

The 14th Conference on
Fungal Genetics
and
Molecular Biology

第 14 回糸状菌分子生物学コンファレンス

2014 年 11 月 15–16 日
東北大学 川内北キャンパス



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	16
シンポジウム講演要旨	19
一般講演要旨	26
ポスター発表講演要旨	36
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	94
お知らせ	95

第 14 回糸状菌分子生物学コンファレンス

日時：2014年11月15日(土)-16日(日)

会場：東北大学 川内北キャンパス (宮城県仙台市青葉区川内 41)
マルチメディア教育研究棟/ Bee アリーナ Café

主催：糸状菌分子生物学研究会

共催：東北大学大学院農学研究科、日本生物工学会北日本支部 (五十音順)

後援：糸状菌遺伝子研究会

11月15日(土)

- 11:30 - 受付開始
- 12:30 - 12:40 開会の辞
- 12:40 - 14:40 口頭発表 (O-1~10)
- 14:40 - 14:50 休憩
- 14:50 - 16:50 口頭発表 (O-11~20)
- 16:50 - 17:20 休憩
- 17:20 - 18:20 特別講演
- 18:30 - 20:30 懇親会

11月16日(日)

- 9:00 - 受付開始
- 9:30 - 10:45 ポスター発表 (奇数番号)
- 10:45 - 12:00 ポスター発表 (偶数番号)
- 12:00 - 13:00 昼休み
- 13:00 - 15:00 シンポジウム
- 15:10 - 15:35 総会・表彰式
- 15:35 - 15:40 閉会の辞

発表演題および講演時間

特別講演 11月15日(土) 17:20 - 18:20

〔座長：後藤正利(九州大学)〕

Molecular dissection of galactofuranose biosynthesis in *Aspergillus niger* and its importance for maintaining cell wall integrity

Dr. Arthur F. J. Ram

(Head of the Department and Associate Professor Molecular Microbiology and Biotechnology at the Institute of Biology Leiden, Leiden University)

シンポジウム 11月16日(日) 13:00 - 15:00

「産業界での物質生産に向けた応用展開」

〔座長：高木 忍 (S-1, 2), 秦 洋二 (S-3, 4)〕

13:00-13:30

S-1 「焼酎製造における液体培養麹の開発」

アサヒビール株式会社 酒類技術研究所
砂川 忠広

13:30-14:00

S-2 「麹菌チロシナーゼを利用した新規染毛料の開発」

月桂冠株式会社 総合研究所
中村 幸宏, 秦 洋二

14:00-14:30

S-3 「培地原料(脱脂小麦胚芽)サプライヤーの違いによるFK506(タクロリムス)生産阻害の発生とその回避」

アステラスファーマテック株式会社 富山技術センター
二瀬 彩子, 井出 綾菜, 渡辺 国晴, 清水 志保

14:30-15:00

S-4 「ノボザイムズ社におけるアグリバイオビジネス：現状と今後の取り組みについて」

ノボザイムズ ジャパン株式会社 研究開発部門
高木 忍

一般講演 (O-1~O-10) 11月15日(土) 12:40 - 14:40

[座長: 織田 健 (O-1, 2), 鈴木 聡 (O-3, 4), 吉田 誠 (O-5, 6), 谷 修治 (O-7, 8), 國武 絵美 (O-9, 10)]

- 12:40 O-1 黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* のペクチンメチルエステラーゼ遺伝子破壊株の機能解析
水谷治, 柿菌ダララット, 韓錦順, 高橋徹, 山田修 (酒総研)
- 12:52 O-2 糸状菌におけるリボソームペプチド合成経路の発見
梅村舞子¹, 長野希美², 小池英明¹, 玉野孝一¹, 阿部敬悦³, 新家一男⁴, 浅井潔⁵, 町田雅之¹ (1産総研・生物プロセス, 2産総研・ゲノム情報, 3東北大・農, 4産総研・バイオメディカル, 5東大・新領域)
- 13:04 O-3 麹菌 hydrophobin RolA とポリエステル間の相互作用における Cys7-Cys8 ループの関与
田中拓未¹, 金允卿¹, 田邊弘毅¹, 上原健二¹, 大類景子¹, 高橋徹², 阿部敬悦²
(¹東北大院・農, ²東北大院・未来研)
- 13:16 O-4 麹菌細胞工場を用いた L-および D-乳酸の生産
笹倉直也¹, 若井暁², 浅井菜々実², 荻野千秋¹, 堤浩子³, 秦洋二³, 近藤昭彦¹
(¹神戸大・工, ²神戸大・自然科学, ³月桂冠・総研)
- 13:28 O-5 白色腐朽菌によるリグニン生分解に必要な遺伝子の同定にむけた基盤整備
中沢威人¹, 宮崎安将², 本田与一¹ (1京大・農, 2森林総研)
- 13:40 O-6 糸状菌が細胞外に分泌する β -マンナン分解に関与する新規タンパク質の解析
金子優平¹, 石原紗彩那¹, 望月麻衣¹, 山本竜也¹, 前林正弘¹, 大場正春¹, 小林哲夫², 志水元亨¹, 加藤雅士¹ (1名城大・農, 2名大院・生命農)
- 13:52 O-7 出芽酵母・糸状菌での植物-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)
- 14:04 O-8 Functional binding characteristics of ManR/ClrB to regulate cellulase and mannanase production in *Aspergillus nidulans*
Nuo Li, Emi Kunitake, Kyoko Kanamaru, Makoto Kimura, Tetsuo Kobayashi
(Grad. Sch. Bioagric. Sci., Nagoya Univ.)
- 14:16 O-9 麹菌の転写因子 FlbC は固体培養特異的発現を示すグルコアミラーゼ遺伝子 (*glaB*) の発現を制御する
吉村緑, 田中瑞己, 新谷尚弘, 五味勝也 (東北大院・農・生物産業創成)
- 14:28 O-10 *Aspergillus aculeatus* における dipeptidyl peptidase 4 の機能解析
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)

一般講演 (O-11~O-20) 11月15日(土) 14:50 - 16:50

[座長: 田中 瑞己 (O-11~13), 竹下 典男 (O-14, 15), 加藤 直樹 (O-16, 17), 赤木 靖典 (O-18~20)]

14:50 O-11 Maintenance of active directional growth by perpetual assembly and disassembly of polarity sites

Norio Takeshita^{1,4} Yuji Ishitsuka², Natasha Savage³, Yiming Li², Anna Bergs¹, Daria Kohler²,
Rebecca Donnelly³, G. Ulrich Nienhaus², Reinhard Fischer¹

(¹Dept. of Microbiology, Inst. for Applied Bioscience, ²Inst. for Applied Physics, Karlsruhe Institute of Technology (KIT). ³Dept. of Functional and Comparative Genomics, Inst. of Integrative Biology, Univ. of Liverpool. ⁴Univ. of Tsukuba, Faculty of Life and Environmental Sciences.)

15:02 O-12 分泌酵素生産に関与する *Aspergillus nidulans* SunA の機能解析

船山あずみ, 金丸京子, 木村真, 小林哲夫 (名大院・生命農学)

15:14 O-13 糸状菌ミトコンドリアの機能へのヒスチジンキナーゼ HysA の関与

林早紀, 小島憲介, 金丸京子, 木村真, 小林哲夫 (名大院・生命農)

15:26 O-14 麹菌 *A. oryzae* における光依存性の分生子形成抑制メカニズムに関する解析

Helge M. Dietrich, 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)

15:38 O-15 カーボンカタボライト抑制制御因子 CreA は活性化条件において安定化する

田中瑞己, 新谷尚弘, 五味勝也 (東北大院農・生物産業創成)

15:50 O-16 メロテルペノイド anditomin 生合成の全容解明

松田侑大, 淡川孝義, 脇本敏幸, 阿部郁朗 (東大院・薬)

16:02 O-17 糸状菌 *Aspergillus nidulans* による土壌フミン酸の構造変化

中澤奈美, 老沼研一, 高谷直樹 (筑波大院・生命環境)

16:14 O-18 化合物アレイを用いたメラニン生合成阻害剤探索

本山高幸^{1,2}, 田中陽子², 長田裕之^{1,2} (¹理研・抗生物質, ²理研・CSRS)

16:26 O-19 ウリ類炭疽病菌における出芽酵母ストレス応答制御因子 *WHI2* のホモログ *CoWHI2* は宿主防御応答の誘導と準活物寄生性の制御に関与する

原田賢, 久保康之 (京府大院・生環)

16:38 O-20 マイコウイルス感染による糸状菌細胞壁の構造変化

望月翔子, 鈴木信弘, 笠原紳 (宮城大・食産業・環境, 岡山大・植物研)

ポスター発表 11月16日(日) 9:30-10:45 (奇数番号)

10:45-12:00 (偶数番号)

P-1 泡盛醸造に用いられている黒麹菌の系統学的解析

塚原正俊¹, 渡久地政汰¹, 伊波朋哉¹, 東春奈¹, 大城彩音¹, 渡邊泰祐², 外山博英², 山田修³
(¹バイオジェット, ²琉球大農・亜熱生資, ³酒総研)

P-2 Influence of light on growth and conidiation of *Aspergillus oryzae*

Pushpa S Murthy^{1,2}, Ken-Ichi Kusumoto², Satoshi Suzuki² (¹CSIR-CFTRI, India, ²NFRI, NARO)

P-3 麹菌総合ゲノムデータベース (CAoGD) のデータ更新とその利用

織田健¹, 上村泰央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-4 麹菌のアミラーゼ生産に関与する転写因子の各種炭素源における細胞内局在解析

今野友維, 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-5 麹菌界面活性タンパク質 hydrophobin RoIA の疎水性表面への吸着機構の解析

永山恵美¹, 田中拓未¹, 田邊弘毅¹, 上原健二¹, 高橋徹², 有田稔彦³, 樋口剛志³, 阿部敬悦^{1,2}
(¹東北大院・農, ²東北大・未来研, ³東北大・多元研)

P-6 麹菌 hydrophobin RoIA とポリエステル間の相互作用における Cys7-Cys8 ループの関与

田中拓未¹, 金允卿¹, 田邊弘毅¹, 上原健二¹, 大類景子¹, 高橋徹², 阿部敬悦²
(¹東北大院・農, ²東北大院・未来研)

P-7 麹菌 hydrophobin RoIA と cutinase CutL1 間の相互作用に関与する CutL1 のアミノ酸残基

金允卿¹, 寺内裕貴², 田中拓未¹, 對馬裕誠¹, 上原健二¹, 高橋徹³, 阿部敬悦^{1,2,3}
(¹東北大院・生物産業創成, ²東北大・農, ³東北大・未来研)

P-8 水性二相分配法 (ATPS) による麹菌 *Aspergillus oryzae* 由来 Hydrophobin HypA の分離・濃縮システムの構築

中野宏軌, 朽方康裕, 堂前圭佑, 加瀬明日香, 中島春紫 (明治大院・農・農化)

P-9 糸状菌由来の免疫回避機能性タンパク質を用いた新規医療用ナノ粒子の開発

佐藤大貴¹, 渡邊祐里絵², 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-10 麹菌 *A. oryzae* のエラスターゼインヒビター様タンパク質**
山下伸雄¹, 平松穂乃花², 奥村欣由², 小森由美子², 打矢恵一², 明石貴裕¹, 小川賢二³, 二改俊章²
(¹白鶴酒造・研究, ²名城大薬, ³(独)東名古屋病院)
- P-11 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-12 糸状菌におけるリボソームペプチド生合成経路の発見**
梅村舞子¹, 長野希美², 小池英明¹, 玉野孝一¹, 阿部敬悦³, 新家一男⁴, 浅井潔⁵, 町田雅之¹
(¹産総研・生物プロセス, ²産総研・ゲノム情報, ³東北大・農, ⁴産総研・バイオメディカル, ⁵東大・新領域)
- P-13 セルラーゼ遺伝子をマルチコピー導入した麹菌の遺伝子コピー数とセルラーゼ活性**
若井暁¹, 浅井菜々実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-14 比較ゲノミクスによる麹菌の異種タンパク質高生産に関与する変異遺伝子の同定**
金鋒杰, 丸山潤一, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)
- P-15 麹菌におけるグルコース抑制関連因子遺伝子破壊株を宿主とした異種遺伝子高発現**
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-16 麹菌細胞壁の α -グルカン合成に関わる多重遺伝子破壊株の形態および物質生産特性**
張斯来, 田中瑞己, 新谷尚弘, 五味勝也 (東北大院・農・生物産業創成)
- P-17 黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* のペクチンメチルエステラーゼ遺伝子破壊株の機能解析**
水谷治, 柿菌ダララット, 韓錦順, 高橋徹, 山田修 (酒総研)
- P-18 麹菌細胞工場を用いた L-および D-乳酸の生産**
笹倉直也¹, 若井暁², 浅井菜々実², 荻野千秋¹, 堤浩子³, 秦洋二³, 近藤昭彦¹
(¹神戸大・工, ²神戸大・自然科学, ³月桂冠・総研)
- P-19 オレイン酸及びリノール酸高生産を目的とした *Mortierella alpina* の分子育種**
阪本鷹行¹, 櫻谷英治², 安藤晃規³, 島 純⁴, 小川 順^{1,3}
(¹京大院農・応用生命, ²徳島大院・工, ³京大生理ユニット, ⁴龍谷大)
- P-20 *Pythium* sp.由来 ω 3 不飽和化酵素遺伝子を活用した油糧微生物 *Mortierella alpina* 1S-4 による EPA の常温生産**
安藤晃規^{1,2}, 中辻諒平², 菊川寛史², 櫻谷英治³, 小川順^{1,2}
(¹京大・生理化学ユニット, ²京大院・農・応用生命, ³徳島大院・ソシオ)

- P-21** 糸状菌 *Pythium* sp. 由来 ω3 不飽和化酵素遺伝子の酵母発現系を用いた機能解析
菊川寛史¹, 中辻諒平¹, 浅井大貴¹, 櫻谷英治^{1,2}, 安藤晃規^{1,3}, 小川順^{1,3}
(¹京大院農・応用生命, ²徳島大院・ソシオ, ³京大・生理化学)
- P-22** 人工ヌクレアーゼ TALENs を用いたイネいもち病菌における高効率遺伝子改変法
荒添貴之¹, 小川哲也¹, 大里修一¹, 佐久間哲史², 山本卓², 有江力³, 桑田茂¹
(¹明治大院農, ²広島大院理, ³農工大院農)
- P-23** 殺菌剤ポリオキシシン耐性遺伝子の同定
升本宙¹, 泉津弘祐², 北出雄生¹, 田中千尋¹ (¹京都大・院・農, ²滋賀県立大・環境科学)
- P-24** 植物病原菌 *Ustilago maydis* における初期エンドソーム動態の生理学的意義に関する解析
樋口裕次郎¹, Gero Steinberg² (¹九大院・生資環・生命機能, ²エクセター大, 生命科学)
- P-25** ウシグソヒトヨタケの子実体未成熟突然変異体の原因遺伝子は CHD1 ホモログをコードしていた。
村口元, 畑中こずえ, 岡野桂樹 (秋田県立大・生物資源)
- P-26** 牧草共生糸状菌 *Epichloë festucae* の低分子量 G タンパク質 Cdc42 および RacA の相互作用因子特異性の機能解析
榎野友香, 竹本大吾 (名大院・生命農学)
- P-27** 牧草共生糸状菌 *Epichloë festucae* における菌糸融合欠損株の探索と共生確立能の解析
岡村文音, 田中愛子, 竹本大吾 (名大院・生命農学)
- P-28** BiFC 法を利用した麹菌 *A. oryzae* の菌糸融合の可視化と解析
岡部知弥¹, 塚崎和佳子¹, 金 鋒杰¹, 岩下和裕², 藤井郁雄³, 丸山潤一¹, 北本勝ひこ¹
(¹東大院・農生科・応生工, ²酒総研, ³阪府大院・理)
- P-29** 麹菌 *Aspergillus oryzae* の菌糸融合における AoSO の機能解析
塚崎和佳子, 丸山潤一, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)
- P-30** 麹菌 *A. oryzae* の子嚢胞子形成における有性生殖関連遺伝子の高発現の促進効果
田中勇気, 金 鋒杰, 丸山潤一, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)
- P-31** Investigation of the mechanism for septal association of Leashin protein in *Aspergillus oryzae*
Pei HAN, Feng Jie JIN, Jun-ichi MARUYAMA, Katsuhiko KITAMOTO
(Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo)

