, Gloer JB, An Z. 2013. Coprophilous fungi: antibiotic discovery and functions in an underexplored arena of microbial defensive mutualism. *Current Opinion in Microbiology*. 16: 1-17.
- Black JG (中村信一・唐澤忠宏訳) 2005 (2007) 1. 微生物学の範囲と歴史 In 林 英生・岩本愛吉・神谷 茂・高橋秀実監訳ブラック微生物学 第2版 丸善、東京 1-27pp.
- Elander RP. 2002. University of Wisconsin contributions to the early development of Penicillin and cephalosporin antibiotics. *SIM News* 52: 270-278.
- Fukuda T, Sudoh Y, Tsuchiya Y, Okuda T, Fujimori F, Igarashi Y. 2011. Marianins A and B, prenylated phenylpropanoids from *Mariannaea camptospora*. *Journal of Natural Products*. 74: 1327-1330
- Gams W. 1971. *Cephalosporium*-artige Schimmelpilze (Hyphomycetes). G. Fischer Verlag, Stuttgart. 262pp.
- Kanai Y, Tatsumi Y, Tokiwa T, Watanabe Y, Fujimaki T, Ishiyama D, Okuda T. 2005. F2928-1 and -2, new antifungal antibiotics from *Cladobotryum* sp. *Journal of Antibiotics* 58: 507-513.
- Koizumi T. 2004. Sake brewery as traditional and advanced technologies. In *Proceedings of The 10th International Congress for Culture Collections (ICCC-10) Open Seminar "Traditional Koji mold entering a modern gate"* edited by Okuda T & Bennet J. 28-33pp.
- Nagahashi Y, Ito T, Masubuchi M, Yamaguchi Y, Sakamoto H, Sudoh M, Kawasaki K, Tsukuda T, Katoh H, Okuda T, Aoki M. 2009. NA255: anti-hepatitis C virus agent produced by *Fusarium incarnatum* and fermentation of NA808, a derivative of NA255. *Proceedings of SIM Annual Meeting and Exhibition*. Westin Harbour Castle, Toronto, ON Canada, July 26-30. P96.
- Rossmann AY, Seifert KA, Samuels GJ, Minnis AM, Schroers HJ, Lombard L, Crous PW, Poldmaa K, Cannon PF, Summerbell RC, Geiser DM, Zhuang WY, Hirooka Y, Herrera C, Salgado-Salazar C, Chaverri P. 2013. Genera in Bionectriaceae, Hypocreaceae, and Nectriaceae (Hypocreales) proposed for acceptance or rejection. *IMA Fungus* 4: 41-51.
- Summerbell RC, Gueidan G, Schroers HJ, de Hoog GS, Starink M, Rosete YA, Guarro J, Scott JA. 2011. *Acremonium* phylogenetic overview and revision of *Gliomastix*, *Sarocladium*,

and *Trichothecium*. *Studies in Mycology* 68: 139-162.

Usuki H, Toyo-oka M, Kanzaki H, Okuda T, Nitoda T. 2009. Pochonicine, a polyhydroxylated pyrrolizidine alkaloid from fungus *Pochonia suchlasporia* var. *suchlasporia* TAMA 87 as a potent beta-N-acetylglucosaminidase inhibitor. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 17: 7248-7253.

Wang QM, Liu WQ, Lit G, Wang SA, Bai FY. 2012. Surprisingly diverged populations of *Saccharomyces cerevisiae* in natural environments remote from human activity. *Molecular Ecology* 22: 5404-5417.

Wicklow DT, McAlpin CE, Peterson SW. 2002. Common genotypes (RFLP) within a diverse collection of yellow-green aspergilla used to produce traditional oriental fermented foods. *Mycoscience*. 43: 298-297.

奥田 徹 2008 1. 食品生産に関わる微生物 In 渡辺 信ほか編 微生物の事典 朝倉書店 73-93pp.

奥田 徹 2009 高峰譲吉、その周辺雑感と現在との交わり 温古知新 46: 10-18.

角田房子 1978 碧素・日本ペニシリン物語 新潮社、東京 237pp.

坂口謹一郎 1986 麴のルーツ In 村上英也編著 麴学 財団法人日本醸造協会 487-496pp.

福田隆雄、須藤ユリ、土屋有紀、奥田徹、五十嵐康弘 2011 糸状菌 *Simplicillium lanosoniveum* の生産する新規ピロリジンアルカロイドとその生合成 日農化(京都) 3A04p03

平井敬二 2012 日本化学療法学会・日本感染症学会からの提言：我々の目指す方向性～抗菌薬開発アクションプラン 2012 第 59 回日本化学療法学会東日本支部総会・第 61 回日本感染症学会東日本地方学術集会合同学会 2012 年 10 月 11 日

Fungal Bank and its Industrial Application

Toru Okuda

(Mycology & Metabolic Diversity Research Center, Tamagawa University Research Institute)

S-4

ポストゲノム時代の糸状菌二次代謝物質生合成遺伝子の同定および利用

木下 浩

大阪大学 生物工学国際交流センター

糸状菌は二次代謝により様々な化合物を生産することから、新規生理活性物質の有望な生物資源とみなされている。これまで多くの化合物が単離されたが、ゲノム解析によって明らかになった生合成遺伝子の総数から考えると、未だ大きな潜在能力を秘めていると考えられる。本発表では全ゲノム解析が一般的になった現在、糸状菌ゲノムに存在する二次代謝生合成遺伝子についての解析とその利用法について報告する。

【菌株・化合物の単離】 糸状菌の場合、同一種であっても毒性や化合物の生産性が大きく異なること、全ゲノム解析がラボ単位で行えるようになってきたことから、将来の応用的な価値を考えると独自に菌株を保持することの意義は今後、より大きくなっていくと思われる。現在、世界中の様々なエリア、多様な分離源から菌の単離が行われている。我々は探索源として、昆虫に感染後、その栄養を利用して増殖し、最終的に宿主の昆虫を死に至らしめる昆虫病原性糸状菌および、タイ王国で民間療法に利用されている薬用植物から単離した植物内生菌を用い、新規化合物のスクリーニングを行った。

【遺伝子の同定】 化合物が単離、同定できても糸状菌の場合、生産が不安定であったり、生産量が低かったりすることも多く、工業的な利用を考慮すると安定に化合物を生産する菌株の育種は重要な課題の一つである。

分子育種のためには、標的となる有用化合物の生合成遺伝子の同定が必要であるが、ゲノム解析が一般的に可能になる前は、多大な労力を要した。通常、同定した化合物の構造をもとに、取り込み実験等も行いながら生合成経路を予測し、関与が予想される酵素を推定する。そのなかで化合物生合成に必須と考えられる酵素遺伝子について保存領域をもとに PCR 等により遺伝子断片を取得するのが一般的であった。しかし、糸状菌における生理活性物質の主要なグループであるポリケタイド、非リボソームペプチド (NRP) の主鎖生合成酵素遺伝子は、活性中心の相同性が高く、かつゲノム中に多数存在するため、一部の領域だけでは標的化合物の生合成遺伝子の特定、取得には不十分なことが多かった。また、化合物の最終産物生成には主鎖合成酵素の他に多くの修飾酵素が関与しており、その遺伝子群はゲノム上に数十 kb に広がって存在していることから、取得した目的遺伝子の一部を起点に、生合成遺伝子クラスターの全配列をプライマーウォーキングにより決定するにもかなりの費用がかかっていた。現在では価格が安価になったことに加え、得られる情報量の多さから考え、ドラフトゲノム解析が遥かに効率的で経済的な手段となっている。

候補遺伝子が見出されると、次に分子遺伝学的解析のために遺伝子破壊による表現型解析が必要となるが、形質転換系の構築にも大きな労力を要してきた。これまでの研究によりプロトプラスト法以外にもアグロバクテリウムを用いる方法が利用されるようになり、形質転換そのものが可能な菌は増えてきたが、糸状菌は非特異的組換え効率が高いため、意図的な遺伝子組換え体の作成が困難であった。しかし、近年、非特異的組換え関連因子を破壊することにより、飛躍的に組換え効率を上げることが可能になり、効率

よく育種することが可能となってきた。¹

今回はゲノム解析時代以前に行った紅麹菌からのシトリニン生合成遺伝子²の同定および解析とドラフトゲノムを利用した昆虫病原性糸状菌からのベルラメルリン生合成遺伝子の同定および解析について報告する。

【遺伝子の利用】 従来、化合物の発見を発端に生合成遺伝子の探索、同定が行われてきた。しかし、ゲノム解析により遺伝情報が容易に得られるようになった現在では、遺伝情報を利用した新規化合物発見が試みられている。

糸状菌のゲノム中には多いもので50以上もの化合物生合成遺伝子が存在しているが、その大部分は最終産物が不明なままである。これらを有効に利用できれば新規化合物の発見につながることを期待される。

これまでに恒常的発現プロモーターによる主鎖合成酵素や転写制御因子の強制発現が行われているが、我々は麹菌を宿主とする糸状菌異種生産系を構築したので報告する。^{3,4}

References

- 1: Ishidoh K et al 2013. *Curr. Genet* in press
 - 2: Shimizu T et al 2005. *Appl Environ Microbiol* **71**:3453-3457.
 - 3: Sakai K et al 2009. *Biotechnol Lett.* **31**:1911-6
 - 4: Sakai K et al 2012 *Appl Microbiol Biotechnol.* **93**:2011-22.
-

Oral Session

O-1 (P-33)

糸状菌の細胞質不和合性反応時におけるプログラム細胞死機構の解析

¹上森喬大, ¹井上加奈子, ¹木田千晶, ¹中屋敷均, ²兼松聡子, ¹池田健一

(¹神戸大院・農学研究科, ²果樹研)

果樹類白紋羽病菌に対し菌類ウイルスを用いた生物防除法である Virocontrol 法は、菌糸融合を介したマイコウイルスの伝搬が重要である。しかし、遺伝子型の異なる菌株間では、細胞質不和合性反応を起こし、菌糸融合することなく細胞死を引き起こすことより、菌類ウイルスの伝搬が困難となる。本研究では細胞質不和合性反応における細胞反応について、細胞学・分子生物学的解析を行った。不和合性反応における菌糸細胞の動態変化を調べるため、菌糸対峙部位の細胞を、生死判定を行うため、Propidium iodide 及び FUN-1 を処理したところ、和合・不和合どちらの組み合わせにおいても、細胞死と判定される結果が得られた。これは和合性・不和合性いずれも共通して細胞膜透過性の向上と液胞の機能低下が生じているものと考えられた。さらに、不和合性反応時に発現誘導される遺伝子を明らかにするために、次世代シーケンサーによる RNAseq 解析を行ったところ、不和合性反応時に特異的に発現誘導している遺伝子群として、response to stimulus, transport などのグループが見出された。

Cytological and transcriptional analyses of heterogenic incompatibility in *Rosellinia nacatrix*.

¹Takahiro Uwamori, ¹Kanako Ikeda, ¹Chiaki Kida, ¹Hitoshi Nakayasiki, ²Satoko Kanematsu, ¹Kenichi Ikeda

(¹Grad. Sch. Agric. Sci, Kobe Univ. ²Nat. Inst. Fruit Tree Sci. NARO)

O-2 (P-35)

麹菌 *A. oryzae* の菌糸損傷後の細胞修復における AoSO の機能解析

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】麹菌 *Aspergillus oryzae* が属するチャワソタケ亜門 (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、ある細胞が損傷した際には隔壁孔をふさいで、隣接する細胞に溶菌が伝播するのを防ぐ機能を備えている。しかしながら、溶菌時の細胞修復と再生長における分子機構は未だ解明されていない部分が多い。我々は以前、*A. oryzae* においてパルスレーザーを用いて、細胞に過大な負担をかけずに溶菌させ、再生長まで観察できる新たな実験法を確立した。そして、AoSO タンパク質が溶菌直後に隔壁孔へ凝集し、再生長に関与することを明らかにした。本研究では、AoSO 及びこれと相互作用すると考えられるタンパク質の解析を通して細胞修復機構の分子機構の解明を試みた。

【方法・結果】AoSO を保存されている領域ごとに3つに区切り、N 末端領域 (1-555 番のアミノ酸) と C 末端領域 (1147-1195 番のアミノ酸) をそれぞれ欠損させた部分欠損体を発現する株において、溶菌前後における AoSO の局在変化を観察した。その結果、C 末端領域の欠損の場合は隔壁孔に凝集する菌糸の割合が減少し、再生長機能の低下と一致する結果が得られた。一方、N 末端領域の欠損において、隔壁孔に凝集する菌糸の割合は変化しなかったが、凝集する時間が AoSO 全長に比べて長くなり、過剰に凝集する様子が見受けられた。さらに、AoSO と相互作用すると考えられる2つの新規タンパク質について、それぞれをコードする遺伝子破壊株を取得した。パルスレーザーにより溶菌させる実験を行った結果、AO090005001564 遺伝子破壊株に関して再生長機能の低下が観察された。また、Aoso 及び AO090005001564 遺伝子破壊株においては、アクチン重合促進タンパク質である AoBni1 が溶菌後の隔壁孔で過剰に蓄積する様子が観察された。現在、AoSO と AO090005001564 の機能的関係について解析を進めている。

Investigation of AoSO function in cell repair after hyphal wounding in *Aspergillus oryzae*

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

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

O-3 (P-77)

新規二次代謝制御因子としての *Aospt3* の機能解析

廣瀬雅人^{1,2}, 河内護之^{1,2}, 岩下和裕^{1,2} (¹広島大院・先端研, ²酒総研)

近年、ヒストン修飾等エピジェネティックな制御の重要性が注目されており、当研究室ではこれまでにヒストンアセチル化修飾に関連する遺伝子の解析を行ってきた。それら遺伝子の破壊株を作製し、表現型解析を行った結果、二次代謝生産に影響を与えるいくつかの因子が見つかり、その一つに *Aospt3* が存在していた。糸状菌の二次代謝産物 (secondary metabolites : 以下 SMs) は、有用な物質から有害な物質まで多岐にわたり、その制御機構を解明することは、物質生産や安全性の観点から重要である。そこで本研究では、麴菌における新規な SMs 制御因子として *Aospt3* に着目し、SMs 生産制御機構の解明を目的として研究を行った。

本研究では、SMs のモデル物質としてコウジ酸を用いている。まず、 $\Delta Aospt3$ におけるコウジ酸生産性の解析とコウジ酸遺伝子クラスター (*kojA*, *kojR*, *kojT*) の発現解析を行った。その結果、生産量が約 100 倍に増加し、また遺伝子の発現上昇が見られたことから、*Aospt3* はコウジ酸生産を負に制御していることが明らかとなった。糸状菌において、様々な SMs 生産制御に関わる代表的な因子として *laeA* がよく知られていることから、*Aospt3* と *laeA* の関係に着目し解析を行った。 $\Delta Aospt3$ における *laeA* の遺伝子発現についてノーザン解析を行った結果、発現の上昇が確認された。さらに $\Delta Aospt3\Delta laeA$ 二重破壊株におけるコウジ酸生産性を解析した結果、 $\Delta laeA$ と同様に、コウジ酸が生産されない表現型が得られた。この結果から、*Aospt3* と *laeA* は共にコウジ酸生産制御に関与していることが明らかとなった。現在 $\Delta laeA$ バックグラウンドでの *spt3* 高発現、 $\Delta Aospt3$ バックグラウンドでの *laeA* 高発現を行い、コウジ酸生産制御における *Aospt3* と *laeA* のエピスタティックな関係について解析を行っている。

Functional analysis of *Aospt3* secondary metabolic regulator

Masato Hirose, Moriyuki Kawauchi, Kazuhiro Iwashita (Hiroshima Univ, NRIB)

O-4

Chaetomium globosum における二次代謝とエピジェネティック変動の関連性

中沢威人¹, 石内勘一郎², 五反田康孝, 野口博司, 渡辺賢二 (静岡県大院薬,¹現 京大院農,²現 日本大薬)

昨年度の本大会において、我々は *Chaetomium globosum* における分子遺伝学実験システムを構築し、本菌が産生する既知二次代謝産物の生合成遺伝子クラスターを網羅的に特定した。さらに、特定の二次代謝産物を介した生合成制御機構の存在を明らかにした [Nakazawa et al. (2013) *J. Am. Chem. Soc.*, in press]. 本発表では、本菌の研究標準株 (CGKW14; $\Delta ligD \Delta pyrG$) を利用して様々な転写調節関連遺伝子の破壊株を作成し、天然物生合成変動と生合成遺伝子のエピジェネティック状態変動の関連性について調査した結果を報告する。

Velvet A ホモログをコードする *CgveA* 破壊株では、chaetoviridin 類および cochliodinol の生合成が活性化し、一方で aureonitol, chaetoglocin 類などの生合成が不活性化した。出芽酵母 SPT10 ホモログをコードする *CgsptJ* 破壊株では、mollipilin 類および coactatin 類の生合成が活性化した。他の遺伝子破壊株においても、天然物生合成に著しい変動がみられた。これらの結果は全て、昨年度発表したとおり、aureonitol および chaetoviridin 類を介した生合成制御機構の存在を改めて支持する結果となった。

ChIP 解析により、上記遺伝子破壊株における生合成遺伝子上流プロモーター領域のヒストン修飾状態を解析した。aureonitol/mollipilin 類および chaetoglocin/coactatin 類の生合成遺伝子の転写変動には、主に H3K9 メチル化 (trimethylation) 修飾状態が影響していることが示唆された。一方 $\Delta CgveA$ 株では、cochliodinol 生合成遺伝子のエピジェネティック状態が変動した一方で、chaetoviridin 類では変動がみられなかった。つまり $\Delta CgveA$ 株における生合成遺伝子の転写変動には、エピジェネティック制御が関与する経路と関与しない経路による複数の制御機構が関わっていると考えられる。

Alternation of biosynthetic regulation and its effect on epigenetic states in *Chaetomium globosum*.

Takehito Nakazawa, Kan'ichiro Ishiuchi, Yasutaka Gotanda, Hiroshi Noguchi, Kenji Watanabe.

(School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka)

O-5 (P-96)

ウリ類炭疽病菌における出芽酵母 RAM ネットワーク構成因子 CoPag1 は植物特異的シグナル受容を介した付着器形成に関与する

小玉紗代, 坂口 歩, 久保康之 (京都府大院・生環)

多くの植物病原糸状菌において付着器形成は病原性発現に必須であり, 植物表面の物質や物理的形狀のシグナルを感知して行われる。我々はこれまでに植物病原糸状菌ウリ類炭疽病菌において *CoKEL2* が付着器の形態形成および細胞極性制御に関与することを明らかにしている。また, *cokel2Δ* は人工基質上で異常形態付着器を形成するが宿主葉上では正常付着器を形成することから, 付着器形成に関与する植物特異的シグナル受容経路の存在を示唆してきた。本研究では植物特異的シグナル受容経路に関与する遺伝子を同定するために, ランダム遺伝子挿入により取得した形態形成・病原性欠損 *CoKEL2* 二重変異株 6 菌株についてゲノムシーケンス解析を行い変異遺伝子の同定を試みた。その結果, 変異遺伝子として出芽酵母の形態形成に関与する RAM (regulation of *Ace2p* activity and cellular morphogenesis) ネットワークの構成因子 Pag1 (Tao3) と同源性をもつ *CoPAG1* を同定した。*copag1Δcokel2Δ* を作出したところ, 人工基質上だけでなく宿主葉上においても異常形態付着器を形成し, 病原性欠損が見られた。この結果から *CoPAG1* が付着器形成に関与する植物特異的シグナル受容経路の構成因子である可能性が示唆された。次に *CoPag1::RFP* の細胞内局在を観察した結果, スライドガラス上では胞子および付着器の細胞質に蛍光が見られ, 発芽管には観察されなかった。一方, 宿主葉上では胞子, 発芽管, 未成熟付着器の輪郭を示すように蛍光が観察され, *CoPag1::RFP* は宿主葉上における付着器の形態分化時にのみ細胞膜周辺に局在する可能性が示唆された。

Colletotrichum orbiculare CoPag1, a component of RAM network in *Saccharomyces cerevisiae*, is involved in appressorium development triggered by plant-derived signals

Sayo Kodama, Ayumu Sakaguchi, Yasuyuki Kubo

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

O-6 (P-63)

Trichoderma reesei におけるセルラーゼ生産に関与するトランスポーターの解析

谷口大樹, 日下秀行, 古川隆紀, 志田洋介, 小笠原渉 (長岡技科大・生物)

糸状菌 *Trichoderma reesei* は, 細胞外セルロース等の誘導物質の存在下でセルラーゼを誘導的に生産する。しかし, 不溶性のセルロースは細胞膜を透過することが出来ないため, どのようにしてこれを認識し, そのシグナルを菌体内に伝達しているのかは不明である。これまでの研究から構成的に発現しているセルラーゼが不溶性のセルロースを分解し, この分解産物を取り込まれることによってセルラーゼが誘導生産されると考えられているが, その詳細に関しても不明である。これまで当研究室ではセルラーゼと同調的に発現し, かつ初発のセルラーゼ誘導物質の取り込みに関わると推定されるトランスポーターに関してセルラーゼ高生産菌株である PC-3-7 で解析してきた。その解析の過程で発見された MFS トランスポーター TRP3405 は, PC-3-7 株において遺伝子破壊を行ったところ, 破壊株においてアビセル, セルロース, ラクトースにおけるセルラーゼ生産が失われていることが明らかとなった。そこで, TRP3405 遺伝子の破壊が, セルラーゼ生産に関わる何らかの重要な遺伝子の発現に影響を与えると考え, PC Δ 3405 株と PC-3-7 株におけるセロビオース誘導試験のマイクロアレイ解析を行っている。その結果から PC Δ 3405 株において主要なセルラーゼ・ヘミセルラーゼの発現が失われていることが判明した。現在は, PC Δ 3405 株と PC-3-7 株間における転写調節遺伝子群やトランスポーター遺伝子群等に関する詳細な解析を行っている

Influence of gene destruction of cellulose specific transporter in *Trichoderma reesei*

Hiroki Taniguchi, Hideyuki Kusaka, Tkanori Furukawa, Yosuke Shida, Wataru Ogasawara

(Nagaoka Univ. of Tech)

O-7 (P-56)

Trichoderma reesei に存在する 10 種類の β -glucosidase isozyme の酵素化学的性質

郭 博洋, 野崎功一, 水野正浩, 天野良彦 (信州大院・生命機能・ファイバー工学)

糸状菌 *Trichoderma reesei* のセルラーゼ誘導物質であるソホロースは, β -glucosidase (BGL) による糖転移反応によって合成されることが推定されている。その合成に関与する BGL を特定するために, 本菌に存在する 10 種類の BGL (Cel1A, Cel1B, Cel3A, Cel3B, Cel3C, Cel3D, Cel3E, Cel3F, Cel3G および Cel3H) について発現系を構築した。これら組換え酵素の精製を行い, 糖転移活性を含めた酵素化学的性質を調査した。

GH1 に属す Cel1A および Cel1B は大腸菌において発現系を構築し, その他 GH3 の BGL は, 麹菌において発現系を構築した。これらのうち, 9 種類の BGL はいずれも *p*-Nitrophenyl- β -D-glucoside (pNPG1) とセロビオース (G2) に対して分解活性を示したが, Cel3H には BGL 活性が認められなかった。BGL 活性を示した 9 種類の酵素について, pNPG1 と G2 に対する分解活性を比較したところ, Cel3A, Cel3B および Cel3E は両方の基質に良く作用し, 比活性の差は少なかった。また, Cel3C, Cel3D, Cel3F, Cel3G および Cel1B は pNPG1 に対する比活性が G2 に比較して高く, Cel1A は G2 に対する比活性が高かった。

一方, 各 BGL のタンパク質量を統一し, 10% の G2 を基質として糖転移活性を調査した。pNPG1 に良く作用する BGL には転移生成物がほとんど確認されなかったが, G2 に良く作用する BGL (Cel1, Cel3A, Cel3B および Cel3E) には明らかな糖転移生成物が確認された。転移生成物には, 結合様式が異なる様々な二糖やセロオリゴ糖が含まれ, その中でもソホロースの合成量は Cel1A と Cel3A が著しく高く, 最大で 5.4 mg/ml と 2.8 mg/ml であった。また, Cel3A による転移生成物は時間の経過に伴ってグルコースに分解され消失したが, Cel1A では減少することなく蓄積されることが明らかとなった。このことから, Cel1A がセルラーゼ誘導物質であるソホロースの合成に関与している可能性が示唆された。

Enzymatic properties of β -glucosidase isozymes from *Trichoderma reesei*

Boyang Guo, Kouichi Nozaki, Masahiro Mizuno, Yoshihiko Amano

(Dept. of Biosci. & Textile Technol., Interdisciplinary Graduate School of Sci. and Technol., Shinshu Univ.)

O-8 (P-4)

麹菌における自己切断型 *Cle/loxP* 選択マーカーリサイクリングシステムの確立

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

麹菌は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ものの, 利用出来る選択マーカーが限られているため, 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, 蓄積した *lox* 配列間における Cre 反応を防ぐために変異型 *lox* を用いた *Cre/loxP* システムによる選択マーカーリサイクリングシステムの構築に成功している (張ら, 2012)。しかし, 望まない Cre 反応を完全に抑制するためには, 選択マーカーと Cre 発現カセットを同時に脱落させるシステムが望ましい。そこで, 本研究では自己切断型選択マーカーカセットを用いた選択マーカーリサイクリングシステムの確立を目指した。

選択マーカー *adeA* と麹菌由来 *xynG2* プロモーターに連結した Cre 発現カセットの両者を変異 *lox* 配列で挟んだ断片を搭載したプラスミドの構築を試みたが, 大腸菌内で Cre 反応が生じて目的のプラスミドを取得できなかった。そこで, Cre 遺伝子内に人為的にイントロンを挿入したところ, 目的のプラスミドの取得に成功した。作製したプラスミドを麹菌 *adeA* 破壊株に導入し, Cre 誘導条件で *adeA* マーカーと同時に Cre 発現カセットも脱落していることが確認された。しかし, *ligD* 破壊株を宿主にすると, 染色体上の *xynG2* プロモーター領域にプラスミドが挿入され, 選択マーカーカセットが脱落しない株も得られた。そこで, Cre 発現のための条件的発現プロモーターに *Penicillium chrysogenum* のキシラナーゼ遺伝子 (*xylP*) のプロモーターを用いたリサイクリングプラスミドを構築し, *adeA* 破壊株に導入した。得られた形質転換体を Cre 誘導条件であるキシロースを炭素源とした培地で培養した結果, *adeA* マーカーと同時に Cre 発現カセットも脱落していることが確認された。現在, 本システムを用いた多重遺伝子導入を試みているところである。

Development of a self-excising *Cre/loxP* marker recycling system in *Aspergillus oryzae*

Silai Zhang, Akihiko Ban, Naoki Ebara, Osamu Mizutani¹⁾, Mizuki Tanaka, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi

(Grad.Sch, Agric.Sci., Tohoku Univ., NRIB¹⁾)

O-9 (P-43)

糸状菌 *Trichoderma reesei* における菌体外繊維状物質合成酵素の探索

田原伸悟¹, 新田美貴子², 志田洋介¹, 堀川祥生³, 杉山淳司³, 大隅正子⁴, 小笠原渉¹

(¹長岡技科大・生物, ²科学技術振興機構, ³京都大学・生存圏研究所, ⁴総合画像研究支援)

糸状菌 *Trichoderma reesei* はセルロースを唯一の炭素源として培養したときに大量のセルラーゼを誘導生産する。セルラーゼ生産条件下における菌糸について走査型電子顕微鏡を用いて観察したところ、細胞壁に繊維状物質が生産されるということが明らかとなった。また、セルラーゼ非生産条件下でも物理的な刺激を受けたときに生産が促進されることが示唆された。しかしながら、繊維状物質の組成や生理学的な役割は全く解明されていない。以前、FT-IR を用いて繊維状物質の組成分析を行った結果、繊維状物質がキチンである可能性が示唆された。キチンは糸状菌の細胞壁の主成分のひとつであり、糸状菌の形態に深く関わっているため、繊維状物質の生産と関連があると考えられる。現在、*T. reesei* のゲノムデータベースより見いだした 6 種のキチン合成酵素遺伝子の破壊を行い、キチン合成酵素と繊維状物質との関連性を解析している。一方、糸状菌の細胞壁に存在する多数の GPI アンカー型タンパク質が、繊維状物質の生産と関連があると考えられたため、*T. reesei* のゲノムデータベースから GPI アンカー型タンパク質遺伝子を探索した。見いだされた遺伝子について、マイクロアレイ解析を用いて、繊維状物質の生産条件と非生産条件で発現挙動の比較解析を行っている。

Exploration of protein related to cell surface fibrous material synthesis of *Trichoderma reesei*

Shingo Tahara¹, Mikiko Nitta², Yosuke Shida¹, Yoshiki Horikawa³, Junji Sugiyama³, Masako Osumi⁴, Wataru Ogasawara¹

(¹Nagaoka Univ. of Technol., ²JST, ³RISH, Kyoto Univ., ⁴IIRS)

O-10 (P-48)

3D モデリングを利用した抗生物質アシラーゼの変異体設計

中山和毅, 山田雅人, 西田洋巳, 磯貝泰弘 (富山県大・生工)

糸状菌 *Coleophoma empetri* F-11899 が生産するキャンディン系抗生物質である環状リポペプチド FR901379 は、放線菌由来のアクレアシン A アシラーゼ (AAC) による脱アシル化後、新たなアシル基を付加することにより、深在性真菌症治療薬 Micafungin として利用されている。AAC は、ペニシリンアシラーゼなど、βラクタム系抗生物質の生産に利用されている各種のアシラーゼ酵素と弱い配列相同性を示すが、その立体構造や基質認識機構は明らかにされていない。

本研究では、ホモロジーモデリングの手法を用いて AAC の立体構造モデルを作製した。このモデルと βラクタムアシラーゼの結晶構造を用いて、アクレアシン A を含む各種基質とのドッキング計算を行った。その結果、AAC の活性部位には、βラクタムアシラーゼには無い、アクレアシン A の長いアシル側鎖を認識する細長い結合ポケットが存在することが示唆された。このモデルを検証し、キャンディン系抗生物質の生産に利用出来る新規酵素の取得を目的として、βラクタムアシラーゼの一つであるセファロスポリンアシラーゼ (CA) の活性部位に複数のアミノ酸置換を導入し、深いアシル基結合ポケットをもつ変異体酵素を設計した。変異 PCR の手法を用いて、*Pseudomonas sp.* SY-77 由来 CA の変異体遺伝子を作製し、大腸菌の発現系を利用して変異体酵素を合成した。精製した変異体酵素は、野生型酵素と較べて、セファロスポリンに対する活性が低下した一方、アクレアシン A に対する活性が顕著に増大した。これらの結果は、AAC と βラクタムアシラーゼの基質認識機構の違いを解明し、本研究で用いたモデリングとドッキングの手法が、酵素の変異体設計に有効であることを示す。

Substrate switching of antibiotics acylase by 3D modeling

Kazuki Nakayama, Masato Yamada, Hiromi Nishida, Yasuhiro Isogai
(Toyama Pref. Univ., Dept. Biotech.)