- P-32** 麹菌 *A. oryzae* における光依存性の分生子形成抑制メカニズムに関する解析
Helge M. Dietrich, 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-33** カーボンカタボライト抑制制御因子 CreA は活性化条件において安定化する
田中瑞己, 新谷尚弘, 五味勝也 (東北大院農・生物産業創成)
- P-34** 麹菌におけるオートファジーによる核の分解 (ヌクレオファジー) の評価法
三谷隆宏, 菊間隆志, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)
- P-35** 麹菌における Acyl-CoA binding protein (AoAcb1, AoAcb2) による特殊分泌経路の解析
川口航平, 菊間隆志, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)
- P-36** 麹菌 *Aspergillus oryzae* のポリリン酸代謝関連遺伝子の機能解析
多田功生, 大口ひかる, 楠本憲一 (農研機構 食総研)
- P-37** Maintenance of active directional growth by perpetual assembly and disassembly of polarity sites
Norio Takeshita^{1,4}, Yuji Ishitsuka², Natasha Savage³, Yiming Li², Anna Bergs¹, Daria Kohler², Rebecca Donnelly³, G. Ulrich Nienhaus², Reinhard Fischer¹ (¹Dept. of Microbiology, Inst. for Applied Bioscience, ²Inst. for Applied Physics, Karlsruhe Institute of Technology (KIT). ³Dept. of Functional and Comparative Genomics, Inst. of Integrative Biology, Univ. of Liverpool. ⁴Univ. of Tsukuba, Faculty of Life and Environmental Sciences.)
- P-38** 分泌酵素生産に関与する *Aspergillus nidulans* SunA の機能解析
船山あずみ, 金丸京子, 木村真, 小林哲夫 (名大院・生命農学)
- P-39** *Aspergillus nidulans* におけるプロテインキナーゼ C によるカルシウム応答シグナル伝達経路制御機構の解析
片山琢也¹, 志波優², 吉川博文³, 堀内裕之¹ (¹東大院・農生科・応生工, ²岩手医大・いわて東北メディカル・メガバンク機構, ³東農大・応生科・バイオ)
- P-40** 糸状菌ミトコンドリアの機能へのヒスチジンキナーゼ HysA の関与
林早紀, 小島憲介, 金丸京子, 木村真, 小林哲夫 (名大院・生命農)
- P-41** 糸状菌 *Aspergillus nidulans* におけるリン酸基伸介因子 YpdA とレスポンスレギュレーター SskA, SrrA の相互作用の解析
福間泰之¹, 緑川裕良¹, 萩原大祐^{2,3}, 古川健太郎⁴, 中山真由美², 吉見啓², 阿部敬悦^{1,2}
(¹東北大院・生物産業創成, ²東北大・未来研, (現) ³千葉大・真菌センター, ⁴ヨーテボリ大)

- P-42** 糸状菌 PKC に特異的な新規阻害剤に対する酵母スクリーニング系の最適化
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-43** *Aspergillus nidulans* の *wspA* の機能とキチン合成酵素局在化における役割
テイロ, 星 浩臣, 堀内 裕之 (東大院・農生科)
- P-44** 麹菌 *Aspergillus oryzae* *admA*, *admB* 遺伝子欠損株の細胞壁構成多糖と RNA-Seq 解析
小林拓嗣¹, 前田浩¹, 古崎利紀², 石井一夫², 有江力², 竹内道雄¹, 山形洋平¹
(¹東農工大院・応生科,²東農工大院・農学系ゲノム人材育成プログラム)
- P-45** *Aspergillus nidulans* におけるガラクトフラノース転移酵素の機能解析
片渕由佳子¹, 篠塚早紀², 泉実², 浴野圭輔¹, 竹川薫³, 後藤正利³, 野村善幸¹, 岡拓二¹
(¹崇城大・生物生命,²岡山大院・環境生命,³九大院・農)
- P-46** 麹菌 *Aspergillus oryzae* のザゼンソウ発熱関連遺伝子と相同性を示す遺伝子の発現比較
小笠原博信¹, 渡辺隆幸¹, 伊藤菊一², 五味勝也³
(¹秋田県総食研セ,²岩手大農・寒冷バイオ,³東北大院農・生物産業創成)
- P-47** 麹菌における Ustiloxin B 生合成遺伝子クラスター転写因子 *ustR* 高発現による Ustiloxin B 生産
吉見啓¹, 梅村舞子², 長野希美³, 小池英明², 町田雅之², 阿部敬悦^{1,4}
(¹東北大・NICHe,²産総研・生物プロセス,³産総研・CBRC,⁴東北大院農・生物産業創成)
- P-48** 白色腐朽菌によるリグニン生分解に必要な遺伝子の同定にむけた基盤整備
中沢威人¹, 宮崎安将², 本田与一¹ (¹京大・農,²森林総研)
- P-49** 担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* 由来 PQQ 依存性酸化還元酵素遺伝子の
クローニングおよび発現
戸谷光平¹, 梅澤究², 石田卓也¹, 吉田誠², 五十嵐圭日子¹, 鮫島正浩¹
(¹東大院・農生科,²農工大・農)
- P-50** 担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* のセルラーゼ, ヘミセルラーゼ生産におけるキシログル
カン添加効果
川村智樹, 中村彰彦, 石田卓也, 五十嵐圭日子, 鮫島正浩 (東大院・農生科)
- P-51** *Aspergillus oryzae* 由来新規なアセチルキシランエステラーゼの特徴づけ
大塚基広, 渡邊裕也, 塩野義人, 小関卓也 (山形大・農)

- P-52** マツタケ (*Tricholoma matsutake*) 由来セルラーゼ遺伝子の cDNA クローニング
大沼広宜¹, 福田泰久¹, 楠田瑞穂², 寺下隆夫¹, 白坂憲章¹
(¹近畿大院・農応生化, ²大阪府大院・生命応生化)
- P-53** 特徴的な基質特異性を持つ麴菌由来新規 β -グルコシダーゼ(BglH)の酵素学的諸性質
渡部 昭, 鈴木 萌, 工藤佳那子, 氏家成隆, 五味勝也 (東北大院農・生物産業創成)
- P-54** 糸状菌が細胞外に分泌する β -マンナン分解に関与する新規タンパク質の解析
金子優平¹, 石原紗彩那¹, 望月麻衣¹, 山本竜也¹, 前林正弘¹, 大場正春¹, 小林哲夫², 志水元亨¹,
加藤雅士¹ (¹名城大・農, ²名大院・生命農)
- P-55** 麴菌 *Aspergillus oryzae* の持つ分泌型ホスホリパーゼ A₂ の酵素学的性質の解析
高柳亜由美¹, 宮川拓也², 大塚淳², 田之倉優², 北本勝ひこ¹, 有岡学¹
(¹東大院・農生科・応生工, ²東大院・農生科・応生化)
- P-56** 黄麴菌 *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・応生化)
- P-57** *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-58** シイタケ(*Lentinula edodes*)における GABA 生成に関与する酵素について
岩本和子, 福田泰久, 白坂憲章 (近畿大・農・応生化)
- P-59** 異なる温度で培養した *Aspergillus fumigatus* 胞子の比較トランスクリプトーム解析
萩原大祐¹, 酒井香奈江¹, 鈴木聡², 亀井克彦¹, 五ノ井透¹, 川本進¹
(¹千葉大・真菌センター, ²食総研)
- P-60** 白麴菌における推定転写制御因子 NosA と RosA の解析
二神泰基¹, 田代智史², 梶原康博³, 高下秀春³, 竹川薫², 玉置尚徳¹, 後藤正利²
(¹鹿児島大・農, ²九大院・農, ³三和酒類)
- P-61** 鉄恒常性に関わる転写因子 HapX と CCAAT-box 結合因子 HapB/C/E との相互作用
中村隼人, 金子優平, 志水元亨, 加藤雅士 (名城大学・農学部)
- P-62** 麴菌の転写因子 F1bC は固体培養特異的発現を示すグルコアミラーゼ遺伝子 (*glaB*) の発現を制御する
吉村緑, 田中瑞己, 新谷尚弘, 五味 勝也 (東北大院・農・生物産業創成)

- P-63** *Aspergillus oryzae* 転写因子 XlnR/AraR による転写制御機構の解析
石川香南, 金丸京子, 木村真, 小林哲夫 (名大院生命農・生物機構)
- P-64** Functional binding characteristics of ManR/ClrB to regulate cellulase and mannanase production in *Aspergillus nidulans*
Nuo Li, Emi Kunitake, Kyoko Kanamaru, Makoto Kimura, Tetsuo Kobayashi
(Grad. Sch. Bioagric. Sci., Nagoya Univ.)
- P-65** 麹菌マルトース資化遺伝子クラスターのアミラーゼ誘導生産への関与
市川昂典, 長谷川一城祥子, 田中瑞己, 新谷尚弘, 五味勝也 (東北大院・農・生物産業創成)
- P-66** 黄麹菌 *Aspergillus oryzae* *pepO* 遺伝子の *cis-element* の探索
山崎周平, 前田浩, 竹内道雄, 山形洋平 (農工大院・農)
- P-67** 糸状菌 *Trichoderma reesei* のアスパラギン酸プロテアーゼの発現誘導機構の解明
塩屋幸樹, 雪真弘, 佐藤春菜, 志田洋介, 小笠原渉 (長岡技科大・生物)
- P-68** *Aspergillus nidulans* セルラーゼ・ヘミセルラーゼの発現に関わるトランスポーターの解析
國武絵美, 金丸京子, 木村真, 小林哲夫 (名大院生命農・生物機構)
- P-69** トランスポーター改変によるコウジ酸の大量生産
佐野元昭, 北川治恵, 大箸信一 (金沢工大)
- P-70** 麹菌のエルゴステロール生合成を制御する転写因子 AtrR と SrbA の機能および細胞内局在解析
杉山航平, 大場歩, 萩原大祐¹, 田中瑞己, 新谷尚弘, 川本進¹, 五味勝也
(東北大院・農・生物産業創成,¹千葉大・真菌センター)
- P-71** *Aspergillus nidulans* の sirtuin アイソザイムによる二次代謝系の発現制御
伊藤英里子, 茂本亮輔, 榊尾俊介, 高谷直樹 (筑波大院・生命環境)
- P-72** 黄麹菌セリントタイプカルボキシペプチダーゼ遺伝子におけるイントロン残存性の解析
石田健, 久保島恵, 森田寛人, 前田浩, 岡本綾子, 竹内道雄, 山形洋平 (東京農工大・応生科)
- P-73** *Aspergillus oryzae* における 331-25 sense RNA, 331-25 antisense RNA の機能解析
辻井雅, 奥田聡, 竹内道雄, 山形洋平 (東京農工大・応生科)
- P-74** *Aspergillus aculeatus* における dipeptidyl peptidase 4 の機能解析
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-75** *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
早川芙佐華, 石田千絵, 山川結, 千代優, 中島春紫 (明治大院・農・農化)
- P-76** 出芽酵母・糸状菌での植物-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-77** *Fusarium graminearum* および *Fusarium sporotrichioides* における転写因子 TRI6 の機能互換性
中嶋佑一, 前田一行, 金丸京子, 小林哲夫, 木村真 (名大院・生命農)
- P-78** 糸状菌 *Trichoderma reesei* における pH 依存的セルラーゼ生産メカニズムの解析
平沢大樹, 塩屋幸樹, 志田洋介, 小笠原渉 (長岡技科大・生物)
- P-79** 糸状菌 *Trichoderma reesei* のセルラーゼ生産制御因子の網羅的解析
会田宏樹, 塩屋幸樹, 志田洋介, 小笠原渉 (長岡技科大・生物)
- P-80** イネ科植物いもち病菌の Argonaute3 は RNA サイレncing を負に制御する
入谷彰英, 横矢佳奈, 中屋敷均 (神戸大院・農)
- P-81** 育種への応用を目的としたシイタケゲノム配列整備
坂本裕一, 佐藤志穂, 金子真也¹, 浅野さとみ¹, 宮崎安将², 白石進³, 宮崎和弘²
(岩手生工研, ¹東工大・生命理工, ²森林総研, ³九大・農学研究院)
- P-82** メロテルペノイド terretonin 生合成機構の解明および関連修飾酵素群の機能解析
岩渕大輝, 松田侑大, 淡川孝義, 阿部郁朗 (東大院・薬)
- P-83** メロテルペノイド anditomin 生合成の全容解明
松田侑大, 淡川孝義, 脇本敏幸, 阿部郁朗 (東大院・薬)
- P-84** *Emericella varicolor* 由来新規メロテルペノイド生合成遺伝子クラスターの機能解析
全智揚, 松田侑大, 三橋隆章, 阿部郁朗 (東大院薬・天然物化学)
- P-85** *Penicillium purpurogenum* における *Monascus* 色素生合成関連ポリケチド生合成遺伝子の探索
荻原淳, 小嶋涼, 茂木美樹, 齋藤亮, 新居鉄平, 加藤順, 春見隆文 (日大・生物資源・生命化学)
- P-86** 糸状菌 *Aspergillus nidulans* による土壌フミン酸の構造変化
中澤奈美, 老沼研一, 高谷直樹 (筑波大院・生命環境)

- P-87** ハイグロマイシン B 処理によるルシラクタエン生産糸状菌 *Fusarium* sp. RK97-94 における二次代謝産物生産誘導
加藤翔^{1,2}, 本山高幸^{1,3}, 鎌倉高志², 長田裕之^{1,3} (¹理研・抗生物質, ²東京理科大, ³理研・CSRS,)
- P-88** エキセチンからフサリセチン A への変換に関わる酵素遺伝子の探索
加藤直樹¹, Jae-Hyuk JANG², 高橋俊二¹, Jong Seog AHN², 長田裕之¹ (¹理研・CSRS, ²KRIBB)
- P-89** *Aspergillus nidulans* の低酸素誘導性脱ユビキチン化酵素の機能
阿部央行, 榎尾俊介, 高谷直樹 (筑波大院・生命環境)
- P-90** 麹菌アシル CoA 合成酵素欠失株による遊離脂肪酸の高生産
玉野孝一¹, Kenneth S. Bruno², 小池英明¹, 石井智子¹, 三浦愛¹, 山根倫子¹, 梅村舞子¹, Scott E. 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)
- P-91** イネいもち病菌の *Ehs1* のノックアウト, ノックダウンにおける表現型の比較と次世代シーケンサーによるトランスクリプトーム解析
村野慶奈, 廣澤拓巳, 成川恵, 荒添貴之, 新井和良, 大鐘潤, 桑田茂, 鎌倉高志
(東理大院理工・応生科)
- P-92** 化合物アレイを用いたメラニン生合成阻害剤探索
本山高幸^{1,2}, 田中陽子², 長田裕之^{1,2} (¹理研・抗生物質, ²理研・CSRS)
- P-93** MAP キナーゼ Pmk1 は H3K4 ヒストンメチル基転移酵素 MoSET1 の上流で機能する
Nguyen Hieu Hanh, Kieu Thi Minh Pham, 池田健一, 中屋敷均 (神戸大・院農)
- P-94** ウリ類炭疽病菌における出芽酵母ストレス応答制御因子 *WHI2* のホモログ *CoWHI2* は宿主防御応答の誘導と準活物寄生性の制御に関与する
原田賢, 久保康之 (京府大院・生環)
- P-95** ウリ類炭疽病菌 GAP 複合体 CoBub2/CoBfa1 は GTPase CoTem1 を介して G1/S 期進行制御および植物感染に寄与する
深田史美, 坂口歩, 久保康之 (京都府大院・生環)
- P-96** ウリ類炭疽病菌における MOR シグナル伝達経路は宿主植物滲出液中のクチンモノマー認識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** 出芽酵母セプチンリング解離因子 *RTS1* のウリ類炭疽病菌ホモログ *CoRTS1* は付着器, 侵入菌糸形成段階のアクチン動態を制御し病原性に関与する
川端昂, 深田史美, 坂口歩, 久保康之 (京府大院・生環)

- P-98** 灰色かび病菌における 26S プロテアソームサブユニット *RPN10* ホモログの解析
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-99** トウモロコシごま葉枯病菌の CHK1 MAPK 経路の推定上流因子の機能解析
北出雄生¹, 泉津弘佑², 住田卓也¹, 田中千尋¹ (¹京大・院・農, ²滋賀県大・環境科学)
- P-100** 非病原性 *Alternaria alternata* 菌株への宿主特異的 AAL 毒素生合成遺伝子クラスターの導入
高尾和実¹, 赤木靖典², 柘植尚志³, 児玉基一郎¹ (¹鳥取連大・²鳥取大農・³名大院生農)
- P-101** トマトアルターナリア茎枯病菌におけるセラミド合成酵素遺伝子の機能解析
赤木靖典¹, 石原亨¹, 柘植尚志², 児玉基一郎³ (¹鳥取大農, ²名大院生農, ³鳥取連大)
- P-102** 植物病原卵菌 *Phytophthora infestans* の付着器形成阻害物質の探索
川本真也, 甲斐建次, 谷修治, 炭谷順一, 川口剛司 (阪府大院・生環科)
- P-103** 多犯性炭疽病菌 (*Colletotrichum fioriniae*) の感染プライミング因子の探索
大高潤之介, 瀬尾茂美, 西村麻里江 (生物研)
- P-104** マイコウイルス感染による糸状菌細胞壁の構造変化
望月翔子, 鈴木信弘, 笠原紳 (宮城大・食産業・環境, 岡山大・植物研)
- P-105** 病原真菌 *Aspergillus fumigatus* を弱毒化するマイコウイルス遺伝子の同定
宍戸絵里香¹, 高橋梓¹, 森山裕充², 五ノ井透¹ (¹千葉大・真菌医学研究センター, ²農工大)
- P-106** *Aspergillus fumigatus* の生産するレクチンによる炎症誘発作用について
酒井香奈江¹, 舘野浩章², 比江森恵子², 平林淳², 五ノ井透¹
(¹千葉大・真菌センター, ²産総研)

Special Lecture

特別講演

Molecular dissection of galactofuranose biosynthesis in *Aspergillus niger* and its importance for maintaining cell wall integrity

Arthur F. J. Ram¹, Joohae Park¹, Boris Tefsen², Ellen Lagendijk¹, Cees A.M.J.J. van den Hondel¹, Irma van Die², Mark Arentshorst¹

¹Leiden University, Institute of Biology Leiden, Molecular Microbiology and Biotechnology, Sylviusweg 72, 2333 BE Leiden, The Netherlands

²Department of Molecular Cell Biology and Immunology, VU University Medical Center, van den Boechorststraat 7, 1081 BT, Amsterdam, The Netherlands

Abstract

The biosynthesis of cell wall galactofuranose (Gal_f) containing glycostructures such as galactomannan, *N*-glycans, *O*-glycans and glycosylinositolphosphoceramides in filamentous fungi are important to secure the integrity of the cell wall. In *A. niger*, the absence of Gal_f synthesis results in activation of the cell wall integrity (CWI)-pathway. Previous work in our group has shown that activation of the CWI-pathway is characterized by the induced expression of the *agsA* gene, which encodes a cell wall alpha-glucan synthase. The induced expression of *agsA* in response to cell wall stress was used in a genetic mutant screen to isolate cell wall mutants with a constitutive expression of *agsA*. In total 240 cell wall mutants were isolated and from this mutant collection the first Gal_f mutant was identified. Characterization of this mutant showed that the mutant is defective in the *ugmA* gene which encodes a UDP-galactopyranose mutase which is essential for the formation of Gal_f (1).

To identify additional mutants defective in Gal_f biosynthesis, the collection of cell wall mutants was screened for the absence of Gal_f containing glycoconjugates in the growth medium using an anti-Gal_f antibody. From the collection of mutants, we identified seven Gal_f deficient mutant from which six belonged to the *ugmA* complementation group and one mutant belonging to a new complementation group. By using whole genome sequencing approach, twenty one SNPs in coding regions were identified between this new mutant and its parental strain. The mutation responsible for the Gal_f phenotype was found to be in the *ugeA* gene. The *ugeA* gene encodes a putative UDP-glucose-4-epimerase (UgeA) and *ugeA* is required for the biosynthesis of Gal_f as well as for galactose metabolism in *A. niger* (2).

The addition of Gal_f-residues to galactomannan, galactomannoproteins and glycolipids is carried out in the Golgi apparatus by Gal_f transferases. UDP-Gal_f is produced in the cytoplasm and a nucleotide sugar transporter is required to transport UDP-Gal_f from the cytosol to the lumen of the Golgi. Such a specific member of the nucleotide sugar transporter family has recently been identified in both *A. fumigatus* and *A. nidulans* (3,4).

Based on homology searches, we identified two putative UDP-Galf-transporters in *A. niger*. Deletion analysis of the single and double mutants indicate that the two putative UDP-Galf-transporters have a redundant function in UDP-Galf-transport as only the double mutant displayed a Galf negative phenotype. Localization of fluorescently-labeled Ugt proteins confirmed their predicted localization in the Golgi. The Galf transferase (GfsA) responsible for the attachment of Galf-residues to glycostructures have recently been identified in *A. fumigatus* and *A. nidulans* (5). *A. niger* contains three genes that are highly homologous to *gfsA* in the two other Aspergillus species.. Systematic deletion analysis of the *gfs* homologs in *A. niger* showed that deletion of *gfsA* results in strong reduction in Galf containing structures and minor roles for *gfsB* and *gfsC*.

In *A. niger*, the absence of Galf synthesis results in activation of the cell wall integrity (CWI)-pathway indicating that the Galf biosynthesis is important for maintaining cell wall strength. To identify genes involved in maintaining cell wall integrity in response to the absence of galactofuranose biosynthesis, a genome-wide expression study was performed with the *ugmA* deletion strain. RNAseq analysis revealed 250 genes to be higher expressed in the *ugmA* mutant compared to the wild-type and these genes encode enzymes involved in chitin synthesis (*gfaB*, *gnsA*, *chsA*), alpha-glucan synthesis (*agsA*), beta-glucan remodeling (*bgxA*, *gelf*, and *dfgC*) and several (GPI)-anchored cell wall protein encoding genes. Interestingly, also the gene encoding the CWI-specific Map-kinase-kinase (MkkA) was induced in the *ugmA* mutant. *In silico* analysis of the 1-kb promoter regions of the differentially up-regulated genes in the *ugmA* mutant using an in house developed transcription factor binding site finder program, indicated overrepresentation of genes with RlmA or SteA binding sites. The importance of the RlmA and SteA transcription to induce cell wall remodelling genes is currently under investigation by constructing a *rlmA-ugmA* and *steA-ugmA* double mutants.

References:

- (1) Damveld RA, Franken A, Arentshorst M, Punt PJ, Klis FM, van den Hondel CA, Ram AF. **A novel screening method for cell wall mutants in *Aspergillus niger* identifies UDP-galactopyranose mutase as an important protein in fungal cell wall biosynthesis.** *Genetics* 2008, **178**:873-881.
- (2) Park JP, Tefsen B, Arentshorst M, Lagendijk E, van den Hondel CAMJJ, van Die I, Ram AF. **Identification of the UDP-glucose-4-epimerase required for galactofuranose biosynthesis and galactose metabolism in *A. niger*.** *Fungal Biology and Biotechnology* 2014, in press
- (3) Engel J, Schmalhorst PS, Dörk-Bousset T, Ferrières V, Routier FH. **A single UDP-galactofuranose transporter is required for galactofuranosylation in *Aspergillus fumigatus*.** *J Biol Chem.* 2009, **284**:33859-33868.

- (4) Afroz S, El-Ganiny AM, Sanders DAR, Kaminskyj SGW. **Roles of the *Aspergillus nidulans* UDP-galactofuranose transporter, UgtA in hyphal morphogenesis, cell wall architecture, conidiation, and drug sensitivity.** *Fungal Genet Biol* 2011, **48**:896-903.
- (5) Komachi Y, Hatakeyama S, Motomatsu H, Futagami T, Kizjakina K, Sobrado P, Ekino K, Takegawa K, Goto M, Nomura Y, Oka T. **GfsA encodes a novel galactofuranosyltransferase involved in biosynthesis of galactofuranose antigen of O-glycan in *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus fumigatus*.** *Mol Microbiol* 2013, **90**:1054-1073.
-

Symposium

シンポジウム

S-1

焼酎製造における液体培養麹の開発

砂川 忠広

(アサヒビール株式会社 酒類技術研究所)

麹菌の液体培養では固体培養と比較して、酵素生産性が低下することが知られているが、我々は穀皮によりデンプン質が覆われた状態の大麦（玄大麦）を用いることを特徴とする液体培養麹（液体麹）技術を開発し、白麹菌 *Aspergillus kawachii* による実用的な焼酎製造への利用に成功している。ジャーファーメンター装置による通気攪拌培養において、焼酎製造に利用可能となる耐酸性 α -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、酸性プロテアーゼ、セルラーゼ等の酵素活性がバランスよく生産された。この液体麹を用いて焼酎を製造したところ、固体麹で製造したものと遜色のない酒質の焼酎が得られた。原料に穀皮で覆われた状態の穀類（粳穀付米や玄米、未加工の豆類・イモ類・雑穀等）を使用した場合でも、産業的に利用可能となるレベルの酵素が生産された。この技術を応用した新しい提案である「麦焼酎かのか」を上市した。

一方、その酵素高生産機構は十分に解明されていなかった。液体麹における酵素高生産機構を検証するため、遺伝子発現解析を行った。対照となる低活性の液体培養は粉碎した玄大麦を含む培地で、固体麹は丸大麦を培地で培養を行った。その結果、培養液遊離型および菌体トラップ型を合計した耐酸性 α -アミラーゼおよびグルコアミラーゼ活性は、低活性液体培養と比べて大きく上昇し、同時に酵素遺伝子発現は、低活性液体培養、固体麹と比べて、顕著に高い発現レベルを示した。液体麹では、グルコース抑制制御を受ける遺伝子群の発現上昇がみられた。また、分生子形成等の分化に関わる遺伝子群、タンパク翻訳後修飾に関わる遺伝子群の発現上昇が確認され、これらは固体麹と共通する発現パターンを示した。顕鏡観察により、液体麹では培養初期に菌糸体の球状化および分生子柄形成等の形態変化が確認された。これらの結果から、玄大麦を用いた液体麹培養での酵素高生産化では、基質制限によるグルコース抑制解除による酵素遺伝子の誘導効果と、固体麹でみられる酵素修飾機構の誘導による活性上昇効果が考えられた。

最近、固体培養において芋麹づくりが難しいとされるサツマイモの肉質を用いても、液体培養でアミラーゼ系酵素の生産が高められることを見出した。培養中のグルコース濃度の経時的変化を調べた結果、高濃度で推移していたことから、酵素が高生産化する機構は玄大麦を用いた場合と異なると考えられた。本方法はサツマイモの品種によらず酵素高生産が可能であるため、原料の特性をいかした多様な香味を有する純芋焼酎製造等への応用についても可能性があると考えている。引き続き、液体麹の産業上の有用性について検討していきたい。

文献

- 1: Shoji H, Sugimoto T, Hosoi K, Shibata K, Tanabe M, Kawatsura K. *J Biosci Bioeng.* 2007; **103**: 203-205.
- 2: Sugimoto T, Horaguchi K, Shoji H. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2011; **38**: 1985-1991.
- 3: Masuda S, Shoji H. *J Inst Brew.* 2012; **118**: 346-351.
- 4: Sunagawa T, Masuda S, Shoji H. *J Agric Sci Technol.* 2014; **4**: 13-26.

The development of liquid koji for shochu production

Tadahiro Sunagawa

(Res. Lab. Alcohol Beverages, Asahi Breweries, Ltd.)

麹菌チロシナーゼを利用した新規染毛料の開発

中村 幸宏, 秦 洋二

(月桂冠株式会社 総合研究所)

1. はじめに

1950年代に清酒醸造において、酒粕が褐変する「黒粕」現象が問題となり、その原因の究明と発生防止に対策が検討された。その結果、黒粕の原因は麹菌のチロシナーゼによってチロシンが酸化され、最終的に黒色素のメラニンが生成することが明らかとなり、その後、チロシナーゼ活性が低い菌株の育種やチロシナーゼ活性が高くない培養法の開発によって、黒粕を防止することが可能となった¹⁾。

一方、麹菌の分子生物学アプローチの発展とともに、麹菌のチロシナーゼ遺伝子 (*melO*) が、単離され、機能解析が進むようになった。しかしながら、この*melO*遺伝子は、液体培養でしか発現せず、黒粕に関与するチロシナーゼは別の遺伝子にコードされる可能性が示唆された。そこで固体培養での遺伝子発現解析を行ったところ、固体培養で特異的に発現する新規チロシナーゼ遺伝子 (*melB*) を発見した²⁾。この*melB*遺伝子をoverexpressionさせたところ、米麹の有意な褐変が認められ、*melB*遺伝子が黒粕現象を引き起こすチロシナーゼをコードしていることが証明された。黒粕現象については、酵素レベル、遺伝子レベルでその発生機構が明らかとなっている。

このように清酒醸造では、チロシナーゼから作られるメラニン色素は、不必要なもので、メラニンの生成を極力抑制するための研究が行われてきたが、異分野ではむしろ必要性が高い物質である場合もある。たとえば、毛髪ケアにおいては、白髪の原因は毛髪内のメラニン量の減少であり、メラニンはむしろ増加させたい物質である。今回は、麹菌のチロシナーゼを用いた新規染毛料の開発について紹介する。

2. メラニン前駆体を用いた新規染毛料の開発

現在の実用化されている染毛技術は、ヘアカラーとヘアマニキュアの2種類に代表される。ヘアカラーとは、染料中間体と過酸化水素およびアルカリ剤を混合することにより、染料を内部まで浸透させる技術である。染色性が高く、色落ちしにくいのが、アルカリ剤などを使用することから繰り返し使用することで、毛髪の蛋白質や脂質を変質あるいは減少させることが指摘されている。一方ヘアマニキュアとは、酸性条件下で比較的高濃度の染料を直接髪に浸透させる技術であるが、皮膚への着色や染料の流失などが課題となっている。

先述の麹菌のチロシナーゼを用いて生産したメラニンを毛髪の染料に利用できれば、生体成分と全く同一物質で毛髪を「染める」ことができる。ただしメラニンは非常に分子量の大きな物質であり、毛髪の内部に浸透させることはできないため、そのまま染料として使用できない。ただし、メラニン合成経路の中間体を用いれば、分子量が小さく、毛髪内部に浸透し、髪を染めることが可能である。そこで、麹菌のチロシナーゼを用いて、染毛力を有するメラニン前駆体のバイオ合成について検討を行った。

3. メラニン前駆体の大量生産技術の開発

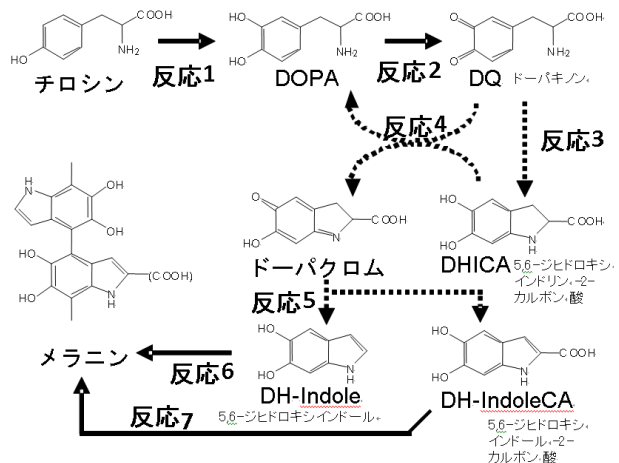
まずメラニン前駆体を合成する基質としては、原料の安定供給や溶解性などから考慮して、DOPAを用いることとした。一方、染色性を有すメラニン前駆体としては、染色性能や保存安定性などから、5-6ジヒドロキシインドール (DHI) を選択した³⁾。また酵素のチロシナーゼについては、麴菌のチロシナーゼ遺伝子 (*melB*) を清酒酵母に導入し、チロシナーゼを大量に生産する組換え酵母を反応触媒として利用した。

DOPAにチロシナーゼを反応させると、反応中間体のドーパクロムやDHIを生成することができる。しかしこれらの中間体は、極めて不安定で、酸素に触れることにより、自動的にメラニンへと重合される。メラニン中間体を安定に保存するためには、酸素を遮断し、自動酸化を防がなければならない。しかしながら、チロシナーゼによるDOPAの酸化反応にも、酸素が必要であり、酸素非存在化では、反応中間体の生成も行われなくなる。この二律背反の問題を解決するため、反応条件を種々検討した結果、メラニン前駆体を高濃度に蓄積させる方法が見つかった。それは、まずチロシナーゼ酵素量を増やし、できるだけ速やかにDOPAの酸化反応を終了させ、その後は酸素供給を停止し、酸素から遮断することにより、前駆体からメラニンへの重合を極力抑制することができた。実際にはまずDOPAはチロシナーゼによりドーパクロムに変換され反応液中に蓄積する。その後、酸素供給を停止することにより、ドーパクロムはDHIに変換されるが、非酸素条件下ではそれ以上の反応は進行せず、最終的に高濃度のDHIが蓄積される。

反応中の酸素濃度を調節することにより、実験室レベルでのDHIの大量蓄積が可能であった。しかしながら、これらの反応プロセスをスケールアップして、工業生産させるには、まだ課題が残っていた。まず大型反応槽において、いかにして適切な時期に酸素供給を調整するかが課題である。DOPAの酵素酸化や中間体の酸化あるいはドーパクロムの脱炭酸などには、酸素消費、pHの変化を伴うため、反応液中のDOやpHを計測し解析することにより、反応経過を経時的に把握できることが明らかとなった、これらの計測値をもとに、適切な時期に適切な培養操作を加えて、高効率で反応中間体を蓄積することが可能となった。

4. メラニン前駆体を用いた新規染毛料の性能⁴⁾

メラニン前駆体を使用した染毛試験を行った結果、黒髪に近い色合いになり、肌へのダメージが少ないことが明らかとなった。ただし、1回の処理で完全に黒髪レベルまで染色することは難しく、2~3回の染毛処理が必要であった。ただ1回で染まりにくいという欠



メラニン生成経路。実線矢印は*MelB*が触媒。点線矢印は非酵素反応。ただし、反応6と7は非酵素的にも進行する。

点は、意外な市場を生み出すことになる。消費者アンケートでは、白髪染めの未使用者で使用しない理由の一つとして、「一度に黒髪になること抵抗がある」ことが挙げられている、これは日本人男性に限った特徴で、周囲への気恥ずかしさなどもあって、急激な変化を好まない傾向がある。今回の染毛料は、徐々に染まる、周囲に気づかれずに徐々に黒髪へかえることができ、上記のような未使用者のニーズにまさしく応える画期的な染毛料となることになった。

おわりに

これらの新規染毛料の開発においては、醸造分野のシーズと化粧品分野のニーズが合致し、業界でも画期的な技術開発につなげることが可能となった。醸造発酵産業では、当たり前前のことであっても、他の業界で新しい側面を持った技術に変身できるかもしれない。これからも醸造発酵のメカニズムを研究し、さらに新しい醸造発酵技術の開発に努めるとともに、その技術の異分野の展開についても挑戦していきたい

本研究は、月桂冠株式会社総合研究所と花王株式会社ビューティーケア研究センターが共同研究の成果である。

引用文献

- 1: 村上英也, 河合美登利: 醸協, **53**, 88-92 (1958)
- 2: Obata, H., Ishida, H., Hata, Y., Kawato, A., Abe, Y., Akao, T., Akita, O., and Ichishima, E.: *J. Biosci. Bioeng.* **97**, 400-405 (2004)
- 3: Prota G., *Med. Res. Rev.* **8**, 525-556 (1988)
- 4: 小池謙造, 秦洋二: フレグランスジャーナル **38**, 16-20 (2010)

The Novel Hair Dyeing Technology by *Aspergillus Tyrosinase*.

Yukihiro Nakamura and Yoji Hata (Research Institute, Gekkeikan Sake Co., Ltd.)