O-11

多様な糸状菌類の SSH ライブラリー解析によるバイオマス糖化関連遺伝子情報の収集

安善榮, 小口晃央, 市川夏子, 関川智洋, 紙野圭 (NITE)

当機構では、新たに国内外より単離した菌株を含めた多様な糸状菌類のバイオマス糖化関連情報付加を進めている。ここでは、リグノセルロース分解時に優位に発現する遺伝子情報を網羅的かつ効率的に取得するための SSH 法による酵素遺伝子情報の収集について報告する。これまでは、アビセル、水熱処理エリアンサス、アルカリ処理エリアンサスの各基質を炭素源として添加した培養菌体の非誘導条件 (Yeast ext., Sucrose, Soluble starch 添加) に対する SSH ライブラリーを調製し、クローン化した後、約 300 クローンの塩基配列を決定していた。このフローを効率化するため、複数のライブラリーを Illumina MiSeq により解析することとし、新たに調製した 17 株の SSH ライブラリーからのデータを Blast により解析した。その比較解析結果について報告する。

本研究の一部は“バイオマスエネルギー先導技術開発/酵素糖化・効率的発酵に資する基盤研究”(NEDO) の委託を受けて実施された。

Investigation of fungal SSH-libraries for biomass decomposition

Sonyon Ann, Akihiro Oguchi, Natsuko Ichikawa, Tomohiro Sekigawa, Kei Kamino

(NITE)

O-12

青色光刺激を与えて糸状菌から有用物質を生産する

小嶋政信¹, 三浦竜平¹, 三原聡², 市村昌紀² (¹信州大院農, ²JA 中野市)

発光ダイオード (LED) が持つ光源特性を利用して、ヒラタケ (*Pleurotus ostreatus*) 菌糸の生長に及ぼす単色可視光の光質と光強度の影響について研究したところ、青色光刺激 (光量子束密度: $105 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 中心発光波長: 470nm) により、光強度に依存しながら菌糸生長が抑制される現象を見出した。

この生長抑制現象をより詳細に考察するため、青色光刺激を与えた菌糸からの水層抽出物に含まれる主要な代謝産物を網羅的に解析した。その結果、菌糸に 36 時間青色光刺激を与えると、鳥インフルエンザ特効薬として知られるタミフルの製造原料となるシキミ酸が、暗所培養菌糸と比較して、200 倍以上増加することを発見した (n=5)。シキミ酸は、他の医薬品開発製造原料や易分解性農薬の開発製造原料としても有用であるため、実用化を見据えた大規模製造技術の開発を検討中である。

本発表では、シキミ酸経路に関与する代謝物質の時系列変化と、それらの物質の生合成過程で関与する遺伝子の発現量変化を解析した結果を基に、シキミ酸経路に及ぼす青色光刺激の効果について議論する。

Production of useful materials from fungi with blue light stimulation

Masanobu Kojima¹, Ryuhei Miura¹, Satoshi Mihara², Masaki Ichimura²

(¹Grad. Sch. Agri., Shinshu Univ.; ²JA Nakanoshi)

O-13

A. flavus・*A.oryzae* 菌株群のゲノムワイドな系統解析

大田 民, 織田 健, 岩下和裕, 後藤奈美 (独立行政法人 酒類総合研究所 醸造技術基盤研究部門)

【背景及び研究目的】*Aspergillus flavus* はアフラトキシンやその他の毒素を作ること等から非常に有害な菌であると認識されている。一方で *A. oryzae* と *A. flavus* は非常に近縁であり, 両菌株群の分類上の議論が長くなされている。このため両菌株群を分別する事は重要であり, ゲノムの構造上の違いについて解析し明らかにする事が必要である。*A. flavus* は *Aspergillus* 属, *Circumduti* 亜属, *Flavi* 節に属し *A. oryzae* も本節に含まれる。これら2種は鑑別分類学の視点から区別可能であるとされてきた。しかし一応の分別は可能であるものの判別が困難な場合も多く, 両菌株群を的確に判別する試みは十分に進んでいなかった。そこで今回我々は ATCC, ARS Culture collection, NRRL から *A. flavus* 31 株 (うち2株は NBRC と NRRL から同じ株を入手) を入手し ITS 領域のシーケンス解析, ISSR 解析および麴菌 DNAchip による系統解析を行ったので報告する。

【実験方法および結果】入手した株について単コロニー分離を行い単離した株について ITS 領域のシーケンス解析を行った結果, 6 株は *A. sojae* など別種属と考えられる株であった。これらの菌株はアウトグループとして以降も使用した。続いて *A. oryzae* 13 系統の代表株を加え ISSR1 (GTG)₅ および ISSR2 (GACA)₄ をプライマーとして使用し ISSR 解析を行い系統樹の作成を行った。この結果, 大まかに3系統に区別できた。*A. oryzae* をメインとする系統, *A. flavus* をメインとする系統に分類されたが全ての系統において両株が混在したため, 両種を完全に区別するにはより詳細な解析を行う必要があると考えられた。そこで広範で偏りのない解析となるよう ISSR 系統結果に基づき *A. flavus* 菌株を選抜し麴菌 DNAchip を用いてゲノムアレキ解析を行った。*A. oryzae* の各系統13株と今回得られた *A. flavus* のデータを使用し Gene spring にて系統解析を行ったところ両菌株群は明確に分かれた。以上の事から *A. flavus* 菌株群と *A. oryzae* 菌株群を明瞭に区別可能となった。

Genome wide phylogenetic analysis of *Aspergillus flavus* and *A. oryzae*

Tamy Ohta, Ken Oda, Kazuhiro Iwashita, Nami Goto (NRIB)

O-14

ニトロソチオネインの発見のその NO 耐性化機構の解明

周勝敏, 鳴神寿昭, 枅尾俊介, 高谷直樹 (筑波大院・生命環境)

微生物の一酸化窒素 (NO) に対する耐性化については、医学・農学分野で高い関心を持たれているものの、細菌と酵母を対象とした研究が主であり、糸状菌のそれに関する研究は極めて少ない。本研究では、糸状菌の新規な NO 耐性化遺伝子とその作用機構を解明したので、これを報告する。

Aspergillus nidulans の遺伝子ライブラリーを導入することによって、本菌に生育の NO 耐性を付与する遺伝子 *ntpA* を単離した。*ntpA* は cysteine-rich 23 aa ペプチドをコードし、NO により発現誘導された。*ntpA* の欠損は細胞内のニトロソ化タンパク質を増加させ、生育の NO 耐性を弱めた。このペプチドは NO やニトロソグルタチオンと反応しシステイン残基がニトロソ化されたことから、これを NO-inducible nitrosothionein (iNT) と命名した。ニトロソ化 iNT は thioredoxin と thioredoxin reductase によって脱ニトロソ化され iNT へと戻ることから、iNT は新たな NO 解毒系として機能することが示された。iNT 様のペプチドは菌類からヒトまで広く分布することから、iNT による NO 耐性化機構は普遍的なものなのかもしれない。

Discovery of an NO-resistant peptide nitrosothionein from *Aspergillus nidulans*.

Shengmin Zhou, Toshiaki Narukami, Shunsuke Masuo, Naoki Takaya

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

O-15

マイタケは、近紫外光が見える

倉橋敦¹, 下田隆史¹, 佐藤真之^{1,2,3}, 藤森文啓^{2,3}, 平間淳司⁴, 西堀耕三¹ (¹雪国まいたけ, ²ハイファジェネシス, ³東京家政大・環境教育, ⁴金沢工大・電気/光/エネルギー応用セ)

マイタケの子実体を暗黒, 赤色 (660 nm), 緑色 (528 nm), 青色 (467 nm), 近紫外 (375 nm) の各種 LED 下で発生させた場合, 近紫外で菌傘の着色及び伸展が良好であった。食用きのこ生産において青色が子実体生育に有効であることは多くの知見があるが, 近紫外の影響についてはマイタケの菌傘着色に関する佐藤らの特許 (JPS56131319(A)-1981-10-14) 以外あまりなく, 菌傘の伸展に関する影響については報告がない。近紫外下で生育させたマイタケは青色下のそれと比べて, 菌傘は2倍大きく, カサ暗色度合を示すメラニン含有量も2倍高かったことから, マイタケには青色と近紫外を見分けることができると考えられた。

そこで我々は, アカパンカビの青色受容体 WC1 と WC2 のホモログである Gf.WC1 と Gf.WC2 が近紫外でも青色と発現が同程度になると予想して遺伝子スクリーニングを行ったところ, これらは暗黒下と同じレベルを保っていた。一方で我々は, 青色と近紫外の両方で発現が上昇する新規な転写因子, Gf.BMR1 を見出した。この遺伝子は, 子囊菌 *Bipolaris oryzae* でメラニン合成を司る転写因子 BMR1 のホモログであった。マイタケでも Gf.BMR1 がメラニン合成に関与していると考えたが, 青色光下での発現量は近紫外光下のそれと大差がなかったことから, Gf.BMR1 に加えて他の因子の関与が示唆された。いずれにせよ, マイタケは青色光と近紫外光を見分け, その差異を利用する生理的機序の存在が示唆されたので, 今後は Gf.BMR1 を基点にその存在を明らかにしていきたい。

Grifola frondosa distinguishes between blue light and near-ultraviolet light.

Atsushi Kurahashi¹, Shimoda Takafumi¹, Masayuki Sato^{1,2,3}, Fujimori Fumihiko^{2,3}, Jyuniji Hiramata², Kozo Nishibori¹ (¹Yukiguni Maitake, ²Hyphagenesis, ³Tokyo Kasei Univ. ⁴Kanazawa Inst. Tech. EOE)

O-16

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

選択的白色腐朽菌 *Ceriporiopsis subvermispora* のバニリンに対する細胞応答

渡邊崇人, 森賢一郎, 木戸彩子, 長谷川隆大, 西村裕志, 本田与一, 渡辺隆司 (京大・生存研)

選択的白色腐朽菌 *Ceriporiopsis subvermispora* は, 「①酵素を細胞壁内に進入させずにリグニンを高選択的に分解する; ②木材腐朽初期に長鎖脂肪酸の分泌と過酸化を活発に起こす; ③リグニンペルオキシダーゼ活性を有しない; ④セルロース分解の原因となる水酸化ラジカル抑制系を有する; ⑤セロビオヒドロラーゼ活性を有しない」等, 白色腐朽菌のモデル種である *Phanerochaete chrysosporium* 等とは異なる特徴を有する。今回は, リグニンの生分解時に見出されるリグニン分解フラグメントの一つバニリン対し, *C. subvermispora* がどのような細胞応答を示すかについて調べた。

バニリン添加及び非添加のグルコースを炭素源とする液体合成培地に *C. subvermispora* をそれぞれ培養したところ, 他の白色腐朽菌とは異なり, バニリンによる生育阻害は見られなかった。また, バニリン添加によって菌の生育及び菌体外多糖の増加とともに培地中のグルコース量が著しく減少した。さらに, パルミチン酸やリノール酸等の長鎖飽和・不飽和脂肪酸や ceriporic acid (フェントン反応における三価の鉄の還元を抑制することで, 水酸化ラジカルの発生を抑制する本菌由来の新規代謝物) の産生量が増加した。一方, Suppression Subtractive Hybridization 法によりバニリン添加によって転写が誘導される遺伝子の取得を試みた。その結果, バニリン等の芳香族化合物の分解や脂肪酸の生合成及び不飽和化に関与する酵素遺伝子等が取得できた。以上より, バニリン等のリグニン分解フラグメントは, 木材腐朽機構を制御するシグナル分子の一つである可能性が示唆された。

Vanillin-induced cellular response in the selective white rot fungus, *Ceriporiopsis subvermispora*

Takahito Watanabe, Kenichiro Mori, Ayako Kido, Takahiro Hasegawa, Hiroshi Nishimura, Yoichi Honda, Takashi Watanabe (RISH, Kyoto Univ.)

O-17

麴菌アレスチン様タンパク質 CreD の脱リン酸化によるグルコース抑制の制御

田中瑞己, 平本哲也, 新谷尚弘, 五味勝也 (東北大院農・生物産業創成)

アレスチン様タンパク質 CreD は、カーボンカタボライト抑制制御因子の一つであり、ユビキチンリガーゼと標的タンパク質とのアダプターとして機能すると推定されている。我々はこれまでに、麴菌において脱ユビキチン化酵素 CreB の破壊によりグルコース抑制が解除されること(一瀬ら, 2012), CreD がマルトースパーミアーゼのグルコース依存的な分解に関わること(平本ら, 2012)を報告してきたが、CreD によるグルコース抑制の制御機構は不明であった。本研究では CreD のリン酸化部位を同定し、CreD 脱リン酸化のグルコース抑制制御への関与を解析した。

creB と *creD* の二重破壊により *creB* 破壊株が示すグルコース抑制の解除が抑えられたことから、CreD がグルコース抑制の制御に関わっていることが示唆された。CreD のホモログである出芽酵母の Rod1 は、Snf1 キナーゼによりリン酸化されることから、CreD 内に存在する 2 箇所の Snf1 標的様セリンをアラニンに置換した。その結果、ウェスタン解析で高分子側のシグナルが消失したことから、この 2 箇所のセリンがリン酸化されていることが示された。*creB* 破壊株において CreD のリン酸化部位をグルタミン酸に置換したところ、グルコース抑制の解除が抑えられたことから、CreD の脱リン酸化がグルコース脱抑制に関与していることが明らかとなった。また、共免疫沈降法により CreD と HECT ユビキチンリガーゼ HulA との相互作用を調べた結果、脱リン酸化された CreD のみが HulA と相互作用す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。)

Regulation of glucose repression through dephosphorylation of arrestin-like protein CreD in *Aspergillus oryzae*.

Mizuki Tanaka, Tetsuya Hiramoto, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi

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

O-18

いもち病菌におけるヒストンリジンメチルトランスフェラーゼの役割

Kieu Pham Thi Minh, 井上義博, Ba Van Vu, Quoc Bao Nguyen, 池田健一, 中屋敷均 (神戸大・農)

イネ科植物いもち病菌は感染過程において、発芽管、付着器、感染菌糸といった様々な感染器官を次々と形成し、劇的な形態変化を行う。このようなダイナミックな形態形成には大規模な遺伝子発現の変化が伴っていることが考えられ、そのクロマチン構造変化による遺伝子発現制御機構には興味を持たれる。本研究では、コムギいもち病菌におけるヒストンメチル化の役割に注目し、ゲノムに存在する 7 個のヒストンリジンメチルトランスフェラーゼ (HMT) の機能解析を試みた。これら HMT 遺伝子の破壊株では、孢子発芽、付着器形成、孢子形成、感染性などに様々なレベルの欠損が認められた。中でも MoHMT4 と命名された出芽酵母 SET1 遺伝子のオーソログの破壊株では、付着器形成率が劇的に低下し、宿主であるコムギにおける感染性を完全に失っていた。ウエスタンブロッティング解析により、MoHMT4 は H3K4 におけるメチル化を担うことが明らかになった。H3K4me2 抗体を用いた ChIP-seq 解析の結果、いもち病菌では H3K4me2 は主としてコーディング領域に蓄積していることが明らかとなった。また、RNA-seq による遺伝子発現解析の結果、MoHMT4 破壊株では、栄養菌糸で通常発現が抑制されている低発現遺伝子群の発現が上昇している傾向があった。その一方、野生株では付着器形成等に伴って発現される遺伝子群の発現上昇が、MoHMT4 破壊株では、抑制されている傾向があり、MoHMT4 によるヒストン修飾は遺伝子の発現誘導と抑制の両方に関与している可能性が示された。

Histone lysine methyltransferases are involved in various aspects of pathogenesis in *Magnaporthe oryzae*.

Kieu Pham Thi Minh, Yoshihiro Inoue, Ba Van Vu, Quoc Bao Nguyen, Ken-ichi Ikeda, Hitoshi Nakayashiki

(Fac. of Agri., Kobe Univ.)

O-19

病原真菌 *Aspergillus fumigatus* のアゾール剤耐性における AtrR の多様な機能

萩原大祐¹, 大場歩², 清水公德¹, 川本進¹, 五味勝也² (¹千葉大・真菌センター, ²東北大院・農)

Aspergillus fumigatus はアスペルギルス症の主要な原因菌で、免疫機能の低下した宿主に感染する。薬剤の選択肢は少なくアゾール剤は重要な役割を果たしているが、長期にわたる投薬は感染菌の耐性化を招き根治に難渋するケースが見られる。さらに、農業分野で使用されるアゾール系農薬により環境中でアゾール耐性を獲得した本菌による感染も欧州を初めとして複数の地域から報告されており、耐性化分子機構の全容解明と早急な対策が求められている。

前年までに、*A. fumigatus* において転写因子 AtrR の遺伝子破壊が各種アゾール剤に対する感受性を高め、標的経路であるエルゴステロール合成経路因子の発現低下を引き起こすことを示してきた。本発表では、当経路を制御することが知られている bHLH 型転写因子 SrbA の遺伝子破壊株を作製し、各種表現型の比較を行った。その結果、アゾール剤感受性および、エルゴステロール合成経路の主要因子(*cyp51A*, *erg3*, *erg24A*, *erg25A*)の発現低下は、*atrR* および *srbA* 破壊株と同程度に観察された。また、*atrR* 破壊株は *srbA* 破壊株と同様に低酸素環境下で生育できないことも明らかにした。これらの結果から、両因子が協調的にエルゴステロール経路を制御してアゾール耐性に関与していることが考えられる。

近年、ABC トランスポーター AbcC/CdrB の遺伝子発現が亢進しているアゾール剤耐性菌が報告された。面白いことに、野生株および *srbA* 破壊株で見られるアゾール剤に対する *abcC/cdrB* の発現応答は *atrR* 破壊株で見られなかった。さらに *abcC/cdrB* 遺伝子破壊株がアゾール剤感受性を示したことから、AtrR はエルゴステロール経路の制御に加え、ABC トランスポーターの制御からもアゾール耐性に関与していることが示唆された。

AtrR plays a crucial role in azole-resistance in *Aspergillus fumigatus*

Daisuke Hagiwara¹, Ayumi Ohba², Kiminori Shimizu¹, Susumu Kawamoto¹, Katsuya Gomi²

(¹MMRC, Chiba Univ., ²Grad. Sch. of Agric. Sci., Tohoku Univ.)

O-20

ウリ類炭疽病菌と宿主キュウリ間に形成されるリング状インターフェイスに向けたエフェクター輸送に関する解析

入枝泰樹, 前田 瞳, 高野義孝 (京大・院・農)

ウリ類炭疽病菌 *Colletotrichum orbiculare* はウリ科植物に感染する植物病原糸状菌である。当研究室では、これまでに本菌の3種のエフェクター遺伝子 *NIS1*, *CoDN3*, *CoMC69* を同定し、機能解析を実施している。宿主キュウリへの感染過程における蛍光イメージング解析により、当該エフェクターが活物寄生段階において強く発現し、侵入菌糸の基部周囲(付着器直下に位置)に形成されるリング状インターフェイスに局在することを昨年度の本会にて報告している。今回、リング状インターフェイスへのエフェクター輸送に焦点を当てた解析結果を報告する。*CoDN3* の発現プロモーターの交換実験を行った結果、活物寄生段階の初期におけるエフェクター遺伝子の強い発現がインターフェイスへのエフェクター輸送に重要であることを見出した。さらに、エフェクター輸送に関与する本菌の細胞内経路を明らかにするため、膜交通関連タンパク質の局在解析およびその遺伝子破壊株の作出、解析を行った。その結果、リング状インターフェイスの内側の病原菌細胞内にエキソサイトーシス制御因子 *SEC4* が局在することを明らかにした。また、*SEC4* および ER-Golgi 間輸送に関わる *SEC22* の遺伝子破壊株において、インターフェイスへのエフェクター輸送が低下することを見出した。以上より、本菌エフェクターは ER-Golgi 経路を経て、リング状インターフェイスへとエキソサイトーシスされると推定された。(生研センター「イノベーション創出基礎的研究推進事業」により支援)

Effector Delivery toward Ring-Shaped Interface Developed between *Colletotrichum orbiculare* and Its Host Cucumber

Hiroki Irieda, Hitomi Maeda and Yoshitaka Takano

(Grad. School of Agriculture, Kyoto Univ.)

Poster Session

P-1

出芽酵母 *Sln1p* 温度感受性株における植物-真菌融合ヒスチジンキナーゼの機能相補とエチレン応答

中山真由美^{1,2}, 古川健太郎³, 吉見啓¹, 阿部敬悦^{1,2} (¹東北大・未来研,²東北大・院農・生物産業創成,³ Univ. of Gothenburg, Dept. of Chemistry and Molecular Biology)

植物のシロイヌナズナにおいてエチレンセンサーとして機能する *AtETR1* はヒスチジンキナーゼ(HK)活性を持ち、エチレンによってHK活性が制御されている。本研究では、この植物由来のエチレン結合ドメイン(EBD)と酵母唯一のHKである *Sln1p* および酵母でのHK機能相補が認められている糸状菌HKの *TcsB* のヒスチジンキナーゼドメイン(HKD)と融合したHKを設計し、エチレン応答性のHKに機能改変した分子の造成を試みた。

AtETR1 のEBDと出芽酵母 *Sln1p* および糸状菌 *Aspergillus nidulans* *TcsB* のHKDとの融合HK発現系を構築し、出芽酵母 *Sln1p* 温度感受性株において *ScSln1p* の機能相補性を評価した結果、*AtETR1*(EBD)-*ScSln1p*(HKD)および *AtETR1*(EBD)-*AnTcsB*(HKD)が *ScSln1p* のHK活性を相補することを確認した。また、エチレン処理によって、融合HKを導入した株で生育の抑制とHOG経路の制御が認められ、エチレン応答性を確認した。

(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た。)

Functional complementation and ethylene response of plant-fungal fusion histidine kinase in a temperature-sensitive *sln1* yeast mutant.

Mayumi Nakayama^{1,2}, Kentaro Furukawa³, Akira Yoshimi¹, Keietsu Abe^{1,2}

(¹NICHe., Tohoku Univ., ²Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., ³ Univ. of Gothenburg, Dept. of Chemistry and Molecular Biology)

P-2

竹材オガコの堆積処理が細菌群集構造に与える影響

¹中田裕治,¹吉田 誠,²高島幸司 (¹農工大・農, ²富山県農林水産総合技術センター森林研究所)

堆積処理した竹材オガコを、ヒラタケ菌床栽培の培地基材として用いることで、子実体の収量が増加することが明らかになっている。しかし、堆積処理が子実体の収量を増加させる因果関係については不明な点が多い。著者らは、竹材の堆積処理期間中に細菌類が竹材に何らかの質的变化をもたらしたのではないかと考えた。そこで本研究では、継時的に堆積処理中の竹材をサンプリングし、細菌類の群集構造解析を試みた。

堆積処理期間(0-24週間)に、定期的に竹材を回収した。その竹材オガコからゲノムDNAを抽出し、それを鋳型として細菌類に特異的なプライマーを用いてPCRを行った。その結果、全てのサンプルから増幅産物が検出されたことから、全ての期間で細菌類の存在が示唆された。これらの増幅産物をDGGE解析に供しところ、全てのレーンで複数のバンドが検出された。従って、堆積処理の時間経過に関わらず、複数の細菌類が存在していることが示唆された。また、堆積処理の初期と後期の泳動パターンは異なっていたことから、堆積期間中に細菌類の群集構造に変化が生じていると考えられた。本発表では、それらのDNA断片の塩基配列に基づく細菌類の同定結果についても報告する。

本研究は特別研究員奨励費(24・3141)の助成を受け、実施された。

Effects of aging treatment on bacterial community in bamboo sawdust

¹Yuji Nakada, ¹Makoto Yoshida, ²Koji Takabatake

(¹Tokyo Univ. of Agric. and Technol., ²Toyama Prefectural Agric, Forestry and Fisheries Research Center, Forestry Research Institute)

P-3

11種の白色および褐色木材腐朽 Polyporales のゲノムおよびセクレトーム解析

堀 千明 (理研・CSRS), 五十嵐圭日子, 鮫島正浩 (東大院・農), David Hibbett (クラーク大), Bernard Henrissat(CNRS), Jill Gaskel, Dan Cullen (IMBT, FPL)

<背景>多くの強力な木材腐朽菌はサルノコシカケ目 (Polyporales) に属し、腐朽形態により白色腐朽菌と褐色腐朽菌の二つのグループに分類される。白色腐朽菌は、主要な木材成分であるセルロース、ヘミセルロース、リグニンを分解できるのに対し、褐色腐朽菌は糖質のみを分解する。本研究では、両菌の糖質分解における違いを明らかにすることを目的として、11種の白色および褐色 Polyporales をゲノムワイドに解析した。

<方法>最近ゲノム配列が解読された3種の白色腐朽菌 *Bjerkandera adusta* および *Ganoderma sp.*, *Phlebia brevispora* を含む11種の Polypore のゲノム情報を基に、糖質関連酵素 (CAZy) および糖質分解に関わるとされる酸化還元酵素について解析した。なかでも、セクレトーム解析の報告例がない7種の菌を木粉培地で5日間培養し、得られた菌体外タンパク質を、液体クロマトグラフィ-質量分析器を用いて網羅的に同定した。

<結果と考察>ゲノム解析の結果、白色腐朽菌では 376 ± 53 の CAZy 遺伝子を保有している一方、褐色腐朽菌では 286 ± 43 であった。なかでも、白色腐朽菌ゲノム上に多い遺伝子ファミリーは、セルロースおよびヘミセルロースの分解に関わるファミリーであった。加えて、本研究で解析した多糖の酸化的分解に関わる遺伝子は白色腐朽菌のみが保有していた。したがって、褐色腐朽菌と比較して、白色腐朽菌はセルロースおよびヘミセルロースの加水分解および酸化的分解に関わる多様な酵素群を利用していることが明らかとなった。

Genome-wide analysis of polysaccharides degrading enzymes in eleven white- and brown-rot Polyporales

Chiaki Hori (CSRS, RIKEN), Kiyohiko Igarashi, Masahiro Samejima (Agri., Univ. of Tokyo), David Hibbett (Clark Univ), Bernard Henrissat (CNRS), Jill Gaskel and Dan Cullen (USDA-FPL)

P-4 (O-8)

麹菌における自己切断型 *Cle/loxP* 選択マーカーリサイクリングシステムの確立

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

麹菌は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ものの、利用出来る選択マーカーが限られているため、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、蓄積した *lox* 配列間における Cre 反応を防ぐために変異型 *lox* を用いた *Cre/loxP* システムによる選択マーカーリサイクリングシステムの構築に成功している (張ら, 2012)。しかし、望まない Cre 反応を完全に抑制するためには、選択マーカーと Cre 発現カセットを同時に脱落させるシステムが望ましい。そこで、本研究では自己切断型選択マーカーカセットを用いた選択マーカーリサイクリングシステムの確立を目指した。

選択マーカー *adeA* と麹菌由来 *xynG2* プロモーターに連結した Cre 発現カセットの両者を変異 *lox* 配列で挟んだ断片を搭載したプラスミドの構築を試みたが、大腸菌内で Cre 反応が生じて目的のプラスミドを取得できなかった。そこで、Cre 遺伝子内に人為的にイントロンを挿入したところ、目的のプラスミドの取得に成功した。作製したプラスミドを麹菌 *adeA* 破壊株に導入し、Cre 誘導条件で *adeA* マーカーと同時に Cre 発現カセットも脱落していることが確認された。しかし、*ligD* 破壊株を宿主にすると、染色体上の *xynG2* プロモーター領域にプラスミドが挿入され、選択マーカーカセットが脱落しない株も得られた。そこで、Cre 発現のための条件的発現プロモーターに *Penicillium chrysogenum* のキシラナーゼ遺伝子 (*xylP*) のプロモーターを用いたリサイクリングプラスミドを構築し、*adeA* 破壊株に導入した。得られた形質転換体を Cre 誘導条件であるキシロースを炭素源とした培地で培養した結果、*adeA* マーカーと同時に Cre 発現カセットも脱落していることが確認された。現在、本システムを用いた多重遺伝子導入を試みているところである。

Development of a self-excising *Cre/loxP* marker recycling system in *Aspergillus oryzae*

Silai Zhang, Akihiko Ban, Naoki Ebara, Osamu Mizutani¹⁾, Mizuki Tanaka, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi (Grad.Sch, Agric. Sci., Tohoku Univ., NRIB¹⁾)

P-5

極微量試料を用いた文化財に潜在する糸状菌のモニタリング

和田朋子¹, 五十嵐圭日子², 藤原裕子³, 藤井義久³, 岡田 健¹ (¹東京文化財研究所・保修セ, ²東大院・農生科, ³京大院・農科)

文化財は、材質が無機物（漆喰、ブロンズなど）や有機物（紙、絹、皮革、木材など）と様々であり、暴露される環境も温度湿度などの制御不能な屋外から恒温恒湿である博物館と非常に多様である。糸状菌類はこれらの文化財を加害する原因菌の代表であるが、これら加害菌の種類は材質や環境によって多様であり、単一の方法で防除することはほぼ不可能である。このことから、個々の文化財の材質を加害する菌の加害メカニズムに着目した対処法を用いることで、文化財を傷めずに菌を除去し、再発生を抑制する技術開発が必須となる。そのためには加害菌種やその量比を把握した上で、特定の加害菌について適切に対処を行っていくことが重要である。文化財は非破壊調査を原則とすることからサンプルはごくわずかな量しか得られない場合が多い。これまでの研究で発表者らは、従来不可能であった超微量試料からの菌種の同定法を開発した。さらに、この手法をさらに発展させ菌叢中での各菌の量比を明らかにする手法を開発した。

本研究では文化財保護に役立てることを目的として、これまでに確立した超微量試料からの定性・定量手法を適用して、種々の文化財中に存在する糸状菌の種やこれらの菌の量比を明らかにして、これらの結果をまとめ、文化財と加害する菌について検討を行ったので報告する。

Monitoring filamentous fungi existing in the cultural properties from infinitesimal quantity samples

Tomoko Wada¹, Kiyohiko Igarashi², Yuko Fujiwara³, Yoshihisa Fujii³, Ken Okada¹

(¹Cent. for Conservation and Restoration Techniques, Nat. Res. Ins. for Cultural Properties, Tokyo, ²Grad. School of Agricultural and Life Sciences, Univ. of Tokyo, ³Grad. School of Agriculture, Kyoto Univ.)

P-6

糸状菌由来の免疫回避機能性素材を用いた新規医療用ナノ粒子の開発

佐藤大貴¹, 松村香菜², 高橋慎太郎³, 高橋徹, 村垣公英¹, 石井恵子², 川上和義², 富樫貴成⁴, 高見誠一⁵, 阿尻雅文⁵, 福本学³, 阿部敬悦^{1,6} (¹東北大院農, ²東北大院医, ³東北大・加齢研, ⁴山形大理, ⁵東北大・多元研, ⁶東北大・未来研)

金属ナノ粒子は、医療分野への応用が期待されているが、静脈内に投与したナノ粒子の殆どが肝臓や脾臓などの細網内皮系に捕捉され標的組織へ送達できないことが課題である。一方、我々は産業糸状菌である麴菌の界面活性蛋白質 hydrophobin(-Rola) に関する研究を行ってきた。その後、ヒト感染性糸状菌 *Aspergillus fumigatus* において hydrophobin がヒトの免疫応答回避 (ステルス) 能を有することが示された。そこで我々は、生体内で安定な金属酸化物ナノ粒子に、糸状菌の新規ステルス因子である界面活性蛋白質 Rola を被覆し、ステルス機能を賦与した新規ステルスナノ粒子の開発を行った。金属ナノ粒子は高温熱水反応により合成した酸化鉄 (Fe₃O₄) ナノ粒子 (平均粒径 200 nm) を用いた。まず、マウス由来の樹状細胞およびマクロファージを用いて Rola 被覆粒子のステルス能を評価した。結果、樹状細胞からのサイトカイン産生、マクロファージによる貪食を誘起しなかった。実用化に向け、現在はマウス生体内での in vivo ステルス能を評価している。また、作製した Rola 被覆粒子のゼータ電位の測定結果から、Rola 被覆粒子はマウス生体内の pH 領域において負の電位を有しており、血中において高い分散性を示すと考えられる。

Development of imaging nano-particles coated with immune-response free (stealth) fungal materials

Daiki Sato¹, Kana Matumura², Shintaro Takahashi³, Kimihide Muragaki¹, Ishi Keiko², Kazuyoshi Kawakami², Takanari Togashi⁴, Seiichi Takami⁵, Masafumi Ajiri⁵, Manabu Fukumoto³, Keietsu Abe^{1,6}

(¹Grad Sch Agric Sci Tohoku Univ, ²Grad Sch Med Tohoku Univ, ³IDAC Tohoku Univ, ⁴Sci Yamagata Univ, ⁵IMRAM Tohoku Univ, ⁶NICHe Tohoku Univ)

P-7

ヒラタケ菌糸に青色光刺激を与えて抗癌活性物質を生産する

三浦竜平¹, 戸田一弥¹, 藤井博¹, 小嶋政信¹, 三原聡², 市村昌紀² (¹信州大院農, ²JA 中野市)

発光ダイオード (LED) が持つ光源特性を利用して、ヒラタケ (*Pleurotus ostreatus*) 菌糸の生長に及ぼす単色可視光の光質と光強度の影響について研究したところ、青色光刺激 (光量子束密度: $105 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 中心発光波長: 470nm) により、光強度に依存しながら菌糸生長が抑制される現象を見出した。青色光照射した菌糸からの有機層粗抽出物を、ヒト悪性前立腺癌細胞株 PC-3 に添加したところ、暗所培養菌糸からの有機層粗抽出物と比較して、有意な癌細胞増殖抑制活性が確認された。さらにヒト前立腺癌細胞の転移原因遺伝子である F A B P 5 の発現も、より効果的に抑制されることを確認した。有機層粗抽出物に含まれる抗癌活性物質の同定ならびにその作用機構を解明することが今後の課題である。

本発表では、暗所培養菌糸と青色光刺激を与えた菌糸の癌細胞増殖抑制効果と F A B P 5 発現抑制効果を比較した実験結果を基に、菌糸に与える青色光刺激の影響について考察する。

Production of materials with anticancer activity from oyster mushroom mycelia by blue light stimulation

Ryuhei Miura¹, Kazuya Toda¹, Hiroshi Fujii¹, Masanobu Kojima¹, Satoshi Mihara², Masaki Ichimura²

(¹Grad. Sch. Agri., Shinshu Univ.; ²JA Nakanoshi)

P-8

アグロバクテリウム法による菌根菌ホンシメジの遺伝子組換え株の作出

山本真弓¹, 泉津弘佑², 北出雄生¹, 羽當加奈子¹, 田中千尋¹ (¹京大院・農, ²滋賀県大・環境科学)

近年、菌類の遺伝学において遺伝子組換えや遺伝子破壊のような分子遺伝学的手法の進歩が著しい。菌類を対象とした形質転換法としては、アグロバクテリウム法が利用されることが多くなってきており、実際に我々は今までに数種の腐生担子菌 (エノキタケ、マイタケ、ブナシメジ) においてアグロバクテリウム法を用いて、遺伝子組換え株の作出に成功している。これらを踏まえて、本研究では、菌根菌であり高級食用担子菌としても知られるホンシメジ (*Lyophyllum shimeji*) の一核体および二核体においてアグロバクテリウム法を用いて遺伝子組換え株の作出を行った。*Agrobacterium tumefaciens* は pPZP-HYG2 プラスミド (薬剤耐性マーカーとしてハイグロマイシン耐性遺伝子を含む) を持つ EHA104 株を用いた。ホンシメジのハイグロマイシン耐性株は、一核体、二核体の両者で得られた。PCR 法により、耐性株 20 株のゲノム中にハイグロマイシン耐性遺伝子が挿入されていることも確認した。1 核体および 2 核体のどちらにおいても、*A. tumefaciens* に感染させるまでの前培養日数が 3 日間から薬剤耐性株を得ることが出来たが、特に 6 日間以上で安定して得られた。今後さらに詳細な条件検討を行い、耐性株作出の最適条件を検討していく予定である。本実験により、アグロバクテリウム法はホンシメジの遺伝子組換え株の作出にも有効なことが示された。また、サザンブロッティングによりランダムな箇所に遺伝子挿入が起こっていることを確かめ、TAIL-PCR 法により遺伝子が挿入された箇所を特定する予定である。特に一核体においても組換え株が多数得られたことから、今後ジーンタギング法などによりホンシメジの持つ様々な特性や機能に関わる遺伝子の特定に大きく貢献できるものと考えられる。

Agrobacterium tumefaciens Mediated Transformation of *Lyophyllum shimeji*

Mayumi Yamamoto¹, Kosuke Izumitsu², Yuki Kitade¹, Kanako Hatoh¹, Chihiro Tanaka¹

(¹Grad. Sch. of Agri., Kyoto Univ., ²Sch. of Environmental Science, Univ. of Shiga Pref.)

P-9

麹菌 *Aspergillus oryzae* オートファジー欠損株における異種タンパク質生産性の向上

寺本 寛, 各務 清美, 小島 海平, 宇田川 裕晃, 高木 忍, 丸山 潤一¹, 北本 勝ひこ¹ (ノボザイムズ ジャパン (株), ¹東大院・農生科・応生工)

[目的] *Aspergillus* 属菌は産業用酵素の生産菌として有用な微生物である。これまで本菌を用いて種々のタンパク質発現を試みた中で、遺伝子コピー数増加により小胞体ストレスを誘発し生産量が低下したと思われる糖質加水分解酵素が存在した。近年麹菌において、オートファジー欠損によるウシキモシン生産性の向上が報告されている(PLoS ONE(2013) 8, e62512)。そこで、オートファジーの難発現性糖質分解酵素生産性への影響を検討すべく、変異株での発現および蛍光標示した当該酵素の局在観察を行った。

[方法・結果] 当該酵素をコードする遺伝子を *A. oryzae* $\Delta Aogat8$ 株および野生株に *amyB* プロモーターの制御下で強発現し、フラスコ培養における生産量を比較した結果、野生株においては、1 コピー株と比較し 2 コピー株で顕著に生産量が低下した。一方で、 $\Delta Aogat8$ 株では 1 コピー株に対し、2 コピー株での生産性向上が認められた。また EGFP 融合タンパク質を用いた局在観察により、本酵素の凝集体と推定される構造物が両株で蓄積することが判明した。野生株では、時間経過に伴い液胞での蛍光シグナルが得られたことから、オートファジー経路による凝集体の液胞への輸送・分解が推定された。一方破壊株では液胞におけるシグナルは観察されなかった。これらの結果から、オートファジー機能の欠失により、凝集体の分解が抑制されたことで、当該酵素の分泌が促進されたことが示唆された。

Improved production of a heterologous protein in *Aspergillus oryzae* by autophagy deficiency.

Hiroshi Teramoto, Kiyomi Kagami, Kaihei Kojima, Hiroaki Udagawa, Shinobu Takagi, Jun-ichi Maruyama¹, Katsuhiko Kitamoto¹

(Novozymes Japan Ltd, ¹ Department of Biotechnology, The University of Tokyo)

P-10

麹菌を用いた同時糖化発酵によるデンプンからの L-乳酸生産

若井 暁¹, 吉栄俊秀², 浅井菜々実¹, 山田亮祐¹, 荻野千秋², 堤 浩子³, 秦 洋二³, 近藤昭彦² (¹神戸大・自然科学, ²神戸大・工, ³月桂冠・総研)

【目的】本研究の目的は、麹菌 *Aspergillus oryzae* を用いて、デンプンからの同時糖化発酵により L-乳酸を効率的に生産することである。化石燃料資源と競合しないバイオマスを用いて様々な化合物を合成することは、バイオリファイナリーとして近年注目されている。その一環として、トウモロコシ由来のデンプンから乳酸を生産し、乳酸を重合したポリ乳酸を用いたバイオプラスチックの生産がある。麹菌は、アミラーゼを大量に生産・分泌するため、デンプンを利用することに長けている。そこで、本研究では、麹菌のデンプン分解能に注目し、デンプンからの乳酸生産を検討した。

【方法・結果】麹菌 (*A. oryzae* RIB40) は、乳酸を蓄積しない。そこで、基質の競合や反応の逆行を回避する目的で、ゲノム上の lactate dehydrogenase (LDH) 遺伝子を欠失させ、加えて乳酸生産能が高い牛由来 LDH を導入した。創成した麹菌 *A. oryzae* LDH Δ 871 株は、100 g/L グルコースから約 50 g/L の乳酸を生産した。また、*A. oryzae* LDH Δ 871 は 100 g/L 可溶性デンプンからも約 30 g/L の乳酸を生産した。生産された乳酸の光学純度は、99.9%以上が L 体であった。以上、麹菌を用いた同時糖化発酵により、デンプンから高い光学純度の L-乳酸を高濃度で生産することに成功した。

L-lactic acid production from starch by simultaneous saccharification and fermentation in *Aspergillus oryzae*

Satoshi Wakai¹, Toshihide Yoshie², Nanami Asai¹, Ryosuke Yamada¹, Chiaki Ogino², Hiroko Tsutsumi³, Yoji Hata³, Akihiko Kondo²

(¹Org. Adv. Sci. Tech., Kobe Univ., ²Dept. Chem. Sci. Eng., Grad. Sch., Kobe Univ., ³Res. Inst., Gekkeikan)

P-11

糸状菌 PKC の新規阻害剤に対する酵母スクリーニング系の構築

庄司郁央¹, 中山真由美², 吉見啓², 藤岡智則³, 河合清³, 堀内裕之⁴, 梅山秀明⁵, 阿部敬悦^{1,2} (¹東北大院農・生物産業創成,²東北大・未来研,³クミアイ化学工業,⁴東大院農,⁵中央大理工)

細胞壁構築シグナル伝達 (CWIS) 経路は、真菌の細胞壁構築において重要な役割を担っている。本経路を構成するタンパク質のうちプロテインキナーゼ C (PKC) は、特に中心的な役割を担っており、糸状菌のモデル生物 *Aspergillus nidulans* の PKC (AnPkcA) やイネいもち病菌の PKC (MgPkc1) の欠損が致死であることが知られている。このことから真菌の PKC は新たな抗真菌剤の標的として注目されている。

我々は、MgPkc1 の阻害剤探索を目的に立体構造モデリングによるインシリコスクリーニングを行ってきた。その結果、数種の MgPkc1 阻害剤候補化合物が見出され、平板寒天培地上での生育阻害試験から、MgPkc1 阻害剤として Z-705 が選抜された。一方、本化合物はイネ葉上での薬剤試験においては効果が認められず、化合物改変による活性向上が求められている。本研究では、Z-705 の改良を見据え、Z-705 およびその類縁体の活性を評価するスクリーニング系の構築を試みた。糸状菌に比べて扱いが容易な酵母を用いることにより、高効率な評価系の構築を目的とした。まず、酵母の PKC1 破壊株において、糸状菌 PKC あるいは酵母と糸状菌 PKC のキメラタンパク質を発現させた。次に、Z-705 を用いた生育阻害試験により、本スクリーニング系を評価した。その結果、Z-705 が糸状菌 PKC に対して高い選択毒性を有すること、本系が糸状菌 PKC 阻害剤探索に有効であることが示唆された。現在、酵母ゲノム上の PKC1 を改変した株を作製し、スクリーニング系の最適化を目指している。

Construction of yeast screening system for novel chemical agents that inhibit PKC of filamentous fungi.

Fumio Shoji¹, Mayumi Nakayama², Akira Yoshimi², Tomonori Fujioka³, Kiyoshi Kawai³, Hiroyuki Horiuchi⁴, Hideaki Umeyama⁵, Keietsu Abe^{1,2} (¹Grad. Sch. Agric. Sci. & ²NICHe. Tohoku Univ., ³Kumiai Chemical Industry Co., Ltd., ⁴Grad. Sch. Agric. Sci. Tokyo Univ., ⁵Facul. Sci. Engin. Chuo Univ.)

P-12

麹菌総合ゲノムデータベースの開発と公開

織田健¹, 上田泰央³, 岩下和裕^{1,2} (¹酒総研,²広島大・先端研,³株式会社ジナリス)

麹菌 (*Aspergillus oryzae*) は、安全性が高く、清酒をはじめとする伝統的発酵食品や食品用、医療用の酵素の供給源、さらには、異種タンパク質生産のホストとしても使用され、我々の生活に欠くことの出来ない微生物である。その重要性から、当所では、麹菌遺伝子解析の一助とするために、麹菌比較ゲノムデータベース(CFGD)を構築し公開してきた。今回、本 CFGD をベースに改変を行い、麹菌総合ゲノムデータベース (Comprehensive *Aspergillus oryzae* genome database: CAoGD) を設置・公開した (<http://nrif21.nrif.go.jp/CFGD/>)。さらに、これまでに酒総研で蓄積してきた RIB40 株の 9 条件 (27 データポイント) でのマイクロアレイ発現データを掲載した。また、当所で行った次世代シーケンサー (Roche 454 GS FLX titanium) による清酒用麹菌等の 3 株、他機関でシーケンスが行われ公開されている 7 株の RIB 保存菌株についてのリードデータを集積し、RIB40 のゲノム配列に対してマッピングを行ない掲載した。さらに、AspGD での情報更新に伴い *A. nidulans* FGSC A4 株および *A. niger* CBS513.88 株についてもデータのアップデートを行った。以上について、糸状菌分子生物学コンファレンスの開催に合わせて公開する予定としている。これらのデータベースを使用した解析の事例についても合わせて紹介したい。

Development and publication of Comprehensive *Aspergillus oryzae* Genome Database (CAoGD)

Ken Oda¹, Yasuo Uemura³, Kazuhiro Iwashita^{1,2} (¹NRIB, ²Hiroshima Univ., ³Genaris Inc.)

P-13

Aspergillus oryzae の機能性ペプチド融合ハイドロフォービン (HypB) による細胞表面工学システムの構築

大橋信太郎, 堂前圭佑, 中間聖, 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) は菌糸を伸長させる糸状菌や担子菌類にみられる細胞表面タンパク質である。低分子量の両親媒性タンパク質であり、単量体として菌体外に分泌された後、細胞表面で疎水性領域を外側に向けて自己集合することで単層を形成し、気中菌糸や孢子・分生子に対して撥水性の付与している。また、Hydrophobin は各種の基材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。

当研究室では清酒・味噌・醤油の製造に用いられる *Aspergillus oryzae* に注目し、Hydrophobin をコードすると推測される遺伝子 *hypA-C* の発現を確認している。これまでの研究から *hypB* 遺伝子は菌糸の伸長が盛んな培養時間 2 日目に最も発現するとともに、HypB タンパク質は菌糸表面に局在することが観察されている。また、*hypB* 遺伝子に *egfp* を融合し、*A. oryzae* の菌糸表面において融合タンパク質として発現させ、蛍光顕微鏡によって菌糸表面の HypB-EGFP 融合タンパク質の蛍光を観察後、菌体を Proteinase K で処理することで EGFP タンパク質の蛍光の退色を観察している。現在、HypB に機能性ペプチドを付加した機能性 HypB を麹菌の細胞表面に発現させることにより、麹菌に機能性を付与する細胞表面工学システムの構築と効率について検討している。

Construction of cell surface display systems using hydrophobin (HypB) with functional peptides in

Aspergillus oryzae

Shintaro Ohashi, Keisuke Domae, Satoshi Nakama, Asuka Kase, Harushi Nakajima

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

P-14

麹菌 *A. oryzae* を用いた植物由来オスモチンの生産および精製

伊藤大修, 丸山潤一, 永田宏次¹, 田之倉優¹, 北本勝ひこ

(東大院・農生科・応生工,¹東大院・農生科・応生化)

【目的】オスモチンは、植物の防御ペプチドファミリーに属するタンパク質であり、酵母に対して抗菌活性を有することが知られている。また、哺乳類細胞において、糖取込みや脂肪酸代謝を促進するアディポネクチンと類似の機能をもつことが報告されている¹⁾。このことから、オスモチンは糖尿病や動脈硬化などの生活習慣病を改善する物質として期待されている。麹菌 *Aspergillus oryzae* は異種タンパク質生産宿主として利用されており、培地中にタンパク質を大量に分泌する能力をもつ。本研究では、食用であるトマトおよびイチゴ由来のオスモチンを大量に得ることを目的として、*A. oryzae* を用いた生産と精製を行った。

【方法・結果】成熟型オスモチンをコードする cDNA について、*A. oryzae* で高発現している *tefl* 遺伝子のコドン含有率に合わせて塩基配列の最適化を行った。その cDNA の上流に *amyB* 遺伝子を融合し、高発現プロモーター *P-glaA142* 制御下で発現するプラスミドを作製した。オスモチンには HA および His₆ タグを付加し、AmyB との間に Kex2 様プロテアーゼ切断配列を挿入するかたちで設計した。各オスモチン発現プラスミドを用い、*A. oryzae* プロテアーゼ 10 重破壊株 NSID-ΔP10²⁾ を宿主として形質転換を行った。取得した形質転換株を 5×DPY 培地で 4 日間振とう培養したところ、培養液中にトマトおよびイチゴ由来それぞれのオスモチンの生産を確認した。さらに、その培養液を Ni-NTA アフィニティークロマトグラフィーに供することでオスモチンを精製した。現在、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* でオスモチンへの感受性に関わる Pho36p と同源性をもつ AO090003000602, AO090026000756 の欠損株を作製し、*A. oryzae* の感受性を低下させることによってオスモチンの生産量の増加を試みている。

1) Narasimhan *et al.* (2005) *Mol. Cell* 17, 171-180. 2) Yoon *et al.* (2011) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89, 747-759.

Production and purification of plant osmotins in *Aspergillus oryzae*

Hiromasa ITO, Jun-ichi MARUYAMA, Koji NAGATA¹, Masaru TANOKURA¹, Katsuhiko KITAMOTO

(Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo; ¹Dept. of Appl. Biol. Chem., The Univ. of Tokyo)

P-15

糸状菌 *Aspergillus nidulans* α -1,3-グルカン欠損株の培養特性と物質生産性の評価

一杉昌玄¹, 吉見啓², 稲葉梓¹, 阿部敬悦^{1,2} (¹東北大院農・生物産業創成, ²東北大・未来研)

我々は、糸状菌のモデル生物である *Aspergillus nidulans* において、細胞壁構成多糖である α -1,3-グルカン (AG) の合成酵素遺伝子 *agsA*, *agsB* の機能解析を進めている。これ迄に、本菌における細胞壁 AG の生合成は主に *agsB* 遺伝子に依存することを明らかにした。また液体振盪培養時には、野生株は菌糸が凝集して球状に生育するのに対し、AG欠損株 (*agsB* 破壊株及び *agsA agsB* 二重破壊株) は菌糸が培地中に均一に分散する特徴的な生育性状を示すことを明らかにした。さらに、200 ml (培地100 ml張り込み) フラスコレベルの培養試験を行った結果、野生株と比較してAG欠損株の生育菌体量が増加していたことから、AG欠損株の物質生産性に興味を持たれた。

今回、AG欠損株の培養特性と物質生産性を評価するために、5L (3L培地張込み) ジャー型培養装置を用いて攪拌数や通気量を変えた種々の条件でAG欠損株の培養試験を行った。その結果、攪拌低回転域では、AG欠損株の菌体量が野生株の菌体量よりも多かった。一方、AG欠損株では菌糸が培地中に均一分散することから、回転翼により菌糸が剪断され易いことが示唆された。物質生産のモデルケースとしてペニシリン生産量を比較したところ、AG欠損株は野生株より多くのペニシリンを培地に生産した。以上の結果より、課題はあるもののAG欠損株の菌糸分散特性を利用した物質生産は有効であると思われる。現在、菌糸の剪断対策をはじめとする培養条件の最適化を試みている。

Morphologic properties and penicillin production of *Aspergillus nidulans* α -1,3-glucan deficient mutants under liquid culture conditions.

Masahiro Hitosugi¹, Akira Yoshimi², Azusa Inaba¹, Keietsu Abe^{1,2} (¹Grad. Sch. Sci., & Tohoku Univ., ²NICHE, Tohoku Univ.)

P-16

油糧微生物 *Mortierella alpina* 1S-4 の *lig4* 遺伝子破壊株の作製

菊川寛史¹, 櫻谷英治¹, 安藤晃規^{1,2}, 落合美佐³, 清水 昌⁴, 小川 順¹ (¹京大院農・応用生命, ²京大・生理化学ユニット, ³サントリーグローバルイノベーションセンター株式会社, ⁴京都学園大・バイオ環境)

【目的】近年、高度不飽和脂肪酸(PUFA)のもつ様々な生理機能が注目され、それらの安定供給が必要とされつつある。これまでに我々は、油糧微生物 *Mortierella alpina* 1S-4 による PUFA 生産と PUFA 生合成経路の解明を行ってきた。しかし、本菌での脂質代謝経路の解明及び厳密な代謝制御による PUFA 生産を行うために、遺伝子ターゲティング技術の開発が必要であった。そこで、非同組換えに関わる DNA リガーゼ活性を有する LIG4 をコードする遺伝子を本菌よりクローニングし、非同組換え頻度が向上すると予想される *lig4* 遺伝子破壊株の作製を試みた。【方法】二回交差非同組換えを介する *lig4* 遺伝子破壊コンストラクトを構築し、アグロバクテリウム法により形質転換を行った。得られた形質転換株のゲノムを鋳型とし、PCR 及びシーケンスにより *lig4* 遺伝子が非同組換え置換された株を選抜した。また、*lig4* 遺伝子破壊株を宿主として非同組換えを試み、*lig4* 遺伝子破壊による遺伝子ターゲティング効率への影響を評価した。【結果】得られた形質転換株 93 株中 3 株が *lig4* 遺伝子破壊株であった (約 3%)。得られた *lig4* 遺伝子破壊株を宿主として遺伝子ターゲティングを試みたところ、形質転換株 4 株中 1 株に遺伝子ターゲティングが確認され (25%)、本菌において *lig4* 遺伝子破壊による遺伝子ターゲティングの効率化が確認された。

A *lig4* gene-disrupted strain from oleaginous fungus *Mortierella alpina* 1S-4

Hiroshi Kikukawa¹, Eiji Sakuradani¹, Akinori Ando^{1,2}, Misa Ochiai³, Sakayu Shimizu⁴, Jun Ogawa¹ (¹Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., ²Res. Uni. Physiol. Chem., Kyoto Univ., ³Suntory Global Innovation Center Ltd., ⁴Fac. Bioenviron. Sci., Kyoto Gakuen Univ.)

P-17

Aspergillus 属菌の細胞壁 α -1,3-グルカンのオリゴ糖化とその機能性評価

吉見啓¹、稲葉梓²、矢野成和³、佐々木宏明⁴、後藤智生⁴、川上和義⁵、阿部敬悦^{1,2} (¹東北大未来研,²東北大院農,³山形大院理工⁴ (榊岐阜セラック製造所),⁵東北大院医)

我々は、Aspergillus 属菌 (*A. oryzae*, *A. nidulans*) において、細胞壁多糖の一つである α -1,3-グルカン (AG) について研究を進めてきた。*A. nidulans* の AG 合成酵素遺伝子破壊株 (AG 欠損株) は、細胞壁染色性の Congo Red や β -グルカナーゼとキチナーゼ活性を有する Lysing Enzymes に対して高い感受性を示した。また、AG 欠損株は液体培養において菌糸が培地中に分散するという特徴的な培養性状を示した。これらのことから、細胞壁 AG は、ある種の細胞壁ストレスから菌体を保護しており、菌糸の凝集性にも関与していることが示唆された。一方、ヒト感染症の病原真菌 *Histoplasma capsulatum* や植物病原性のイネいもち病菌 *Magnaporthe grisea* において、AG が宿主免疫反応からの回避機能 (ステルス機能) に関与することが明らかになり、真菌の生存戦略における AG の重要性が認識されつつある。

このような背景のもと、我々は、AG のステルス機能に着目し、AG を低免疫刺激性の素材として活用できるのではないかと考えた。そこで本研究では、水不溶で取扱い困難な AG をオリゴ糖化し、水溶性化することを試みた。まず、細胞壁から抽出した AG について、亜臨界水への溶出条件を決定し、可溶化した AG について糖分析を行った。その結果、2~25 糖の AG オリゴ糖が生成していることが確認できた。次に、AG オリゴ糖の機能性を評価するため、分取した AG オリゴ糖を免疫細胞刺激試験に供試した。今回は、この免疫細胞での AG オリゴ糖の機能性評価結果についても議論したい。

Production of alpha-1,3-glucan oligosaccharides from cell wall of Aspergilli and its functional analysis

Akira Yoshimi¹, Azusa Inaba², Shigekazu Yano³, Hiroaki Sasaki⁴, Tomoo Goto⁴, Kazuyoshi Kawakami⁵, Keietsu Abe^{1,2} (¹NICHe, ²Grad. Sch. Agric. Sci., ³Sch. of Med. Tohoku Univ., ⁴Grad. Sch. Sci. & Eng. Yamagata Univ., ⁵Gifu Shellac MFG)

P-18

麹菌で異種発現させたアフィディコリン生合成酵素の細胞内局在解析

伴暁彦、田中瑞己、藤居瑠彌¹⁾、南篤志¹⁾、及川英秋¹⁾、新谷尚弘、五味勝也 (東北大院・農・生物産業創成, 北大院・理)

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、生合成系を構成する酵素群を異種宿主に導入して高生産させようという試みが盛んになっている。実際に、植物病原菌 *Phoma betae* が生産する DNA polymerase 阻害剤であるアフィディコリンを麹菌 *Aspergillus oryzae* によって異種生産させることに成功している¹⁾。そこで本研究では、生産量の向上を目指して生合成反応が行われるオルガネラや排出に関わるトランスポーター (TP) に着目し、それらの細胞内局在解析を行った。

各生合成酵素やオルガネラマーカートンパク質を GFP または RFP との融合タンパク質として共発現させ、蛍光顕微鏡観察を行うことで、融合タンパク質の局在部位を同定した。その結果、アフィディコリン生合成反応の最終段階に関わる 2 種類の Cytochrome P450 は小胞体への局在が認められたが、触媒ドメインが小胞体内腔にあるのかどうかを含めて、更なる解析を進めている。また、最終産物の排出に関わっていると推定される TP は細胞内で興味深い挙動を示し、効率的な排出という観点からも重要性が示唆されたため、実際にアフィディコリン生産に与える影響について検討も行っている。

1) Fujii et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**, 1813-1817 (2011)

Subcellular localization of aphidicolin biosynthetic enzymes expressed in the heterologous host, *Aspergillus oryzae*.

Akihiko Ban, Mizuki Tanaka, Ryuya Fujii¹⁾, Atsushi Minami¹⁾, Hideaki Oikawa¹⁾, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi (Div. Biosci. Biotechnol. Future Bioind., Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., ¹Hokkaido Univ.)

P-19

Involvement of lectin-type cargo receptors in heterologous protein secretion in *Aspergillus oryzae*

Dung Huy Hoang, Jun-ichi Maruyama, Katsuhiko Kitamoto (Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo)

Aspergillus oryzae has a superior capacity to secrete a large amount of proteins into the medium, and is being industrially used for the production of commercially important proteins. In order to further improve the strain, detailed knowledge about its secretory pathway is crucial. However, current understanding on how elements of *A. oryzae*'s secretory pathway interact with secreted proteins is still very scarce. Cargo receptor is a class of membrane proteins that are responsible for the efficient recruiting and packaging of cargo proteins into anterograde or retrograde vesicles for trans-organelle transportation. One subclass of cargo receptor, the lectin cargo receptor, specifically interacts with glycoproteins via their lectin domain. In recent years, lines of evidence are implying that lectin cargo receptor not only recruits cargo proteins into transport vesicles but also functions in quality control of secretory proteins. It is then very interesting to investigate the relationship between lectin cargo receptors and heterologous proteins in *A. oryzae*. The mammalian Vip36 and yeast Emp47p are well-studied lectin cargo receptors, with the former being reported to be involved in post-ER quality control of certain secretory proteins. A BLAST search on the *A. oryzae* genome database returned two homologs of these two proteins. The two genes ID are AO090026000428 and AO090102000145, which were named *Aovip36* and *Aoemp47*, respectively. Fluorescence microscopy observation revealed that the two lectin cargo receptors mostly colocalized with an early Golgi marker. Deletion of each cargo receptor gene improved the secretion of heterologously expressed bovine chymosin and human lysozyme into the culture supernatant. Moreover, analysis of the ER-enriched fractions revealed that deletion of each gene reduced the degree of heterologous protein accumulation, suggesting that those two cargo receptors may be involved in the retention of heterologous proteins along the secretory pathway. Further studies to investigate the interaction mechanism between those two cargo receptors and heterologous proteins are being conducted.

P-20

麹菌で確認された6個のアシル CoA 合成酵素ホモログの生育における役割の解析

玉野孝一¹, Kenneth Bruno², 小池英明¹, 石井智子¹, 三浦愛¹, 梅村舞子¹, Scott Baker², 町田雅之¹

(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。そこで、麹菌 *Aspergillus oryzae* 等の糸状菌は物質分解と合成の能力に優れていることから、この能力を活かして、更に代謝工学的な遺伝子改変を駆使することにより、バイオ燃料やその原料を高生産する技術開発を進めてきた。麹菌の作る脂肪酸や脂肪（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可能なることから、これらの高生産化をこれまでに中心的に試みてきた。

脂肪酸代謝には多数の酵素が関与するが、そのうちのアシル CoA 合成酵素は、遊離脂肪酸をアシル CoA に変換する反応を触媒する。その役割は、脂肪酸やトリグリセリドの合成と分解の両方に関与する。本研究では当酵素遺伝子に注目し、その発現を遺伝子組換えにより変化させることで脂肪酸の生産性向上を試みた。

まず麹菌の当酵素遺伝子の探索を行った。酵母 *S. cerevisiae* や *A. nidulans* 等他の真菌で同定されている当酵素に対して麹菌ゲノムの全翻訳産物を相同性検索した結果、当酵素に特徴的なドメインの配列を明確にもつ遺伝子が6個確認された。次にこれらの各破壊株を作製し、表現型・脂肪酸資化能・菌体内脂肪酸量等を調べた。その結果、当ホモログの1個は欠失により菌体内脂肪酸量を向上させ、別の1個は脂肪酸資化に主に働くことが明らかとなった。他の4個は欠失しても表現型等が変化しなかったため、生育における役割は判らなかつた。今後、菌体内脂肪酸量が向上した株で他の遺伝子を組換えて、更なる向上を目指す予定である。

Analysis on the Roles of Six Fatty Acyl-CoA Synthetase Homologs in the Growth of *Aspergillus oryzae*

Koichi Tamano¹, Kenneth Bruno², Hideaki Koike¹, Tomoko Ishii¹, Ai Miura¹, Myco Umemura¹, Scott Baker²,

Masayuki Machida¹ (¹AIST, ²PNNL)

P-21

麹菌 *A. oryzae* におけるストレス応答調節タンパク質 AoRim15 の機能解析

中村英淳, 菊間隆志, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)

【目的】酵母の Rim15 はストレス応答性転写因子の上流にあり, 栄養飢餓になると活性化し, 孢子形成を誘導すると考えられている。また, 清酒酵母は, 実験室酵母と比較して高いアルコール発酵力を有しており, その理由として *Rim15* 遺伝子における機能欠失変異が報告されている。本研究では, 麹菌 *Aspergillus oryzae* の *Aorim15* の機能解析を目的とした。

【方法・結果】Rim15 に相同なタンパク質をコードする麹菌 *A. oryzae* *Aorim15* について, 破壊株を取得した。表現型解析を行った結果, PD 培地では野生株と比較して分生子が顕著に減少した。一方, ソルビトール入り高浸透圧培地では, 野生株との分生子数の差が減少した。また, 破壊株では, 野生株と比較して熱に感受性を示すことが観察された。さらに, 野生株と *Aorim15* 破壊株に, EGFP - AoRim15 で両株の局在を調べたところ, 細胞質に蛍光が観察された。以上の結果より, *S. cerevisiae* と同様に *A. oryzae* でも, AoRim15 が浸透圧や熱ストレス, 分生子形成に関与していることが示唆された。一方で, 清酒酵母の Rim15 はフレームシフト変異が生じたことにより, C 末側が欠損している。そこで, 清酒酵母の Rim15 と同様に AoRim15 の推定されるストレス応答調節ドメインの C 末端側を一部欠損させた株を作製した。現在, この株を用いて, 野生株と破壊株の表現型を解析中である。また, 破壊株と同様に熱などのストレス感受性試験も行う予定である。

Functional analysis of the stress response regulator protein AoRim15 in *Aspergillus oryzae*

Hidetoshi NAKAMURA, Takashi KIKUMA, Katsuhiko KITAMOTO

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

P-22

糸状菌 *Aspergillus nidulans* による土壌フミン酸の代謝機構

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, 植物リグニン由来の芳香環や脂肪族鎖を多く含む難分解性の高分子化合物であり, 自然界では生物・非生物的に分解され地球上の炭素循環が維持される。しかしながら, 一部の細菌や白色腐朽菌を除いて, フミン酸の生物分解についてのほとんどは未解明である。一方, 本研究室では, これまでに, 188 種の糸状菌のうち 15 種が培地中のフミン酸を脱色する活性を示すこととこれらの多くが培養に伴いフミン酸を低分子化することを見出してきた (昨年度, 本コンファレンス発表 P-8)。

本研究では, フミン酸の低分子化能が強かった *Aspergillus nidulans* を用いて, 糸状菌によるフミン酸代謝の分子機構を解明することを試みた。最少液体培地に *A. nidulans* の分生子を添加して 12 時間振とう培養した後, これに 0.1% フミン酸を添加し, さらに 3~24 時間培養した菌体から全 RNA を抽出し, DNA マイクロアレイ解析を行った。遺伝子発現パターンによるクラスター解析の結果, フミン酸の添加に伴い発現が上昇するクラスターには, カルボン酸, 有機質, 脂肪酸 (GO No. 46395, 1901575, 6631) の代謝遺伝子が多く見られた。また, 芳香族の分解に関わる Flavin-containing monooxygenase および Cytochrome P450 遺伝子群のうち, それぞれ AN10582, AN7522 の発現が上昇しており, 現在これらの機能についての解析をすすめている。また, フーリエ変換型赤外分光解析により, 培養後の培養液中のフミン酸では芳香環やカルボン酸の含量が低下することが示された。以上の結果から, 土壌環境中にも棲息する *A. nidulans* がフミン酸を分解すること, 糸状菌が土壌フミン酸に対して遺伝子発現レベルで応答・代謝することが初めて示された。

Analysis of soil humic acid degradation by the fungus *Aspergillus nidulans*

Nami Nakazawa, Ken-Ichi Oinuma, Naoki Takaya

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

P-23

麴菌の菌糸融合能力の解析方法の確立と培地成分が与える影響の検討

塚崎和佳子, 丸山潤一, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)

【目的】麴菌 *Aspergillus oryzae* は日本の伝統的な醸造産業に使用されてきたほか、酵素生産や異種タンパク質生産の宿主としても利用されている。*A. oryzae* が菌糸融合を行う能力をもつことは、およそ 50 年前に坂口謹一郎東京大学名誉教授らにより報告されている(Ishitani *et al.* 1956)。しかし、*A. oryzae* の菌糸融合に関して、それ以降ほとんど研究が行われておらず、*A. oryzae* の育種で利用されることはなかった。また、菌糸融合は有性生殖での重要なステップの一つであり、これを解析することにより、まだ見つかっていない *A. oryzae* の有性生殖の発見につながる可能性がある。今回我々は、*A. oryzae* の菌糸融合能力の解析方法を確立し、培地成分による菌糸融合能力への影響を検討した。

【方法と結果】まず、*A. oryzae* において、ウリジン・ウラシル要求性($\Delta pyrG$)とアデニン要求性($\Delta adeB$)の 2 種類の株を作製し、両者の分生子を混合して、ウリジン・ウラシル、アデニンを含む寒天培地に植菌した。数日間培養ののち形成した分生子を回収し、最少培地に塗布した。複数のコロニーの生育が観察されたため、ゲノム PCR を行ったところ、これらのコロニーは栄養要求性が相補された菌糸融合体由来のものであることが確認された。次に、他の糸状菌において菌糸融合に関与することが知られているタンパク質のホモログである AoFus3 および AoSO の欠損株を用いて実験を行った。この場合は菌糸融合体が観察されなかったことから、今回の方法は菌糸融合を評価する手法として利用可能であると判断した。培地成分を変えて実験を行った結果、ポテトデキストロース培地や DPY 培地などの栄養源が豊富な培地では、菌糸融合の効率が著しく低くなり、窒素源を欠乏させた条件下では菌糸融合が促進されることが判明した。

Investigation of nutrition effects in hyphal fusion efficiency of *Aspergillus oryzae*

Wakako TSUKASAKI, Jun-ichi MARUYAMA, Katsuhiko KITAMOTO

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

P-24

Aspergillus oryzae における 331-25 sense RNA, 331-25 antisense RNA の機能解析

辻井雅, 森田寛人, 前田浩, 山形洋平, 竹内道雄 (東京農工大・応生科)

【背景と目的】黄麴菌の分生子及び発芽分生子の EST 解析の結果、331-25 遺伝子領域から読み出される 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。また、分生子において 331-25 sense RNA (以後 SN RNA) と 331-25 antisense RNA (以後 AS RNA) の両方が読み出されていることを報告した。⁽¹⁾ 本研究は 331-25 遺伝子領域から読み出され、分生子特異的に存在することが推測された mRNA の機能を明らかにすることを目的とした。