培地原料（脱脂小麦胚芽）サプライヤーの違いによる FK506（タクロリムス）生産阻害の発生とその回避

○二瀬 彩子, 井出 綾菜, 渡辺 国晴, 清水 志保
(アステラスファーマテック株式会社
富山技術センター 技術開発部)

FK506（タクロリムス）は、1984年当社探索研究所によって筑波山の土壌より分離された *Streptomyces tsukubaensis* No.9993株の培養液から発見された免疫抑制活性を有するマクロライド抗生物質である。現在、臓器移植時の拒絶抑制薬およびアトピー性皮膚炎治療薬として世界的に市販されている。安定的に原薬を供給することが我々企業の使命であり、そのためには発酵培地原料のベンダーを複数社持つことが継続的な生産を続けるためのリスク回避となる。タクロリムス発酵培地の窒素源のひとつである脱脂小麦胚芽についても、現用のA社製に加え、B社製、C社製についての利用可能性を調査した。その結果、現用A社と比較して、B社製では同等の生産性と品質が得られることが分かったが、C社製では生産性が顕著に低下した。これはC社製の脱脂小麦胚芽に残存する酵素活性が培地成分と反応し、タクロリムス生産菌の生育や二次代謝を阻害する化合物が生成されていることが原因であった。

本発表では、C社製の脱脂小麦胚芽で生成する阻害物の探索結果と回避法に加え、タクロリムス生産菌のメタボローム解析から推察できる阻害による代謝への影響について述べる。

引用文献

- 1: タクロリムス (Tacrolimus,FK506) の工業化研究
生物工学会誌 第76巻 第9号 389-397.1998

Production Inhibition for FK506 (Tacrolimus) Caused by Culture Medium (defatted wheat germ) of Different Suppliers and Its Prevention

Ayako Futase, Ayana Ide, Kuniharu Watanabe, Shiho Shimizu

(Astellas Pharma Tech Co., Ltd, Toyama Technology Center, Technology Development)

ノボザイムズ社におけるアグリバイオビジネス： 現状と今後の取り組みについて

高木 忍

ノボザイムズ ジャパン株式会社 研究開発部門

2000年に61億人といわれた世界人口は現在すでに70億人を超え、最近の予測では2050年には95億人に達すると見込まれている¹⁾。このような急激な人口増加を受けて食糧の供給確保は世界における重要課題の一つとなっている。幸い農業技術の進歩により耕地面積当りの穀物生産量が人口増加を上回る伸びを見せており²⁾、将来世界的な食糧危機に陥ることは現在想定されていない。しかしながら、一方では今すでに途上国で9億人が飢餓に苦しんでいるといわれ、他方では新興国における食文化の欧米化が進み、食糧・飼料生産を支える農業技術は種々の方面で今後一層の向上が期待されると同時に、アグリビジネスは今後の成長産業の一つとみなされている。特に近年は微生物農薬または微生物肥料など、微生物の農業利用が注目を集めている。ノボザイムズ社では2000年より微生物製剤の開発・販売を行っており、これまでは廃水処理、エビ養殖、施設クリーニング分野等で実績を伸ばしてきた。近年は新たなトレンドとして農業分野における微生物製剤の開発に注力している。昨年末には、本アグリバイオビジネス(BioAg)を一層進めるため米国モンサント社と提携することを決定した。農業分野で実績のあるモンサント社と提携することにより、社会の持続的発展に貢献できるバイオソリューションを農業分野に拡大できることを期待している。今回は、糸状菌を用いたリン酸吸収促進剤³⁾ JumpStart®、根粒菌由来 Nod 因子を利用した作物収量促進剤⁴⁾ TagTeam®LCO など弊社製品の紹介を交えながら、ノボザイムズ社におけるアグリバイオビジネスの取り組みについて紹介する。

引用文献

1: 総務省統計局 世界の統計2014 <http://www.stat.go.jp/data/sekai/0116.htm>

2: USDA: Agricultural Outlook,

3: Kucey, R.M.N. 1987. Appl. Environ. Microb. 53:2699-2703.

4: PCT patent application WO2008085958

Introduction of BioAg business at Novozymes

Shinobu Takagi (R&D, Novozymes Japan Ltd.)

Oral Session

O-1 (P-17)

黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* のペクチンメチルエステラーゼ遺伝子破壊株の機能解析

水谷治, 柿菌ダララット, 韓錦順, 高橋徹, 山田修 (酒総研)

焼酎製造, 特に原料に芋を用いた場合に, 微量のメタノールが含まれてしまうことが経験上知られている。焼酎のメタノール濃度において, わが国の食品衛生法では製品あたり 1,000 mg/L 未満とされており, 全く問題となっていないが, 台湾の輸入基準では 100% エタノールあたり 1,000 mg/L 以下と設定されており, 芋焼酎においては輸出ができない場合も想定され, 解決しなければならない問題となっている。メタノールは原料である芋に含まれるペクチンを基質として焼酎麹菌が産生するペクチンメチルエステラーゼ (Pme) の関与によって生成する。本研究では, Pme に焦点をあて, その低減方法について検討を行うことを目的としている。

焼酎麹菌 (*A. luchuensis*) のゲノムデータベースより, *A. oryzae* の PmeA と相同性を示す遺伝子を見出し, *pmeA, B, C* と命名した。これら遺伝子のメタノール生成活性調べたところ, PmeA, B において, ペクチンを基質としてメタノール生成活性を有している事が明らかとなった。また, *pmeA, pmeB* の単独破壊及び二重破壊を行い, メタノール生成活性を調べた結果, *pmeA* を破壊することで親株と比較して, 有意に減少することを見出した。続いて, 実際の芋焼酎においてもメタノールが低減化されるかを明らかにするために, 各破壊株の米麹を用いた芋焼酎小仕込み試験を行った。その結果, 各破壊株麹で醸造した芋焼酎のエタノール濃度は親株とほぼ同等であったのに対し, メタノール濃度は *pmeA* 単独破壊株及び *pmeApmeB* 二重破壊株で大きく減少することが明らかとなった。

Characterization of the deletion mutants of pectin methylesterase genes in *Aspergillus luchuensis*.

Osamu Mizutani, Dararat Kakizono, Jin Shun, Toru Takahashi, Osamu Yamada (NRIB)

O-2 (P-12)

糸状菌におけるリボソームペプチド生合成経路の発見

梅村舞子¹, 長野希美², 小池英明¹, 玉野孝一¹, 阿部敬悦³, 新家一男⁴, 浅井潔⁵, 町田雅之¹ (¹産総研・生物プロセス, ²産総研・ゲノム情報, ³東北大・農, ⁴産総研・バイオメディカル, ⁵東大・新領域)

ウスチロキシン B は植物病原菌である *Ustilagoidea virens* によって産生されることが知られるペプチド性の二次代謝物質で, Tyr-Ala-Ile-Gly (YAIG) からなる環状ペプチドに非リボソーム性アミノ酸であるノルバリンが修飾された構造を持つ。この度 *Aspergillus flavus* においてもウスチロキシン B が産生されることを見出し, その生合成遺伝子群を同定したところ, 環状ペプチド部分がそのまま遺伝子配列に書き込まれたリボソームペプチドであることが明らかになった (Umemura et al., 2014)。これはキノコ *Amanita* での 1 例を除いて, 糸状菌で初めてのリボソームペプチド生合成経路の報告である。さらにその設計図といえる前駆体タンパク質では環状ペプチドのアミノ酸配列 YAIG を含むコアペプチドが 16 回繰り返しており, 他に類を見ない特徴的なリボソームペプチド生合成経路である (RiPS 経路とする)。 *A. flavus* におけるウスチロキシン B の生合成遺伝子クラスターは 15 個の遺伝子からなる。その各々の破壊株を作成し, 特徴的に蓄積する代謝中間体を解析することで, 環状化に必要な遺伝子等が明らかになりつつある。それらの結果について報告する。

Umemura et al., *Fungal Genetics and Biology*, 68: 23-30 (2014); 本研究は, 経済産業省委託事業「革新的バイオマテリアル実現のための高機能化ゲノムデザイン技術開発」の一部として実施された。

Discovery of novel ribosomal peptide biosynthetic pathway in filamentous fungi

Myco Umemura¹, Nozomi Nagano¹, Hideaki Koike¹, Koichi Tamano¹, Keietsu Abe², Kazuo Shin-ya¹, Kiyoshi Asai³, Masayuki Machida¹

(¹AIST, ²Tohoku Univ., ³Univ. Tokyo)

O-3 (P-6)

麹菌 hydrophobin RolA とポリエステル間の相互作用における Cys7-Cys8 ループの関与

田中拓未 (東北大院・農), 金允卿 (東北大院・農), 田邊弘毅 (東北大院・農), 上原健二 (東北大院・農), 大類景子 (東北大院・農), 高橋徹 (東北大院・未来研), 阿部敬悦 (東北大・未来研)

hydrophobin は糸状菌に広く保存されている界面活性タンパク質であり, 8つの保存された Cys 残基を持つ。Cys3-Cys4 ループ及び Cys7-Cys8 ループは疎水面を形成し, 疎水性表面への吸着に関与していると考えられている。生分解性ポリエステル polybutylene succinate-co-adipate (PBSA)を含む液体培地で麹菌 *Aspergillus oryzae* を培養すると, PBSA への吸着性を持つ hydrophobin RolA と, PBSA 分解酵素であるクチナーゼ CutL1 を分泌する。RolA は PBSA に吸着した後構造変化し, CutL1 をリクルートすることで PBSA 分解を促進する。

本研究において, 我々は PBSA への RolA 吸着キネティクスを, プルダウンアッセイ及び Quartz Crystal Microbalance(QCM)によって解析した。また, RolA の疎水性ループ中に存在する疎水性アミノ酸残基を, 親水性アミノ酸の Ser に置換した変異体を作製し, PBSA に対する吸着キネティクスを解析した。Cys7-Cys8 ループ中の Leu137, Leu142 を置換した RolA 変異体では, 野生型 RolA と比較して PBSA への吸着速度または最大吸着量が低下したことから, この 2つの残基が PBSA への吸着に重要であり, Cys7-Cys8 ループが吸着に主に関与することを示唆した。現在, Cys7-Cys8 ループ中の荷電性アミノ酸を疎水性アミノ酸である Ala に置換した変異体を用い, Cys7-Cys8 ループ中に存在する荷電が PBSA への吸着に及ぼす影響を調べている。

Involvement of C7-C8 loop of *Aspergillus oryzae* hydrophobin RolA in interaction between RolA and a polyester.

Takumi Tanaka (Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ.), Yoonkyung Kim (Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ.), Hiroki Tanabe (Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ.), Kenji Uehara (Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ.), Toru Takahashi (NICHe., Tohoku Univ.), Keietsu Abe (NICHe., Tohoku Univ.).

O-4 (P-18)

麹菌細胞工場を用いた L-および D-乳酸の生産

笹倉直也¹, 若井暁², 浅井菜々実², 荻野千秋¹, 堤浩子³, 秦洋二³, 近藤昭彦¹ (¹神戸大・工, ²神戸大・自然科学, ³月桂冠・総研)

【目的】本研究の目的は, 麹菌 *Aspergillus oryzae* を用いたデンプンからの L-および D-乳酸の生産である。乳酸は, 従来のプラスチック等に替わるバイオプラスチックであるポリ乳酸の原料となる。L 体と D 体が混合されたステレオコンプレックス型ポリ乳酸は耐熱性が高く, そのため, L-および D-乳酸両方の需要が伸びてきている。麹菌は細胞外に著量のアミラーゼを分泌するのでデンプン分解能が高く, デンプンからの乳酸生産の有用なホストの一つと考えられる。

【結果および考察】*A. oryzae* のゲノム上の lactate dehydrogenase (LDH) 遺伝子を欠失させ, 乳酸生産能が高い牛由来 LDH を導入し, 創成した形質転換麹菌 *A. oryzae* LDHΔ87I は, 100 g/L 可溶性デンプンから約 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。また, 上記とは別に *A. oryzae* に, 三種の微生物由来 D-lactate dehydrogenase 遺伝子の形質転換を行った。創成した形質転換体の一株は, 100 g/L デンプンから 23 g/L の D-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 D 体であった。

以上, 麹菌を用いることでデンプンからの L-および D-乳酸の生産に成功した。一方で, その生産量はグルコースからの生産量と比べて低い。今後は, 代謝改変等により生産効率の向上を目指すと共に, デンプンだけでなくセルロースバイオマスからの L-および D-乳酸生産を目指す。

Production of L- and D-lactate in *Aspergillus* cell factory

Naoya Sasakura¹, Satoshi Wakai², Nanami Asai², Chiaki Ogino¹, Hiroko Tsutsumi³, Yoji Hata³, Akihiko Kondo¹

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

O-5 (P-48)

白色腐朽菌によるリグニン生分解に必要な遺伝子の同定にむけた基盤整備

中沢 威人¹, 宮崎 安将², 本田 与一¹ (¹京大・農, ²森林総研)

担子菌門に分類される白色腐朽菌は、超難分解性高分子リグニンを単独で生分解（無機化）可能な地球上唯一の生物である。長年、そのリグニン生分解に関わる酵素群の研究は盛んに行われてきた。近年では、各種オミックス解析が盛んに行われ、白色腐朽菌に関する生態・進化など各方面で興味深い知見が得られ始めている。しかし今日に至っても、なぜ白色腐朽菌がリグニンを生分解できるのか・それを可能にしている主要要素は実際何なのか、特に遺伝子レベルでは上記肝心な点が不明なままである。そこで本研究では、白色腐朽菌ヒラタケを用いた順遺伝学（リグニン生分解に必要な遺伝子の同定）を通じて、上記の謎に迫ることを目標としている。本発表では、その実現のために行った種々の検討結果について報告する。

本研究では検討実験として、リグニン生分解能と相関を示す色素（基質）脱色能を指標とした突然変異体スクリーニングを行った。ゲノム解読され、交配可能なモノカリオン PC9・PC15 間の F₁ 子孫において、安定的に脱色能を保持する基質・培養条件を決定した後、PC9 株に対して UV 変異を導入した。結果、約 150 株に 1 株の割合で基質脱色不全をきたす突然変異体が再現よく分離できた。次に、PC9・PC15 間における特定のゲノム配列差異を、PCR によって簡便かつ効率的に識別できる実験系を確立した。F₁ 分析において、変異表現型が単一遺伝子の変異に起因すると示唆された突然変異体 B84×PC15 間の F₁ 子孫集団を、上記 PCR による遺伝解析に供した。結果、特定のゲノム領域が、変異表現型と強く連鎖して分配されることを見いだした（PC9×PC15 では、そうではなかった）。以上を踏まえて現在は、ゲノム・リシーケンスを通じた変異箇所の特定、そして推定変異遺伝子の相補実験によって、原因変異遺伝子を特定することを試みている。

Forward Genetics in the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*: Towards understanding molecular mechanisms underlying wood decay

Takehito Nakazawa¹, Yasumasa Miyazaki², Yoichi Honda¹ (¹Kyoto Univ., ²FFPRI)

O-6 (P-54)

糸状菌が細胞外に分泌する β-マンナン分解に関与する新規タンパク質の解析

金子優平¹, 石原紗彩那¹, 望月麻衣¹, 山本竜也¹, 前林正弘¹, 大場正春¹, 小林哲夫², 志水元亨¹, 加藤雅士¹ (¹名城大・農, ²名大院・生命農)

[目的] β-マンナンは様々な植物に含まれる難分解性多糖で、未利用バイオマスの一つであるため、バイオエタノールの原料などとして注目を集めている。我々は、β-マンナンのみを唯一の炭素源として糸状菌 *Aspergillus nidulans* を生育させた際に、*endo*-1,4-β-マンナーゼと共に細胞外に多量に生産される機能未知タンパク質 (HP) を同定した。HP は既知のタンパク質と全く相同性を有しておらず、推定される機能ドメインも含まれていなかった。本研究では、糸状菌による β-マンナン分解における HP の役割を明らかにすることを目的とした。

[結果および考察] *hp* 遺伝子破壊株 (Δ HP 株) を作製し、β-マンナンを唯一の炭素源とした培地で生育させたところ、野生株と比較して生育が抑制された。グルコース、セルロースなどを唯一の炭素源とした場合、野生株と同様に生育したことから、HP はβ-マンナンの分解に関与すると考えられた。また、精製したリコンビナントおよびネイティブの HP を用いて解析したところ、HP は、ゲル化した β-マンナンの主鎖を加水分解せずに β-マンナン溶液の粘度を大きく低下させた。さらに、HP と *endo*-1,4-β-マンナーゼを混合すると、β-マンナーゼによる β-マンナンの分解が促進された。これらのことから、HP は β-マンナン分子間の水素結合を切断し、繊維構造を緩める働きを持つエクспанシン様の機能を有していることが考えられた。

本研究の一部は生研センター「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。

Novel protein involved in β-mannan degradation from filamentous fungus *Aspergillus nidulans*

Yuhei Kaneko¹, Saaya Ishihara¹, Mai Mochizuki¹, Tatsuya Yamamoto¹, Masahiro Maebayashi¹, Masaharu Ohba¹, Tetsuo Kobayashi², Motoyuki Shimizu¹, Masashi Kato¹ (¹Meijo Univ., ²Nagoya Univ.)

O-7 (P-76)

出芽酵母・糸状菌での植物-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)

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、エチレンによってその HK 活性が制御される。本研究では、この植物由来のエチレン結合ドメインと酵母唯一の HK である ScSln1p 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 AnTcsB に加え、浸透圧感受に関係する AnNikA のヒスチジンキナーゼドメインと融合した HK をそれぞれ設計し、エチレン応答性の HK に機能改変した分子の造成を試み、酵母・糸状菌での HK 機能相補性とエチレン応答性について検証した。これまでに発芽酵母 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、ScSln1p および AnTcsB の融合 HK が ScSln1p の HK 活性を相補することを確認した。また、融合 HK を導入した株ではエチレン処理で生育の抑制と HOG 経路の制御が認められたことより、エチレン応答性を確認した。加えて、AnNikA の融合 HK についても同様に HK 機能相補性とエチレン応答性を確認し、浸透圧刺激の感受に重要とされる HAMP ドメインの機能が融合 AnNikA に維持されていることを確認した。現在、発芽酵母において HK 機能相補性を確認した融合 HK について糸状菌での発現系を構築し、解析を進めている。(本研究は、生研センターイノベーション創出基礎的研究推進事業と農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業の支援を受けて行われたものである。)

Functional complementation and ethylene response of plant-fungal fusion histidine kinase in budding yeast and filamentous fungi.

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

(¹NICHE., Tohoku Univ., ²Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku, Univ., ³Univ. of Gothenburg)

O-8 (P-64)

Functional binding characteristics of ManR/ClrB to regulate cellulase and mannanase production in *Aspergillus nidulans*

Nuo Li, Emi Kunitake, Kyoko Kanamaru, Makoto Kimura, Tetsuo Kobayashi
(Grad. Sch. Bioagric. Sci., Nagoya Univ.)

ManR in *Aspergillus oryzae* and ClrB in *A. nidulans*, which are orthologous to each other, were identified independently as transcriptional activators involved in mannanase and cellulase genes. Cellulase genes are under control of not only ManR/ClrB but also McmA that contributes to activation of cellulase genes via recruiting ManR/ClrB to CeRE (Cellulose Responsive Element). In the case of mannanase genes, McmA is generally not required. It has been shown that ManR binds to the promoter region of *mndB* that encodes β -mannosidase without assistance of McmA.

To identify the functional binding site for ManR *in vivo*, DNA fragments of three binding sites (CGGN₈CCG) on the *mndB* promoter were independently fused to the coding region of *A. oryzae* α -amylase gene (*taaG2*) and integrated at the *argB* locus of *A. nidulans* genome. The transformants that exhibited highest amylase activity in response to cellulose carried the sequence CGGAGCGAAACCCG that located at -547 ~ -560 relative to the translation start site of *mndB*, which indicated that this region works as the recognition site of ManR *in vivo*. Meanwhile, the recognition sequence of ManR on the promoter of the endoglucanase gene *eglB* was examined *in vitro* by supershift assay. The ManR-Mcma binding site of *eglB* consists of two overlapped CeRE in the opposite direction (CCGN₂CCN₆GGN₂CGG). Mutation of CCG and CGG led to stronger binding of McmA and loss of McmA assisted ManR binding. This implies that ManR binding to CeRE is supported by interaction with McmA as well as the CGG triplet. All above discoveries will help to understand the binding property of ManR that involved in regulatory function.

This work was supported by the Program for Promotion of Basic and Applied Researches for Innovations in Bio-oriented Industry and the Science and technology research promotion program for agriculture, forestry, fisheries and food industry

O-9 (P-62)

麴菌の転写因子 FlbC は固体培養特異的発現を示すグルコアミラーゼ遺伝子 (*glaB*) の発現を制御する

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

麴菌の固体培養特異的に生産されるグルコアミラーゼ *GlaB* は、菌糸成長阻害条件、低水分活性条件、高温培養条件という3条件によりプレート培養でも誘導生産が可能である。この条件を満たす培養条件として、50%マルトースを含む寒天培地(低水分活性)に載せたナイロン膜上(菌糸成長阻害)で麴菌を培養し、ナイロン膜に分泌吸着された *GlaB* を抗体反応で再現性高く検出することに成功した。この方法を用いて転写因子破壊株ライブラリー434株のスクリーニングを行い、選抜した19株について小麦ふすまを用いた固体培養を行い、グルコアミラーゼ活性と α -アミラーゼ活性を測定した。その結果、 α -アミラーゼ活性に対するグルコアミラーゼ活性が *glaB* 破壊株と同程度まで低下した株が1株得られた。この株は分生子形成に関わることが報告されている C_2H_2 型転写因子 FlbC の遺伝子破壊株であったことから、FlbC と同様の経路で機能する他の転写因子破壊株について *GlaB* 生産を調べたが、顕著な生産低下は認められなかった。さらに、*GlaB* と同様に固体培養で特異的に生産されるプロテアーゼとチロシナーゼを測定したところ、*flbC* 破壊株では酸性プロテアーゼ活性の低下がみられ、FlbC は *GlaB* の発現だけでなく酸性プロテアーゼ遺伝子の発現にも関与する可能性が示唆された。(本研究は「農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業」の支援を受けて行われた。)

The *Aspergillus oryzae* transcription factor FlbC involved in the expression of the *glaB* gene specifically expressed in solid-state culture

Midori Yoshimura, Mizuki Tanaka, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi

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

O-10 (P-74)

Aspergillus aculeatus における dipeptidyl peptidase 4 の機能解析

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)

我々は、*A. aculeatus* T-DNA 挿入変異株ライブラリーから単離したセルロース誘導能欠損株において、dipeptidyl peptidase 4 (*dpp4*) 遺伝子が破壊されていることを見いだした。*A. aculeatus* DPP4 は *A. fumigatus* 及び哺乳類の DPP4 とそれぞれ 67%, 31% の相同性を有しており、DPP4 は生物において広く保存されている酵素である。哺乳類 DPP4 は、ペプチドホルモンの N 末端側から 2 番目の Pro または Ala の C 末端側を切断することで様々なシグナル伝達を制御している。*Aspergillus* には、*dpp* 遺伝子が 4 種存在するがいずれの酵素も生理機能に関する報告はない。そこで我々は、糸状菌における DPP4 の機能を解明することを目的として研究を進めている。

新たに作出した *dpp4* 破壊株 ($\Delta dpp4$) において cellobiohydrolase I 遺伝子等のアビセルやセロビオースにより誘導される遺伝子の発現は、誘導初期に限定的に減少していた。一方、xylanase Ib 遺伝子等のキシランやキシロースにより誘導される遺伝子の発現量は変化していなかったことから、DPP4 はセルロース誘導の制御に関与していることが示された。次にコントロール株、 $\Delta dpp4$ 、*dpp4* 高発現株 (*dpp4*-OE) における DPP 活性を Gly-Pro-pNA を基質に用いて測定した結果、*dpp4*-OE において有意に DPP 活性が上昇していた。また、 $\Delta dpp4$ ではコントロール株と比較して菌体破碎後の可溶性画分の活性には大きな違いがなかったが、菌体残渣の Triton X-100 可溶性画分では約 2/3 に低下していることが認められた。このことから、DPP4 が膜に結合していることが推測されたため、現在 DPP4 の局在解析を行っている。また、 $\Delta dpp4$ 、*dpp4*-OE における形質の変化も現在解析中である。

Functional analysis of dipeptidyl peptidase 4 in *Aspergillus aculeatus*

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

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

O-11 (P-37)

Maintenance of active directional growth by perpetual assembly and disassembly of polarity sites

Norio Takeshita^{1,4}, Yuji Ishitsuka², Natasha Savage³, Yiming Li², Anna Bergs¹, Daria Kohler², Rebecca Donnelly³, G. Ulrich Nienhaus², Reinhard Fischer¹ (¹Dept. of Microbiology, Inst. for Applied Bioscience, ²Inst. for Applied Physics, Karlsruhe Institute of Technology (KIT). ³Dept. of Functional and Comparative Genomics, Inst. of Integrative Biology, Univ. of Liverpool. ⁴Univ. of Tsukuba, Faculty of Life and Environmental Sciences.)

Polar cell extension depends on spatially very defined insertion of new membrane. In filamentous fungi, like *Aspergillus nidulans* hyphal tips (3 μm in diameter) extend with speeds of 0.3 – 1.0 μm per min, which means an increase of the membrane surface of $0.9\pi - 3\pi \mu\text{m}^2$ per min. Given that secretory vesicles are about 40 nm in diameter, massive exocytosis of about 600 – 2000 vesicles per min is required to ensure sufficient membrane supply even in the case that endocytosis is ignored. On the other hand, secretion at the hyphal tip depends on the exact positioning of landmark or cell-end marker proteins, anchored in the membrane. The active exocytosis in filamentous fungi has a potential to diffuse membrane associated polarity markers but they can maintain the polarity to form hyphae. Here, we discovered a mechanism how polar growth can be maintained despite the continuous, massive disturbance of cell-end marker positioning caused by membrane insertion. In *A. nidulans* the cell-end marker protein TeaR reaches the tip through microtubule- and actin-dependent transport. Once at the tip, TeaR recruits other proteins among which is the actin forming formin SepA. Thus the actin cytoskeleton assembles at the site of TeaR, and delivers more TeaR to this site. This positive feedback loop causes increased secretion, local membrane extension, but also dilution of the cell-end markers. To solve the contradiction, the polarity is reconstructed by microtubules repeatedly in addition the cell growth, membrane extension, occurs in a fluctuation manner. The localization and dynamic behavior of TeaR is investigated by super-resolution microscopy technique PALM (photoactivation localization microscopy).

O-12 (P-38)

分泌酵素生産に関与する *Aspergillus nidulans* SunA の機能解析

船山あずみ, 金丸京子, 木村真, 小林哲夫 (名大院・生命農学)

【目的】 AHP1102 はアミラーゼ, セルラーゼ, プロテアーゼなど分泌酵素の生産性が向上した変異株であり *sunA* 遺伝子は本変異を相補する。*A. fumigatus* において SunA のオルソログ Sun1 は細胞壁 β -1, 3-glucan に作用する酵素であることが近年示されている。本研究では SunA の機能, そして分泌酵素生産性に与える影響を解析した。

【方法・結果】 まず AHP1102 における *sunA* 遺伝子上の変異を同定した。その結果, この変異はクロモソーム I の *sunA* のプロモーター領域とクロモソーム VIII の AN0430 構造遺伝子内との組み換えにより生じたことが明らかとなった。SunA が分泌酵素生産性に影響を与えることを確認するため, 破壊株, 高発現株を作製した。破壊株では AHP1102 と同様に分泌酵素の生産性向上がみられたが, 高発現株では有意な影響は見られなかった。また, 菌体外タンパク質を SDS-PAGE で比較すると, 破壊株では野性株に比べ多様なタンパク質が菌体外に存在することが明らかとなった。SunA が細胞形態に与える影響を顕微鏡観察したところ, 破壊株では菌糸の形状がいびつになるなどの異常がみられた。更には細胞壁に作用する化学物質である Calucofluor white, Congo red などに対する破壊株の感受性を野性株と比較したところ, 破壊株では感受性を示した。これらのことから SunA の細胞壁合成・分解への関与が示唆された。一方で細胞壁の恒常性に関与する転写因子, 情報伝達因子と *sunA* 遺伝子発現との関係を検討したが, *nikA*, *mpkA*, *rlmA* いずれの破壊も *sunA* の発現に影響を与えなかった。

Functional analysis of *Aspergillus nidulans* SunA involved in extracellular enzymes production

Azumi Funayama, Kyoko Kanamaru, Makoto Kimura, Tetsuo Kobayashi

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

O-13(P-40)

糸状菌ミトコンドリアの機能へのヒスチジンキナーゼ HysA の関与

林早紀, 小島憲介, 金丸京子, 木村真, 小林哲夫 (名大院・生命農)

糸状菌の環境応答には、生物に広く保存された His-Asp リン酸リレー情報伝達機構が重要な役割を担っていることが知られている。このシステムでは、環境センサーであるヒスチジンキナーゼ (HK) からのリン酸基転移によって情報が細胞内に伝達される。以前われわれは、モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* の HK 破壊株 (13 種類) における活性酸素種 (ROS) の発生を観察し、HysA の破壊株において ROS の発生レベルが高いことを見いだした。

酸素呼吸を行う生物では、ミトコンドリアの電子伝達系で ROS が発生することが知られている。ミトコンドリアが正常な際には ROS を無毒化することが可能だが、ミトコンドリアが機能を失うと発生した ROS が細胞内に蓄積し、タンパク質や DNA にダメージを与える。*hysA* 破壊株において発生した ROS は、ミトコンドリア機能の変化によって発生蓄積した可能性が考えられた。そこで、*hysA* 破壊株を 3 日間培養し、膜電位の生じた活性化ミトコンドリアを検出する蛍光色素、Mito Tracker Red で染色し、顕微鏡下で観察した。その結果、破壊株では、活性化ミトコンドリアが分生子柄において偏って局在していた。ROS の発生は分生子柄において最も強く観察されることから、この偏りが ROS 発生の原因であることが考えられた。本研究では、緑色蛍光タンパク質 GFP を用いた HysA の局在解析の結果も併せ、情報伝達因子である HysA がどのように糸状菌ミトコンドリアの機能に関与するか考察する。

Possible involvement of Histidine kinase HysA in mitochondrial function of *Aspergillus nidulans*

Saki Hayashi, Kensuke Kojima, Kyoko Kanamaru, Makoto Kimura, Tetsuo Kobayashi

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

O-14 (P-32)

麹菌 *A. oryzae* における光依存性の分生子形成抑制メカニズムに関する解析

Helge M. Dietrich, 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)

麹菌 *Aspergillus oryzae* における分生子形成は、種麹造りや菌株の植菌・保存などの産業的利用に影響する重要な過程である。我々は以前、光によって *A. oryzae* の分生子形成が抑制されることを報告した¹⁾。一方で、*Aspergillus nidulans* などで報告されているように、光がストレスとなって分生子形成が促進されるのが一般的であると考えられるが、*A. oryzae* の応答はこれとは正反対である。*A. oryzae* が家畜化される際に、暗い屋内の種麹造りで分生子を多く形成する株が選択されてきた可能性が考えられるが、その分子メカニズムは不明であった。今回は、照射する光の波長を選択できる LED 光源を使用することにより、*A. oryzae* が光に応答して分生子形成を抑制するメカニズムに関して解析を行った。

青色光および赤色光照射条件で *A. oryzae* RIB40 株の培養を行い、分生子の形成効率について調べた。その結果、青色光照射による分生子形成の抑制が見られたが、赤色光では光の影響は観察されなかった。このことから、光による分生子形成の抑制は青色光に依存することが示された。この光応答のメカニズムを解析するため、*A. oryzae* ゲノムデータベースより、*A. nidulans* の青色光受容体 *LreA* と赤色光受容体 *FphA* に相同なタンパク質をコードする遺伝子を見だし、それぞれ *AolreA*, *AofphA* と命名した。遺伝子破壊株を作製した結果、*AolreA* 破壊株において青色光による分生子形成の抑制が見られなくなった。一方で、*AofphA* 破壊株では、野生型株と同様に青色光により分生子形成が抑制された。したがって、*A. nidulans* の *LreA* と *FphA* は光に応答し、協調して分生子形成を促進するのに対し²⁾、*A. oryzae* では *AolreA* のみが光依存的に分生子形成を抑制し、*AofphA* はこの過程に関与しないことが明らかになった。

1) Hatakeyama *et al.* (2007) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71:1844-9. 2) Purschwitz *et al.* (2008) *Curr. Biol.* 18:255-9.

Investigation of light-dependent repression of conidiation in *Aspergillus oryzae*

Helge M. DIETRICH, Yuki TANAKA, Feng Jie JIN, Jun-ichi MARUYAMA, Katsuhiko KITAMOTO

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

O-15 (P-33)

カーボンカタボライト抑制制御因子 CreA は活性化条件において安定化する

田中瑞己, 新谷尚弘, 五味勝也 (東北大院農・生物産業創成)

糸状菌のカーボンカタボライト抑制は、 C_2H_2 型転写因子 CreA によって制御されることが知られている。*Aspergillus nidulans* では、カーボンカタボライト抑制に関わる他の因子としてユビキチン化や脱ユビキチン化に関与する因子が同定されており、これらが CreA の分解に関与する可能性が指摘されている。しかし、CreA の安定性についてはほとんど知見がない。本研究では、チアミン添加により発現抑制可能な *thiA* プロモーター制御下で 3FLAG タグ融合 CreA を麹菌で発現させ、様々な炭素源存在下における CreA の安定性を解析した。

前培養した 3FLAG タグ融合 CreA 発現株の菌体をチアミン添加培地に移して発現を抑制させた後、各種炭素源を添加し、経時的に CreA タンパク質量を調べた。その結果、炭素源を加えない場合やマルトース、フルクトース、キシロース、グリセロールを添加した場合には CreA は急速に分解された。一方、グルコースやマンノースを添加した場合には CreA が著しく安定化した。各種炭素源のカーボンカタボライト抑制への関与を調べるため、デンプン培地に各種炭素源を混合し、ハロー形成能を比較した。その結果、グルコースとマンノースを添加した場合に野生株のハロー形成能が *creA* 破壊株と比較して著しく抑制された。以上の結果から、CreA はカーボンカタボライト誘導条件において安定化されることが示唆された。現在、CreA の細胞内局在やユビキチン・脱ユビキチン化関連因子の CreA 安定性への関与について解析を行っている。本研究は「農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業」の支援を受けて行われた。

Stabilization of carbon catabolite repression regulator CreA under the activation condition in *Aspergillus oryzae*.