【方法及び結果】黄麴菌の $\Delta brlA$ 株を培養した分生子着生直前の菌体には、半定量 PCR により菌糸には見出されなかった AS RNA が存在していた。このことから、AS RNA は分生子柄の形成とともに転写が開始されることが示唆された。次に、331-25 遺伝子領域欠損株 ($\Delta 331-25$ 株) を作製し、表現形の観察を行った。経時的に分生子数、コロニー直径の計測を行ったところ、 $\Delta 331-25$ 株はコントロール株と比較して、分生子数の低下、コロニー径が小さくなっていた。また、331-25 遺伝子領域の欠損による発芽率への影響は見られなかった。さらに、光照射条件(明所,好氣的条件)で表現形の観察を行ったところ、分生子柄の形成に影響が見られ、光非照射条件(暗所,嫌氣的条件)で表現形の観察を行ったところ、331-25 遺伝子領域の欠損によって分生子数が上昇していた。以上のことより、331-25 遺伝子領域から読み出された SN RNA, AS RNA は光照射条件,光非照射条件の両方において分生子形成能に影響している可能性が示唆された。

(1)辻井ら, 第 12 回糸状菌分子生物学カンファレンス要旨集 p. 46 (2012)

Analysis of 331-25 sense RNA, 331-25 antisense RNA 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

麹菌 *A. oryzae* における菌核形成抑制因子 EcdR 欠損による有性生殖発見の試み

田中 勇氣, 金 鋒杰, 丸山 潤一, 北本 勝ひこ (東大院・農生科・応生工)

【目的】麹菌 *Aspergillus oryzae* において有性世代は発見されていないが, 株によって異なる接合型遺伝子 *MATI-1* あるいは *MATI-2* をもつことから, ヘテロタリックな有性生殖を行う可能性が示唆されている。菌核は菌糸が分岐, 接着, 融合を繰り返して形成する耐久構造であり, 他の糸状菌で菌核内に有性胞子が形成されることが報告されている。以前の我々の研究において, 菌核形成を正に制御する転写因子 *SclR* を過剰発現した結果, 2つの株が菌糸融合して形成する菌核の増加が見られた。今回は, 菌核形成を負に制御する転写因子をコードする *ecdR* 遺伝子の破壊を行い, *A. oryzae* の有性生殖の促進効果を検討することを目的とした。

【方法と結果】菌糸融合および有性生殖の有無を判別するため, 異なる栄養要求性および蛍光色で可視化した株を作製した。具体的には, *A. oryzae* のそれぞれの接合型株において, ウリジン・ウラシル要求性またはアデニン要求性を付加するとともに, EGFP もしくは mDsRed の発現による蛍光で標識した。さらに, *ecdR* 遺伝子を破壊した株どうしで対峙培養を行ったところ, 2つの株が菌糸融合して形成する菌核の増加が見られ, *sclR* 遺伝子過剰発現よりも *ecdR* 遺伝子破壊において菌核形成の促進効果が高いと評価された。さらに, 菌核を成熟させ内部構造を観察したところ, 有性胞子と類似した形態的特徴をもつ構造が観察された。現在, 培養条件の検討や有性生殖関連遺伝子の過剰発現によって, *A. oryzae* の有性生殖を発見することを試みている。

Promotion effects of deleting a sclerotial formation repressor EcdR for discovery of sexual reproduction in *Aspergillus oryzae*

Yuki TANAKA, Feng Jie JIN, Jun-ichi MARUYAMA, Katsuhiko KITAMOTO

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

P-26

麹菌 *A. oryzae* におけるオートファジー関連膜タンパク質 AoAtg9 の局在および機能解析

藤木 耕平, 菊間 隆志, 北本 勝ひこ (東大院・農生科・応生工)

【目的】オートファジーは二重膜構造を持つオートファゴソームを介して細胞内成分をリソソーム/液胞で分解する機構であり, 真核生物に広く保存されている。現在, オートファゴソーム形成過程でその膜成分がどこから来るのかについて議論されている中で, 近年 Atg9 が注目されている。Atg9 は Atg タンパク質の中で唯一の複数回膜貫通ドメインを持つタンパク質である。また, オートファゴソーム形成のために pre-autophagosomal structure(PAS)へ膜脂質を供給する役割を担っていると考えられており, オートファゴソーム形成に重要であるとされている。本研究では, *Aspergillus oryzae* においてオートファゴソーム形成の分子機構を明らかにするため, AoAtg9 の機能解析を行った。

【方法・結果】*Aoatg9* 破壊株を作製し, 寒天培地における生育を観察したところ, 気中菌糸形成が抑制され, 分生子数が大きく減少した。オートファジーのマーカータンパク質である AoAtg8 の EGFP 融合タンパク質を *Aoatg9* 破壊株に発現させ, 窒素飢餓条件で観察したところ, 液胞で分解されていなかった。これらの結果より, AoAtg9 が *A. oryzae* においてオートファジーに必須であることが分かった。AoAtg9 の局在を調べるため AoAtg9-EGFP を発現させ, 観察を行ったところ, 大きいドットと小さいドットが細胞質中に存在し, 小さいドットが微小管依存的に動いていることが分かった。また, 窒素飢餓条件で液胞膜及び液胞内に蛍光が観察された。さらに AoAtg9-EGFP と mDsRed-AoAtg8 を共発現し, 局在観察を行ったところ, オートファジーの初期段階において部分的な共局在が見られ, 一部の AoAtg9 が PAS に局在していることが示唆された。現在, 様々な *Aoatg* 遺伝子破壊株において AoAtg9 の局在観察を進めている。

Localization and functional analysis of the autophagy-related membrane protein AoAtg9 in *Aspergillus oryzae*

Kohei Fujiki, Takashi Kikuma, Katsuhiko Kitamoto

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

P-27

Aspergillus oryzae の細胞壁ストレス耐性に関わる機能未知遺伝子の解析

徳永奈央¹, 妹尾史子^{3,4}, 二神泰基², 竹川薫², 岩下和裕^{3,4}, 後藤正利²

(¹九大院・生資環, ²九大院・農, ³広大院・先端研, ⁴酒総研)

【目的】ゲノム解析の結果、麹菌のもつ遺伝子の50%以上は機能未知であり、その多くは糸状菌で保存されていることが明らかになっている。これらの遺伝子の解析は、糸状菌独自の生命現象の解明につながるものとして期待される。本研究では、黄麹菌 *Aspergillus oryzae* のもつ糸状菌に特異的な機能未知遺伝子のうち、その遺伝子破壊株が細胞壁合成阻害剤に対して高感受性を示す AO080569000108 の機能解析を行った。

【方法と結果】AO080569000108 破壊株は、野生株と比較して、菌糸伸長能および分生子形成能が低下し、さらに、Congo red および Calcofluor white に高感受性を示した。また、細胞壁組成を分析した結果、アルカリ可溶性グルカンが減少し、一方、GlcNAc が増大していることが示唆された。また、EGFP 融合タンパク質を同遺伝子破壊株に発現させた結果、破壊株の表現型を相補した。AO080569000108-EGFP は FM4-64 と共局在したことから、液胞に局在することが示唆された。以上の結果より、AO080569000108 は液胞において、麹菌の正常な細胞壁合成に関与するものと推察した。

Functional analysis of functionally-unknown gene related cell wall stress resistance in *Aspergillus oryzae*.

Nao Tokunaga¹, Ayako Senoo^{3,4}, Taiki Futagami², Kaoru Takegawa², Kazuhiro Iwashita^{3,4}, Masatoshi Goto²

(¹Grad. Sch. Biores. Bioenviron., Kyushu Univ., ²Faculty of Agriculture, Kyushu Univ.,

³Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ., ⁴NRIB)

P-28

麹菌アミノ酸トランスポーターの機能解析

浜中大夢, 金子明裕, 北川治恵, 佐野元昭, 尾関健二, 大箸信一 (金沢工大・ゲノム研)

【目的】小麦フスマには8%ほどのデンプン質が共存しており、小麦フスマを培地として麹菌(*Aspergillus oryzae*)を培養した場合、アミラーゼ系酵素遺伝子が強く誘導され、その他の遺伝子の解析に大きな影響をおよぼしていた。麹菌では炭素源を制限した培養条件下での、栄養源の取り込みに関わるトランスポーター遺伝子の機能についてほとんど解析が行われていなかった。そこで小麦フスマのデンプン質を除いた固体培地での遺伝子発現について、DNA マイクロアレイを用いて解析を行った。その結果、酵母の様々なアミノ酸取り込みに関与する General amino acid permease (*Gap1*)と相同性の高い麹菌遺伝子(*GapA*)の発現がデンプン質除去フスマで高くなっていることが確認された¹⁾。そこで今回、*GapA* 遺伝子の機能について解析を行ったので報告する。

【方法と結果】リアルタイム PCR 法によりデンプン質を除去した小麦フスマと、通常的小麦フスマでの培養における *GapA* 遺伝子の発現量について解析を行った。その結果、デンプン質除去フスマにおいて、*GapA* 遺伝子の発現量に顕著な増加が確認された。また、酵母の *Gap1* 遺伝子の発現が抑制されることが知られているグルタミン、アルギニン液体培養に添加し、*GapA* 遺伝子の発現量を解析したところ、グルタミンではあまり差がなかったが、アルギニンでは発現量の増加が確認された。このように、*GapA* と酵母の *Gap1* で機能の違う点がみられた。現在、培養時のアミノ酸存在下での生育や取り込みについて、さらなる詳細な解析を行っている。

1)佐野ら：日本農芸化学会 2012 年度大会

Functional analysis of the *Aspergillus oryzae* amino acid transporter

Hironu Hamanaka, Akihiro Kaneko, Harue Kitagawa, Motoaki Sano, Kenji Ozeki, Shinichi Ohashi (KIT)

P-29

Aspergillus nidulans におけるプロテインキナーゼ C の sterigmatocystin 合成制御に関わる機能の解析

片山琢也, 堀内裕之 (東大院・農生科・応生工)

Aspergillus nidulans のプロテインキナーゼ C (PKC) をコードする *pkcA* は生育に必須な遺伝子であり, その産物である PkcA は細胞壁の完全性維持や極性生長, ペニシリン合成など様々な現象に関わる機能を持つことが示唆されている。PkcA は細胞壁の完全性維持に関わる cell wall integrity (CWI) 経路で機能し、BckA, MkkA, MpkA からなる MAP キナーゼカスケードを活性化するが, このカスケードとは独立した機能を持つことも示唆されている。これまでに PkcA 失活条件における網羅的転写解析を行った結果, この条件においてマイコトキシンである sterigmatocystin (ST) の合成に関わる遺伝子の多くとそれらの転写を誘導する転写因子をコードする *aflR* の mRNA 量が増加していた。*pkcA* 温度感受性株において PkcA が部分的に失活する条件で ST 生産量を測定したところ, ST 生産量が野生型株と比べて増加していた。一方, 活性化型 PkcA を高生産する株を用い, PkcA 活性化条件における ST 生産量を測定したところ, ST 生産量が野生型株と比べて減少していた。これらの結果から, PkcA は ST 生産を負に制御することが示唆された。さらに, CWI 経路において PkcA の下流で機能すると考えられる転写因子をコードする *rlmA* の欠失株における ST 生産量と活性化型 MkkA を高生産できる株を用いた MkkA 活性化条件における ST 生産量を測定したところ, どちらも ST 生産量は野生型株と同等であった。このことから PkcA の ST 生産制御に関わる機能は CWI 経路の MAP キナーゼカスケードとは独立した機能であることが示唆された。

Functional analysis of Protein kinase C in sterigmatocystin biosynthesis in *Aspergillus nidulans*

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

P-30

Aspergillus nidulans における分生子特異的低分子タンパク質 CON ホモログの解析

鈴木聡^{a, b}, Özlem Sarikaya Bayram^a, Özgür Bayram^a, Gerhard H. Braus^a

(a ゲッティンゲン大学, b 食総研)

1980 年代にアカパンカビにおいて, 分生子及び分生子形成期に特異的に蓄積される転写産物として, いくつかの *con* 遺伝子が見出された。なかでも *con-6* および *con-10* は分生子の形成と成熟に伴って分生子中で高発現する遺伝子として注目されている。それぞれのコードするタンパク質 CON-6 及び CON-10 はそれぞれ 96 及び 86 アミノ酸からなる機能不明の親水性低分子タンパク質である。これらの遺伝子をそれぞれ欠損したアカパンカビにおいては顕著な表現形を見る事が出来なかった。CON-6 及び CON-10 は広く糸状菌において保存されており, 我々はアスペルギルス・ニドランスのゲノム情報より, それぞれの相同遺伝子 *conF* 及び *conJ* を見出し, 解析を行った。GFP を融合した両タンパク質は, 成熟した分生子に局在し, 発芽に伴って, FM4-64 により染色される液胞と思われる膜構造内に蓄積が見られた。また, 核近傍への局在も観察された。それぞれの遺伝子の単独破壊株では表現形を見る事が出来なかったが, 二重破壊株では, 発芽速度の低下が見られた。また, 分生子内の糖アルコールの存在比率に変化が生じた。

Role of CON-6 and CON-10 homologue in *Aspergillus nidulans*

Satoshi Suzuki^{a, b}, Özlem Sarikaya Bayram^a, Özgür Bayram^a, Gerhard H. Braus^a

(a Georg-August-Universität Göttingen, b NFR)

P-31

Aspergillus nidulans のグリコーゲン代謝とステリグマトシスチン生合成

小松崎愛里, 上村曜介, 高谷直樹 (筑波大院・生命環境)

Aspergillus nidulans の AmyR は、アミラーゼ遺伝子の転写を活性化させる転写因子として知られている。一方、我々は AmyR が、本菌が生産する二次代謝産物であるステリグマトシスチン (ST) の生成を抑制していることを見出した。また、AmyR 遺伝子の遺伝子破壊株 (Δ amyR) は野生株と比較して多量のグリコーゲンを細胞内に蓄積していた。本研究では、AmyR による *A. nidulans* の二次代謝の発現抑制メカニズムの解明を目指し、本菌のグリコーゲン代謝に着目した検討を行った。

Δ amyR と野生株をグルコースを炭素源とした最少寒天培地を用いて培養した際の遺伝子発現の経時変化を DNA マイクロアレイ解析を用いて解析した。その結果、 Δ amyR では、ST だけでなく他の PKS・NRPS を含む二次代謝系の生合成遺伝子クラスターの遺伝子の発現が脱抑制されていることが明らかとなった。本培養条件下で AmyR によって発現が誘導されるアミラーゼ AmyB の遺伝子破壊株 (Δ amyB) は、 Δ amyR と同様にグリコーゲンを蓄積した。一方、菌類のグリコーゲン分解系として広く知られるグリコーゲンホスホリラーゼをコードする *gphA* の遺伝子破壊株 (Δ gphA) も、 Δ amyB と同様にグリコーゲンを蓄積した。また、AmyB と GphA のいずれもグリコーゲンの分解活性を持つことが確認された。これらのことから、*A. nidulans* は、GphA だけでなく AmyB の働きによって細胞内のグリコーゲンを分解することが明らかとなった。また、これらの遺伝子破壊株は、 Δ amyR とは異なり、ST を生成しなかった。以上の結果から、ST の生成と細胞内のグリコーゲン量には相関がないことが明らかとなった。

Analysis for glycogen and sterigmatocystin metabolisms by *Aspergillus nidulans*

Airi Komatsuzaki, Yosuke Kamimura, Naoki Takaya

(Grad Sch Life Environment Sci, Univ. of Tsukuba)

P-32

麹菌マルトースパーミアーゼ分解における HECT ユビキチンリガーゼ HulA の関与

松浦優佳, 田中瑞己, 平本哲也, 新谷尚弘, 五味勝也 (東北大院・農・生物産業創成)

細胞は外部環境に応じて不要となった膜タンパク質を速やかに分解する機構を有している。我々はこれまでに、グルコース存在下においてマルトースパーミアーゼ MalP がエンドサイトーシス依存的に液胞へ輸送され、液胞で分解されることを明らかにしている。出芽酵母ではアレクチン様タンパク質がアダプターとして働き、ユビキチンリガーゼ Rsp5 が膜タンパク質をユビキチン化することでエンドサイトーシス依存的な分解が生じる。我々は昨年度の本会において、アレクチン様タンパク質である CreD を欠損することで MalP のエンドサイトーシス依存的な分解が抑制されることを報告した (平本ら, 2012)。本研究ではさらに、Rsp5 のオーソログである HulA の MalP 分解への関与について解析を行った。

麹菌 HulA には 3 つの WW ドメインが存在しており、CreD-3FLAG と GST-HulA-WW domain 融合タンパク質を用いてプルダウンアッセイを行った結果、CreD と HulA は WW ドメインを介して結合することが明らかになった。HulA は生育必須遺伝子であると予想されたことから、条件的発現株を作製して sGFP-MalP の蛍光顕微鏡観察を行ったところ、HulA 発現抑制条件下ではグルコースを添加しても sGFP-MalP の液胞への移行は認められなかった。したがって、HulA が MalP のエンドサイトーシス依存的な取り込みに関与することが示された。HulA の WW ドメインとの相互作用に関与すると考えられる CreD 上のプロリンに富んだ配列 (PPLY および 3 か所の PXY) に変異を導入した株を作製し、CreD-HulA 間の相互作用について解析した結果も報告する予定である。

Involvement of HECT ubiquitin ligase, HulA, in degradation of maltose permease in *Aspergillus oryzae*

Yuka Matsuura, Mizuki Tanaka, Tetsuya Hiramoto, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi

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

P-33 (O-1)

糸状菌の細胞質不和合性反応時におけるプログラム細胞死機構の解析

¹上森喬大, ¹井上加奈子, ¹木田千晶, ¹中屋敷均, ²兼松聡子, ¹池田健一 (¹神戸大院・農学研究科, ²果樹研)

果樹類白紋羽病菌に対し菌類ウイルスを用いた生物防除法である Virocontrol 法は、菌糸融合を介したマイコウイルスの伝搬が重要である。しかし、遺伝子型の異なる菌株間では、細胞質不和合性反応を起こし、菌糸融合することなく細胞死を引き起こすことより、菌類ウイルスの伝搬が困難となる。本研究では細胞質不和合性反応における細胞反応について、細胞学・分子生物学的解析を行った。不和合性反応における菌糸細胞の動態変化を調べるため、菌糸対峙部位の細胞を、生死判定を行うため、Propidium iodide 及び FUN-1 を処理したところ、和合・不和合どちらの組み合わせにおいても、細胞死と判定される結果が得られた。これは和合性・不和合性いずれも共通して細胞膜透過性の向上と液胞の機能低下が生じているものと考えられた。さらに、不和合性反応時に発現誘導される遺伝子を明らかにするために、次世代シーケンサーによる RNAseq 解析を行ったところ、不和合性反応時に特異的に発現誘導している遺伝子群として、response to stimulus, transport などのグループが見出された。

Cytological and transcriptional analyses of heterogenic incompatibility in *Rosellinia nacatrix*.

¹Takahiro Uwamori, ¹Kanako Ikeda, ¹Chiaki Kida, ¹Hitoshi Nakayasiki, ²Satoko Kanematsu, ¹Kenichi Ikeda
(¹Grad. Sch. Agric. Sci, Kobe Univ. ²Nat. Inst. Fruit Tree Sci. NARO)

P-34

麹菌 *A. oryzae* における 2 つの acyl-CoA binding protein (AoAcb1, AoAcb2) の解析

川口航平, 菊間隆志, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)

近年多くの真核生物において、小胞体とゴルジ体を介した通常の分泌経路とは異なる様々な経路でのタンパク質分泌が報告されている。その一つとして、酵母において、特殊分泌経路による acyl-CoA binding protein (Acb1) の細胞外への分泌が報告されている。Acb1 にはシグナル配列が存在せず、Acb1 の特殊分泌経路には多くのオートファジー関連タンパク質が必要とされる。酵母では ACBP (Acyl-CoA Binding Protein) モチーフを有するタンパク質は Acb1 だけであるが、糸状菌の多くでは ACBP モチーフを持つタンパク質が 2 つ存在する。本研究では糸状菌 *Aspergillus oryzae* における 2 つの acyl-CoA binding protein (AoAcb1, AoAcb2) の解析を行い、特殊分泌経路発見の手がかりを得ることを目的とした。

AoAcb1-EGFP は細胞内でドット状構造をとっており、微小管依存的に移動する様子が観察された。一方 AoAcb2-EGFP は細胞質に広く存在していた。Aoacb2 破壊株を得ることはできなかったため、*thiA* プロモーターで *aoacb2* 発現を制御したところ、コロニー半径の減少や分生子数の低下が観察された。オートファジー誘導に関与する *aoatg1*, オートファゴソーム膜形成、伸長に関わる *aoatg4* と *aoatg8* の破壊株では AoAcb1 が細胞質で凝集して移動を行わなくなった。一方、オートファジックボディー分解に関与する *aoatg15* の破壊株では AoAcb1 の細胞質での凝集は見られなかったが、一部が液胞内で観察された。以上の結果から、AoAcb1 の輸送や機能にはオートファゴソーム形成に関連するタンパク質が関与していることが示唆された。現在、*aoacb2* 制御株の詳細な生育の比較、AoAcb1 と AoAcb2 の細胞外への分泌について解析を進めている。

Analysis of two acyl-CoA binding proteins (AoAcb1, AoAcb2) in *Aspergillus oryzae*

Kouhei KAWAGUCHI, Takashi KIKUMA, Katsuhiko KITAMOTO

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

P-35 (O-2)

麹菌 *A. oryzae* の菌糸損傷後の細胞修復における AoSO の機能解析

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】 麹菌 *Aspergillus oryzae* が属するチャワタケ亜門 (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, ある細胞が損傷した際には隔壁孔をふさいで, 隣接する細胞に溶菌が伝播するのを防ぐ機能を備えている。しかしながら, 溶菌時の細胞修復と再生長における分子機構は未だ解明されていない部分が多い。我々は以前, *A. oryzae* においてパルスレーザーを用いて, 細胞に過大な負担をかけずに溶菌させ, 再生長まで観察できる新たな実験法を確立した。そして, AoSO タンパク質が溶菌直後に隔壁孔へ凝集し, 再生長に関与することを明らかにした。本研究では, AoSO 及びこれと相互作用すると考えられるタンパク質の解析を通して細胞修復機構の分子機構の解明を試みた。

【方法・結果】 AoSO を保存されている領域ごとに 3 つに区切り, N 末端領域 (1-555 番のアミノ酸) と C 末端領域 (1147-1195 番のアミノ酸) をそれぞれ欠損させた部分欠損体を発現する株において, 溶菌前後における AoSO の局在変化を観察した。その結果, C 末端領域の欠損の場合は隔壁孔に凝集する菌糸の割合が減少し, 再生長機能の低下と一致する結果が得られた。一方, N 末端領域の欠損において, 隔壁孔に凝集する菌糸の割合は変化しなかったが, 凝集する時間が AoSO 全長に比べて長くなり, 過剰に凝集する様子が見受けられた。さらに, AoSO と相互作用すると考えられる 2 つの新規タンパク質について, それぞれをコードする遺伝子破壊株を取得した。パルスレーザーにより溶菌させる実験を行った結果, AO090005001564 遺伝子破壊株に関して再生長機能の低下が観察された。また, Aoso 及び AO090005001564 遺伝子破壊株においては, アクチン重合促進タンパク質である AoBni1 が溶菌後の隔壁孔で過剰に蓄積する様子が観察された。現在, AoSO と AO090005001564 の機能的関係について解析を進めている。

Investigation of AoSO function in cell repair after hyphal wounding in *Aspergillus oryzae*

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

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

P-36

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)

ハイドロフォービン (hydrophobin) は, 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, 菌体に撥水性を付与する。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。

これまでの研究で, 麹菌 *Aspergillus oryzae* のハイドロフォービン遺伝子 *hypA, B, C* の発現を確認している。*hypA, B, C* について破壊株を作製し, 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, *hypB* 遺伝子は菌糸の伸長期に転写量が増加することを見出している。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, DsRed をそれぞれ融合して, *hypA, hypB* 二重破壊株に同時形質導入した株を作製した。蛍光顕微鏡観察により, HypA, HypB の局在性はプロモーターが支配することを確認した。次に HypA の分生子での特異的発現に関与する *hypA* プロモーター内シスエレメントの特定のため *hypA* プロモーターの構造機能解析を行った。これまでのところ, *hypA* 遺伝子上流-400~-200bp 内に目的のシスエレメントが存在することを示唆する結果を得ている。

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-37

麹菌 *Aspergillus oryzae* のポリリン酸代謝とストレス応答

多田 功生, 大口 ひかる, 楠本 憲一 (農研機構 食総研)

ポリリン酸は、数個から数百個のリン酸（オルトリン酸）が高エネルギーリン酸結合した直鎖状のポリマーであり、バクテリアから哺乳類までの生物の細胞に広く存在している。細胞内におけるリン酸とエネルギーの貯蔵と調節がその主要な役割であるとされているが、バクテリアにおいては栄養飢餓や各種のストレス応答の際にその蓄積量が増大し、ある種のプロテアーゼの活性調節やシグナル伝達に関与していることが明らかとなっている。また、ポリリン酸は優れたキレート作用を持つことから、微生物における重金属代謝との関与も示唆されている。

我々は、麹菌 *Aspergillus oryzae* におけるポリリン酸の機能を明らかにするべく、その基礎的な知見を得るために、通常培養時の菌体内ポリリン酸量の経時変化、また金属ストレス、酸化ストレスによる蓄積量の変動について調べた。金属イオン添加後の菌体内ポリリン酸量の変化は金属種によって大きく異なり、蓄積量が増加するものから、ほぼ検出されなくなるほど減少するものまで様々であった。また、過酸化水素水、あるいはメナジオンによる酸化ストレス存在下では、どちらの場合もポリリン酸量は増加することが明らかとなった。本研究の一部は、日本学術振興会科学研究費助成事業の助成を受けて行われたものである。

Polyphosphate metabolism and stress response in *Aspergillus oryzae*

Sawaki Tada, Hikaru Ohkuchi, Ken-Ichi Kusumoto (NFRI, NARO)

P-38

Roles of AoLAH in regulating Woronin body position and function in *Aspergillus oryzae*

Pei HAN, Feng Jie JIN, Jun-ichi MARUYAMA, Katsuhiko KITAMOTO (Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo)

Woronin body is a Pezizomycotina-specific organelle observed in the vicinity of septum, and plugs the septal pore in response to cellular wounding. Previously, we characterized AoHex1 as the major protein of Woronin body in *Aspergillus oryzae*¹⁾, and investigated the Woronin body differentiation from the peroxisome²⁾. Recently, the Leashin (LAH) protein was identified to tether Woronin bodies to the cell cortex in *Neurospora crassa*³⁾. In this study we attempted to investigate the roles of Leashin protein in regulating Woronin body position and function in *A. oryzae*.

We predicted *Aolah* gene encoding a single polypeptide of 5,727 amino acids, which is homologous to the *N. crassa lah* gene expressed into two distinct proteins³⁾. AoLAH-EGFP expressed from the endogenous locus was detected as Woronin body-like dots along the hyphae and closely associated with the septum. Transmission electron microscopic analysis demonstrated that the *Aolah* gene disruption led to no tethering of Woronin bodies in the vicinity of septum. We also observed excessive loss of the cytoplasm upon hyphal injury in *Aolah* disruptant, suggesting the functional involvement of AoLAH in the septal plugging ability of Woronin body.

N-terminal conserved region of AoLAH (AoLAH[1-2039]) was expressed as EGFP fusion protein, and it was detected at both sides of the septal pore, which is typical for Woronin body localization, suggesting a role of AoLAH N-terminal region in association with Woronin body. C-terminal conserved region of AoLAH (AoLAH[4710-5727]) expressed as EGFP fusion protein was detected closely to the septal pore both in the wild-type strain and *Aolah* disruptant, indicating that AoLAH[4710-5727] itself functions for associating to the septum. When AoLAH N- and C-terminal fusion fragment lacking the unconserved middle region was expressed in *Aolah* disruptant, Woronin bodies were re-discovered in the vicinity of septum, however, the cytoplasm was still excessively lost upon hyphal injury. This suggests that the unconserved middle region of AoLAH has a role in the septal plugging ability of Woronin body, which is being further evaluated.

1) Maruyama *et al.* (2005) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Vol. 331, 1081-1088. 2) Escaño *et al.* (2009) *Eukaryot. Cell* Vol. 8, 296-305. 3) Ng *et al.* (2009) *PLoS Genet.* Vol. 5, e1000521.

P-39

アカパンカビにおける外来 DNA のランダム導入様式の解析

鎌田竜平, 田中秀逸, 畠山晋 (埼玉大・理・遺伝)

外来 DNA がゲノムに組込まれる現象には、主として DNA 二本鎖切断修復機構が関与していると考えられる。例えば、十分な相同配列長を持つ DNA 断片を、非相同末端結合 (NHEJ) が欠損した株に導入した場合、相同組換え修復機構が優制的に機能して、遺伝子ターゲティング効率が飛躍的に上昇する。今回、我々は相同配列長を持たない DNA 断片を導入した時に起こる「ランダム導入」について解析した。アカパンカビの野生株に、相同配列を含まないマーカー遺伝子を導入したところ、NHEJ、一本鎖アニーリング (SSA)、マイクロホモロジー媒介末端結合 (MMEJ) の関与を示唆する導入が検出された。「ランダム導入」の機構についてさらに検討するために、NHEJ、SSA、MMEJ それぞれにおいて機能する遺伝子を欠損した株について導入様式の解析を行った。薬剤耐性を指標に選別された形質転換株からゲノムを抽出し、改良した TAIL-PCR 法によって導入様式、並びに導入部位の決定を行った。「ランダム導入」における、形質転換頻度および DNA の削り込み、配列付加、変異の導入など、導入の事象に与える影響について、それぞれの修復系の関わりを考察する。

The mode of random integration of exogenous DNA in *Neurospora crassa*

Ryuhei Kamada, Shuuitsu Tanaka, Shin Hatakeyama

(Lab. Genet., Dept. Regulatory Biol., Saitama Univ.)

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

P-40

麹菌 *A. oryzae* におけるオートファジー関連ステロールグルコシルトランスフェラーゼ AoAtg26 の機能解析

菊間隆志, 田所隆之, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)

【目的】オートファジーにおける隔離膜伸長およびオートファゴソーム形成の分子機構は未だ謎が多く、またステロールグルコシルトランスフェラーゼであるオートファジー関連タンパク質 Atg26 の機能はほとんどわかっていない。メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* PpAtg26 は、メタノール誘導性ペキシファジーに関与するが、通常のペキシファジーには関与しないことから、大きなサイズのオートファゴソーム形成に必要であると考えられている。一方、出芽酵母 *Sccharomyces cerevisiae* の *atg26* 破壊株は表現型を示さない。本研究は、麹菌 *A. oryzae* におけるオートファゴソーム形成機構解明を目的とし AoAtg26 の機能解析を行った。

【方法・結果】*A. oryzae* において *Aoatg26* 遺伝子破壊株を作製し、表現型解析を行ったところ、気中菌糸および分生子形成が顕著に抑制された。これは *A. oryzae* におけるオートファジー欠損株の特徴的な表現型であることから、AoAtg26 は非選択的オートファジーに関与することが示唆された。そこでオートファジーのマーカータンパク質である EGFP-AoAtg8 を *Aoatg26* 破壊株に発現させたところ、オートファゴソーム形成が途中で停止した隔離膜の蓄積が観察された。また、Cvt 経路のカーゴである AoApe1-EGFP の *Aoatg26* 破壊株における挙動を観察した結果、タンパク質レベルの大きさの基質輸送経路である Cvt 経路は機能していることが示された。以上より、AoAtg26 はオートファゴソーム形成に重要な役割を果たし、オートファゴソームの大きさを決定する因子である可能性が示唆された。現在、*Aoatg26* 破壊株におけるペルオキシソーム、ミトコンドリアなどの選択的オートファジーについて解析中である。

Analysis of the autophagy-related sterol glucosyltransferase AoAtg26 in *Aspergillus oryzae*

Takashi Kikuma, Takayuki Tadokoro, Katsuhiko Kitamoto

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

P-41

麹菌 (*A.oryzae*) General amino acid permease (*Gap A*) 遺伝子破壊株の生育への影響

金子明裕, 浜中大夢, 佐野元昭, 尾関健二, 大箸信一 (金沢工大・ゲノム研)

【目的】

外界の栄養源の取り込みには細胞膜上に存在するトランスポーターが重要な働きをしている。トランスポーターの働きは、外界の栄養源の濃度や種類により、遺伝子で複雑な制御を受けることが近年の研究により明らかにされてきている。麹菌 (*Aspergillus oryzae*) は、アミノ酸トランスポーター関連遺伝子が多く発現しており、栄養源の取り込みに関与する遺伝子は約 80 個あると考えられている。その中で、発現量が多いのが、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の General amino acid permease 1 (*Gap 1*) と相同性の高い *Gap A* 遺伝子であった。そこで、今回、*A.oryzae* の *Gap A* 遺伝子破壊株を作成し、アミノ酸及び炭素源の生育への影響について解析を行った。

【方法及び結果】

酵母 *Gap 1* と相同性の高い *Gap A* の *A.oryzae* 遺伝子破壊株を作成した。宿主株と破壊株でヒスチジンやプロリンなどを単一窒素源とした培地で生育を観察したところ、破壊株では宿主株と比べ、生育不良が観察された。破壊した *Gap A* 遺伝子はアミノ酸などの取り込みに関わる重要な遺伝子であると考えられた。また、酵母の *Gap 1* の発現を抑制するとされるアルギニンを単一窒素源とした培地での生育を観察したところ、酵母の *Gap 1* と同様に宿主株と破壊株の差はあまりみられなかった。

デンプン質除去小麦フスマで培養を行うと親株と遺伝子破壊株で生育に差が認められた。多糖類、二糖類さらに単糖類のフルクトースでも差が見られた。この麹菌遺伝子 *Gap A* は、窒素源の取り込みだけでなく、炭素源の取り込みにも影響する遺伝子の可能性があると考えられた。

Effects on growth and repression of *A.oryzae* GapA gene disruption.

Akihiro Kaneko, Hiromu Hamanaka, Motoaki Sano, Kenji Ozeki, Shinichi Ohashi

(Kanazawa Institute of Technology)

P-42

麹菌由来新規 MOA レダクターゼ高発現株の作製とロイシン酸生産能の解析

山本竜也, 小出恵美理, 森千明, 竹浦賢吾, 大穀未来, 志水元亨, 加藤雅士 (名城大・農)

清酒の代表的な香気成分であるカプロン酸エチルや酢酸イソアミルは酵母が単独で生合成できるため、それらの生産能が高い酵母の育種が盛んに行われている。一方、香気成分の中で清酒の香気増強に重要なロイシン酸エチルの生成機構については、麹菌 *Aspergillus oryzae* により、米に含まれるロイシンがロイシン酸へと変換され、さらに酵母の作用により、ロイシン酸エチルが生成すると報告されているが¹⁾、関与する酵素についての知見はない。そこで本研究ではロイシン酸の前駆体 4-methyl-2-oxopentanoic acid (MOA) をロイシン酸に変換する酵素の探索を行った。見出した酵素を高発現させた麹菌を作製することで香味豊かな吟醸酒の生産への展開にも期待される。

麹菌のゲノム情報から MOA をロイシン酸に変換する 2-ケト酸デヒドロゲナーゼファミリーに属する 5 種の遺伝子を選別した。それらの遺伝子について大腸菌を宿主として組換え酵素を異種発現させ、精製を行った後、MOA 存在下における NAD(P)H の減少をモニターすることで MOA レダクターゼ活性の有無を調べた。その結果、5 種のうち 1 種は NAD(P)H 存在下で MOA をロイシン酸に変換した。この遺伝子を *TEF1* プロモーター下で恒常的に過剰発現するように構築したプラスミドで、麹菌を形質転換した。現在、作製した MOA レダクターゼ高発現株のロイシン酸生産能について解析を進めている。

1) Suzuki, M. Yoneyama, H. Koizumi, T. (1982) The mechanism of formation of ethyl leucinate, an important aroma component in sake. *Hakkokogaku*, **60**, 19-25.

Overexpression and characterization of a novel 4-methyl-2-oxopentanoic acid (MOA) reductase in *Aspergillus oryzae*.

Tatsuya Yamamoto, Emiri Koide, Tiaki Mori, Takeura Kengo, Miki Daikoku Motoyuki, Shimizu, Masashi Kato

(Fac. of Agri., Meijo Univ.)

P-43 (O-9)

糸状菌 *Trichoderma reesei* における菌体外繊維状物質合成酵素の探索

田原伸悟¹, 新田美貴子², 志田洋介¹, 堀川祥生³, 杉山淳司³, 大隅正子⁴, 小笠原渉¹

(¹長岡技科大・生物, ²科学技術振興機構, ³京都大学・生存圏研究所, ⁴総合画像研究支援)

糸状菌 *Trichoderma reesei* はセルロースを唯一の炭素源として培養したときに大量のセルラーゼを誘導生産する。セルラーゼ生産条件下における菌糸について走査型電子顕微鏡を用いて観察したところ、細胞壁上に繊維状物質が生産されるということが明らかとなった。また、セルラーゼ非生産条件下でも物理的な刺激を受けたときに生産が促進されることが示唆された。しかしながら、繊維状物質の組成や生理学的な役割は全く解明されていない。以前、FT-IR を用いて繊維状物質の組成分析を行った結果、繊維状物質がキチンである可能性が示唆された。キチンは糸状菌の細胞壁の主成分のひとつであり、糸状菌の形態に深く関わっているため、繊維状物質の生産と関連があると考えられる。現在、*T. reesei* のゲノムデータベースより見いだした6種のキチン合成酵素遺伝子の破壊を行い、キチン合成酵素と繊維状物質との関連性を解析している。一方、糸状菌の細胞壁に存在する多数の GPI アンカー型タンパク質が、繊維状物質の生産と関連があると考えられたため、*T. reesei* のゲノムデータベースから GPI アンカー型タンパク質遺伝子を探索した。見いだされた遺伝子について、マイクロアレイ解析を用いて、繊維状物質の生産条件と非生産条件で発現挙動の比較解析を行っている。

Exploration of protein related to cell surface fibrous material synthesis of *Trichoderma reesei*

Shingo Tahara¹, Mikiko Nitta², Yosuke Shida¹, Yoshiki Horikawa³, Junji Sugiyama³, Masako Osumi⁴, Wataru Ogasawara¹

(¹Nagaoka Univ. of Technol., ²JST, ³RISH, Kyoto Univ., ⁴IIRS)

P-44

糸状菌の Poly(ADP-ribose) glycohydrolase の探索及びその働き

平野濤¹, 須藤美穂¹, 枡尾俊介², 高谷直樹², 志水元亨¹, 加藤雅士¹ (¹名城大・農) (²筑波大院・生命環境)

ポリ(ADP-リボース)化は、真核生物に特異的な可逆的翻訳後修飾である。この反応には、ポリ(ADP-リボース)を合成する poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) と分解する poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG) の2種類の酵素が関与することが知られている。PARPは、酵母を除くすべての真核生物に高度に保存され、DNA修復、転写調節、細胞死、中心体の分裂制御に関与していると考えられている。*Aspergillus nidulans* のゲノム中にも *parp* の ortholog が1つ存在する。一方、酵母および *A. nidulans* を含む糸状菌のゲノム中には、高等真核生物で高度に保存されている *parg* の ortholog は見出されていない。

そこで、*A. nidulans* のゲノム中からヌクレオチドの代謝に関与すると考えられる7種類の *parg* 候補遺伝子を選抜した。リコンビナントタンパク質を調製し、解析した結果、1種類のタンパク質が Mg^{2+} 依存的にポリ(ADP-リボース)を加水分解したことから、このタンパク質を fungal PARG (fPARG) と名付けた。さらに、*A. nidulans* に DNA アルキル化剤(MMS)を添加したところ、*parp* と同様に *fparg* の転写が活性化されたことから、fPARGはDNA損傷応答に関与することが示唆された。現在、*fparg* 破壊株を作製し、解析している。

Identification and Characterization of the Novel Poly(ADP-ribose) Glycohydrolase of Filamentous Fungus *Aspergillus nidulans*.

Mio Hirano¹, Miho Sudo¹, Shunsuke Masuo², Naoki Takaya², Motoyuki Shimizu¹, Masashi Kato¹ (¹Fac. Of Agri., Meijo Univ., ²Grad. Sch. of Life & Env. Of Tsukuba)

P-45

麹菌 *Aspergillus oryzae* 菌体内金属プロテアーゼ ADAM の機能解析

小林拓嗣, 前田浩, 竹内道雄, 山形洋平 (東農工大院・応生化)

【背景および目的】 麹菌 *Aspergillus oryzae* のプロテアーゼの中には, ADAM (A Disintegrin And Metalloproteinase) との相同性を持つものが 2 種類存在する。我々は, これら 2 つのプロテアーゼをコードすると推定される遺伝子を *admA*, *admB* とした。ADAM は, 金属プロテアーゼドメインとディスインテグリンドメインを持つタンパク質であり, ADAM ファミリーとして 30 を超えるメンバーが存在する。ADAM の機能は, 特にヒトやマウスで多くの報告があり, 細胞接着やタンパク質プロセッシング, シグナル伝達などに関与することが知られている。真菌の ADAM では, *A. fumigatus* の組換え型 ADM-B が金属プロテアーゼ活性を有し *shedase* として機能し得ることや分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* の Mde10 が孢子表層構造の構築に働くと推定されているものの, 真菌での生物学的な機能は明らかになっていない。そこで本研究では, 麹菌 *A. oryzae* における ADAM の機能を明らかにすることを目的とした。

【方法および結果】 *admA*, *admB* 遺伝子破壊株 $\Delta admA$ 株と $\Delta admB$ 株, さらに $\Delta admA\Delta admB$ 株を作製し, 寒天平板培養での表現型観察を行った。コントロール株と各破壊株では, 最小培地における生育の差は認められなかったが, *calcofluor white* もしくは *congo red* を添加した培地では若干の感受性を示し, さらに 37°C でこの感受性が増加した。このことから, 遺伝子破壊により細胞壁ストレス応答に変化が生じたと考えられる。また, 走査型電子顕微鏡により分生子を観察したところ破壊株の分生子は分生子表面の構造がコントロール株と異なっていた。この結果から, 麹菌 *A. oryzae* の ADAM は分生子の成熟に関与することが示唆された。

Functional analysis of intracellular metalloprotease ADAM in *Aspergillus oryzae*

Takuji KOBAYASHI, Hiroshi MAEDA, Michio TAKEUCHI, Youhei YAMAGATA

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

P-46

麹菌が産生する hydrophobin RolA と固体表面間の相互作用に関する研究

田中拓未¹, 田邊弘毅¹, 高橋徹², 富樫貴成³, 有田稔彦⁴, 阿部敬悦^{1,2} (¹東北大院農・生物産業創成, ²東北大・未来研, ³山形大理・物質生命化学, ⁴東北大・多元研)

麹菌の産生する両親媒性蛋白質 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, 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, ①RolA の Leu137, Leu142 が PBSA への結合に重要, ②pH4-10 での PBSA への RolA の親和性は pH4 で最大, ③PBSA 微粒子の pH4-10 でのゼータ電位は中性で負, 酸性で 0 となる結果を得た。以上の結果及び, RolA の pI=4.6-4.8 という結果から, PBSA への RolA 吸着において“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 吸着様式の解析を目的とし, 異なる化学的性質を付与した表面への RolA 吸着を, QCM を用いて pH4, 7, 10 で評価した。

疎水度が異なる表面に対する RolA の親和性は, 表面の疎水度と相関性を示した。正電荷表面に対する親和性は pH4, 7 で無荷電性表面より上昇し, pH10 で低下した。一方, 負電荷表面に対しては RolA が一定濃度以下の場合に吸着がほとんど見られなかった。以上から, 固体表面への RolA の親和性において, 固体表面の疎水性及び正電荷が吸着に, 負電荷が反発に働く可能性が示唆された。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増加が確認された。RolA は両親媒性であり, 荷電性アミノ酸に富む領域と疎水性アミノ酸に富む領域を持つことから, 固体表面の性質に依存して RolA の接近配向性や接地配向性が異なり, kinetics が影響を受けている可能性が推察される。

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

Takumi Tanaka¹, Hiroki Tanabe¹, Toru Takahashi², Takanari Togashi³, Toshihiko Arita⁴, Keietsu Abe^{1,2} (¹Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., ²NICHe., Tohoku Univ., ³Dept. Sci., Yamagata Univ., ⁴IMRAM., Tohoku Univ.)

P-47

麴菌ペプスタチン非感受性プロテアーゼの酵素学的性質の解析

竹内真理衣、岡本綾子、阿保春花、前田浩、山形洋平、竹内道雄（農工大院・応生化）

麴菌ゲノム解析の結果から、*Aspergillus oryzae* は3つの pepstatin insensitive protease (PIP) 遺伝子(317-062、315-005、306-018)を持つことが明らかになった。PIP とは酸性領域で作用するエンド型プロテアーゼであり、DGDT W(F/Y)EW(F/Y/L)P ED(F/Y) の活性中心モチーフが見出されている。PIP は、aspartic protease とは違い、ペプスタチンによって活性阻害を受けず、グルタミン酸残基が触媒残基であることから、glutamic protease という新しいカテゴリーに分類されている。本研究では *A. oryzae* の PIP の酵素学的性質の解明を目的とし、解析を行った。

PIP 遺伝子の発現状況について確認した所、培養条件によって3つ全てが mRNA として発現していることが判明した。また、酵素学的性質の解析を行うために、317-062、315-005 は *Pichia pastoris*、306-018 は *Aspergillus nidulans* を宿主とした発現系を用いて、発現した。317-062 と 306-018 は可溶性画分に発現した。一方、315-005 は不溶性画分に発現したため、8 M urea による可溶化と、段階透析法によるリフォールディングを行った。精製した3つの PIP は、酸性 pH 領域において、ペプスタチンに阻害されないタンパク質基質に対する活性を示した。317-062、306-018 については、至適 pH、pH 安定性などの解析を行った。現在、315-005 について、最適なりフォールディング条件と、詳細な酵素学的性質を検討している。

Enzymatic Properties of Pepstatin Insensitive Protease in *Aspergillus oryzae*

Marii Takeuchi, Ayako Okamoto, Haruka Abo, Hiroshi Maeda, Youhei Yamagata, Michio Takeuchi

(Division of Applied Biological Chemistry, Tokyo Univ. of Agriculture and Technology)

P-48 (O-10)

3D モデリングを利用した抗生物質アシラーゼの変異体設計

中山和毅、山田雅人、西田洋巳、磯貝泰弘（富山県大・生工）

糸状菌 *Coleophoma empetri* F-11899 が生産するキャンディン系抗生物質である環状リポペプチド FR901379 は、放線菌由来のアクレアシン A アシラーゼ (AAC) による脱アシル化後、新たなアシル基を付加することにより、深在性真菌症治療薬 Micafungin として利用されている。AAC は、ペニシリンアシラーゼなど、βラクタム系抗生物質の生産に利用されている各種のアシラーゼ酵素と弱い配列相同性を示すが、その立体構造や基質認識機構は明らかにされていない。

本研究では、ホモロジーモデリングの手法を用いて AAC の立体構造モデルを作製した。このモデルと βラクタムアシラーゼの結晶構造を用いて、アクレアシン A を含む各種基質とのドッキング計算を行った。その結果、AAC の活性部位には、βラクタムアシラーゼには無い、アクレアシン A の長いアシル側鎖を認識する細長い結合ポケットが存在することが示唆された。このモデルを検証し、キャンディン系抗生物質の生産に利用出来る新規酵素の取得を目的として、βラクタムアシラーゼの一つであるセファロスポリンアシラーゼ (CA) の活性部位に複数のアミノ酸置換を導入し、深いアシル基結合ポケットをもつ変異体酵素を設計した。変異 PCR の手法を用いて、*Pseudomonas sp.* SY-77 由来 CA の変異体遺伝子を作製し、大腸菌の発現系を利用して変異体酵素を合成した。精製した変異体酵素は、野生型酵素と較べて、セファロスポリンに対する活性が低下した一方、アクレアシン A に対する活性が顕著に増大した。これらの結果は、AAC と βラクタムアシラーゼの基質認識機構の違いを解明し、本研究で用いたモデリングとドッキングの手法が、酵素の変異体設計に有効であることを示す。

Substrate switching of antibiotics acylase by 3D modeling

Kazuki Nakayama, Masato Yamada, Hiromi Nishida, Yasuhiro Isogai
(Toyama Pref. Univ., Dept. Biotech.)

P-49

麹菌の凝乳酵素の機能解析

田久 陽子, 岡本 綾子, 前田 浩, 山形 洋平, 竹内 道雄 (農工大院・応生化)

【目的】凝乳酵素とはチーズの製造過程で凝固剤として使用される酵素で、古くから仔牛の第4胃から抽出した chymosin が使用されてきた。chymosin は乳中に含まれる κ -casein の Phe105 – Met106 を特異的に分解することで、カゼインミセルが崩壊し、カードを生成する。*Aspergillus oryzae* では凝乳酵素の存在が報告されている。しかし、その酵素をコードする遺伝子と酵素タンパクの関係については明らかになっていない。ゲノム解析の結果、*A. oryzae* RIB40 は 11 種類のアスパルティックプロテアーゼ遺伝子を保有していることが明らかとなっている。本研究では、これらのプロテアーゼ遺伝子産物について凝乳活性のスクリーニングを行い、酵素化学的性質を同定することを目的とした。

【方法および結果】各アスパルティックプロテアーゼ遺伝子を発現したスクリーニングの結果、1つの遺伝子産物で高い凝乳活性が確認され、それを AOchymosin 1 と命名した。*A. nidulans* A89 をホストに AOchymosin 1 の高発現株を作製し、培養液中に分泌されたプロテアーゼをイオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーにより精製し、各温度、pH における凝乳活性、タンパク質分解活性試験を行った。その結果、30°C、pH 5.5 の条件で良質なカードを生成することを確認した。また、*A. luchuensis* におけるオルソログ ALchymosin 1 についても同様に高発現株を作製し、凝乳活性を確認した。現在、両酵素についてさらなる酵素化学的性質を検証している。

Characterization of milk clotting enzymes in *Aspergilli*

Yoko Takyu, Ayako Okamoto, Hiroshi Maeda, Yohei Yamadata, Michio Takeuchi

(Division of Applied Biological Chemistry, Tokyo Univ. of Agriculture and Technology)

P-50

Aureobasidium pullulans に由来する安息香酸-4-水酸化酵素遺伝子の解析

東田知洋, 太田一良 (宮崎大農・応生科)

【目的】二形性真菌 *Aureobasidium pullulans* ATCC 20524 株から、既にアラビノキシラン分解に関与する酵素 α -L-アラビノフラノシダーゼをコードする遺伝子 (*abfB*) を含む DNA 断片 (4,996 bp) をクローニングした。この DNA 断片のホモロジー検索の結果、*abfB* 遺伝子の下流に安息香酸-4-水酸化酵素をコードする遺伝子 (*bphA*) と推定される配列を見出した。本報では、*A. pullulans* ATCC 20524 株から cDNA を調製し、RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) 法により *bphA* 遺伝子の領域を特定し、解析することを目的とした。

【方法・結果】*A. pullulans* ATCC 20524 株をカバ材由来キシランを炭素源として 30°C で 3 日間培養した。その菌体から mRNA を抽出し、cDNA ライブラリーを作成した。その cDNA を鋳型として RACE 法により 5' RACE プライマーまたは 3' RACE プライマーと、*bphA* 遺伝子に特異的なプライマーを用いて PCR で増幅した。既知の *abfB* 遺伝子の終止コドンから 555 bp 下流に *bphA* 遺伝子の ORF (1,512 bp) が存在し、54 bp のイントロンが 1ヶ所存在した。また、*bphA* 遺伝子の開始コドンから 96 bp 上流に TATA ボックス、63 bp 上流に転写開始点、終止コドンから 114 bp 下流にポリ A 付加部位が存在した。*bphA* 遺伝子には分泌シグナルペプチドが存在しないことから細胞内に存在し、キシラン分解に伴い産生されるフェルラ酸等の芳香環を有する化合物を無毒化する機能が推測された。次に *bphA* cDNA の全 ORF を *EcoRI* と *NotI* 部位を付加したプライマーで増幅し、制限酵素消化後 pET-26b ベクターに挿入した。構築したプラスミド pBPH103 は *E. coli* BL21 (DE3) 株に導入した。今後、*bphA* cDNA を発現させ、その組換え酵素 BphA の酵素化学的諸性質を検討する。

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 benzoate-4-hydroxylase gene from *Aureobasidium pullulans*.

Chihiro Higashida, Kazuyoshi Ohta

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

P-51

Aspergillus nidulans の GfsA は O-グリカンの Galf を合成する糖転移酵素である

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

我々は、これまでに *Aspergillus nidulans* の GfsA がラクトフラノース(Galf)転移酵素であることを報告してきた。今回、GfsA が O-グリカンの非還元末端に存在する Galf を合成する酵素であることを明らかにしたので報告する。 $\Delta gfsA$ より抽出したガラクトマンノプロテイン(GMP)を受容基質として、精製した GfsA-3xFLAG および UDP-Galf と共に反応させた後に、EB-A2 によってウェスタンブロットを行うと 40-200 kDa の範囲でシグナルが検出される。このシグナルの由来を調べるために GMP を PNGase F 処理もしくは β -elimination 処理した。その結果、PNGase F 処理ではシグナル強度に影響を受けなかったが β -elimination 処理ではシグナル強度が減少した。また、O-グリカンの合成開始を担う *pmtA* および *pmtC* 遺伝子の破壊株から抽出した GMP では wt に比べてシグナルが減少していた。次に、O-グリコシル化タンパク質である WscA-HA を発現する wt, $\Delta gfsA$ をそれぞれ構築し、各株より WscA-HA を精製した。それぞれを HA 抗体と EB-A2 を用いて解析した。その結果、 $\Delta gfsA$ 由来 WscA-HA の EB-A2 によるシグナル強度が減少することが明らかになった。さらに、 $\Delta gfsA$ より精製した WscA-HA を受容基質として精製 GfsA-3xFLAG を用いて *in vitro* Galf 合成酵素活性を検出したところ、WscA-HA 上の Galf 残基が検出された。以上のことから、GfsA が O-グリカンの非還元末端に存在する Galf を合成する酵素であることが明らかになった。

GfsA is a novel glycosyltransferase involved in biosynthesis of galactofuranose antigen of O-glycan in *Aspergillus nidulans*.

Haruka Motomatsu¹, Taiki Futagami², Keisuke Ekino¹, Kaoru Takegawa², Masatoshi Goto², Yoshiyuki Nomura¹, Takuji Oka¹ (¹ Univ. of Sojo, ² Univ. of Kyusyu)

P-52

ヒラタケのリポキシゲナーゼ遺伝子の機能解析

小林大記, 小黑健太, 田崎裕二 (長岡高専・物質工)

[目的] キノコの代表的な香気成分 1-オクテン-3-オールは、リノール酸からヒドロペルオキシリノール酸を経て合成されると推定されている。リポキシゲナーゼ (LOX) はリノール酸の酸化に関与していると考えられている。ヒラタケ N001 株のゲノムデータベースを用いたモチーフ検索の結果、2つの推定 LOX 遺伝子 (*PoLOX1*, *PoLOX2*) が確認された。本研究では、ヒラタケの LOX の機能を明らかにするため、*PoLOX1* と *PoLOX2* の cDNA の塩基配列を決定した後、大腸菌で発現させた *PoLOX1* と *PoLOX2* の生化学的性質を調べた。

[方法と結果] 各種 PCR 法により、*PoLOX1* と *PoLOX2* の cDNA を増幅した後、塩基配列を決定した。*PoLOX1* と *PoLOX2* は 640 (分子量 72 kDa) と 661 (74 kDa) のアミノ酸から構成される推定タンパク質をコードしており、イントロンを1つ含んでいた。*PoLOX1* と *PoLOX2* のコード領域の cDNA を pET16b ベクターに連結後、大腸菌 BL21(DE3)株に形質転換した。形質転換体懸濁液の SDS-PAGE の結果、予測された分子量の 72 kDa と 74 kDa にメジャーなバンドが確認された。至適 pH を調べたところ、*PoLOX1* は pH 11.5, *PoLOX2* は pH 5.5, 7.0 で高い活性を示した。また、*PoLOX1* と *PoLOX2* の K_m , V_{max} は、それぞれ 0.05 mM, 0.22 μ mol/min および 0.18 mM, 0.90 μ mol/min であった。

Functional analysis of two lipoxygenase genes of *Pleurotus ostreatus* strain N001

Daiki Kobayashi, Kenta Oguro, Yuji Tasaki

(Dept. of Mater. Eng., Nagaoka Col. of Technol.)

P-53

アミノリシス活性及び好塩性を示す麹菌 *Aspergillus oryzae* の D-アミノ酸特異的アミノペプチダーゼ(DamA)の解析

松下(森田)真由美¹, 中川博之¹, 多田功生¹, 丸井淳一郎^{1,5}, 鈴木聡¹, 服部領太¹, 天野仁², 石田博樹³, 山形洋平⁴, 竹内道雄⁴, 楠本憲一¹ (¹農研機構・食総研, ²天野エンザイム, ³月桂冠, ⁴東京農工大・院, ⁵JIRCAS)

【背景】バクテリアのβ-アミノペプチダーゼ(BapA)は、ペプチド鎖のN末端のβ-アミノ酸(β-Ala等)を特異的に認識する酵素であり、アミノリシス活性を有している(Heck, T et, al. 2007, 2012)。我々はBapAに相同性を示す遺伝子(AO090138000075)を*Aspergillus oryzae*ゲノムデータベースより見出し、その機能について解析を行った。【方法と結果】*A. oryzae*を宿主として、上記遺伝子の過剰発現株をN末端にHis-Tagを付加する設計で作成後、無細胞抽出液より精製した。精製酵素は市販の17種(L体13種, D体3種, β体1種)のaminoacyl-*p*-nitroanilide(*p*NA)基質に対し、β-Ala-*p*NAを好むBapAとは異なり、D-Leu-*p*NAとD-Phe-*p*NAに対して高い基質特異性を示したため、D-stereoselective aminopeptidase(DamA)と名付けた。次にD-Leu-NH₂を基質にし、反応産物をLC/MS/MSを用いて解析すると、D-Leu-OHだけでなくD-Leu-D-Leu-NH₂が検出され、DamAもBapA同様アミノリシス活性を有する事が明らかとなった。またD-Leu-*p*NAを基質にして、反応液に3.0 M NaClを加えると、対照と比較してDamAの*p*NA遊離活性は3.1倍に上昇した。さらに、DamAのアミノリシス活性を用いて、いくつかの生理活性ペプチドの合成が確認出来た。本研究の一部は生研センター基礎研究推進事業により実施された。M. Matsushita-Morita et al. Appl. Biochem. Biotechnol. (in press)

Characterization of a D-stereoselective aminopeptidase (DamA) from *Aspergillus oryzae*

Mayumi Matsushita-Morita¹, Hiroyuki Nakagawa¹, Sawaki Tada¹, Junichiro Marui^{1,5}, Satoshi Suzuki¹, Ryota Hattori¹, Hitoshi Amano², Hiroki Ishida³, Youhei Yamagata⁴, Michio Takeuchi⁴, Ken-Ichi Kusumoto¹
(¹Natl. Food Res. Inst., NARO, ²Amano Enzyme, ³Gekkeikan, ⁴Tokyo Univ. of Agric. Tech., ⁵JIRCAS.)

P-54

麹菌 *Aspergillus oryzae* *pepO* 遺伝子欠損株の菌体外エンド型プロテアーゼについて

上野絢子, 前田浩, 山形洋平, 竹内道雄(農工大・院)

〈目的〉ゲノム解析の結果、黄麹菌 *Aspergillus oryzae* RIB 40 にはプロテアーゼをコードすると推定される遺伝子が126個存在することが明らかになった。以前の報告で、RIB 40の菌体外において酸性条件下で作用しペプスタチンで阻害されるアスパルティックプロテアーゼ(APase)はPepOのみであることが示された。そこで、本研究では、*pepO*を*pyrG*で置換した*pepO*遺伝子欠損株を作製し、その欠損が他の菌体外分泌の酸性エンド型プロテアーゼに及ぼす影響について調べることを目的とした。

〈方法・結果〉*pepO*遺伝子欠損株($\Delta pepO$)を作製した。 $\Delta pepO$ の培養上清について、酸性条件下で作用するエンド型プロテアーゼの活性測定を行ったところ、野生型のRIB 40に比べ約5割程度の活性が認められた。この活性はペプスタチンによる阻害を受けず、APaseではないことが明らかになった。そこで、 $\Delta pepO$ の培養上清に幾種かのプロテアーゼ阻害剤を添加して活性測定をした結果、antipainにより強く阻害された。antipainに阻害される酸性エンド型プロテアーゼであるAorsinAの基質であるZ-Arg-Arg-MCAを用いて活性測定を行うと、活性が認められた。野生株RIB 40と $\Delta pepO$ における遺伝子の転写量に変化は認められなかった。以上より、RIB 40の菌体外において酸性条件下で作用する主なエンド型プロテアーゼはPepOとAorsinAであることが示唆された。

Extracellular endoproteases of *Aspergillus oryzae* *pepO* gene deletion strain

Ayako UENO, Hiroshi MAEDA, Youhei YAMAGATA, Michio TAKEUCHI
(Division of Applied Biological Chemistry, Tokyo Univ. of Agriculture and Technology)

P-55

Aspergillus oryzae の菌体内金属プロテアーゼ saccharolysin homolog の機能解析

石川 雄一朗, 前田 浩, 竹内 道雄, 山形 洋平 (農工大院・農)

[目的] *A. oryzae* のゲノムには多くのプロテアーゼ遺伝子が存在している。アミノ酸配列の相同性から, *S. cerevisiae* には 1 つしか存在しない saccharolysin の homolog をコードする遺伝子が見出され, oryzalysin (Ols) A, B, C とした。Saccharolysin は, ミトコンドリア膜間腔に局在する金属ペプチダーゼで, ミトコンドリア膜間腔やマトリックス間で酸化ダメージを受けたタンパク質が分解されて産生されるペプチドや, ペプチダーゼによって切断されたシグナルペプチドを分解する機能が酵母において知られている。酵母に比して, *A. oryzae* ゲノム中には, *ols A*, *ols B*, *ols C* の 3 つの遺伝子が存在している。このことから *A. oryzae* では Ols の機能分担の可能性が示唆された。本研究では, *A. oryzae* における oryzalysin の機能解析を目的とした。

[方法・結果] *ols A*, *ols B*, *ols C* の各遺伝子の単独破壊株, 過剰発現株を作製し, コントロール株と比較した。*ols A*, *ols B*, *ols C* の各単独破壊株は, 脱共役剤 2,4-dinitrophenol によってミトコンドリア膜電位を消失させた時, コントロール株よりコロニー中心部における気中菌糸の伸長促進が見られた。*ols A* 過剰発現株は, *ols A* が過剰に発現する時, コントロール株よりコロニー直径, 分生子着生の減少が見られた。*ols A*, *ols B*, *ols C* の各遺伝子の単独破壊株, 過剰発現株の転写解析を行った。*ols C* 破壊株において *ols A* の転写量が減少し, *ols C* 過剰発現株において *ols A* の転写量が増加していた。このことから *ols A* と *ols C* の転写レベルでの協調性が示唆された。現在, タンパク質レベルにおける解析を行っている。

Functional analysis of intracellular metalloproteases saccharolysin homolog in *Aspergillus oryzae*

Yuichiro ISHIKAWA, Hiroshi MAEDA, Michio TAKEUCHI, Youhei YAMAGATA
(Division of Applied Biological Chemistry, Tokyo Univ. of Agriculture and Technology)

P-56 (O-7)

Trichoderma reesei に存在する 10 種類の β -glucosidase isozyme の酵素化学的性質

郭 博洋, 野崎功一, 水野正浩, 天野良彦 (信州大院・生命機能・ファイバー工学)

糸状菌 *Trichoderma reesei* のセルラーゼ誘導物質であるソホロースは, β -glucosidase (BGL) による糖転移反応によって合成されることが推定されている。その合成に関与する BGL を特定するために, 本菌に存在する 10 種類の BGL (Cel1A, Cel1B, Cel3A, Cel3B, Cel3C, Cel3D, Cel3E, Cel3F, Cel3G および Cel3H) について発現系を構築した。これら組換え酵素の精製を行い, 糖転移活性を含めた酵素化学的性質を調査した。

GH1 に属す Cel1A および Cel1B は大腸菌において発現系を構築し, その他 GH3 の BGL は, 麹菌において発現系を構築した。これらのうち, 9 種類の BGL はいずれも *p*-Nitrophenyl- β -D-glucoside (pNPG1) とセロビオース (G2) に対して分解活性を示したが, Cel3H には BGL 活性が認められなかった。BGL 活性を示した 9 種類の酵素について, pNPG1 と G2 に対する分解活性を比較したところ, Cel3A, Cel3B および Cel3E は両方の基質に良く作用し, 比活性の差は少なかった。また, Cel3C, Cel3D, Cel3F, Cel3G および Cel1B は pNPG1 に対する比活性が G2 に比較して高く, Cel1A は G2 に対する比活性が高かった。

一方, 各 BGL のタンパク質量を統一し, 10% の G2 を基質として糖転移活性を調査した。pNPG1 に良く作用する BGL には転移生成物がほとんど確認されなかったが, G2 に良く作用する BGL (Cel1, Cel3A, Cel3B および Cel3E) には明らかな糖転移生成物が確認された。転移生成物には, 結合様式が異なる様々な二糖やセロオリゴ糖が含まれ, その中でもソホロースの合成量は Cel1A と Cel3A が著しく高く, 最大で 5.4 mg/ml と 2.8 mg/ml であった。また, Cel3A による転移生成物は時間の経過に伴ってグルコースに分解され消失したが, Cel1A では減少することなく蓄積されることが明らかとなった。このことから, Cel1A がセルラーゼ誘導物質であるソホロースの合成に関与している可能性が示唆された。

Enzymatic properties of β -glucosidase isozymes from *Trichoderma reesei*

Boyang Guo, Kouichi Nozaki, Masahiro Mizuno, Yoshihiko Amano

(Dept. of Biosci. & Textile Technol., Interdisciplinary Graduate School of Sci. and Technol., Shinshu Univ.)

P-57

マツタケのフェニルアラニンアンモニアリアーゼ遺伝子の構造と機能の解析

宮川駿人, 勝田尚樹, 田崎裕二 (長岡高専・物質工)

[目的] マツタケ (*Tricholoma matsutake*) において, その香りの特徴づける香気成分である桂皮酸メチルの生合成に関する知見はほとんどない。しかし, バジルでは, 桂皮酸メチルが L-フェニルアラニン (Phe) から桂皮酸を経て生成することが明らかにされている。その初発酵素として Phe より桂皮酸とアンモニアを生成する酵素である Phe アンモニアリアーゼ (PAL) が機能する。そこで, 本研究では, マツタケの PAL 遺伝子 (*TmPAL1*) の cDNA およびゲノム DNA をクローニングし, 大腸菌発現系によりマツタケ PAL (*TmPAL1*) を産出し, その酵素化学的性質の解明を試みた。

[方法と結果] 植物と酵母の PAL の保存配列を基に設計したディジェネレートプライマーとマツタケ (NBRC30605 株) 菌糸体のトータル RNA を用いた RT-PCR, 3' 及び 5' RACE 法で *TmPAL1* cDNA を増幅し, その全長の塩基配列を決定した。*TmPAL1* の推定アミノ酸配列は, 担子菌キノコ由来の PAL と 60% 以上の相同性を示した。*TmPAL1* のコード領域は PCR, 3' 及び 5' 末端の非コード領域はインバース PCR で増幅した後, ゲノムの塩基配列を決定した。cDNA とゲノム配列との比較により, 7 つのイントロンの存在を確認した。また, 4 種の制限酵素で処理したゲノム DNA を用いたサザン解析により, *TmPAL1* はシングルコピーであることが示唆された。さらに, pET-28 ベクターと大腸菌 BL21(DE3)株を用いて, 活性を有する組換え *TmPAL1* を産出した。現在, その酵素化学的性質を調べている。

Structure and functional characterization of a phenylalanine ammonia-lyase gene, *TmPAL1*, in *Tricholoma matsutake*.