Mizuki Tanaka, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi

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

O-16 (P-83)

メロテルペノイド anditomin 生合成の全容解明

松田侑大, 淡川孝義, 脇本敏幸, 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 variegator* の産生する anditomin は、特異な分子内架橋構造を有しており、その生合成の分子基盤に興味を持たれる。我々は、昨年度の本会にて anditomin 生合成遺伝子クラスターの同定を報告した。これまでに、生合成初期段階を担う 5 つの酵素の機能解析を行い、五環性の分子骨格を有する生合成中間体（化合物 **1**）の単離に成功している。今回新たに、本遺伝子クラスターのコードする 7 つの修飾酵素の機能解析を行い、anditomin 生合成の分子基盤解明を目指した。

化合物 **1** 以降の生合成経路を予測することは困難であったため、異種糸状菌 *Aspergillus oryzae* にて種々の組み合わせの修飾酵素発現系を構築し、得られた形質転換体に **1** を投与後、その代謝物を分析することで、各修飾酵素の機能ならびに生合成経路を推定した。各生合成中間体の単離、構造決定にあたっては、化合物 **1** の合成に関わる 5 つの遺伝子も合わせて発現する系を順次構築した。加えて、一部酵素については大腸菌にて大量発現、精製後 *in vitro* の試験に供した。以上により、anditomin の全生合成経路の解明に成功した。本生合成においては、Fe(II)および α -ケトグルタル酸依存型ジオキシゲナーゼ AndA が二段階の反応を触媒し、特異な bicyclo[2.2.2]octane 骨格形成を担うことが判明した。また、生合成の最終段階では、やはりジオキシゲナーゼである AndF が酸化的転位反応により anditomin の分子骨格を与えることを見出した。

Complete biosynthetic pathway of fungal meroterpenoid anditomin

Yudai Matsuda, Takayoshi Awakawa, Toshiyuki Wakimoto, Ikuro Abe

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

O-17 (P-86)

糸状菌 *Aspergillus nidulans* による土壌フミン酸の構造変化

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、植物リグニン等に由来する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、自然界では生物的または非生物的に分解されることによって地球上の炭素循環の維持に貢献している。しかしながら、一部の細菌や白色腐朽菌を除いた菌類とフミン酸との相互作用についてはほとんど未解明である。本研究室では、これまでに、*Aspergillus nidulans* の DNA マイクロアレイ解析から、フミン酸の添加によって本菌の複数の酸化酵素遺伝子の発現が上昇することを見出してきた (2013 度, 本コンファレンス発表 P-22)。

そこで、本研究では、*A. nidulans* の培養に伴うフミン酸の構造変化の解析を試みた。*A. nidulans* は培養に伴って培地中のフミン酸を吸着した。菌に吸着したフミン酸と培養液中のフミン酸をそれぞれ回収し、フーリエ変換型赤外分光解析 (FTIR) を行ったところ、どちらも脂肪族、アリルエーテル、フェノールの増加が観察された。培養後の培養液中のフミン酸の固体 ^{13}C NMR より、カルボキシ基とメトキシ基の増加が、電位差滴定による官能基分析より、カルボン酸とフェノールの含量が増加することが示された。また、ゲルろ過分析により、培養に伴ってフミン酸が高分子化することが明らかとなった。以上のことから、フミン酸は発現誘導された *A. nidulans* の酸化酵素群の働きによって酸化重合されていると考えられた。フミン酸の添加によって顕著に誘導される Flavin-containing monooxygenase (AN10582) の遺伝子破壊株を作製して培養後のフミン酸の FTIR 解析を行ったが、官能基の変化は野生型株と変わらなかった。現在、フミン酸の酸化に関わる遺伝子の特定を試みている。

Structural changes of soil humic acid by the fungus *Aspergillus nidulans*

Nami Nakazawa, Ken-Ichi Oinuma, Naoki Takaya

(Faculty of Life and Environmental Sciences, Univ. of Tsukuba)

O-18 (P-92)

化合物アレイを用いたメラニン生合成阻害剤探索

本山高幸^{1,2}, 田中陽子², 長田裕之^{1,2} (¹理研・抗生物質, ²理研・CSRS)

【目的】イネいもち病菌の二次代謝産物メラニンは病原性に必須であるが生育には必要とされないため、生合成系の酵素は環境負荷が低い農薬の標的として注目されてきた。メラニン生合成系の 2 種類の標的酵素 (3HNR, Sdh1) に対する農薬 (MBI-R, MBI-D) が開発されてきたが、既存の農薬は耐性菌などの問題を抱えており、新たな制御薬剤の開発が求められている。我々は、天然化合物バンク NPDepo を設立し、標的タンパク質に対する結合化合物探索を超ハイスループットで行うことが可能な化合物アレイを開発してきた。今回、化合物アレイを用いた NPDepo 化合物からのメラニン生合成阻害剤探索について報告する。

【方法と結果】メラニン生合成系の標的酵素として、非還元型ポリケタイド合成酵素 (NR-PKS) Alb1, ヒドロキシナフトレン還元酵素 3HNR, シタロン脱水酵素 Sdh1 を選択した。Sdh1 については、野生型酵素 Sdh1-WT と農薬耐性型酵素 Sdh1-V75M を用いた。それぞれの標的酵素を大腸菌で発現・精製し、化合物アレイスクリーニングを行った。NPDepo の約 3 万化合物の中から、Alb1, 3HNR, Sdh1-WT, Sdh1-V75M に対してそれぞれ、21 個、21 個、4 個、8 個のヒット化合物を得た。3HNR のヒット化合物の阻害活性を解析したところ、1 化合物 (リファマイシン誘導体) が阻害活性を示した ($\text{IC}_{50}=25 \mu\text{M}$)。従来のスクリーニング法と化合物アレイによるスクリーニング法との違いについて報告する。

本研究の一部は、農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業による支援を受けた。

Chemical array screening of melanin biosynthesis inhibitors

Takayuki Motoyama^{1,2}, Yoko Tanaka², Hiroyuki Osada^{1,2}

(¹Antibiotics Lab, RIKEN, ²CSRS, RIKEN)

O-19 (P-94)

ウリ類炭疽病菌における出芽酵母ストレス応答制御因子 *WHI2* のホモログ *CoWHI2* は宿主防御応答の誘導と準活物寄生性の制御に関与する

原田 賢, 久保康之 (京府大院・生環)

昨年度の本会にて、ウリ類炭疽病菌の *CoRas2* は感染器官の形成過程にダイナミックな局在を示すことを報告した。出芽酵母の *Whisky2(Whi2)* は *Ras* の細胞内局在の制御やフォスファターゼをコードする *Psrl* と結合することにより転写因子 *Msn2* を脱リン酸化し、*STRE*(Stress response element)を有するストレス誘導遺伝子の発現を制御することが報告されている。そこで、*Ras* の時空間的な制御と感染器官の形態形成の関係について調べるために、我々はウリ類炭疽病菌における *WHI2* のホモログ *CoWHI2* に着目し、機能解析を行った。まず、*CoWHI2* が病原性や感染器官の形態形成に関与するのか、 $\Delta cowhi2$ 株を作出し、検討した。その結果、 $\Delta cowhi2$ 株のキュウリに対する病原性は野生株と比較し、低下した。また、 $\Delta cowhi2$ 株の侵入菌糸は野生株と比較し、死物寄生性様の細い形態を示した。興味深いことに、 $\Delta cowhi2$ 株は野生株と比較し、宿主植物のカロース形成を顕著に誘導した。そこで、 $\Delta cowhi2$ 株はカロース形成に関わるカロース合成酵素遺伝子の発現を誘導するのか、 $\Delta cowhi2$ 株接種葉のカロース合成酵素遺伝子の発現量を qRT-PCR を用い、経時的に測定した。その結果、 $\Delta cowhi2$ 株接種葉では野生株接種葉と比較し、早期にシロイヌナズナ *ATGSL4, ATGSL8* のホモログの発現量が増加した。このことから、*CoWHI2* によるカロース形成の誘導はこれらのカロース合成酵素遺伝子に起因する可能性が示唆された。次に $\Delta cowhi2$ 株は死物寄生様侵入菌糸を形成したことから、死物寄生菌に対し発現が増加するシロイヌナズナの *PDF1.2* のキュウリにおけるホモログ *DEFENSIN19* の発現量を qRT-PCR を用い、検討した。その結果、 $\Delta cowhi2$ 株接種葉の *DEFENSIN19* の発現量は野生株接種葉と比較し、顕著に増加した。以上から、*CoWHI2* は宿主防御応答の誘導と準活物寄生性の制御に関与することが示唆された。

***CoWHI2*, the homolog of stress response regulator *WHI2* of *Saccharomyces cerevisiae*, is involved in induction of host defense response and regulation of hemibiotrophic infection in *Colletotrichum orbiculare*.**

Ken Harata Yasuyuki Kubo (Life and Environmental Sciences, Kyoto Prefectural Univ.)

O-20 (P-104)

マイコウイルス感染による糸状菌細胞壁の構造変化

望月翔子, 鈴木信弘, 笠原紳 (宮城大・食産業・環境, 岡山大・植物研)

糸状菌 *Cryphonectria parasitica* (旧 *Endothia parasitica*) は凝乳活性を示す酸性プロテアーゼを高産生し、わが国でも古くから研究対象とされてきた糸状菌であるが、クリなどの果樹に対して胴枯病を引き起こす植物病原菌でもある。100 年余り前に日本から米国東部にもたらされた本菌が、感受性の高いアメリカグリ (American chestnut) を山野からほぼ一掃したことは植物病理学史上、特に有名である。*C. parasitica* はウイルス (マイコウイルス) 感染により菌糸成長速度や孢子形成能が低下し、病原性もほぼ消失することが知られている。また、ウイルス感染により細胞壁溶解酵素への感受性が増大するなど、細胞壁の構造が影響を受けているとの予備的知見があり、非ウイルス感染株とウイルス感染株のそれぞれの細胞壁に着目して細胞壁構成多糖の分画と定量、構成糖分析等を行った。キチン結合性の蛍光色素 Calcofluor White による *C. parasitica* 細胞壁中キチンの局在観察では、非ウイルス感染株である EP155 株、ウイルス感染株である EP713 株、CHV2/EP155 株、MyRV1/EP155 株でそれぞれ蛍光強度が変化していた。細胞壁多糖の分画実験では、非ウイルス感染株とウイルス感染株間で、キチンを含む AI 画分の質量に有意差は見られなかったが、 α -1, 3-グルカンを含むとされる AS2 画分においては、ウイルス感染株の多くで質量が減少していた。また、構成糖分析の結果より、非ウイルス感染株とウイルス感染株では、細胞壁多糖を構成する各単糖成分の比率に大きな違いは見られなかった。これらの結果より、ウイルス感染により細胞壁中の α -1, 3-グルカン量が有意に減少し、このことが病原性と関連している可能性が示唆された。

Structural changes in fungal cell wall caused by mycovirus infection.

Shoko Mochizuki, Nobuhiro Suzuki* & Shin Kasahara

(Miyagi Univ. School of Food, Agric. & Environ. Sci., *IPSR, Okayama Univ.)

Poster Session

P-1

泡盛醸造に用いられている黒麹菌の系統学的解析

塚原正俊¹, 渡久地政汰¹, 伊波朋哉¹, 東春奈¹, 大城彩音¹, 渡邊泰祐², 外山博英², 山田修³ (¹バイオジェット, ²琉球大農・亜熱生資, ³酒総研)

沖縄県の伝統酒「泡盛」は 600 年の歴史を有する日本最古の蒸留酒である。現在, 商業的泡盛醸造には, 黒麹菌として, アワモリ菌, サイトイ菌 (全ての酒造所にて 2 種混合利用), および戦前からの保存菌株を復刻した瑞泉菌 (瑞泉酒造) が用いられており, これらは安全かつ優れた醸造特性を有していることが確認されている。これらの, 泡盛黒麹菌は長い間 *Aspergillus awamori* に分類されてきた。しかしながら, *A. awamori* および *A. niger* には, 本来の分類されるべき多数の株が相互に混在している問題点が指摘・検討された結果, *A. luchuensis* という学名が認められると共に, *A. luchuensis*, *A. tubingensis*, *A. niger* の 3 種に再整理された (山田ら)。今回, 複数菌株の全ゲノム解析を行い, 泡盛醸造に用いられる黒麹菌の詳細な系統解析を行った。その結果, アワモリ菌および瑞泉菌は既報の通り *A. luchuensis* であることが示された。一方, 標準株とされている *A. saitoi* NRRL4757^T は *A. tubingensis* に分類されると報告されている。しかしながら, 泡盛醸造に用いられているサイトイ菌は, アワモリ菌および瑞泉菌と同じ *A. luchuensis* であることが明らかとなった。

Classification of black koji molds for Awamori brewing

Masatoshi Tsukahara¹, Shota Toguchi¹, Tomoya Iha¹, Haruna Azuma¹, Ayane Oshiro¹, Taisuke Watanabe², Hirohide Toyama², Osamu Yamada³ (¹Biojet, ²Univ.Ryukyu, ³NRIB)

P-2

Influence of light on growth and conidiation of *Aspergillus oryzae*

Pushpa S Murthy^{1,2}, Ken-Ichi Kusumoto², Satoshi Suzuki² (¹CSIR-CFTRI, India, ²NFRI, NARO)

Common mode of asexual reproduction in fungi is by conidiation. *Aspergillus oryzae* is able to respond to light and presence of conserved light related genes in genome sequence supports this fact. With this background, light regulation with respect to morphology, growth and sporulation of *A. oryzae* were explored. *A. oryzae* were screened on potato dextrose media and incubated at 30°C for four days illuminated under white light 10 min, a day along with control which was maintained under dark condition. The preliminary experiments resulted in the colonies with circular stripe pattern containing white and green rings which illustrated poor and rich spores and mycelia formation. The color of the colony was much heavier in the white light condition than in dark. The aerial hyphae in the light condition were much denser than those under dark conditions. *A. oryzae* strain MSL1 produced the fewest conidia under the dark condition and the most under white light, suggesting light could stimulate conidiation. Strain MSL1 exhibited 1.94 fold more asexual spores with light induction than with continuous dark. Inoculation on the surface of liquid minimal media also demonstrated the sporulation to be more prominent in case of continuous light illumination than in dark. Thus the results indicate that *A. oryzae* perceives and responds to light as a trigger of conidiation. Molecular mechanisms of photo reaction of this fungus would provide physiological significance for basic and also for biotechnological processes.

P-3

麹菌総合ゲノムデータベース (CAoGD) のデータ更新とその利用

織田健¹, 上村泰央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/>)。これまで RIB40 データについて本データベースでは、他の菌株ゲノムシーケンスのマッピング情報などは AspGD に、各種培養条件でのマイクロアレイによる発現解析情報は NRIB Ace33v2 に付与されるなど、それぞれ独立して搭載していた。そこで、各種の情報を一括して閲覧できるように、データベース間で共通して存在する遺伝子について、最新のアノテーションを元にしてデータを統合し、改善を図った。また、これまでに当研究室で麹菌の比較ゲノム解析に用いた清酒、味噌、醤油用などの 55 麹菌株のゲノムアレイの結果を搭載し、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。また、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。今後、当データベースは、プラットフォームの大規模な改築を予定しており、ユーザーの意見を反映して行く所存である。この機会に御使用頂いた上で要望や改善点などの御意見を頂ければ幸いである。

Update and use of Comprehensive *Aspergillus oryzae* Genome Database (CAoGD)

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

P-4

麹菌のアミラーゼ生産に関与する転写因子の各種炭素源における細胞内局在解析

今野友維, 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)

麹菌のデンプン分解酵素生産には、デンプン分解酵素遺伝子群を直接制御する転写因子 AmyR とマルトース取り込み系を制御する MalR の 2 種の転写因子が関与している。*A.nidulans* において、AmyR が活性化と協調的に核移行することに加え、マルトース存在下よりもイソマルトースやグルコース存在下で速やかに核移行することが報告されている (1)。麹菌においては、いずれの炭素源により AmyR と MalR の核移行および活性化が早く誘導されるのか不明である。本研究では AmyR と MalR の活性化機構を解析するため、グルコース抑制制御因子 (CreA) 破壊株における発現解析および各種炭素源培養時の sGFP-AmyR と sGFP-MalR の細胞内局在解析を行った。

各種炭素源における細胞内局在観察の結果、sGFP-AmyR は誘導基質非存在下では細胞質に存在しており、誘導基質依存的に核局在することが明らかになった。また、マルトースよりもイソマルトースが速やかに AmyR の核移行を誘導することが明らかになった。一方、sGFP-MalR は興味深いことに調べた全ての炭素源培養時において核局在していた。このことから、MalR は活性化・非活性化状態に関わらず、構成的に核局在していることが示され、誘導基質依存的に核内で何らかの修飾を受けていることにより活性化すると推定された。

本研究は生研センター「農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業」の支援を受けて行われた。

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

Intracellular localization in various carbon source of transcription factors involved in amylase production in *Aspergillus oryzae*

Yui Konno, Kuta Suzuki, Mizuki Tanaka, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi

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

P-5

麴菌界面活性タンパク質 hydrophobin RolA の疎水性表面への吸着機構の解析

永山恵美¹, 田中拓未¹, 田邊弘毅¹, 上原健二¹, 高橋徹², 有田稔彦³, 樋口剛志³, 阿部敬悦^{1,2}

(¹東北大院・農, ²東北大・未来研, ³東北大・多元研)

Aspergillus oryzae は生分解性ポリエステルである PBSA(Poly(butylene succinate-co-adipate))を唯一の炭素源として培養すると, PBSA 分解酵素の cutinase CutL1 と共に, 界面活性タンパク質である hydrophobin RolA を発現する。RolA は PBSA に吸着した後, CutL1 を PBSA 表面にリクルートすることで, PBSA の分解効率を上昇させている。hydrophobin はその界面活性特性により, 材料表面加工への応用が期待されている。その一方で, 様々な特性を有する固体表面と hydrophobin との相互作用機構や, 吸着の速度論的性質についての詳細は不明である。現在までに我々は, SAM (Self-Assembled Monolayer)化によって異なる性質の表面を作製し, その表面と RolA との親和性を QCM (Quartz Crystal Microbalance)で測定して, 固体表面の性質によって RolA 吸着の動力学的性質が異なることを見出した。QCM を用いた RolA の吸着解析では, QCM 用センサー金電極表面の均一な SAM 化が必要となる。そこで本研究では, 接触角測定と AFM (Atomic Force Microscope)を用いて, QCM 電極の SAM 化の形成状態を評価する方法の確立を目指した。接触角測定と AFM 観察により, 1-undecanethiol で作製した疎水性 SAM 化表面は均一に作製できていることが確認された。そこで現在, 均一な 1-undecanethiol SAM 化表面に対して, 異なる pH の緩衝液条件下で RolA を吸着させた表面を作製し, AFM で観察している。表面観察の結果と QCM を用いた疎水表面への RolA の親和性解析の結果を比較することで, 疎水性の固体表面に対する RolA の吸着様式・吸着機構を考察する。

Analysis of adsorption mechanism of *Aspergillus oryzae* hydrophobin RolA to hydrophobic surface.