Hayato Miyakawa, Naoki Katsuda, Yuji Tasaki

(Dept. of Mater. Eng., Nagaoka Col. of Technol.)

P-58

麴菌 hydrophobin RolA と cutinase CutL1 間の相互作用に關与する RolA の塩基性残基

對馬 裕誠¹, 佐藤 大貴¹, 金 允卿¹, 村垣 公英¹, 上原 健二¹, 高橋 徹², 山形 洋平³, 阿部 敬悦¹

(¹東北大院・生物産業創成, ²東北大・未来研, ³東京農工大・応用生物科学)

hydrophobin は糸状菌および担子菌の特有な分泌タンパク質で, 菌糸表面に局在する。*Aspergillus oryzae* の場合, 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 と相互作用し, PBSA 表面に CutL1 を濃縮することで PBSA 分解を促進する。これまでの研究によって, RolA と CutL1 の相互作用にはイオンの相互作用が關与し, RolA 側の His32, Lys34 が CutL1 側の Glu31, Asp142, Asp171 が結合に重要であることが示された。しかし, RolA の野生型, H32S/K34S 二重変異体と CutL1 の野生型, E31S/D142S/D171S 三重変異体を用いて相互作用の動力的解析を行ったところ, NaCl 存在時, RolA 二重変異体に対する CutL1 三重変異体の結合量が NaCl 非存在時に比較して顕著に減少した。この結果から特定された残基以外にもイオンの相互作用部位が残存する可能性が示唆された。そこで本研究は, RolA 二重変異体に残存する CutL1 との相互作用部位の解明及びその相互作用機構の解析を目的とした。正電荷アミノ酸残基を化学修飾した RolA 二重変異体と相互作用に關与すると推測される正電荷アミノ酸残基を置換した RolA 三重変異体を作製し, QCM により RolA-CutL1 間相互作用を評価した。その結果, RolA 側の His32, Lys34 の他に Lys41, Lys46, Lys51 が相互作用に關与し, His32, Lys34 と共に多価効果により CutL1 との相互作用に寄与することが示された。また, Kd により Lys41 < Lys46 ≒ Lys51 の順で相互作用に寄与すると推測された。

Aspergillus oryzae hydrophobin RolA possesses positive residues involving in RolA-cutinase CutL1 interaction

Yusei Tsushima¹, Daiki Sato¹, Yoonkyung Kim¹, Kimihide Muragaki¹, Kenji Uehara¹, Toru Takahashi², Youhei Yamagata³, Keietsu Abe¹ (¹Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., ²NRIB., ³Tokyo univ. of Agric. And Technol.)

P-59

麦麴の製造過程における白麴菌のトランスクリプトーム解析

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

【目的】白麴菌 (*Aspergillus kawachii*) は、焼酎の醸造に使用される麴菌である。本研究では、白麴菌の特徴的な性質のひとつであるクエン酸高生産のメカニズムの全体像を明らかにすることを目的として、麦麴の製造過程における白麴菌のトランスクリプトーム解析を行った。

【方法・考察】まず、麦焼酎の原料に使用される大麦、および焼酎醸造用の白麴菌(樋口松之助商店)を用いて製麴した。製麴 25 時間目に 40°C から 30°C へ温度を低下させた通常条件(クエン酸生産誘導条件)と、40°C を維持した条件(クエン酸生産非誘導条件)から RNA を抽出し、DNA マイクロアレイ (Agilent Technologies) により遺伝子発現量を比較した。その結果、クエン酸生産誘導条件において 2 倍以上発現量が増加した 296 遺伝子、および減少した 250 遺伝子を同定した。これらの遺伝子の Gene Ontology 解析の結果、アミノ酸トランスポーターの発現増加と分子シャペロンの発現減少が、クエン酸生産誘導時の遺伝子の発現変動の特徴であることが示唆された。また、40°C から 30°C に温度を低下したことにより、高温ストレスから解除されたことによると考察した。現在、同定された発現変動遺伝子の中からクエン酸の高生産に関わると予測された遺伝子の機能解析を進めている。

Transcriptome analysis of white koji mold in a barley koji-making process

Taiki Futagami¹, Kazuki Mori¹, Shotaro Wada², Yasuhiro Kajiwara², Hideharu Takashita², Toshiro Omori²,
Kosuke Tashiro¹, Satoru Kuhara¹, Masatoshi Goto¹
(¹Kyushu Univ., ²Sanwa Shurui Co., Ltd.)

P-60

静置培養系による白色腐朽担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* のキシラン成分応答に関する研究

中村友紀, 堀 千明, 五十嵐圭日子, 鮫島正浩 (東大院・農生化)

白色腐朽担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* は菌体外に様々な酵素を分泌することで木材を効率的に分解できることから、木質系バイオマス分解のモデル菌として広く研究されてきた。しかしながら、木材はセルロース、ヘミセルロース、リグニンをはじめとする様々な成分を含む複合体であることから、木材そのものを炭素源とした培養系では各成分に対する菌の応答を調べることは非常に困難である。そのため、これまでは粉末セルロースを基質とした振とう培養系が広く用いられてきたが、振とう培養系は自然界における木材の分解環境からかけ離れているため、より自然に近い静置培養系の構築が求められている。

本研究では、吸水性・保水性に優れたセルローススポンジを炭素源として用いることで、担子菌静置培養系の構築を試みた。まず、セルローススポンジ濃度 2% w/v あるいは 4% w/v で振とう培養と静置培養を比較した。セルローススポンジ濃度 2% w/v では菌体外液のタンパク質濃度・Cel7 活性共に振とう培養の方が高い値を示したが、セルローススポンジ濃度 4% w/v では逆転し、静置培養の菌体外液でいずれも高い値を示した。次にマイクロプレートを用いてセルローススポンジとキシラン添加セルローススポンジを培養したところ、キシランの添加によって菌体外液のタンパク質濃度は約 9 倍、Cel7 活性は約 14 倍高くなり、セルロース分解関連酵素の分泌が示唆された。今後は当研究室で保有するモノコンポーネント酵素処理したキシランをセルローススポンジに添加して培養し、各成分に対する担子菌の応答を明らかにしていく予定である。

Static cultivation of *Phanerochaete chrysosporium* to unveil responses to xylan components

Yuki Nakamura, Chiaki Hori, Kiyohiko Igarashi, Masahiro Samejima
(Dept. Biomat. Sci., Univ. of Tokyo)

P-61

麹菌のカーボンカタボライト抑制関連因子 CreA・CreB 二重破壊によるアミラーゼ高生産

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 のユビキチン化・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、本研究では麹菌において *creA*, *creB* 単独及び *creA/creB* 二重破壊株を作製し、これらの遺伝子破壊のグルコース抑制への影響を解析した。

creA 及び *creA/creB* 二重破壊株では最小培地における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寒天培地で α -アミラーゼ生産を観察したところ、野生株ではハロー形成が見られないのに対して、各破壊株では明瞭なハローが観察された。以上の結果から、各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。また、グルコース液体培地において *creA* 及び *creA/creB* 二重破壊株では野生株と比較して α -アミラーゼ活性の上昇が認められた。さらに興味深いことに、デンプンまたはマルトースを炭素源とする液体培地では *creA/creB* 二重破壊株は *creA* 破壊株よりも顕著に高い α -アミラーゼ活性を示した。

(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。)

Hyperproduction of amylases by double deletion of CreA and CreB involved in carbon catabolite repression in *Aspergillus oryzae*

Sakurako Ichinose, Mizuki Tanaka, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi

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

P-62

キシラン誘導型キメラ転写因子 AmyR::XlnR によるアミラーゼ生産

金子優平¹ 田中寿基² 丸井淳一郎² 志水元亨¹ 小林哲夫² 加藤雅士¹

(¹名城大院・農) (²名大院生命農)

【目的】麹菌では既に強力なタンパク質生産系が確立されているが、さらにきめ細かな調節を可能にするため、転写因子を細分化し再構築することで「転写因子工学」ともいうべき、新たな転写制御技術の開発を行うことを目的とした。今回はその第一歩として、キシラン分解酵素の転写因子 XlnR とアミラーゼ遺伝子群の転写因子 AmyR とのキメラ転写因子を作製し、解析を行った。【方法と結果】N 末端には FLAG-His-tag を付加し、AmyR の DNA 結合ドメインを含む N 末端側 68aa と XlnR の DNA 結合ドメイン直後から C 末端までの 812aa を連結し、AmyR::XlnR キメラ転写因子を構築した。これを *amyR* 欠失株において発現させ、抗 FLAG 抗体を用いたウェスタンブロッティングにより、AmyR::XlnR キメラ転写因子の発現を確認した。また、AmyR::XlnR キメラ転写因子発現株は CMC やデンプンの添加ではアミラーゼ活性はほとんど検出されないのに対し、キシラン及びキシロースを添加した場合は、顕著なアミラーゼ活性が検出された。

A model chimeric transcription factor: construction and characterization of an AmyR::XlnR hybrid transcription factor.

Yuhei KANEKO¹, Hisaki TANAKA², Jun-ichiro MARUI², Motoyuki SHIMIZU¹, Tetsuo KOBAYASHI², Masashi KATO¹. ¹Meijo Univ., ²Nagoya Univ.

P-63 (O-6)

Trichoderma reesei におけるセルラーゼ生産に関与するトランスポーターの解析

谷口大樹, 日下秀行, 古川隆紀, 志田洋介, 小笠原渉 (長岡技科大・生物)

糸状菌 *Trichoderma reesei* は、細胞外セルロース等の誘導物質の存在下でセルラーゼを誘導的に生産する。しかし、不溶性のセルロースは細胞膜を透過することが出来ないため、どのようにしてこれを認識し、そのシグナルを菌体内に伝達しているのかは不明である。これまでの研究から構成的に発現しているセルラーゼが不溶性のセルロースを分解し、この分解産物を取り込まれることによってセルラーゼが誘導生産されると考えられているが、その詳細に関しても不明である。これまで当研究室ではセルラーゼと同調的に発現し、かつ初発のセルラーゼ誘導物質の取り込みに関わると推定されるトランスポーターに関してセルラーゼ高生産菌株である PC-3-7 で解析してきた。その解析の過程で発見された MFS トランスポーター TRP3405 は、PC-3-7 株において遺伝子破壊を行ったところ、破壊株においてアビセル、セルロース、ラクトースにおけるセルラーゼ生産が失われていることが明らかとなった。そこで、TRP3405 遺伝子の破壊が、セルラーゼ生産に関わる何らかの重要な遺伝子の発現に影響を与えると考え、PC Δ 3405 株と PC-3-7 株におけるセロビオース誘導試験のマイクロアレイ解析を行っている。その結果から PC Δ 3405 株において主要なセルラーゼ・ヘミセルラーゼの発現が失われていることが判明した。現在は、PC Δ 3405 株と PC-3-7 株間における転写調節遺伝子群やトランスポーター遺伝子群等に関する詳細な解析を行っている

Influence of gene destruction of cellulose specific transporter in *Trichoderma reesei*

Hiroki Taniguchi, Hideyuki Kusaka, Tkanori Furukawa, Yosuke Shida, Wataru Ogasawara

(Nagaoka Univ. of Tech)

P-64

Aspergillus nidulans 転写因子 ManS の機能

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)

【目的】 *A. oryzae* において同定された転写因子 ManR は、マンナナーゼ・セルラーゼ生産に必須の因子である。一方、*A. nidulans* では *manR* に加えてそのホモログである *manS* を有しており、*manR* と *manS* の単独破壊株ではマンナナーゼ生産能の完全な消失には至らないが、二重破壊株では完全にマンナナーゼ生産性が失われる。本研究では *manS* 制御下のバイオマス分解酵素遺伝子の網羅的同定を行った。

【方法・結果】 野生株、 Δ *manS* 株を konjac glucomannan (KG) を単一炭素源として 24 時間誘導し、抽出した RNA を用いて RNA シークエンシングを行った結果、エンドマンナナーゼ遺伝子である *manC*, *manE*, *manF* 遺伝子が ManS による制御を受けていることが示された。ManR 制御の遺伝子は *manB* と *manC* であり、*manC* を除くと ManR と ManS は異なるマンナナーゼ遺伝子を制御していることが示された。ManR と ManS により共通して制御される多糖分解酵素遺伝子は *manC* だけでなく、*eglA*, *eglB*, *cbhA*, *cbhD*, *faeC* が挙げられた。すなわち、ManR 支配の一部の主要セルラーゼ遺伝子は ManS によっても制御されていた。CMC による誘導では *manS* 破壊が *EglA*, *EglB* 生産に影響を与えないことを考慮すると、ManS は異なる誘導物質に応答して ManR と一部重複する遺伝子を制御すると考えられる。現在、リン酸膨潤セルロース、KG を誘導物質として *manS* 破壊が推定マンナナーゼ、セルラーゼ遺伝子群の発現に与える影響について Northern ブロット解析により確認を行っている。

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。

Physiological function of ManS, a fungal-specific transcription factor in *Aspergillus nidulans*

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

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

P-65

ヒラタケのリグニン分解酵素発現調節機構におけるカルモデュリンの役割

末富高志¹, 阪本鷹行¹, 徳永祥孝¹, 本田与一², 泉津弘佑¹, 鈴木一実¹, 入江俊一¹

(¹滋賀県大・環, ²京大・農)

以前の解析より, 代表的な Ca²⁺情報伝達タンパク質の一つであるカルモデュリン (CaM) が白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* における主要リグニン分解酵素発現を正に調節することが示唆されている。 *Pleurotus ostreatus* (ヒラタケ) は主要リグニン分解酵素としてラッカーゼ (Lac) およびマンガンペルオキシダーゼ (MnP) を生産する国内自生の白色腐朽菌である。ヒラタケ PC9 株を用いて, CaM 過剰発現株と shRNA 発現による発現抑株を作成したところ, 前者は Lac および MnP 活性が減少し, 後者は増加した。また, 野生型株に CaM 阻害剤 W-7 を添加した場合も Lac および MnP 活性が増加することが観察された。以上のことから, ヒラタケにおいて CaM はリグニン分解酵素発現を負に調節することが示唆された。現在, 詳細な制御機構を解析するため, Lac および MnP 主要アイソザイム遺伝子の転写物量解析を行っている。

Role of calmodulin in regulation of ligninolytic enzymes expression in *Pleurotus ostreatus*.

Takashi Suetomi¹, Takaiku Sakamoto¹, Yoshitaka Tokunaga¹, Yoichi Honda², Kousuke Izumitsu¹, Kazumi Suzuki¹ and Toshikazu Irie¹

(¹Unvi. of Shiga Pref., ²Kyoto Univ.)

P-66

Aspergillus aculeatus セルロース系バイオマス分解酵素遺伝子の発現制御因子の同定

遊亀翔太, 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* におけるセルラーゼ生産調節機構を分子レベルで解明するため, 我々は新たなセルラーゼ生産調節因子を同定し, その作用機序を解明することを目指している。

cellobiohydrolase I 遺伝子 (*cbhI*) プロモータ支配下でレポータとして orotidine 5'-phosphate decarboxylase 遺伝子を発現するように作製した株を宿主に用いて T-DNA 挿入変異株ライブラリを構築し, その中から 5-fluoroorotic acid (5-FOA) を含むセルロース培地上で生育した株を選択した。得られた 5-FOA 耐性株の中から, セルロース資化能が低下した株を制御因子欠損候補株として単離した。各候補株における *cbhI* 発現量をノーザンブロット法により定量した結果, 誘導条件下においても *cbhI* 発現量が検出限界以下まで減少していた候補株 (B7 株) を取得した。inverse PCR 法を用いて B7 株における T-DNA 挿入座位を限定し, その周辺の遺伝子を pPTRII プラスミドを用いて B7 株に導入したところ, ある遺伝子 (*gene1*) の導入により *cbhI* 発現量, セルロース資化能が共にコントロール株レベルまで回復した。現在は *gene1* の単独欠損株およびその相補株を作出し, セルロース系バイオマス分解酵素生産量および各遺伝子発現量を解析している。

Identification of regulator(s) controlling the expression of cellulase genes in *Aspergillus aculeatus*

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

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

P-67

Expression cluster analysis of the transcriptomes at sequential growth stages in the white-rot fungus, *Phanerochaete carnosae*, grown on aspen and spruce woods.

Hitoshi Suzuki (RIKEN, CSRS), Philip Wong, Chi-Yip Ho, Yunchen Gong, Kin Chan, Elisabeth Tillier and Emma Master (Univ. of Toronto)

A white-rot fungus, *Phanerochaete carnosae*, is a natural decomposer of coniferous wood and has an ability to degrade various types of softwood and hardwood tissues. While proteins produced by *P. carnosae* are expected to comprise promising enzymes for bioprocessing lignocellulose including fibre from coniferous wood, genome sequencing revealed that a large contingent of likely relevant proteins remain uncharacterized.

Here, we performed gene expression cluster analysis using multiple *P. carnosae* transcriptomes obtained at different stages of fungal growth on trembling aspen and white spruce. The results revealed co-expression pairs and clusters of known lignocellulolytic genes associated with genes of unknown functions (UNKs), suggesting participation of those unknowns in the lignocellulolytic system of this fungus.

P-68

麹菌の転写因子 AmyR と MalR の翻訳後修飾と安定性

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

麹菌のアミラーゼ生産には、アミラーゼ遺伝子群を直接制御する 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。これらの転写因子は誘導基質の有無に関わらず構成的に発現しているため、誘導基質依存的に翻訳後修飾を受け、タンパク質レベルで活性化すると予想されている。昨年度の本会において、我々は AmyR と MalR が異なる細胞内局在を示すことを報告した (1)。本研究では、タンパク質タグを融合させた AmyR と MalR を麹菌で発現させ、ウエスタンブロット解析により AmyR と MalR の各種炭素源におけるタンパク質修飾や安定性について解析した。

チアミン依存的に転写が抑制される *thiA* プロモーター制御下で、タンパク質タグを付加した AmyR と MalR の発現株を作製した。これら発現株をカザミノ酸を炭素源とした培地で前培養した後、誘導基質とチアミンを添加し、経時的に菌体を回収した。菌体からタンパク質を抽出し、ウエスタンブロット解析に供したところ、AmyR は誘導基質依存的に速やかにバンドが消失したのに対し、MalR は安定であった。このことから、MalR と異なり、AmyR は誘導基質依存的に速やかな分解を受ける可能性が示唆された。また、AmyR は phosphatase 処理によりシグナルが低分子量側にシフトしたことから、リン酸化修飾を受けていることが示された。今後は Phos-tag SDS-PAGE を用いて、これら転写因子のリン酸化レベルを解析する予定である。

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

(1) 鈴木空太ほか；第 12 回糸状菌分子生物学コンファレンス要旨集, p.57

Post-translational modification and stability of transcription factors, AmyR and MalR, in *Aspergillus oryzae*.

Kuta Suzuki, Mizuki Tanaka, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi

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

P-69

pH 応答転写因子 PacC による糸状菌セルラーゼ遺伝子発現制御

國武絵美¹, 萩原大祐², 宮本健太郎¹, 金丸京子¹, 木村真¹, 小林哲夫¹

(¹名大院生命農・生物機構, ²千葉大・真菌センター)

【目的】 *Aspergillus nidulans* において, pH シグナル伝達因子 PalC 遺伝子の変異によってセルラーゼ生産性が著しく低下することを見出している。そこで, PalC の下流に存在する C₂H₂ 型転写因子 PacC の遺伝子破壊株を作製したところ, PalC 変異株と同様にセルラーゼ生産性の低下が観察された。本研究では PacC の関与をより詳細に調べるため, *pacC* 破壊株における環境 pH に応答したセルラーゼ遺伝子群の発現解析を行った。

【結果】 酸性 (pH 4.2) 及びアルカリ (pH 8.2) 両条件下におけるセロビオース誘導時の各セルラーゼ遺伝子の転写解析を qRT-PCR 法を用いて行った。野生株において, 酸性条件下では誘導後 3 時間で転写のピークを迎える一方で, アルカリ条件下では 1 時間後と速やかな転写が観察された。 $\Delta pacC$ 株ではいずれの条件下でも野生株ほどの転写量の上昇は見られなかった。レポーターアッセイにより *eglA* プロモーターの変異解析を行った結果, PacC 結合配列を欠失又は変異させても pH 応答性が見られたため, PacC による *eglA* の制御は間接的であることが明らかになった。セルラーゼ遺伝子の発現制御因子遺伝子の qRT-PCR 解析結果から, これらの調節を介した間接制御の可能性は否定された。そこで, PacC 制御下にある遺伝子について網羅的に調べるため, アルカリ条件のサンプルを RNA-seq に供したところ, ManR 依存的に調節される遺伝子の転写が $\Delta pacC$ 株で減少し, また複数の推定糖輸送体遺伝子が PacC 制御下にあることが判明した。TLC 解析により $\Delta pacC$ 株では野生株と比較して培養上清中にセロビオースが多く残存していたことから, PacC はセロビオースの取り込みを介して, ManR の活性化を制御していると考えられる。これらの糖輸送体遺伝子破壊株を作製し, pH に応答したセロビオースの取り込み及びセルラーゼ生産性について解析する予定である。

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。

The pH-signaling transcription factor PacC regulates expression of cellulase genes in *Aspergillus nidulans*.

Emi Kunitake¹, Daisuke Hagiwara², Kentaro Miyamoto¹, Kyoko Kanamaru¹, Makoto Kimura¹, Tetsuo Kobayashi¹

(¹Graduate Sch. of Bioagric. Sci., Nagoya Univ., ²MMRC, Chiba Univ.)

P-70

麴菌 *xyrA* 及び *larA* 遺伝子の XlnR と AraR による協調的発現制御

石川香南, 川瀬智美, 野口佑司, 金丸京子, 木村真, 小林哲夫 (名大院生命農・生物機構)

【目的】 XlnR と AraR は *Aspergillus* 属糸状菌のもつ Zn(II)₂Cys₆ 型の転写因子である。これら因子はいずれもペントース代謝系遺伝子群を正に制御するが, 遺伝子によっては明らかな両者の競合が見られる。この協調的かつ一部競合的な制御機構の詳細を明らかにするため, 本研究では, ペントース代謝系の第一段階の酵素をコードする *xyrA* 及び *larA* のプロモーター領域に存在する XlnR, AraR 結合部位を同定した。その結果をもとに, 協調的かつ競合的な制御機構について考察する。

【方法・結果】 大腸菌を宿主として生産した XlnR, AraR の DNA 結合ドメインを用い, *xyrA*, *larA* プロモーターに存在する DNA 結合部位を EMSA により同定した。*xyrA* プロモーターでは, XlnR は 2 カ所の 5'-GGCTAA-3', AraR は 5'-CGGGTAAA-3' に結合した。これらは既知の結合コンセンサス配列である。結合配列は 60 bp の領域内に存在し, 最短の XlnR, AraR 結合配列間の距離は 11 bp であった。*larA* プロモーターでは, AraR は 3 カ所のコンセンサス配列, XlnR は 5'-GGATAA-3' という新規配列に結合することが示され, 1 カ所の AraR 結合配列を除くとこれら結合配列は 40bp 内に集積しており, 内 1 カ所では XlnR と AraR 結合配列は重複していることが示唆される。以上から, XlnR, AraR は一部の結合配列において競合すると考えられ, その証拠も得られつつある。従って, XlnR, AraR の核内のモル比, それぞれの活性化状態, 競合結合領域の発現レベルへの貢献度が *xyrA*, *larA* の最終的発現レベルを決定すると考えられる。

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。

Co-regulation of *A. oryzae xyrA* and *larA* expression by XlnR and AraR

Kana Ishikawa, Tomomi Kawase, Yuji Noguchi, Kyoko Kanamaru, Makoto Kimura, Tetsuo Kobayashi

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

P-71

Aspergillus aculeatus セロビオース応答因子 ClbR とそのパラログ因子 ClbR2 の作用機序解析

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, セルロースに応答して XlnR 依存的・非依存的に誘導される遺伝子の発現を亢進する。ClbR を構成的に高発現する株を作製し, 小麦ふすまを炭素源として培養したところ, その培養上清中には ClbR 制御下の遺伝子産物のうち Xyn1a の分泌量が劇的に増加しており, またその転写量も同様に増加していたが, その他の遺伝子の発現は亢進されなかった。また Yeast Two Hybrid (Y2H) 法により ClbR の相互作用因子を探索したところ, ClbR と相同性 42% のパラログ因子 ClbR2 の C 末端欠損タンパク質 (ClbR2₁₋₂₉₅) が同定された。clbR2 単独破壊株と clbR との二重破壊株を作製し, 各株における遺伝子発現量を定量した結果, ClbR2 は ClbR と協調的に転写因子 ManR の発現を制御する一方で, ClbR 制御下にある Fia-xylanase (*xyn1a*), Fib-xylanase (*xyn1b*) 遺伝子の発現には関与していないことが示唆された。

そこで ClbR の *in vitro* における DNA への結合特性を解析するために, ClbR 全長 (MalE-ClbRwhole) と *xyn1a* プロモーター領域を用いて Electrophoresis mobility shift assay を行った結果, シフトバンドが検出された。現在, Y2H により ClbR との相互作用が示された ClbR2 の C 末端欠損タンパク質 (MalE-ClbR2₁₋₂₉₅) を用いて, ClbR および ClbR2 の *xyn1a* および *manR* プロモーター領域に対する結合特性を解析している。

Functional analysis of cellobiose response regulator (ClbR) and its paralog (ClbR2) in *Aspergillus aculeatus*.

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

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

P-72

Molecular basis that divides ManR-dependent and ManR/McmA-dependent genes in *Aspergillus nidulans*

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

(Grad. Sch. Bioagric. Sci., Nagoya Univ.)

Fungal hydrolytic gene expression is tightly controlled at the transcription level. Besides the traditional XlnR-dependent mechanism, a novel McmA-ManR mechanism involved in regulation of cellulolytic and hemicellulolytic genes has been identified recently. Both transcription factors are essential to inductive expression of *eglA*, encoding endoglucanase A, because ManR requires McmA for binding to CeRE (Cellulose Responsive Element) on the promoter. Based on RNA sequencing analysis, highly expressed cellulolytic genes are under control by both McmA and ManR (ManR/McmA dependent). But at the same time a number of genes are ManR-dependent but not McmA-dependent (ManR-dependent). The ManR-dependent genes include some mannanolytic and xylanolytic genes. In this report, we confirmed the requirement of McmA for ManR-binding using the promoter of *eglB*, another endoglucanase gene, and also examined whether ManR without McmA could bind the promoter of the ManR-dependent gene *mndB* encoding β -mannosidase.

Binding of His-tagged McmA and Flag-tagged ManR DNA binding domain to various probes were examined by EMSA. When binding to the *eglB* was examined results similar to *eglA* were obtained. ManR did not bind to the promoter in the absence of McmA, while it bound to CeRE containing DNA fragments in its presence. McmA alone could bind to various locations on the promoter, but CeRE was required for recruitment of ManR. This implies ManR not only binds to McmA but also to DNA. In contrast, ManR could bind to the *mndB* promoter in the absence of McmA. Since no CeRE-like sequence exists on the promoter, it appeared that ManR recognized a sequence different from CeRE. Further study will focus on the identification of the binding site for ManR on the *mndB* promoter.

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

P-73

糸状菌 *Aspergillus niger* 由来 PKS-NRPS 遺伝子クラスターの強制発現

淡川孝義, 楊小龙, 脇本敏幸, 阿部郁朗 (東大院薬)

糸状菌 *Aspergillus niger* は9つの polyketide synthase – non-ribosomal peptide synthase (PKS-NRPS) 遺伝子を有するが、その全ての生成物は未同定である。よって、これら未知の生成物を同定することで、新規な生成物の知見が得られることが期待される。本研究では、そのうちの一つの PKS-NRPS 遺伝子 *An11g00250* (*pynA*) を含む遺伝子クラスター (*pyn* クラスターと命名) に注目した。*Pyn* クラスターは正の転写因子である *pynR* 遺伝子を含む。*PynR* は GAL4 類似の転写因子であり、遺伝子クラスターに含まれる遺伝子全ての転写を誘導すると考えられた。そのため、*A. niger* ATCC 1015 株に PEG-プロトプラスト法にて *pynR* 上流に *gpdA* promoter を付加したものを導入し、グルコースを含む培地で形質転換体を培養して *pynR* を強制発現することで、*pyn* クラスターの生成物の検出を試みた。しかし、結果として生成物は得られず、RT-PCR の結果、グルコース存在下では、*pynR* は転写されるものの、*pynA* は転写されないことが判明した。そこで、*pyn* クラスターはグルコース存在下、転写が抑制されているのではないかと予想し、グルコース非依存型の *aga* プロモーターを *pynR* 上流に挿入した形質転換体を作製した。その結果、グルコースを含まない誘導培地で、形質転換体を培養することで、コントロールにはない、新たな化合物が生産されることが確認された。この化合物を大量調製し、NMR, MS 分析に供することで、新規化合物である pyranonigrin E であると同定した。その生合成経路についても発表にて考察する。

Expression of the dormant PKS-NRPS gene cluster in *Aspergillus niger*

Takayoshi Awakawa, Xiao-Long Yang, Toshiyuki Wakimoto, Ikuro Abe

(Grad. School of Pharm. Sci., Univ. of Tokyo)

P-74

トリコテセン生合成遺伝子の転写因子をコードする *Tri6* の機能解析

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

Fusarium graminearum はトリコテセン系毒素を産生し、宿主植物へ感染する際の病原因子として用いる。毒素産生条件下では、トリコテセン生合成遺伝子 (*Tri* 遺伝子) クラスター内に存在する *Tri6* 遺伝子がコードする転写因子と *Tri10* 遺伝子がコードする機能未知の制御タンパク質の働きにより経路酵素遺伝子 *Tri5* や *Tri4* が発現する。しかし *Tri6* 自身がどのように発現制御を受け、また各 *Tri* 遺伝子の転写に TRI6 がどのように関与しているかについては分かっていない。そこで遺伝子クラスター中の *Tri6* コード領域に点変異を導入して不活化した *Tri6* (*Tri6_nsm*) を有する株 (*Tri6_nsm* 株) を作成し、*Tri6* の機能を解析した。*Tri6_nsm* 株では毒素産生条件下で *Tri6_nsm* の発現誘導がかかった (トリガー転写) が、その転写量は野生株と比べ極めて少ない量であった。一方、*Tri6_nsm* 株に対してクラスター外から TRI6 転写因子としての機能を有する *Tri6::GFP* を構成的に発現させたところ、*Tri6_nsm* の転写量が顕著に増大 (正のフィードバック転写) した。*Tri6* のトリガー転写は TRI10 に非依存的で、また TRI6 の zinc finger ドメインと GFP を融合したタンパク質も TRI10 に非依存的に核へ移行した。これらの結果は TRI6 が TRI10 に依存して自身の発現を正に制御していることを示す。さらに様々な培養条件下における *Tri* 遺伝子の発現解析から、*Tri6* 遺伝子と他の経路 *Tri* 遺伝子の転写活性化は異なる TRI6 複合体の形成を介してい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事業の支援を受けて行った。

Functional analysis of *Tri6* that encodes a transcriptional factor for trichothecene biosynthesis.

Yuichi Nakajima, Yoshiyuki Kito, Kazuyuki Maeda, Hinayo Ichikawa, Tetsuo Kobayashi, Makoto Kimura

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

P-75

かび毒テルペンドールの生産制御メカニズム

本山高幸, 長田裕之 (理研・抗生物質)

【目的】テルペンドール類は家畜などに痙攣を引き起こすかび毒として知られるインドールジテルペン化合物である。テルペンドール類は高脂血症治療薬の標的である ACAT の阻害剤としても報告され、更にテルペンドール E は抗がん剤の標的であるキネシン Eg5 の天然物初の阻害剤として報告され、注目されている。我々はテルペンドール類の生合成遺伝子クラスターを取得・解析することにより、テルペンドール E がテルペンドール類生合成の鍵となる初期中間体であることを見出した。テルペンドールの生産制御はかび毒制御や有用な類縁体生産において重要だが、生産制御メカニズムは不明だった。今回、テルペンドール生産菌のゲノム解読を行い、生産制御メカニズムを解析した。

【方法と結果】次世代シーケンサーを用いてテルペンドール生産菌 *Chaunopycnis alba* RK99-F33 のドラフトゲノム解読を行った。テルペンドール生合成遺伝子クラスターの近傍に C6 型転写因子遺伝子が存在することが明らかになったため、遺伝子破壊を行ったがテルペンドール類生産には影響しなかった。次に、糸状菌において二次代謝制御に関与することが知られる LaeA オルソログ及び p38 MAPK の遺伝子を破壊して生産制御への関与を解析したところ、テルペンドール類の生産が LaeA オルソログ (Lae1) に依存することが明らかとなった。アフラトキシンやトリコテセンなどのかび毒の生産も LaeA オルソログに依存することから、かび毒生産制御メカニズムの共通性が示唆された。

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。

Production control mechanism of terpenole mycotoxins

Takayuki Motoyama, Hiroyuki Osada

(Antibiotics Lab., RIKEN)

P-76

イネいもち病菌におけるテヌアゾン酸の生産制御メカニズム及び生理活性

尹忠鉄, 本山高幸, 二村友史, 長田裕之 (理研・抗生物質)

【目的】我々は糸状菌の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、膨大な数の休眠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。前回、イネいもち病菌の二成分情報伝達系を攪乱することにより、固体培養条件下で野生型株では生産しないテヌアゾン酸の生産誘導が可能であることを報告した。今回はイネいもち病菌においてテヌアゾン酸の生産誘導制御メカニズム及びテヌアゾン酸の生理活性に関して報告する。

【方法と結果】イネいもち病菌北1株はテヌアゾン酸を生産しないがDMSO添加培養時と二成分情報伝達系下流で働くp38 MAPキナーゼOSM1の遺伝子破壊株ではテヌアゾン酸が生産誘導される。この生産誘導メカニズムを明らかにするため糸状菌において二次代謝生産制御因子として知られるLaeAとの関係を調べることにした。LaeAのオルソログであるLAE1の遺伝子破壊株ではDMSO添加によるテヌアゾン酸の生産誘導が起らなくなり、過剰発現株ではDMSOなしでもテヌアゾン酸の生産が誘導された。p38 MAPキナーゼOSM1の遺伝子破壊株においてもLAE1破壊株ではテヌアゾン酸の生産誘導が起らなくなった。以上のことからDMSO添加とp38 MAPキナーゼ破壊によるテヌアゾン酸の生産誘導はLAE1を介して起きていることが示唆された。また、テヌアゾン酸について抗菌活性を調べた結果、特に強い活性を示すことはなかったが、イネいもち病菌とテヌアゾン酸を一緒にイネに散布するとイネいもち病菌のイネに対する感染能の低下が観察された。

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。

Bioactivity of tenuazonic acid and its production control mechanism in *Magnaporthe oryzae*.

Choong-Soo Yun, Takayuki Motoyama, Yusi Hutamura, Hiroyuki Osada

(Antibiotics Lab., RIKEN)

P-77 (O-3)

新規二次代謝制御因子としての *Aospt3* の機能解析

廣瀬雅人^{1,2}, 河内護之^{1,2}, 岩下和裕^{1,2} (¹広島大院・先端研, ²酒総研)

近年、ヒストン修飾等エピジェネティックな制御の重要性が注目されており、当研究室ではこれまでにヒストンアセチル化修飾に関連する遺伝子の解析を行ってきた。それら遺伝子の破壊株を作製し、表現型解析を行った結果、二次代謝生産に影響を与えるいくつかの因子が見つかり、その一つに *Aospt3* が存在していた。糸状菌の二次代謝産物 (secondary metabolites : 以下 SMs) は、有用な物質から有害な物質まで多岐にわたり、その制御機構を解明することは、物質生産や安全性の観点から重要である。そこで本研究では、麹菌における新規な SMs 制御因子として *Aospt3* に着目し、SMs 生産制御機構の解明を目的として研究を行った。

本研究では、SMs のモデル物質としてコウジ酸を用いている。まず、 $\Delta Aospt3$ におけるコウジ酸生産性の解析とコウジ酸遺伝子クラスター (*kojA*, *kojR*, *kojT*) の発現解析を行った。その結果、生産量が約 100 倍に増加し、また遺伝子の発現上昇が見られたことから、*Aospt3* はコウジ酸生産を負に制御していることが明らかとなった。糸状菌において、様々な SMs 生産制御に関わる代表的な因子として *laeA* がよく知られていることから、*Aospt3* と *laeA* の関係に着目し解析を行った。 $\Delta Aospt3$ における *laeA* の遺伝子発現についてノーザン解析を行った結果、発現の上昇が確認された。さらに $\Delta Aospt3\Delta laeA$ 二重破壊株におけるコウジ酸生産性を解析した結果、 $\Delta laeA$ と同様に、コウジ酸が生産されない表現型が得られた。この結果から、*Aospt3* と *laeA* は共にコウジ酸生産制御に関与していることが明らかとなった。現在 $\Delta laeA$ バックグラウンドでの *spt3* 高発現、 $\Delta Aospt3$ バックグラウンドでの *laeA* 高発現を行い、コウジ酸生産制御における *Aospt3* と *laeA* のエピスタティックな関係について解析を行っている。

Functional analysis of *Aospt3* secondary metabolic regulator

Masato Hirose, Moriyuki Kawauchi, Kazuhiro Iwashita

(Hiroshima Univ, NRIB)

P-78

Emericella varicolor におけるセスタテルペン合成酵素の探索

三橋隆章, 松田侑大, 淡川孝義, 阿部郁朗 (東大院・薬)

糸状菌 *Emericella varicolor* からは、アンジオテンシン II 受容体に対する阻害活性や免疫抑制活性を有する varicolin, 細胞毒性活性物質 ophiobolin 類のほか、astellatol, variculanol など種々のセスタテルペンの単離報告がなされているが、その生合成に関わる酵素は知られていない。これら *E. varicolor* 由来セスタテルペン生合成遺伝子の解明は、顕著な生物活性を有する天然有機化合物の大量生産や、生合成酵素機能や生合成経路の改変による新規有用化合物の創出にも資すると考えられる。そこで我々は、これらセスタテルペン生合成遺伝子の探索ならびにその機能解析に着手した。

当研究室でドラフトゲノムシーケンス解析を行った *E. varicolor* のゲノム中において、*Aspergillus clavatus* 由来の既知セスタテルペン合成酵素 ophiobolin F synthase (AcOS) と高い相同性を示すタンパク質をコードする遺伝子を検索したところ、3 つの候補遺伝子が見出された。これらはいずれも、AcOS や *Phomopsis amygdali* 由来のジテルペン合成酵素 fusicoccadiene synthase などと同様に、直鎖状ポリプレニル二リン酸合成部位とテルペン環化部位を併せ持つキメラ酵素をコードすると予想される。現在、各遺伝子の機能解析を行うべく、異種糸状菌 *Aspergillus oryzae* にて発現系を構築し、その生成物の分析を進めている。加えて、各セスタテルペン合成酵素遺伝子の近傍に存在する推定修飾酵素遺伝子群についても、異種発現系構築による機能解析を行う予定である。

The search for sesterterpene synthases from *Emericella varicolor*

Takaaki Mitsuhashi, Yudai Matsuda, Takayoshi Awakawa, Ikuro Abe

(Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Univ. of Tokyo)

P-79

糸状菌由来メロテルペノイド anditomin の生合成研究

松田侑大, 淡川孝義, 阿部郁朗 (東大院・薬)

メロテルペノイドとは、テルペノイドの部分構造を有する化合物の総称であり、糸状菌からは構造多様性ならびに生物活性に富む多数のメロテルペノイドが報告されている。*Aspergillus varicolor* の産生する anditomin は、ビシクロ[2,2,2]オクタン骨格を有するメロテルペノイドであり、この特異な構造は、分子内 Diels-Alder 反応を経て生合成されると予想されている。これまでに、種々の標識化合物を用いた生合成研究が行われてきた一方で、anditomin の生合成遺伝子は全く明らかになっていない。今回我々は、anditomin 生合成遺伝子の探索ならびにその機能解析による、Diels-Alder 反応を担う酵素 (Diels-Alderase) の同定、ひいては生合成の全容解明を目指した。

まず、anditomin 生産菌のドラフトゲノムシーケンス解析により、13 遺伝子からなる推定生合成遺伝子クラスターを見出した。メロテルペノイドの生合成は一般に、ポリケタイド合成酵素やテルペン環化酵素などによる“基本骨格構築反応”と種々の酸化酵素などによる“修飾反応”の2つに大別される。推定生合成遺伝子群を精査したところ、5つの遺伝子が基本骨格構築に寄与するものと予想された。そこで、これら5つの遺伝子を異種糸状菌 *Aspergillus oryzae* にて発現させたところ、導入遺伝子特異的に、順次新たな化合物が検出された。現在、これら新規化合物の構造解析を進めるとともに、修飾反応を担うと考えられる7つの遺伝子を、5つの基本骨格構築遺伝子と共発現させることで、修飾酵素群の機能解析ならびに Diels-Alderase の探索を行っている。

Biosynthetic studies on a fungal meroterpenoid anditomin

Yudai Matsuda, Takayoshi Awakawa, Ikuro Abe

(Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Univ. of Tokyo)

P-80

Aspergillus fumigatus 由来 pseurotin A 生合成機構の解明

下村康一郎, 松田侑大, 淡川孝義, 阿部郁朗 (東大院薬)

Pseurotin A は糸状菌 *Aspergillus fumigatus* が低酸素条件下で産生する化合物であり、その immunoglobulin E 抑制作用より人体の肺内部の低酸素条件下での感染性に寄与していると考えられている。その他にも神経突起の生成促進作用やキチン合成酵素の阻害による抗真菌活性等、多様な生理活性を持つ。また、特異なヘテロスピロ環構造を骨格に含むため、その生合成経路に興味を持たれる。先行研究として 2007 年に Turner らにより *A. fumigatus* のゲノム内に唯一存在する polyketide synthase - non-ribosomal peptide synthetase 複合型酵素をコードする遺伝子 (*Afu8g00540*) が pseurotin A の生合成に関与することが遺伝子破壊実験によって示されたが、それ以降の詳細な生合成経路は明らかにされていない。本研究では、糸状菌 *Aspergillus oryzae* にて推定生合成遺伝子クラスターの異種発現系を構築し、ヘテロスピロ環骨格を生成する酵素の同定とその反応メカニズムの解明を目的とした。ベクター pTAex3、pUSA、pAdeA、pPTRI 上の AmyB プロモーターの下流に *Afu8g00540*、hydrolase 遺伝子 (*Afu8g00530*、*Afu8g00570*)、P450 遺伝子 (*Afu8g00560*)、methyl transferase 遺伝子 (*Afu8g00550*) をクローニングして構築した発現ベクターを *A. oryzae* NSAR1 株に導入し、形質転換株を取得した。現在、それらを誘導培養し、それぞれの生合成のステップで蓄積する代謝物の解析を行っている。

Functional analysis of pseurotin A biosynthetic gene cluster in *Aspergillus fumigatus*

Koichiro Shiomura, Yudai Matsuda, Takayoshi Awakawa, Ikuro Abe

(Grad. School of Pharm. Sci., Univ. of Tokyo)

P-81

糸状菌 *Fusarium* sp. FN080326 株由来フサリセチン A 生合成遺伝子クラスターの同定

加藤直樹¹, Jun-Pil JANG², Jae-Hyuk JANG², 高橋俊二¹, Jong Seog AHN², 長田裕之¹

(¹理研・CSRS, ²KRIBB)

フサリセチン A はがん細胞の形態形成を阻害する物質として *Fusarium* sp. FN080326 株より単離された代謝物であり、ユニークな五環性の新規炭素骨格を有する。*Fusarium* 属糸状菌の代謝物として知られているエキセチンを生合成中間体に、そこから特徴的な五環性構造を有する本化合物に変換されると予想される。エキセチンもまた、様々な生物活性が報告されている化合物であり、PKS-NRPS ハイブリッド酵素に由来するテトラミン酸化合物である。本研究は類縁体創製と活性化化合物の高生産を目的に、フサリセチン生合成遺伝子クラスターの同定と、テトラミン酸化合物からより複雑な環構造を有する化合物への変換反応に関わる酵素遺伝子の機能解析を行った。

まずは、フサリセチン生産菌 FN080326 株のドラフトゲノム解析を行い、二次代謝遺伝子クラスターを探索した。その結果、PKS-NRPS ハイブリッド酵素遺伝子はゲノム中に 1 遺伝子のみであり、最近報告されたエキセチン生合成を担うハイブリッド酵素遺伝子 *eqxS* (Kakule TB, et al. 2013 *ACS Chem Biol* 8:1549-1557) と非常に高い相同性を示した。周辺の遺伝子構成も *eqx* クラスターのそれと酷似しており、そこで、本遺伝子クラスターをフサリセチン生合成遺伝子 (*fsa*) クラスターの候補として解析を進めることとした。*fsa* クラスターに唯一含まれるシトクロム P450 遺伝子 *fsa9* がエキセチンからフサリセチンへの変換を担う酵素遺伝子の有力候補であり、現在、遺伝学的アプローチにより本遺伝子の生合成への関与を検証するとともに、酵母発現系を用いて機能解析を行っている。

Identification of fusarisetin A biosynthetic gene cluster of *Fusarium* sp. FN080326

Naoki Kato¹, Jun-Pil Jang², Jae-Hyuk Jang², Shunji Takahashi¹, Jong Seog Ahn², Hiroyuki Osada¹

(¹RIKEN CSRS, ²KRIBB)

P-82

糸状菌 *Fusarium* sp. RK97-94 のルシラクタエン生合成遺伝子クラスター中のメチル基転移酵素遺伝子 *luc1* とトランスポーター遺伝子 *luc4* の機能解析

加藤翔^{1,2}, 本山高幸¹, 廣田洋¹, 鎌倉高志², 長田裕之² (¹理研・抗生物質, ²東京理科大)

【目的】ルシラクタエン(**1**)は糸状菌 *Fusarium* sp. RK97-94 が生産する低分子化合物であり、がん抑制遺伝子 p53 の不活性化細胞で細胞周期阻害活性を示す。**1** 生産菌は同時に環状エーテルが開環している類縁体 NG-391(**2**)を主要代謝物として生産する。我々は **1** と **2** の生合成に必須な PKS-NRPS 融合酵素遺伝子 *luc5* をクローニングし、その近傍に 8 遺伝子からなる **1** の推定生合成遺伝子クラスターが存在していることを明らかにしている。今回、メチル基転移酵素遺伝子 *luc1* とトランスポーター遺伝子 *luc4* の機能解析を行った。

【方法と結果】まず *luc4* 遺伝子破壊株を作製し、代謝物を解析した。破壊株では **2** の生産性は野生株と比べ変化が見られなかったが、**1** の生産性は大幅に低下したため、*Luc4* は **1** の生合成に特異的に関与していることが示された。次に、細胞外への排出に関与するトランスポーターとしての機能を持つかどうかについて解析したが、遺伝子破壊株と野生型株で **1** と **2** の細胞外排出能に変化はなく、*Luc4* は細胞外への排出には関与しないことが示唆された。次に *luc1* 遺伝子破壊株を作製し、代謝物を分析した。破壊株は、**1** と **2** の生産能を失い、**1** の脱メチル化体(**3**)を主要代謝物として生産するようになったことから、*Luc1* がカルボキシル基のメチル化に関与していることが明らかになった。**2** の脱メチル化体が主要ピークとして観察されなかったことから、カルボキシル基のメチル化が環状エーテル形成に影響することが示唆された。今回の結果をもとに、**1** の生合成経路を推定した。

Functional analysis of the methyltransferase gene *luc1* and the transporter gene *luc4* in the lucilactaene biosynthesis gene cluster of the producing fungus *Fusarium* sp. RK97-94

Sho Kato^{1,2}, Takayuki Motoyama¹, Hiroshi Hirota¹, Takashi Kamakura², Hiroyuki Osada¹

(¹Antibiotics Lab., RIKEN, ²Tokyo Univ. of Sci.)

P-83

麹菌 *hstD* 破壊による二次代謝物生産系の活性化

河内護之^{1, 2}, 豊浦利枝子², 岩下和裕^{1, 2} (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を生産する為、その制御機構が注目されている。この二次代謝物生産制御に、ヒストン修飾遺伝子が関与することが予想されたことから、我々はこれまでに麹菌の全 Histone deacetylase について機能解析を行った。その結果、菌類特異的 sirtuin である *hstD* が、*laeA* の制御を介し二次代謝物生産と分化を制御する事を新規に見出している。本研究では、*hstD* による二次代謝物生産制御について更なる理解をすることを目的に、マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析並びに LC-Q/TOF-MS を使用した代謝物解析により広範に二次代謝物生産系について解析を行った。

【方法・結果】麹菌 *hstD* 破壊株をコウジ酸生産培地で 4 日間液体培養後、菌体から RNA を抽出しマイクロアレイ解析を実施した。Control 株と比較し $\Delta hstD$ 株で、発現が危険率 5% で 2 倍以上変化した遺伝子を抽出した結果、発現上昇あるいは低下した遺伝子が、それぞれ 228 個と 160 個抽出された。発現が上昇した遺伝子には、関連する生産物質が不明の PKS や NRPS をコードする遺伝子が含まれていた。発現変動が有った遺伝子群について、FungiFun を用いて FunCat による機能分類を行った。その結果、発現上昇したものには、[secondary metabolism]や[detoxification]に分類される遺伝子が多く含まれている事が明らかとなった。

続いて、麹菌 *hstD* 破壊株をコウジ酸生産培地で 4 日間液体培養を行い、培地を等量の SM 抽出液 (methanol : dichloromethane : ethyl acetate=1:2:3, 1% formic acid) で分配し、得られた有機層の成分について、LC-Q/TOF-MS を用いて解析を行った。その結果、コントロール株では検出されないものを含め、多くの代謝物質の生産が上昇していることが明らかとなった。以上の結果により、麹菌 *hstD* の破壊により二次代謝物生産系が活性化される事が示唆された。

Activation of secondary metabolism in the *hstD* disruptant of *Aspergillus oryzae*.

Moriyuki Kawauchi^{1, 2}, Rieko Toyoura², Kazuhiro Iwashita^{1, 2}

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

P-84

麹菌 *Aspergillus oryzae* 由来タイプ III 型ポリケタイド合成酵素 CsyB による 3-acetyl-6-alkyl- α -pyrone の生成

橋元 誠¹、高橋宏明¹、高圓 宰¹、須田千尋¹、北本勝ひこ²、藤井 勲¹

(岩手医科大・薬、東大院・農生科・応生工)

タイプ III 型ポリケタイド合成酵素である CsyB を *A. oryzae* 中で発現させると形質転換体の培養液中に 3-acetyl- α -pyrone 骨格の csypyron B (CPB) 類が生産される。CPB 類は fatty acyl-CoA がスターターとなりアルキル側鎖をもつ pre CPB の形成後、宿主内で酸化されることで生成することが予想された。今回、大腸菌で発現させたときに得られた生成物の構造解析、および *in vitro* による反応解析を行ったので、報告する。

csyB 遺伝子を pET22b にクローニング後、BL21(DE3) 株にて一晩、低温下で誘導培養した。誘導培養液を HPLC 分析したところ、コントロールにはないピークを複数検出した。構造解析を行った結果、C15 のアルキルおよびアルケニル側鎖を 6 位にもつ pre CPB 類縁体が主生成物であることを明らかにした。*in vitro* による解析では、pColdTF にクローニングし、同様に誘導培養後、Ni-NTA 精製した融合タンパクを用いた。その結果、butyryl-CoA および malonyl-CoA、acetoacetyl-CoA を基質として用いた時に C3 プロピル側鎖の pre CPB (pre CPB-C3) の生成を質量分析により確認した。また、スターターを hexanoyl-CoA、octanoyl-CoA に変更したときに pre CPB-C5 および C7 に対応するピークをそれぞれ確認した。以上のことから、CsyB は fatty acyl-CoA、malonyl-CoA および acetoacetyl-CoA を基質として 3-acetyl-6-alkyl- α -pyrone を生成するものと結論した。

Production of 3-acetyl-6-alkyl- α -pyrones by a type III polyketide synthase CsyB from *Aspergillus oryzae*

Makoto Hashimoto¹, Hiroaki Takahashi¹, Tsukasa Koen¹, Chihiro Suda¹, Katsuhiko Kitamoto², Isao Fujii¹

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

P-85

DNA二本鎖切断によるイネいもち病菌の標的遺伝子改変法

用之丸哲也¹、荒添貴之¹、大里修一¹、有江力²、桑田茂¹ (¹明治大院農・²農工大院農)

イネいもち病菌において DNA 二本鎖切断(DSBs)の修復経路の 1 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では高頻度に遺伝子破壊が可能であることが報告されている。これは遺伝子破壊においても一方の DSBs 修復経路である相同組換え(HR)が重要な役割を持つことを示唆している。

我々はイネいもち病菌において 18 塩基認識の制限酵素 I-SceI を用いて、マーカー遺伝子へ人為的な DSBs の導入により、DSBs 導入領域の近傍において HR が高頻度に誘導されることを報告した(平成 24 年度)。このことは本菌において標的遺伝子への DSBs 導入により高頻度の遺伝子ターゲティング(GT)が可能であることを示している。

今回、本菌ゲノム上の標的遺伝子に対して Zinc finger nucleases (ZFNs)による DSBs 導入を行い、高頻度の HR を誘導する GT 法の開発に向けた基礎的研究を行った。メラニン生合成遺伝子の 1 つである *Scytalone dehydratase (SDH)* を標的遺伝子とした 2 種類の ZFNs をデザイン後、各 GT 個体の作出効率を評価した。使用した ZFNs は *SDH* 遺伝子の開始コドンから 163 bp または 412 bp より 18 bp 長を認識するように設計し、1 組の ZFN はセルフプロセシング能を有する 2A 配列を介して融合発現するように構築した。本菌プロトプラストに対し破壊用ベクターのみを導入した場合、GT 個体の作出効率は 5%未満であるのに対し、ZFNs と破壊用ベクターを共導入した場合にはその作出効率は約 10 倍に向上した。現在、高効率の HR に必要となる相同配列長の検証を行い、DSBs と HR の関係性の調査を行っている。

DNA double-strand breaks mediated targeted gene replacement in the rice blast fungus

Tetsuya Younomaru¹, Takayuki Arazoe¹, Shuichi Ohsato¹, Tsutomu Arie², Shigeru Kuwata¹

(¹Sch. Agric., Meiji Univ., ²Grad. Sch. Agric. Sci., Tokyo Univ. of Agric. & Tech.)

P-86

真菌を用いた Roxithromycin の新規作用点の探索

熊坂茉佑、石井晶、紙透伸治、倉持幸司、菅原二三男、奈良(成川)恵、鎌倉高志(東理大院理工・応生科)

イネいもち病菌(*Magnaporthe oryzae*)はイネに感染して病害を引き起こす植物病原糸状菌である。本菌は宿主植物内への侵入において感染特異的な器官である付着器を形成する。本菌の付着器形成は、真核生物の細胞分化の最も単純な機構の一つであり、細胞分化には多くの遺伝子が関与するため各種の細胞内因子を阻害する化合物に対して鋭敏に反応する。本研究はこの付着器を用いて各種化合物の新規作用を探索し、その作用機作を解明することを目的としている。

本菌に様々な化合物を作用させたところ、14員環マクロライド系抗生物質である Roxithromycin(RXM)が、発芽管伸長を阻害せずに付着器形成を特異的に阻害する作用を示した。RXM は原核生物のタンパク質合成を阻害するが、真核生物である本菌に効果を示し、またヒトにおける RXM の効果でも作用点が明確になっていないものが報告されていることから、本菌に対する RXM の新規作用点の存在が示唆された。

そこで、T7ファージディスプレイ法による RXM の分子標的の探索を行い、CDC27 と相同性が高い遺伝子に着目し解析を行った。その結果、この遺伝子が本菌において付着器形成時特異的に発現しており、この遺伝子の発現量が低下した株では RXM の感受性が低下していた。また、この遺伝子の過剰発現株では、野生株と比較して RXM の感受性の変化は見られなかったが、高濃度条件下では発芽と発芽管伸長阻害が緩和された。この研究を通して、RXM の作用機作を解明し、本菌を含む抗菌剤の標的としての応用や RXM のヒトへの副作用点の解明に繋げられるよう、さらなる解析を進めていく。

A Possible alternative Target of Roxithromycin in Fungi

Mayu Kumasaka, Akira Ishii, Shinji Kamisuki, Kouji Kuramochi, Fumio Sugawara, Megumi Narukawa-Nara,

Takashi Kamakura

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

P-87

トウモロコシごま葉枯病菌における cAMP シグナル伝達経路関連遺伝子の機能解析

湯谷智, 住田卓也, 北出雄生, 泉津弘佑, 田中千尋 (京大・院・農)

cAMP シグナル伝達経路は数あるシグナル伝達経路の中でも最も重要な経路の一つであり、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であるトウモロコシごま葉枯病菌(*Cochliobolus heterostrophus*)では当経路を構成する因子の情報が得られていなかった。我々はこれまでに、当経路を構成する要素である二種のタンパクキナーゼ A(PKA)が本菌の基本的生育に必須の役割を重複して担うこと、PKA 制御サブユニット(PKR)を破壊することで菌糸生育が阻害されることを明らかにし、cAMP シグナル伝達経路が菌の生育を制御することを報告している。しかし、本経路の上流部に存在するアデニルサイクラーゼ関連因子については未解明のままである。特に、アデニルサイクラーゼに対する結合部位を持つサイクラーゼ関連タンパク(Cyclase associated protein: CAP)については他の病原糸状菌においてもその知見は少ない。そこで、我々は本菌の CAP 遺伝子(CAP1)の破壊株を新たに作出し、これまで報告している結果と併せて、cAMP シグナル伝達経路の詳細な役割を明らかにすることを目指した。

CAP1 欠損株の表現型についての調査を行った。CAP1 欠損株では非常に強いメラニン化が起きた他、菌糸形態に異常がみられ、菌糸生育の速度が劇的に遅くなった。また、付着器形成能を調査したところ、付着器の形成は確認できなかった。さらに、交配試験の結果、子嚢胞子を形成したものの、偽子嚢殻の形成数が減少した。現在、CAP1 欠損株の胞子発芽能試験や病原性試験などを実施しており、それらの結果についても議論したい。さらに、これまで得られている PKA1 及び PKA2、PKR、二種のホスホジエステラーゼ(PDEL 及び PDEH)の機能解析の結果を併せ、cAMP シグナル伝達経路の本菌生活史における役割について考察したい。

Characterizations of cAMP signaling pathway associated genes of *Cochliobolus heterostrophus*

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

(Grad. School of Agriculture, Kyoto Univ.)

P-88

Aspergillus fumigatus の病原性に関わる因子の機能解析

酒井香奈江, 大荒田素子, 五ノ井透 (千葉大・真菌センター)

アスペルギルス症は、アスペルギルス属菌によって引き起こされる様々な疾病の総称である。特に免疫機能の低下したヒトに感染すると重篤になりやすく、治療が遅れた場合の致死率は高い。近年の医療技術の高度化に伴い、免疫機能の低下した患者が増えていることを背景にアスペルギルス症の患者も増えてきている。主な原因菌として知られているのが *A. fumigatus* であり、抗生物質による治療が行われている。しかし、抗生物質に耐性を持つ *A. fumigatus* の出現が報告されており、新たな治療薬が求められている。

これまでに宿主であるヒトや動物モデルにおいて、病原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。一方で、真菌側のレセプターが感染・病原性発現においてどのような働きをしているのかほとんど明らかになっていない。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でアスペルギルス症の感染・発症メカニズムについて新たな知見を得ることにした。

A. fumigatus のゲノム配列から、レクチンと考えられる配列をいくつか選び破壊株を作製した。マウス感染モデルを用いて破壊株の病原性を確認したところ、マウスの生存率が顕著に悪くなる破壊株を見出した。解析を進めたところ、野生型株と比べて破壊株を投与したマウスでは、dectin1 や TLR4 といった感染防御に関与する遺伝子発現の増加が少ないことが分かった。現在、遺伝子発現増加が少なくなった原因についてさらに調べているところである。

Functional analysis of pathogen related factor in *Aspergillus fumigatus*.

Kanae Sakai, Motoko Oarada, Tohru Gono

(MMRC, Univ. of Chiba)

P-89

病原真菌 *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¹, 高橋梓², 森山裕充³, 五ノ井透²

(¹千葉大学・医学薬学府, ²千葉大・真菌センター, ³農工大)

Aspergillus fumigatus は、アスペルギルス症の主な起因菌であり、分生子を吸入することにより感染する。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。そこで我々は *A. fumigatus* を弱毒化するマイコウイルスを探索し、抗真菌薬としての応用を目指している。

ヒト病原真菌におけるマイコウイルスの報告はごく少なく、これまでに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、ウイルスゲノムである 2 本鎖 RNA を精製する手法により、4 株のマイコウイルス保有株を検出した。得られたウイルスについて次世代シーケンサー(illumina 社 Miseq)を用いて解析したところ、それらは、1. partitivirus, 2. chrysovirus と配列未決定種の 2 重感染, 3. 配列未決定種, 4. 新種 であることが明らかとなった。

次に、単孢子分離法によりウイルスフリー株を取得した。得られたウイルスフリー株とウイルス保有株において性状を比較した。その結果ウイルス保有株では、分生子形成能や菌糸伸長能等の低下が観察された。さらに、両株をマウスに経気道感染させ、生存率を比較したところ、ウイルス保有株はウイルスフリー株に比べ、病原性が低下していた。これらの結果から、本研究で発見したマイコウイルスが宿主 *A. fumigatus* の病原性を抑制していることが示唆された。

Isolation and characterization of four types of Mycoviruses in opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus*

Misa Yahara¹, Azusa Takahashi-Nakaguchi², Hiromitsu Moriyama³, Tohru Gono²

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

P-90

いもち病菌のヘテロ 3 量体 G タンパク質 γ サブユニットの解析

風間静花^{1,2}, 川崎寿¹, 西村麻里江² (¹電大院・物質工学, ²生物研)

真核生物において α , β , γ サブユニットからなるヘテロ三量体 G タンパク質は膜レセプターが認識した環境シグナルを細胞内に伝達する役割を持つ。環境シグナルを受け取ると $G\alpha$ と $G\beta\gamma$ がかい離し、それぞれが細胞内にシグナルを伝達するが、ここで $G\gamma$ は $G\beta$ を細胞膜につなぎとめる機能を持つ。これまでの研究から、いもち病菌ではヘテロ三量体 G タンパク質シグナルは細胞内 cAMP 濃度の調節により感染器官(付着器)の形成誘導などを制御していることが知られている。本研究は、 $G\gamma$ 遺伝子破壊株 ($\Delta G\gamma$) と $G\beta$ 遺伝子破壊株 ($\Delta G\beta$, Nishimura et al., 2003) の形質を比較することにより、 $G\beta\gamma$ シグナルにより制御される形質や遺伝子発現を明らかにすることを目的として行った。

GFP 融合 $G\beta$ (GFP: $G\beta$) を発現するコンストラクトを作製して発芽時のいもち病菌細胞内での局在を観察したところ、GFP: $G\beta$ は野生型株では細胞質、隔壁および細胞の輪郭で観察されたが、 $\Delta G\gamma$ では細胞質でのみ観察された。このことから、いもち病菌においても $G\gamma$ が $G\beta$ の膜への局在に必要であることが推測された。付着器形成率は $\Delta G\gamma$, $\Delta G\beta$ 共に 0 に近い値となったが、cAMP を添加した場合は、50%近くまで上昇した。しかし、植物ワックスを添加しても付着器形成率は上がらなかった。オートミール寒天培地上では $\Delta G\beta$ は菌糸生育が遅れるが、 $\Delta G\gamma$ では野生型株との差が見られなかった。また $\Delta G\gamma$ の孢子形成量が野生型株に比べてやや減少したのに対し、 $\Delta G\beta$ では野生型株の 10%以下にまで大きく低下した。しかし、発芽管先端での付着器形成の欠損とイネに対する病原性の欠損という形質は $\Delta G\gamma$, $\Delta G\beta$ で共通して観察された。これらの結果から、 $\Delta G\gamma$ の形質は必ずしも $\Delta G\beta$ と一致しないものの、少なくとも $G\beta\gamma$ シグナルが付着器形成と感染に必要なことが確認された。現在、マイクロアレイを用いて $G\beta\gamma$ シグナルにより特異的に制御される遺伝子の探索を行っており、上記内容とあわせて発表する予定である。

Analyses on a heterotrimeric G-protein γ subunit in *Magnaporthe oryzae*

Shizuka Kazama^{1,2}, Hisashi Kawasaki¹, Marie Nishimura²

(¹Tokyo Denki Univ., ²NIAS)

P-91

トウモロコシごま葉枯病菌の *ChSte20* および *ChCla4* 遺伝子の機能解析

北出雄生¹, 泉津弘佑², 住田卓也¹, 湯谷智¹, 田中千尋¹ (¹京大・院・農, ²滋賀県大・環境科学)

トウモロコシごま葉枯病菌はトウモロコシ生産に甚大な被害をもたらす植物病原糸状菌である。本菌の感染過程は、宿主植物の認識、感染特異的器官である付着器の形成、付着器による植物表皮細胞への穿入、宿主内での感染菌糸の伸長からなり、各過程は様々なシグナル伝達経路によって制御されていることが近年の研究で明らかにされてきている。今回、我々は付着器の形成および感染菌糸の伸長を制御するとされる Chk1 MAP キナーゼ経路に注目した。本経路は、感染過程のほかにも有性・無性生殖などを含む、多様な形態形成を制御することが知られているが、本経路の上流に存在する制御因子については研究があまりすすめられていない。本研究では、Chk1 MAP キナーゼ経路の活性化に関わると推測される2つの PAK-like キナーゼをコードする遺伝子、それぞれ出芽酵母の *Ste20* および *Cla4* のオルソログである、*ChSte20* および *ChCla4* 遺伝子を同定し、機能解析した。*ChSte20* 遺伝子欠損株は野生株と同様の菌糸成長パターンを示したが、*ChCla4* 遺伝子欠損株は頻繁に分枝する特有の成長パターンを示した。また、分生子の形成について、*ChSte20* 欠損株では野生株と同様であったが、*ChCla4* 欠損株では形態異常の分生子が形成された。*ChSte20* 欠損株は感染過程において野生株と顕著な差は見られなかった一方、*ChCla4* 欠損株では付着器の形成において著しい低下が認められ、感染能力を失っていた。有性生殖については、両遺伝子欠損株で偽子囊殻の発達の遅延が認められ、*ChSte20* 欠損株では子囊および子囊胞子が形成された一方、*ChCla4* 欠損株ではほとんど形成されず雌性不稔であった。これらの結果から、2つの PAK-like キナーゼにおいて機能分化が認められた。すなわち、主に *ChCla4* が無性・有性世代の様々な形態形成段階において重要な役割を持つ一方、*ChSte20* については有性生殖の制御に関与するが、必ずしも必須ではないことが明らかとなった。

Characterization of *ChSte20* and *ChCla4* genes in *Cochliobolus heterostrophus*

Yuki Kitade¹, Kosuke Izumitsu², Takuya Sumita¹, Satoshi Yutani¹, Chihiro Tanaka¹

(¹Grad. Sch. of Agriculture, Kyoto Univ., ²Sch. of Environmental Science, Univ. of Shiga Pref.)