Megumi Nagayama¹, Takumi Tanaka¹, Hiroki Tanabe¹, Kenji Uehara¹, Toru Takahashi², Toshihiko Arita³, Takeshi Higuchi³, Keietsu Abe^{1,2}. (¹Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., ²NICHe., Tohoku Univ., ³IMRAM, Tohoku Univ.)

P-6 (O-3)

麴菌 hydrophobin RolA とポリエステル間の相互作用における Cys7-Cys8 ループの関与

田中拓未 (東北大院・農), 金允卿 (東北大院・農), 田邊弘毅 (東北大院・農), 上原健二 (東北大院・農), 大類景子 (東北大院・農), 高橋徹 (東北大院・未来研), 阿部敬悦 (東北大・未来研)

hydrophobin は糸状菌に広く保存されている界面活性タンパク質であり, 8つの保存された Cys 残基を持つ。Cys3-Cys4 ループ及び Cys7-Cys8 ループは疎水面を形成し, 疎水性表面への吸着に関与していると考えられている。生分解性ポリエステル polybutylene succinate-co-adipate (PBSA)を含む液体培地で麴菌 *Aspergillus oryzae* を培養すると, PBSA への吸着性を持つ hydrophobin RolA と, PBSA 分解酵素であるクチナーゼ CutL1 を分泌する。RolA は PBSA に吸着した後構造変化し, CutL1 をリクルートすることで PBSA 分解を促進する。

本研究において, 我々は PBSA への RolA 吸着キネティクスを, プルダウンアッセイ及び Quartz Crystal Microbalance(QCM)によって解析した。また, RolA の疎水性ループ中に存在する疎水性アミノ酸残基を, 親水性アミノ酸の Ser に置換した変異体を作製し, PBSA に対する吸着キネティクスを解析した。Cys7-Cys8 ループ中の Leu137, Leu142 を置換した RolA 変異体では, 野生型 RolA と比較して PBSA への吸着速度または最大吸着量が低下したことから, この 2つの残基が PBSA への吸着に重要であり, Cys7-Cys8 ループが吸着に主に関与することを示唆した。現在, Cys7-Cys8 ループ中の荷電性アミノ酸を疎水性アミノ酸である Ala に置換した変異体を用い, Cys7-Cys8 ループ中に存在する荷電が PBSA への吸着に及ぼす影響を調べている。

Involvement of C7-C8 loop of *Aspergillus oryzae* hydrophobin RolA in interaction between RolA and a polyester.

Takumi Tanaka (Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ.), Yoonkyung Kim (Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ.), Hiroki Tanabe (Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ.), Kenji Uehara (Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ.), Toru Takahashi (NICHe., Tohoku Univ.), Keietsu Abe (NICHe., Tohoku Univ.).

P-7

麴菌 hydrophobin RolA と cutinase CutL1 間の相互作用に関与する CutL1 のアミノ酸残基

金 允卿¹, 寺内 裕貴², 田中 拓未¹, 對馬 裕誠¹, 上原 健二¹, 高橋 徹³, 阿部 敬悦^{1,2,3}

(¹ 東北大院・生物産業創成, ² 東北大・農, ³ 東北大・未来研)

Aspergillus oryzae を生分解性ポリエステルである PBSA を唯一の炭素源として培養すると, hydrophobin RolA と PBSA 分解酵素 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関与し, RolA 側の H32, K34, K41, K46, K51 と CutL1 側の E31, D142, D171 が結合に重要であることが明らかになった。しかし, QCM(Quartz Crystal Microbalance)を用いて動力的解析を行ったところ, NaCl 存在下における RolA 二重変異体(H32S/K34S)に対する CutL1 三重変異体(E31S/D142S/D171S)の結合量が NaCl 非存在時に比べ顕著に減少した。このことから, これまでに特定された部位以外にもイオンの相互作用部位が残在する可能性が示唆された。そこで本研究では CutL1 側に着目し, E31, D142, D171 以外の RolA との相互作用に関与する部位を特定し, 相互作用機構を解明することを目的とした。CutL1 立体構造モデルと CutL1 ホモログ間のアラインメント解析から相互作用に関与すると推測される負電荷アミノ酸残基を新たに選抜した。本報告では, 候補部位のうち D73 を非荷電性の Ser に置換した CutL1 一重, 四重変異体を作製し, QCM および Pull-down assay により RolA との相互作用について検証を行った。その結果, CutL1 D73 も RolA との結合に重要であり, 他の部位との多価効果により RolA との相互作用に関与することが示された。

Analysis of cutinase CutL1 amino acid residues involved in the interaction between fungal hydrophobin RolA and CutL1

Yoonkyung Kim¹, Yuki Terauchi², Takumi Tanaka¹, Yusei Tsushima¹, Kenji Uehara¹, Toru Takahashi³, Keietsu Abe^{1,2,3}

(¹ Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., ² Dept. Agric., Tohoku Univ., ³ NICHe., Tohoku Univ.)

P-8

水性二相分配法 (ATPS) による麴菌 *Aspergillus oryzae* 由来 Hydrophobin HypA の分離・濃縮システムの構築

中野宏軌, 朽方康裕, 堂前圭佑, 加瀬明日香, 中島春紫 (明治大院・農・農化)

Hydrophobin とは, 糸状菌・担子菌類の細胞表面に局在する両親媒性低分子量タンパク質であり, 基材表面に吸着して親水性を逆転させるなどユニークな性質を持つことから, さまざまな分野への応用が期待されている。しかし, Hydrophobin はきわめて吸着・重合しやすい上に再分離が困難なため, 硫安沈殿などの沈殿濃縮が不可能であり, その上ほとんどのイオン交換カラムでは吸着したまま溶出されないため, 回収・精製が非常に困難である。

筆者らは, 麴菌 *Aspergillus oryzae* から Hydrophobin をコードすると考えられる遺伝子(*hypA-D*)を単離, 各々の遺伝子について局在性や発現時期の解析を行ない, HypA/RolA が固体培養時に最も多く発現していることを観察している。

筆者らは, 麴菌 *A.oryzae* を宿主とした HypA 高発現株を液体培養し, 培養上清を回収した。非イオン界面活性剤 Triton X-114 を 3%(v/v)添加し, 静置したところ, 水相と Triton X-114 相に分離し, 単量体の HypA が Triton X-114 相に濃縮されることを見いだした。この Triton X-114 相には水分も分配されており, Triton X-114 相を分液し, イソブタノールを添加することで Triton X-114 を除去することにより, HypA の濃縮水溶液を得ることができた。さらに, 陰イオン交換クロマトグラフィー (CELLUFINE Q-500 m ;JNC Corporation) を行うことにより, 簡便な HypA の分離・濃縮に成功した。

Construction of the separation and condensation system of Hydrophobin HypA from *Aspergillus oryzae* using Aqueous two-phase system (ATPS).

Hiroki Nakano, Yasuhiro Kuchikata, Keisuke Domae, Asuka Kase, Harushi Nakajima

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

P-9

糸状菌由来の免疫回避機能性タンパク質を用いた新規医療用ナノ粒子の開発

佐藤大貴¹, 渡邊祐里絵², 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免疫応答によって肝臓などの細網内皮系に捕捉され標的組織へ到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麹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を、糸状菌の新規ステルス因子である界面活性蛋白質 RolA で被覆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 *in vitro* での 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引き起こさなかった。さらに、マウスに RolA 被覆粒子を投与したところ、肝臓への粒子蓄積が少なく生体内でもステルス能を確認できた。また、RolA 被覆粒子のゼータ電位の測定結果から、RolA 被覆粒子は生体内の pH 領域において負の電位を有しており、血中での高分散性が予想される。

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

Daiki Sato¹, Yurie Watanabe², 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-10

麹菌 *A. oryzae* のエラスターゼインヒビター様タンパク質

山下 伸雄¹, 平松穂乃花², 奥村 欣由², 小森 由美子², 打矢 恵一², 明石 貴裕¹, 小川 賢二³, 二改 俊章²
(¹白鶴酒造・研究,²名城大薬,³(独) 東名古屋病院)

我々は、日和見感染性をもつ *Aspergillus fumigatus* から新規なエラスターゼインヒビターを単離し、その構造について解明した。つぎに産業上有用な糸状菌である麹菌 *A. oryzae*RIB40 から、エラスターゼインヒビター様物質 AOEI を単離した。この物質は gene dosage 効果等による阻害活性の上昇は見られず、インヒビターの大量生産による実用化、X線構造解析等を保留した。次に *A. oryzae*RIB40 から AOEI とは異なる物質であるエラスターゼインヒビター様物質 AOEI2 を単離した。AOEI2 は部分アミノ酸配列および TOF-MS にて分子質量を分析した結果、麹菌 EST データベース(<http://www.nrrib.go.jp/data/EST2/est.htm>)にて AoEST1310 と特定された。これに該当するゲノムの ORF 配列を読んだところ、全長 750 bp で分子質量 3604.61 に比して大きく、イントロンを 6 つ含んでいた。本 ORF は繰り返し様の配列を含み、イントロンの直前は必ずグルタミン酸をコードしていた。この配列を麹菌で高発現させたところ、エラスターゼ阻害活性の増大がみられた。

Elastase inhibitor-like protein from koji mold *Aspergillus oryzae*.

Nobuo Yamashita, Honoka Hiramatsu, Yoshiyuki Okumura, Yumiko Komori, Kei-ichi Uchiya, Takahiro Akashi, Kenji Ogawa, Toshiaki Nikai

(Hakutsuru Sake brewing Co. Ltd., Meijo Univ., Higashi Nagoya National Hospital)

P-11

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。近年, オートファゴソーム形成機構について活発に研究が行われており, Atg9 が重要な役割を果たしていることが示唆されている。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り, オートファゴソーム形成の核として初期段階に機能していると考えられている。しかし, オートファゴソーム形成における Atg9 の詳細な機能は分かっていない。そこで本研究では, 糸状菌における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, 麹菌 *Aspergillus oryzae* における AoAtg9 の解析を行った。

【方法・結果】AoAtg9-EGFP およびオートファジー特異的な構造のマーカーとして mDsRed-AoAtg8 を共発現し, 局在観察を行ったところ, オートファジー誘導条件下において一部の AoAtg9 が PAS(Pre-Autophagosomal Structure), 隔離膜, オートファゴソーム膜に共局在していた。他の AoAtg タンパク質との関与を調べるため, 様々な *Aoatg* 遺伝子破壊株($\Delta Aoatg1$, $\Delta Aoatg4$, $\Delta Aoatg8$, $\Delta Aoatg15$)において AoAtg9 の局在を調べたところ, *Aoatg1* 破壊株のみにおいて AoAtg9 が PAS に凝集していた。Atg1 はセリン/スレオニンキナーゼであり, *Saccharomyces cerevisiae* において, Atg9 の Atg1 によるリン酸化がオートファゴソーム形成に必須であることが報告されている。現在, AoAtg9 の予想リン酸化部位(セリン・スレオニン残基)に対しアラニン置換変異を導入した株を作製しており, オートファジーへの影響を検討している。

Analysis of the autophagy-related membrane protein AoAtg9 in *Aspergillus oryzae*

Kohei Fujiki, Takashi Kikuma, Katsuhiko Kitamoto

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

P-12 (O-2)

糸状菌におけるリボソームペプチド生合成経路の発見

梅村舞子¹, 長野希美², 小池英明¹, 玉野孝一¹, 阿部敬悦³, 新家一男⁴, 浅井潔⁵, 町田雅之¹ (¹産総研・生物プロセス, ²産総研・ゲノム情報, ³東北大・農, ⁴産総研・バイオメディカル, ⁵東大・新領域)

ウスチロキシン B は植物病原菌である *Ustilaginoidea virens* によって産生されることが知られるペプチド性の二次代謝物質で, Tyr-Ala-Ile-Gly (YAIG) からなる環状ペプチドに非リボソーム性アミノ酸であるノルバリンが修飾された構造を持つ。この度 *Aspergillus flavus* においてもウスチロキシン B が産生されることを見出し, その生合成遺伝子群を同定したところ, 環状ペプチド部分がそのまま遺伝子配列に書き込まれたリボソームペプチドであることが明らかになった (Umemura et al., 2014)。これはキノコ *Amanita* での 1 例を除いて, 糸状菌で初めてのリボソームペプチド生合成経路の報告である。さらにその設計図といえる前駆体タンパク質では環状ペプチドのアミノ酸配列 YAIG を含むコアペプチドが 16 回繰り返しており, 他に類を見ない特徴的なリボソームペプチド生合成経路である (RiPS 経路とする)。*A. flavus* におけるウスチロキシン B の生合成遺伝子クラスターは 15 個の遺伝子からなる。その各々の破壊株を作成し, 特徴的に蓄積する代謝中間体を解析することで, 環状化に必要な遺伝子等が明らかになりつつある。それらの結果について報告する。

Umemura et al., *Fungal Genetics and Biology*, 68: 23-30 (2014); 本研究は, 経済産業省委託事業「革新的バイオマテリアル実現のための高機能化ゲノムデザイン技術開発」の一部として実施された。

Discovery of novel ribosomal peptide biosynthetic pathway in filamentous fungi

Myco Umemura¹, Nozomi Nagano¹, Hideaki Koike¹, Koichi Tamano¹, Keietsu Abe², Kazuo Shin-ya¹, Kiyoshi Asai³,

Masayuki Machida¹

(¹AIST, ²Tohoku Univ., ³Univ. Tokyo)

P-13

セルラーゼ遺伝子をマルチコピー導入した麹菌の遺伝子コピー数とセルラーゼ活性

若井 暁¹, 浅井 菜々実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】石油資源の代わりにセルロースバイオマスエネルギー・化成品原料として利用することが近年注目されている。しかしながら、そのようなバイオマスは、セルロース結晶が非常に硬く分解し辛いので、利用する上で大きな問題がある。この問題を解決するために、我々は、麹菌のタンパク質分泌生産能力を利用し、セルロース分解酵素を大量に作らせてセルロースを効率的に分解することを目指した。

【方法・結果】麹菌の選抜、導入する遺伝子の断片、遺伝子導入法を組み合わせ、様々な遺伝子組換え麹菌を作製した結果、数株のセルロース分解麹菌を取得した。得られた形質転換体について定量 PCR により導入遺伝子コピー数を測定し、比色定量法により培養上清の酵素活性を測定した。形質転換方法や導入遺伝子の前後に付加したプロモーター・ターミネーターの組み合わせの違いによって、導入遺伝子のコピー数や培養上清に分泌された酵素活性に大きな差異が見られた。

培養上清の酵素活性の差は、コピー数と正の相関があり、さらにコピー数よりもプロモーター・ターミネーターに強く依存していた。これは、複数種の遺伝子を導入して代謝の強弱を調節する代謝工学的改変を行う際に、有用な情報となる。今後は、導入遺伝子の染色体上の位置、導入遺伝子の形状、導入遺伝子数の配列依存性について解析する。

Gene copy number and enzyme activity of *Aspergillus oryzae* strains constructed by introducing cellulase genes

Satoshi Wakai¹, 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-14

比較ゲノミクスによる麹菌の異種タンパク質高生産に関与する変異遺伝子の同定

金 鋒杰, 丸山潤一, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)

麹菌 *Aspergillus oryzae* は、日本酒、醤油、味噌などの醸造食品産業においてきわめて重要な役割をもつとともに、異種タンパク質生産の宿主としても利用されている。我々は以前、*A. oryzae* のプロテアーゼ遺伝子 2 重破壊株 ($\Delta tppA \Delta pepE$) を変異処理し、異種タンパク質のモデルとしてヒト由来リゾチームを高生産する変異株 (AUT [*A. oryzae* hyper-producing strain developed in The University of Tokyo] 株) を取得した¹⁾。しかし、*A. oryzae* では有性生殖が見つかっておらず交配が適用できないため、酵母のように原因となる変異遺伝子を同定することは非常に困難であった。本研究では、リゾチーム高生産変異株の全ゲノム配列の解読を行い、比較ゲノム解析によって異種タンパク質高生産に関与する変異遺伝子の同定を行った。

リゾチーム高生産変異株 AUT1 とその親株であるプロテアーゼ遺伝子 2 重破壊株 NS-tApE について、次世代シーケンサーにより全ゲノム配列を解読し、比較ゲノム解析を行った。そのなかから、機能未知遺伝子 AO090120000003 において、アミノ酸置換をとまなう変異を 1 か所見いだした。この遺伝子は 371 アミノ酸からなる alpha/beta hydrolase fold ドメインを含むタンパク質をコードし、AUT1 株では 267 番目のグリシンがアルギニンに置換していた。この変異により異種タンパク質の高生産が再現するかを確認するため、同様の変異を導入した株を作製し、リゾチームの生産実験を行ったところ、生産量が増加することが明らかになった。さらに、この遺伝子の破壊株においてもリゾチーム生産量の増加が見られた。以上の結果より、AUT1 株の異種タンパク質を高生産する表現型に、AO090120000003 遺伝子の機能欠損が関与することが示された。

1) Nemoto *et al.* (2009) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82:1105-14.