P-92

ウリ類炭疽病菌における Ras GTPase 活性化タンパク質 *CoIra1* は *CoRas2* を介して cAMP シグナル伝達経路と *CoMekk1-Cmk1* MAPK 経路の上流制御因子として関与する

原田 賢, 久保康之 (京府大院・生環)

我々はウリ類炭疽病菌における感染器官の形態形成や病原性に関与する Ras GTPase 活性化タンパク質をコードする *CoIRA1* を同定している。本研究では *CoIra1* により制御されるシグナル伝達経路を解析した。まず、出芽酵母の *Ira1/2* は *Ras1/2* を介して細胞内 cAMP 量を制御することから、 $\Delta coira1$ 株の細胞内 cAMP 量を測定した。その結果、 $\Delta coira1$ 株の cAMP 量は野生株より増加し、*CoIra1* は細胞内 cAMP 量を制御することが示唆された。次に *CoIRA1* と *CoRAS2* の関係を明らかにする為に $\Delta coras2$ 株を作成し、表現型を検討した。その結果、 $\Delta coras2$ 株は発芽欠損を示し、*CoRAS2* は胞子発芽に関与することが示唆された。次に、*CoRas2* と恒常活性型 *CoRAS2* に RFP タグした菌株を作成し、*CoRas2* の局在を比較した。その結果、野生株菌糸において *CoRas2* は細胞膜や細胞質に局在したが、恒常活性型 *CoRAS2* は細胞膜に顕著な局在を示した。また、 $\Delta coira1$ 株では *CoRas2* は細胞膜に顕著な局在を示した。このことから、*CoIra1* は *CoRas2* に負の制御をする可能性が示唆された。さらに、*CoRas2* が *CoMekk1-Cmk1* MAPK 経路に関与するか恒常活性型の *CoRAS2* と *CoMEKK1* 導入株の表現型により検討した。その結果、 $\Delta coras2$ 株への恒常活性型 *CoMEKK1* 導入菌株は胞子発芽し、一方、 $\Delta comekk1$ 株への恒常活性型 *CoRAS2* 導入菌株は胞子発芽の欠損を示すことから、*CoRas2* は *CoMekk1-Cmk1* 経路の上流因子であると示唆された。以上から、*CoIra1* は *CoRas2* を介して cAMP シグナル伝達経路と *CoMekk1-Cmk1* MAPK 経路に関与することが示唆された。

Ras GTPase activating protein *CoIRA1* is involved in cAMP signaling transduction pathway and *CoMekk1-Cmk1* MAPK pathway as an upstream regulatory factor in *Colletotrichum orbiculare*.

Ken Harata Yasuyuki Kubo

(Life and Environmental Science, Univ. of Kyoto Prefectural)

P-93

イネいもち病菌マイコウイルス MoCV1 と MoCV1-B のゲノム構造の比較

高井遼子, 浦山俊一, 迫田紘史, 加藤優, 木村優里, 福原敏行, 有江力, 寺岡徹, 森山裕充

(農工大院・農)

Magnaporthe oryzae chrysovirus 1 (MoCV1) は 5 本の dsRNA ゲノムを有するマイコウイルスで、宿主のイネいもち病菌に生育阻害および病原力の低下を引き起こす。この MoCV1 と相同性を持つ *Magnaporthe oryzae* chrysovirus 1-B (MoCV1-B) が感染したイネいもち病菌株は、MoCV1 感染株に比べてさらに生育が劣る。これらのウイルスは長期培養によって細胞外に存在し得ることを特徴とし、その際ウイルス構造タンパク質の ORF3(dsRNA3 がコード)と ORF4(dsRNA4 がコード)がそれぞれ 83kDa, 85kDa から 58kDa, 70kDa などに特異的に部分分解される。この分解機構の解明を目的として、MoCV1 と MoCV1-B のゲノム構造及びコードされるタンパク質について比較検討を行った。MoCV1 と MoCV1-B の各ゲノム構造の核酸相同性は、dsRNA1(79.6%), dsRNA2(76.3%), dsRNA3(71.3%), dsRNA4(72.4%), dsRNA5(96.2%), 全体のタンパク質の同一性は、ORF1(92.5%), ORF2(80.1%), ORF3(87.8%), ORF4(89.4%), ORF5(97.1%)であった。この内 ORF2 の N 末端(約 200aa)は 51.1%, ORF3 の C 末端(約 200aa)は 34.1%と低い同一性を示し、この C 末端は部分分解によって除去される領域と一致した。ORF1, ORF4 においては同一性の偏りは見られなかった。大腸菌や酵母を用いた ORF3, ORF4 の異種タンパク質発現系では分解されたタンパク質は検出されず、全長のタンパク質のみが検出されることから、観察されたプロセッシングはいもち病菌の細胞内で特異的に生じている可能性が示唆された。

Comparison of genome structures between *Magnaporthe oryzae* chrysovirus 1 and *Magnaporthe oryzae* chrysovirus 1-B

Ryoko Takai, Syun-ichi Urayama, Hirofumi Sakoda, Yu Katoh, Yuri Kimura, Toshiyuki Fukuhara, Tsutomu Arie, Tohru Teraoka, Hiromitsu Moriyama (Faculty of Agriculture, Tokyo Univ. of Agri. & Tech)

P-94

植物病原性 *Alternaria alternata* における global regulator *LaeA* の機能解析

高尾和実¹, 赤木靖典¹, 播本佳明², 石原亨¹, 柘植尚志², 難波栄二³, 児玉基一朗¹ (¹鳥取大・²名大院生農・³鳥大医)

methyltransferase をコードする *LaeA* 遺伝子は *Aspergillus nidulans* において見出され、global regulator として複数の二次代謝産物をエピジェネティックに制御していると考えられている。トマトアルターナリア茎枯病菌 (*Alternaria alternata* tomato pathotype, 茎枯病菌) の全ゲノムドラフトシーケンス情報より、*LaeA* ホモログである *AaLAEa* を同定した。また、イチゴ黒斑病菌 (*A. alternata* strawberry pathotype) およびリンゴ斑点落葉病菌 (*A. alternata* apple pathotype) においても、同様に *LaeA* ホモログを同定した。本遺伝子ノックアウト (KO) 株を、それぞれの *A. alternata* 野生株と比較した結果、3 病原型全てにおいて菌糸成長およびコロニー形態に差異が認められた。さらに、これら KO 株の毒素生産能 および病原性は、野生株と比較して著しく低下していた。以上の結果より、*LaeA* は宿主特異的毒素依存病原菌において、形態形成、毒素生産および病原性を広範に制御していることが示唆された。

Functional analysis of the global regulator *LaeA* homologues in the plant pathogenic *Alternaria alternata*

Kazumi Takao¹, Yasunori Akagi¹, Yoshiaki Harimoto², Toru Ishihara¹, Takashi Tsuge², Eiji Nanba³, Motoichiro Kodama¹

(¹Fac. Agric., ²Fac. Medicine, Tottori Univ., ³Grad. Sch. Bioagric. Sci., Nagoya Univ.)

P-95

灰色かび病菌のオートファジー関連遺伝子 *BcAtg1* の機能解析

住田卓也¹, 泉津弘佑², 田中千尋¹ (¹京大・院・農, ²滋賀県大・環境科学)

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、糸状菌類においては胞子形成や、気中菌糸形成に関与することが報告されている。また近年、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においても注目を集めている。灰色かび病菌 *Botrytis cinerea* は多犯性の重要植物病原性糸状菌であり、同菌の主要な感染源となる大型分生子と、有性生殖における雄性器官としての機能をもつ小型分生子の二種類の分生胞子を形成する。今回我々は、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* においてオートファジーの開始に必要であるとされるセリン/スレオニンキナーゼをコードする遺伝子 *Atg1* の灰色かび病菌におけるオルソログ遺伝子 *BcAtg1* を同定し、その遺伝子破壊株を作出した。*BcAtg1* 破壊株は野生型株と比べ平板培地上での気中菌糸形成が低下し、菌叢上に形成された大型分生子柄は著しく貧弱な様相を呈した。分生胞子の形成数を調査したところ、*BcAtg1* 破壊株においては大型分生子の形成数が劇的に低下していること、さらに小型分生子の形成数も有意に低下していることが明らかとなった。大型分生子柄の形成頻度において *BcAtg1* 破壊株と野生型株の間に顕著な差異は認められなかったため、*BcAtg1* 破壊株における大型分生子形成数の劇的な低下の主な要因は、大型分生子柄の発達が著しく損なわれることによると考えられる。現在、*BcAtg1* 破壊株の宿主への病原性に関する各種試験を行っており、本発表においてはこれらの結果についても報告する。

Characterization of the autophagy-related gene *BcAtg1* in *Botrytis cinerea*

Takuya Sumita¹, Kosuke Izumitsu², Chihiro Tanaka¹

(¹Grad. Sch. of Agriculture, Kyoto Univ., ²Sch. of Environmental Science, Univ. of Shiga Pref.)

P-96 (O-5)

ウリ類炭疽病菌における出芽酵母 RAM ネットワーク構成因子 *CoPag1* は植物特異的シグナル受容を介した付着器形成に関与する

小玉紗代, 坂口 歩, 久保康之 (京都府大院・生環)

多くの植物病原糸状菌において付着器形成は病原性発現に必須であり、植物表面の物質や物理的形状のシグナルを感知して行われる。我々はこれまでに植物病原糸状菌ウリ類炭疽病菌において *CoKEL2* が付着器の形態形成および細胞極性制御に関与することを明らかにしている。また、*cokel2Δ* は人工基質上で異常形態付着器を形成するが宿主葉上では正常付着器を形成することから、付着器形成に関与する植物特異的シグナル受容経路の存在を示唆してきた。本研究では植物特異的シグナル受容経路に関与する遺伝子を同定するために、ランダム遺伝子挿入により取得した形態形成・病原性欠損 *CoKEL2* 二重変異株 6 菌株についてゲノムシーケンス解析を行い変異遺伝子の同定を試みた。その結果、変異遺伝子として出芽酵母の形態形成に関与する RAM (regulation of *Ace2p* activity and cellular morphogenesis) ネットワークの構成因子 *Pag1* (*Tao3*) と相同性をもつ *CoPAG1* を同定した。*copag1Δcokel2Δ* を作出したところ、人工基質上だけでなく宿主葉上においても異常形態付着器を形成し、病原性欠損が見られた。この結果から *CoPAG1* が付着器形成に関与する植物特異的シグナル受容経路の構成因子である可能性が示唆された。次に *CoPag1::RFP* の細胞内局在を観察した結果、スライドガラス上では胞子および付着器の細胞質に蛍光が見られ、発芽管には観察されなかった。一方、宿主葉上では胞子、発芽管、未成熟付着器の輪郭を示すように蛍光が観察され、*CoPag1::RFP* は宿主葉上における付着器の形態分化時にのみ細胞膜周辺に局在する可能性が示唆された。

Colletotrichum orbiculare *CoPag1*, a component of RAM network in *Saccharomyces cerevisiae*, is involved in appressorium development triggered by plant-derived signals

Sayo Kodama, Ayumu Sakaguchi, Yasuyuki Kubo

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

P-97

トマトアルターナリア茎枯病菌が保有する病原性染色体の構造解析

赤木靖典¹, 多賀正節², 柘植尚志³, 難波栄二⁴, 児玉基一朗¹

(¹鳥取大農・²岡山大理・³名大院生農・⁴鳥取医)

トマトアルターナリア茎枯病菌 (*Alternaria alternata* tomato pathotype) は、宿主特異的 AAL 毒素を生産することにより、特定のトマト品種にのみ著しい壊死病斑を引き起こす。本毒素は、構造的に *Giberella* 種の生産するマイコトキシン フモニシンと類似しており、それぞれの生合成に関与する遺伝子群 (AAL 毒素: *ALT* クラスター, フモニシン: *FUM* クラスター) も類似している。本菌におけるゲノムシーケンス解析および遺伝子機能解析により、*ALT* クラスター遺伝子のほとんどが AAL 毒素生合成に関与していることが明らかとなっている。*ALT* クラスターは、本菌が特異的に保有する 1 Mb conditionally dispensable chromosome (CDC) に座乗しており、CDC の有無により本菌の病原性が決定されるため、本 CDC は“病原性染色体”であるとみなされる。CDC のシーケンス解析, optical mapping および rare cutting enzyme (*NotI*) による RFLP 解析により、本染色体が同腕染色体 (isochromosome) 構造を有する可能性が示唆された。さらに、CDC 上のセントロメアおよびテロメア近傍領域をプローブとして行った間期核における FISH 解析も、本 CDC が左右対称構造を有する可能性を支持した。以上の結果から、本菌が保有する病原性染色体は同腕染色体であることが明確となった。

Structural analysis of a pathogenicity chromosome in *Alternaria alternata* tomato pathotype.

Yasunori Akagi¹, Masatoki Taga², Takashi Tsuge³, Eiji Nanba⁴, Motoichiro Kodama¹

(¹Fac. Agric., ⁴Fac. Medicine, Tottori Univ., ²Fac. Sci., Okayama Univ., ³Grad. Sch. Bioagric. Sci., Nagoya Univ.)

P-98

セプチン動態を制御する出芽酵母の *RTS1* のホモログ *CoRTS1* はウリ類炭疽病菌において適切な胞子形成、付着器形態形成に必要である

川端 昂, 深田史美, 坂口 歩, 久保康之 (京府大院・生環)

これまでウリ類炭疽病菌において、出芽酵母の spindle position checkpoint (SPOC) 構成要素の1つである *BUB2* のホモログ *CoBUB2* が、出芽酵母とは異なり細胞周期の G1 / S 期進行に関与することを報告している。今回、*Bub2* の活性化に関わる上流因子 *RTS1* のホモログ *CoRTS1* に着目した。出芽酵母において *Rts1* は SPOC 機能の他、細胞質分裂時のセプチン解離を促進する機能を持ち、*rts1* 変異株はセプチンが適切に解離せず母細胞と娘細胞が繋がった状態を保つ。植物病原糸状菌において *RTS1* の詳細な機能解析は行われていない。ウリ類炭疽病菌の *corts1* 破壊株は培地上における生育速度、胞子形成量が顕著に減少し、宿主内伸展能の低下を示した。また、菌糸の隔壁間隔は狭くなり、菌糸先端で離脱せず繋がった胞子が高頻度にみられた。一方、離脱した胞子の大部分は野生株と同様の形状を示したが、一部に細胞質分裂が未完了の繋がった胞子が存在した。さらに *corts1* 破壊株に *CoRTS1::GFP* 融合遺伝子を導入したところ、変異形質の相補が確認され、菌糸隔壁において *CoRts1* の局在がみられた。*CoRTS1* の推定局在機能部位を破壊し *corts1* 部分相補株を作出したところ、培地上における生育速度、胞子形成量が相補される一方で、胞子は異常形態付着器を形成した。これらの結果から *CoRTS1* はウリ類炭疽病菌において細胞質分裂に関与し適切な胞子形成に必要であり、推定局在機能部位が付着器形態形成に重要であることが示唆された。

CoRTS1, the homolog of *Saccharomyces cerevisiae* *RTS1* regulating septin dynamics, is required for proper conidiation and appressorium formation in *Colletotrichum orbiculare*.

Kou Kawabata, Fumi Fukada, Ayumu Sakaguchi, Yasuyuki Kubo

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

P-99

ミトコンドリア局在型の *Enoyl-CoA hydratase* はウリ類炭疽病菌の病原性発現に必須である

泉津弘佑, 多々良康香, 小松香織, 横山綾, 谷口拓矢, 丸山麻美, 入江俊一, 鈴木一実 (滋賀県大・環)

脂肪酸の β 酸化反応は、一般的にミトコンドリアおよびペルオキシソームという異なる細胞内小器官で行われることが知られている。我々は、ATMT法を用いたランダム突然変異株の解析から、ウリ類炭疽病菌 (*Colletotrichum orbiculare*) の病原性欠損変異株 Path-1 株を単離した。TAIL PCR 法により、Path-1 株においては脂肪酸 β 酸化反応の中心的な役割を担う *enoyl-CoA hydratase* をコードする遺伝子が破壊されていることを見出し、この遺伝子を *CoEch1* と名付けた。*CoEch1* の配列からはミトコンドリア局在シグナルが見出された。我々は相同性組替えにより、改めて *CoEch1* の完全な破壊株を作出し、その機能を解析した。*CoEch1* 破壊株は、通常の PDA 培地においては野生株と生育の大きな差は認められなかったが、オレイン酸などの脂肪酸を唯一の炭素源とした培地においては生育が著しく制限された。*CoEch1* 破壊株は、野生株と比較してやや小型でメラニン着色の弱い付着器を形成し、宿主であるキュウリ葉への病原性は欠損していた。次に、*CoEch1* 破壊株に *CoEch1-GFP* 融合遺伝子を再導入した相補株を用いて、細胞内局在を調査した。*CoEch1-GFP* の局在はミトコンドリアの特異的染色剤である Mitotracker の局在パターンと一致していた。これまで植物病原菌類ではペルオキシソームにおける脂肪酸の β 酸化反応が病原性に重要であるという報告がなされてきたが、今回の結果から、ミトコンドリアおよびペルオキシソームの双方における β 酸化反応が植物への病原性発現に重要であることが強く示唆される。

Enoyl-CoA hydratase CoEch1* is essential for pathogenicity of *Colletotrichum orbiculare

Kosuke Izumitsu, Yasuka Tataru, Kaori Komatsu, Aya Yokoyama, Takuya Taniguchi, Mami Maruyama, Toshikazu Irie, Kazumi Suzuki (Sch. of Environmental Science, Univ. of Shiga Pref.)

P-100

ウリ類炭疽病菌の推定細胞極性因子 *CoTEA4* および *CoMOD5* の機能解析

河下美都里, 坂口 歩, 久保康之, 辻 元人 (京府大院生環)

ウリ類炭疽病菌における付着器形成の制御には、人工基質上における非生物的因子を介した経路および宿主植物に由来する生物的因子の受容を介した経路の2つの独立した経路の関与が示唆されている。分裂酵母 *TEA1* ホモログ *CoKEL2* は前者に特異的に関与している。分裂酵母において *Tea1* は足場タンパク質として細胞端に局在し、種々のタンパク質と複合体を形成することにより極性成長を制御することが明らかになっている。今回、*Tea1* 複合体構成因子として *Tea4* および *Mod5* に着目し、本菌におけるそのホモログ遺伝子 *CoTEA4* および *CoMOD5* について機能解析を行った。*cotea4* 破壊株は人工基質上で側部発芽する異常付着器を形成したが、宿主植物上では正常付着器を形成した。一方、*comod5* 破壊株は *cotea4* 破壊株や *cokel2* 破壊株と同様にコロニー生育にやや遅延が認められたものの、付着器形成に異常は認められなかった。以上より、*CoTEA4* は非生物的因子の受容を介した付着器形成の制御に関与していることが示唆された。

Functional analysis of putative cell polarity factors, *CoTEA4* and *CoMOD5*, from *Colletotrichum orbiculare*

Midori Kawashimo, Ayumu Sakaguchi, Yasuyuki Kubo, Gento Tsuji

(Grad.sch.of Life and Environ. Sci.of Kyoto Prefectural Univ.)

P-101

糸状菌メロテルペノイド terretonin の生合成に関わる修飾酵素群の機能解析

岩瀬大輝, 松田侑大, 淡川孝義, 阿部郁朗 (東大院・薬)

Aspergillus terreus の生産する terretonin はポリケタイドと farnesyl 基由来のテルペノイドからなる特異なハイブリッド型化合物 (メロテルペノイド) である。糸状菌由来メロテルペノイドには様々な生物活性を示すものが知られており, これらはしばしば生合成過程でその構造多様性や生物活性に寄与する種々の修飾反応を受ける。すでに, terretonin の生合成経路については当研究室や他グループの研究によってその大部分が明らかにされているが, terretonin 生合成における特徴的な D 環の環拡大反応については, そのメカニズムが推定されているものの, 反応に関与する酵素や反応機構はいまだ未解明である。我々は, terretonin 生合成を異種糸状菌 *Aspergillus oryzae* にて再構築することにより, 本環拡大反応のメカニズムならびに terretonin 生合成の全容解明を目指した。

遺伝子破壊実験により terretonin 生合成への関与が判明している酵素群のうち, Trt9 (short chain dehydrogenase) および Trt3 (FAD-dependent monooxygenase) の発現系を構築した後, 5つの酵素群によって生合成される中間体 preterretonin A を投与した。その結果, 生成が期待された生合成中間体 preterrenoid および terrenoid と推定される化合物を検出した。現在, これら化合物の構造決定を行うとともに, 他の生合成関連酵素 Trt6 (P450), Trt7 (non-heme iron-dependent dioxygenase), Trt14 (hypothetical protein) を含む発現系を構築し, 各酵素の機能解析を進めている。

Functional analysis of the tailoring enzymes involved in the biosynthesis of a fungal meroterpenoid terretonin

Taiki Iwabuchi, Yudai Matsuda, Takayoshi Awakawa, Ikuro Abe

(Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Univ. of Tokyo)

発表者索引

----- B -----	阿尻雅文	41	江原直樹	32, 40	河下美都里	88
Ba Van Vu	阿部敬悦	39, 41, 44, 46,	----- お -----		川瀬智美	73
Bernard Henrissat		47, 61, 67	及川英秋	47	川畑絢平	29, 56
----- C -----	阿部郁朗	74, 77, 78a, 78b,	老沼研一	49	川端昂	87
Chi-Yip Ho		89	大荒田素子	82	川村彩乃	74
----- D -----	阿保春花	62	大口ひかる	57	川本進	38
Dan Cullen	天野仁	65	大里修一	81	----- き -----	
David Hibett	天野良彦	32, 66	大隅正子	33, 60	菊川寛史	46
Dung Huy Hoang	有田稔彦	61	太田一良	63	菊間隆志	49, 51, 55,
----- E -----	荒添貴之	81	大田民	35		58
Elisabeth Tillier	有江力	81, 85	大場歩	38	木田千晶	29, 55
Emma Master	淡川孝義	75, 77, 78a, 78b,	大箸信一	52, 59	北川治恵	52
----- F -----		89	大橋信太郎	45	北出雄生	42, 82, 84
Feng Jie JIN	安善榮	34	大森俊郎	68	北本勝心	29, 43, 45,
----- G -----	安藤晃規	46	岡拓二	64		48, 49, 50, 51a, 51b, 55,
Gerhard H. Braus	----- い -----		小笠原渉	31, 33, 60, 70		56, 57, 58, 80
----- J -----	五十嵐圭日子	14, 40, 41,	岡田健	41	木戸彩子	36
Jae-Hyuk JANG		68	岡田元	18	鬼頭良幸	75
Jill Gaskel	池田健一	29, 37, 55	岡本綾子	62, 63	木下浩	27
Jong Seog AHN	石井晶	81	小川順	46	木村真	70, 73a, 73b,
Jun-Pil JANG	石井智子	48	荻野千秋	43		74, 75
----- K -----	石田博樹	65	奥田徹	21	木村優里	85
Kenneth Bruno	泉津弘佑	42, 71, 82, 84,	小口晃央	34	金鋒杰	51, 67
Kieu Pham Thi Minh		86, 88	小黒健太	64	----- く -----	
Kin Chan	石井恵子	41	長田裕之	76a, 76b, 79a,	郭博洋	32, 66
----- N -----	石内勘一郎	30		79b	日下秀行	31, 70
Nuo Li	石川雄一朗	66	尾関健二	52, 59	楠本憲一	57, 65
----- O -----	石田千絵	56	織田健	35, 44	國武絵美	71, 73, 74
Özgür Bayram	石川香南	73	落合美佐	46	久原哲	68
Özlem Sarikaya Bayram	石原亨	85	----- か -----		久保康之	31, 84, 86,
----- P -----	磯貝泰弘	33, 62	各務清美	43		87, 88
Pei HAN	市川夏子	34	風間静花	83	熊坂茉佑	81
Philip Wong	市川雛代	75	梶原康博	68	倉橋敦	36
----- Q -----	一瀬桜子	69	加瀬明日香	45	倉持幸司	81
Quoc Bao Nguyen	市村昌紀	34, 42	片山琢也	53	桑田茂	81
----- R -----	伊藤大修	45	勝田尚樹	67	----- こ -----	
----- S -----	稲葉梓	46, 47	加藤翔	79	小池英明	48
Scott Baker	井上加奈子	29, 55	加藤直樹	79	小出恵美理	59
----- T -----	井上義博	37	加藤雅士	59, 60, 69	高圓宰	80
----- U -----	入江俊一	71, 88	加藤優	85	小島海平	43
----- V -----	入枝泰樹	38	金子明裕	52, 59	小嶋政信	34, 42
----- W -----	岩下和裕	30, 35, 44, 52,	金子優平	69	児玉基一朗	85, 87
----- X -----		77, 80	兼松聡子	29, 55	小玉紗代	31, 86
----- Y -----	岩渕大輝	89	金丸京子	70, 73a, 73b, 74	五反田康孝	30
Yunchen Gong	----- う -----		鎌倉高志	79, 81	後藤智生	47
----- あ -----	上田泰央	44	鎌田竜平	58	後藤奈美	35
青山未来	上野絢子	65	紙透伸治	81	後藤正利	52, 64, 68
赤木靖典	上原健二	67	紙野圭	34	五ノ井透	82, 83
浅井菜々実	宇田川裕晃	43	上村曜介	54	小林大記	64
----- ば -----	梅村舞子	48	河合清	44	小林拓嗣	61
----- び -----	梅山秀明	44	河内護之	30, 77, 79	小林哲夫	69, 70, 73a,
----- ぶ -----	浦山俊一	85	川上和義	41, 47		73b, 74, 75
----- べ -----	上森喬大	29, 55	川口航平	55	小松香織	88
----- ぼ -----	----- え -----		川口剛司	71, 74	小松崎愛里	54
----- ば -----	浴野圭輔	64	川崎寿	83		

五味勝也	32, 37, 38, 40, 47, 54, 69, 72	高見誠一	41	中間聖	45	古川健太郎	38
近藤昭彦	43	高谷直樹	35, 49, 54, 60, 62	中村友紀	68	古川隆紀	31, 70
----- さ -----		田久陽子	63	中村英淳	49	----- ほ -----	
佐伯圭	29, 56	竹内道雄	50, 61, 63, 65a, 65b, 66	中屋敷均	29, 37, 55	保坂健太郎	16
酒井香奈江	82	竹内真理衣	62	中山和毅	33, 62	堀千明	40, 68
坂口歩	31, 86, 87, 88	竹浦賢吾	59	中山真由美	38, 44	堀内裕之	44, 53
阪本鷹行	71	竹川薫	52, 64	奈良(成川) 恵	81	堀川祥生	33, 60
櫻谷英治	46	田崎裕二	64, 67	鳴神寿昭	35	本田与一	36, 71
迫田紘史	85	田代康介	68	難波栄二	85, 87	----- ま -----	
佐々木宏明	47	多田功生	57, 65	----- に -----		丸井淳一郎	65, 69
佐藤真之	36	多々良康香	88	西田洋巳	33, 62	前田一行	75
佐藤大貴	41, 67	田所隆之	58	西堀耕三	36	前田瞳	38
佐野元昭	52, 59	田之倉優	45	西村麻里江	83	前田浩	50, 61, 62, 63, 65, 66
鮫島正浩	40, 68	田中秀逸	58	西村裕志	36	栴尾俊介	35, 60
----- し -----		田中拓未	61	新田美貴子	33, 60	町田雅之	48
志田洋介	31, 33, 60, 70	田中千尋	42, 82, 84, 86	----- の -----		松浦優佳	54
清水公德	38	田中寿基	69	野口博司	30	松下(森田) 真由美	65
清水昌	46	田中瑞己	32, 37, 47, 54, 69, 72	野口佑司	73	松田侑大	77, 78a, 78b, 89
志水元亨	59, 60, 69	田中勇氣	51	野崎功一	32, 66	松村香菜	41
下田隆史	36	田邊弘毅	61	野村義幸	64	丸山潤一	29, 43, 45, 48, 50, 51, 55, 57
下村康一郎	78	谷修治	71, 74	----- は -----		丸山麻美	88
庄司郁央	43	谷口大樹	31, 70	萩原大祐	38, 73	----- み -----	
周勝敏	35	谷口拓矢	88	橋元誠	80	三浦愛	48
新谷尚弘	32, 37, 40, 47, 54, 69, 72	田原伸悟	33, 60	長谷川隆大	36	三浦竜平	34, 42
----- す -----		玉野孝一	48	秦洋二	43	水野正浩	32, 66
末富高志	71	----- ち -----		島山晋	58	水野佑香	56
菅原二三男	81	張斯来	32, 40	羽當加奈子	42	水谷治	32, 40
須田千尋	80	----- つ -----		服部領太	65	三橋隆章	77
杉山淳司	33, 60	塚崎和佳子	50	浜中大夢	52, 59	南篤志	47
鈴木一実	71, 88	柘植尚志	85, 87	早川芙佑華	56	三原聡	34, 42
鈴木空太	72	辻元人	88	原田賢	84	宮川駿人	67
鈴木聡	53, 65	辻井雅	50	播本佳明	85	宮本健太郎	73
鈴木一史	72	對馬裕誠	67	伴暁彦	32, 40, 47	----- ひ -----	
須藤美穂	60	堤浩子	43	----- ひ -----		東田知洋	63
住田卓也	82, 84, 86	----- て -----		一杉昌玄	45	平野濤	60
炭谷順一	71, 74	寺岡徹	85	平野濤	60	平間淳司	36
----- せ -----		寺本寛	42	平本哲也	37, 54	廣瀬雅人	30, 77
関川智洋	34	----- と -----		廣田洋	79	----- ふ -----	
妹尾史子	52	堂前圭佑	45	深田史美	87	福原敏行	85
----- た -----		富樫貴成	41, 61	福本学	41	藤本勲	80
大穀未来	59	徳永奈央	52	藤井博	42	藤井義久	41
多賀正節	87	徳永祥孝	71	藤居瑠彌	47	藤岡智則	44
高井遼子	85	戸田一弥	41	藤木耕平	51	藤森文啓	36
高尾和実	85	豊浦利枝子	80	藤森文啓	36	藤原裕子	41
高下秀春	68	----- な -----		二神泰基	52, 64, 68	二村友史	76
高木忍	43	中川博之	65	二村友史	76	----- や -----	
高橋梓	83	中沢威人	30	山形洋平	50, 61, 62, 63, 65a, 65b, 66, 67	矢野成和	47
高橋俊二	79	中澤奈美	49	山川結	56	八原美沙	83
高橋慎太郎	41	中島春紫	45, 56	山田雅人	33, 62	山田亮祐	43
高橋徹	41, 61, 67	中嶋佑一	75	山本竜也	59	山本真弓	42
高橋宏明	80	永田宏次	45	----- ま -----			
高野義孝	38	中田裕治	39	丸井淳一郎	65, 69		
高島幸司	39			前田一行	75		
				前田瞳	38		
				前田浩	50, 61, 62, 63, 65, 66		
				栴尾俊介	35, 60		
				町田雅之	48		
				松浦優佳	54		
				松下(森田) 真由美	65		
				松田侑大	77, 78a, 78b, 89		
				松村香菜	41		
				丸山潤一	29, 43, 45, 48, 50, 51, 55, 57		
				丸山麻美	88		
				----- み -----			
				三浦愛	48		
				三浦竜平	34, 42		
				水野正浩	32, 66		
				水野佑香	56		
				水谷治	32, 40		
				三橋隆章	77		
				南篤志	47		
				三原聡	34, 42		
				宮川駿人	67		
				宮本健太郎	73		
				----- む -----			
				村垣公英	41, 67		
				----- も -----			
				元松遥	64		
				本山高幸	76a, 76b, 79		
				森一樹	68		
				森千明	59		
				森賢一郎	36		
				森田寛人	50		
				森山裕充	83, 85		
				----- や -----			
				矢野成和	47		
				八原美沙	83		
				山形洋平	50, 61, 62, 63, 65a, 65b, 66, 67		
				山川結	56		
				山田雅人	33, 62		
				山田亮祐	43		
				山本竜也	59		
				山本真弓	42		

楊小龙 74

----- ヲ -----

遊亀翔太 71

湯谷智 82, 84

尹忠鉄 76

----- ヲ -----

用之丸哲也 81

横山綾 88

吉栄俊秀 43

吉田誠 39

吉見啓 39, 44, 46, 47

----- わ -----

若井暁 43

脇本敏幸 74

和田正太郎 68

和田朋子 41

渡邊亜也子 70

渡辺賢二 30

渡邊崇人 36

渡辺隆司 36

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（2013年6月30日まで）

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

糸状菌分子生物学研究会運営委員会名簿（案）（2013年7月1日から*）

会 長

小林 哲夫 名古屋大学大学院 生命農学研究科

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（庶務担当）	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
小笠原 渉	長岡技術科学大学 生物系
加藤 雅士（会計・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
佐野 元昭	金沢工業大学 ゲノム生物工学研究所
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
高谷 直樹	筑波大学 生命環境科学研究科
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
山形 洋平（編集担当）	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

* 総会での承認をもって最終決定となります

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
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