Identification of a mutation involved in hyper-production of heterologous protein by comparative genomics in *Aspergillus oryzae*

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

P-15

麴菌におけるグルコース抑制関連因子遺伝子破壊株を宿主とした異種遺伝子高発現 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)

麴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。モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* では、広域制御型転写因子 CreA のユビキチン・脱ユビキチン化によりグルコース抑制が制御されることが示唆されており、グルコース存在下では、脱ユビキチン化酵素 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。これまでに、*creA*、*creB* 及び *creA/creB* 二重破壊株を作製し、マルトースを炭素源とした液体培地では *creA/creB* 二重破壊株において顕著に高い α -アミラーゼ活性を示すことを明らかにした。そこで本研究では、*creA/creB* 二重破壊株において α -アミラーゼをコードする *amyB* 遺伝子プロモーターを用いて異種遺伝子を高発現させることで、異種タンパク質の高生産の可能性を検討した。

amyB プロモーターの下流に異種遺伝子のモデルとして β -グルクロニダーゼ (GUS) 遺伝子を連結して発現させた。その結果、野生株を宿主とした場合と比較して、二重破壊株では GUS 活性及び GUS 遺伝子の転写量が増加したことから、*creA/creB* 二重破壊株を宿主株とした異種タンパク質の高生産が可能であることを見出した。また、分泌型酵素 β -グルコシダーゼ BglC を同様にして二重破壊株において高発現させた結果、顕著に高い β -グルコシダーゼ活性を示した。さらに、分泌型異種タンパク質の高発現・分泌生産を試みた結果についても報告する。

(本研究は「農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業」の支援を受けて行われた。)

Overexpression of heterologous genes in deletion strains of genes 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-16

麴菌細胞壁の α -グルカン合成に関わる多重遺伝子破壊株の形態および物質生産特性

張斯来, 田中瑞己, 新谷尚弘, 五味勝也 (東北大院・農・生物産業創成)

麴菌は利用出来る選択マーカーが限られているため多重遺伝子導入および破壊が困難であった。我々は、2種類の変異型 *lox* 配列で選択マーカーと条件的 Cre 発現カセットを挟んだ自己切断型選択マーカーリサイクリング用プラスミドを開発し、このシステムを利用してコウジ酸合成に関与する *kojA*、*kojT* の2遺伝子の高発現株と3種類の α -1,3-グルカン合成酵素遺伝子 (*agsA*, *agsB*, *agsC*) の単独、2重及び3重破壊株を作製することに成功している(張ら, 2013)。本研究では、このようにして得られた α -グルカン合成酵素遺伝子の破壊株について、液体培養条件下における菌体性状や酵素などの物質生産に関する特性を解析することにより二次代謝産物と異種タンパク質の高生産を目指した。

選択マーカーリサイクリングシステムを用いることにより、麴菌染色体上に存在する3種類の α -グルカン合成酵素遺伝子をいろいろな組み合わせで容易に破壊することができた。得られた破壊株は寒天培地上では野生株とほとんど差のない生育状態を示したが、液体培養時に野生株がペレット状になるのに対して、*agsB* 遺伝子を破壊した株ではパルプ状または非常に小さなペレット状の形態を示した。そこで、液体培養における形態観察を行うとともに、細胞壁の α -グルカン量の測定を行った。また、麴菌自身の α -アミラーゼや高発現させたコウジ酸などの生産量についても調べた結果を報告する。

Morphology and useful substance production of multiple gene deletion mutants for α -glucan biosynthesis in *Aspergillus oryzae*

Silai Zhang, Mizuki Tanaka, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi (Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ.)

P-17 (O-1)

黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* のペクチンメチルエステラーゼ遺伝子破壊株の機能解析

水谷治, 柿菌ダララット, 韓錦順, 高橋徹, 山田修 (酒総研)

焼酎製造, 特に原料に芋を用いた場合に, 微量のメタノールが含まれてしまうことが経験上知られている。焼酎のメタノール濃度において, わが国の食品衛生法では製品あたり 1,000 mg/L 未満とされており, 全く問題となっていないが, 台湾の輸入基準では 100% エタノールあたり 1,000 mg/L 以下と設定されており, 芋焼酎においては輸出ができない場合も想定され, 解決しなければならない問題となっている。メタノールは原料である芋に含まれるペクチンを基質として焼酎麹菌が産生するペクチンメチルエステラーゼ (Pme) の関与によって生成する。本研究では, Pme に焦点をあて, その低減方法について検討を行うことを目的としている。

焼酎麹菌 (*A. luchuensis*) のゲノムデータベースより, *A. oryzae* の PmeA と相同性を示す遺伝子を見出し, *pmeA, B, C* と命名した。これら遺伝子のメタノール生成活性調べたところ, PmeA, B において, ペクチンを基質としてメタノール生成活性を有している事が明らかとなった。また, *pmeA, pmeB* の単独破壊及び二重破壊を行い, メタノール生成活性を調べた結果, *pmeA* を破壊することで親株と比較して, 有意に減少することを見出した。続いて, 実際の芋焼酎においてもメタノールが低減化されるかを明らかにするために, 各破壊株の米麹を用いた芋焼酎小仕込み試験を行った。その結果, 各破壊株麹で醸造した芋焼酎のエタノール濃度は親株とほぼ同等であったのに対し, メタノール濃度は *pmeA* 単独破壊株及び *pmeApmeB* 二重破壊株で大きく減少することが明らかとなった。

Characterization of the deletion mutants of pectin methylesterase genes in *Aspergillus luchuensis*.

Osamu Mizutani, Dararat Kakizono, Jin Shun, Toru Takahashi, Osamu Yamada (NRIB)

P-18 (O-4)

麹菌細胞工場を用いた L-および D-乳酸の生産

笹倉直也¹, 若井暁², 浅井菜々実², 荻野千秋¹, 堤浩子³, 秦洋二³, 近藤昭彦¹ (¹神戸大・工, ²神戸大・自然科学, ³月桂冠・総研)

【目的】本研究の目的は, 麹菌 *Aspergillus oryzae* を用いたデンプンからの L-および D-乳酸の生産である。乳酸は, 従来のプラスチック等に替わるバイオプラスチックであるポリ乳酸の原料となる。L 体と D 体が混合されたステレオコンプレックス型ポリ乳酸は耐熱性が高く, そのため, L-および D-乳酸両方の需要が伸びてきている。麹菌は細胞外に著量のアミラーゼを分泌するのでデンプン分解能が高く, デンプンからの乳酸生産の有用なホストの一つと考えられる。

【結果および考察】*A. oryzae* のゲノム上の lactate dehydrogenase (LDH) 遺伝子を欠失させ, 乳酸生産能が高い牛由来 LDH を導入し, 創成した形質転換麹菌 *A. oryzae* LDHΔ871 は, 100 g/L 可溶性デンプンから約 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。また, 上記とは別に *A. oryzae* に, 三種の微生物由来 D-lactate dehydrogenase 遺伝子の形質転換を行った。創成した形質転換体の一株は, 100 g/L デンプンから 23 g/L の D-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 D 体であった。

以上, 麹菌を用いることでデンプンからの L-および D-乳酸の生産に成功した。一方で, その生産量はグルコースからの生産量と比べて低い。今後は, 代謝改変等により生産効率の向上を目指すと共に, デンプンだけでなくセルロースバイオマスからの L-および D-乳酸生産を目指す。

Production of L- and D-lactate in *Aspergillus* cell factory

Naoya Sasakura¹, Satoshi Wakai², Nanami Asai², Chiaki Ogino¹, Hiroko Tsutsumi³, Yoji Hata³, Akihiko Kondo¹

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

P-19

オレイン酸及びリノール酸高生産を目的とした *Mortierella alpina* の分子育種

阪本鷹行¹, 櫻谷英治², 安藤晃規³, 島 純⁴, 小川 順^{1,3}

(¹京大院農・応用生命, ²徳島大院・工, ³京大生理ユニット, ⁴龍谷大)

【背景】油脂は炭化水素骨格を有する高還元度化合物であり, 現有する化学工業における石油代替原料として有用である。特に, オレイン酸 (18:1 ω 9, OA) 及びリノール酸 (18:2 ω 6, LA) は水酸化物を経てナイロン6・10 ポリマーの原料であるセバシン酸へと変換可能である。糸状菌 *Mortierella alpina* は脂質を多量に蓄積する性質を有する油糧微生物であるが, その脂肪酸組成は多岐にわたる。本研究では, ニトロソグアニジン処理を行った *M. alpina* 人為突然変異株群より Δ 12 不飽和化酵素 (DS) 活性欠損株及び Δ 6DS 活性低下株を選抜し, これらの分子育種によりさらに OA 及び LA を高蓄積する変異株の誘導を試みた。

【結果】 Δ 12DS 活性欠損株群において, OA を総脂肪酸当たり 50%近く生産する OA 高生産株を選抜した。さらに, OA 高生産株において, アグロバクテリウム法を用いて Δ 6DS 遺伝子の RNAi を行った結果, ミード酸生産の低下に伴って OA 含有量が 60%を上回る分子育種株が得られた。同様に, Δ 6DS 活性低下株群より, LA が総脂肪酸当たり 25%近く蓄積する LA 高生産株を選抜した。さらに, LA 高生産株において担子菌 *Coprinopsis cinerea* 由来の Δ 12DS 遺伝子を過剰発現させることにより, OA 含有量の低下に伴って LA 含有率が 45%にまで上昇した分子育種株を得た。

Molecular breeding of *Mortierella alpina* for high-production of linoleic acid and oleic acid

Takaiku Sakamoto¹, Eiji Sakuradani², Akinori Ando^{1,3}, Jun Shima⁴, Jun Ogawa^{1,3}

(¹Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., ²Fac. Eng., Tokushima Univ. ³Res. Unit Physiol. Chem. Kyoto Univ., ⁴Ryukoku Univ.)

P-20

Pythium sp.由来 ω 3 不飽和化酵素遺伝子を活用した油糧微生物 *Mortierella alpina* 1S-4 による EPA の常温生産

安藤晃規^{1,2}, 中辻諒平², 菊川寛史², 櫻谷英治³, 小川順^{1,2} (¹京大・生理化学ユニット, ²京大院・農・応用生命, ³徳島大院・ソシオ)

【背景・目的】アラキドン酸生産性糸状菌 *M. alpina* 1S-4 は, 低温条件下で培養することでエイコサペンタエン酸(EPA)を蓄積することわかっている。これまでに, 本菌の分子育種を通じて脂肪酸組成の改変を報告してきた。本発表では, 他生物由来の ω 3 不飽和化酵素遺伝子を本菌に導入することにより, 常温下における EPA 生産能を試みたので報告する。

【方法・結果】糸状菌 *Pythium* sp.由来 ω 3 不飽和化酵素遺伝子のコドン使用頻度を *M. alpina* 様に改変し, 高発現プロモーターにて制御した発現カセットを構築した。本発現カセットをウラシル要求性を指標とするマーカー遺伝子とタンデムに連結したバイナリーベクターを構築し, アグロバクテリウム法にて *M. alpina* 1S-4 に導入した。安定な形質転換株を選抜後, 5 ml の GY 培地 (グルコース 2%, 酵母エキス 1%) を用いて 28 °C での常温培養を行った。脂肪酸を抽出後, ガスクロマトグラフィーにて分析したところ, 外来遺伝子である ω 3 不飽和化酵素の発現による ω 3 系脂肪酸蓄積が確認でき, 7 日間培養において, 脂肪酸生産量は約 0.4 mg/mL, EPA 含有率は総脂肪酸中の約 20%に達した。

EPA production under room temperature by *Mortierella alpina* 1S-4 introduced omega-3 desaturase gene derived from *Pythium* sp.

Akinori Ando^{1,2}, Ryohei Nakatsuji², Hiroshi Kikukawa², Eiji Sakuradani³, Jun Ogawa^{1,2} (¹Res. Uni. Physiol. Chem., Kyoto Univ. ²Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ. ³Inst. Technol. Sci., Univ. Tokushima)

P-21

糸状菌 *Pythium* sp. 由来 ω 3 不飽和化酵素遺伝子の酵母発現系を用いた機能解析

菊川寛史¹, 中辻諒平¹, 浅井大貴¹, 櫻谷英治^{1,2}, 安藤晃規^{1,3}, 小川順^{1,3} (¹京大院農・応用生命, ²徳島大院・ソシオ, ³京大・生理化学)

【背景】 ω 3 脂肪酸は、抗炎症作用など多彩な生理機能が報告され、医薬・健康食品として需要が高まっている。現在、 ω 3 脂肪酸生産は魚油に依存しており、安定供給源として微生物の育種による代替生産が検討されている。本研究では、 ω 6 脂肪酸からの ω 3 脂肪酸生産の鍵酵素である ω 3 不飽和化酵素 (ω 3DS) 遺伝子の単離と機能解析を行った。【結果】土壌より単離したエイコサペンタエン酸生産性糸状菌 *Pythium* sp. より、近縁種の *omega3ds* 遺伝子のアミノ酸相同配列をもとに縮重プライマーを設計し、本菌のゲノム DNA と cDNA を鋳型としたクローニングを行った。結果、近縁種の ω 3DS と相同性を示すホモログ遺伝子の塩基配列を取得し、369 残基のアミノ酸からなるタンパク質であると明らかにした。また、*omega3ds* 発現酵母にて本遺伝子の発現解析を行った結果、 ω 6 脂肪酸を対応する ω 3 脂肪酸へと変換する ω 3 不飽和化活性を示すことが確認された。

Characterization of an omega-3 desaturase gene from *Pythium* sp. by using yeast expression system

Hiroshi Kikukawa¹, Ryohei Nakatsuji¹, Asai Takahiro¹, Sakuradani Eiji^{1,2}, Akinori Ando^{1,3}, Jun Ogawa^{1,3} (¹Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ. ²Inst. Technol. Sci., Univ. Tokushima ³Res. Uni. Physiol. Chem., Kyoto Univ.)

P-22

人工ヌクレアーゼ TALENs を用いたイネいもち病菌における高効率遺伝子改変法

荒添貴之¹, 小川哲也¹, 大里修一¹, 佐久間哲史², 山本卓², 有江力³, 桑田茂¹ (¹明治大院農・²広島大院理・³農工大院農)

DNA 二本鎖切断 (DSB) 修復機構を利用して、標的遺伝子内への塩基置換、欠失や挿入などを人為的に誘導するゲノム編集技術は、任意の塩基配列特異的に DSB を導入することが可能な人工ヌクレアーゼの開発により進展しつつある。我々は、植物病原糸状菌であるイネいもち病菌の DSB 修復機構の解析結果をもとに、Platinum Gate TALEN システム (Sakuma et al., 2013) の糸状菌への最適化と高効率遺伝子改変法の確立を試みた。まず、全 CDS 領域を糸状菌のコドン使用頻度に最適化した Platinum Gate TALEN システムを構築した。次に、メラニン生合成生経路に関わる *Scytalone dehydratase* (*SDH*) 遺伝子を標的とした TALEN ベクターをデザインし、薬剤耐性遺伝子を含む破壊ベクターとの共導入により得られる遺伝子改変効率から TALEN の DSB 活性を評価した。TALEN との共導入によって得られた薬剤耐性株では、*SDH* 遺伝子が相同組換えを介して破壊されたことを示す菌叢の白色化が観察され、その効率は 100%にまで達した。以上より TALEN を用いた高効率 DSB の導入および遺伝子改変法が糸状菌において有用であることが示された。

Highly efficient targeted gene replacement in the rice blast fungus using engineered TALENs

Takayuki Arazoe¹, Tetsuya Ogawa¹, Shuichi Ohsato¹, Tetsushi Sakuma², Takashi Yamamoto², Tsutomu Arie³, Shigeru Kuwata¹

(¹Grad. Sch. Agric., Meiji Univ., ²Grad. Sch. Sci., Hiroshima Univ. ³Grad. Sch. Agric. Sci., Tokyo Univ. of Agric. & Tech.)

P-23

殺菌剤ポリオキシシン耐性遺伝子の同定

升本宙¹, 泉津弘祐², 北出雄生¹, 田中千尋¹ (¹京都大・院・農, ²滋賀県立大・環境科学)

抗生物質ポリオキシシンは、真菌細胞壁をターゲットとする殺菌剤で、その作用機作は基質 UDP-N-アセチルグルコサミンとの拮抗によるキチン合成酵素の阻害と考えられている。また、本剤の耐性機構としては、薬剤の取込低下が *Alternaria* 属菌で報告されている。一方、*Bipolaris maydis* (トウモロコシごま葉枯病菌) の突然変異株を用いた実験から、複数のポリオキシシン耐性遺伝子が同定されており、薬剤の取り込み以外の耐性化機構の存在が示唆されている。今回、これら耐性遺伝子のうち、*Pol2* ならびに *Pol4* について、全ゲノム手法を用いて分子遺伝学的な同定を行った。なお、これらの耐性遺伝子は、薬剤耐性だけでなく、菌糸生育低下やアントラキノン類の蓄積など多面的な作用をもつ耐性遺伝子である。これら耐性株を野生型株と 10 世代にわたり戻し交雑し、野生型株ならびに得られた耐性型子孫株ゲノム DNA を HiSeq2000 で解析した。ゲノムシーケンスデータは、BWA を用い、本菌タイプ菌株のゲノム配列にマッピング後、耐性型子孫株特異的な遺伝子多型を SAMtool ならびに perl スクリプトを用いて選抜した。候補遺伝子については、さらに子孫株のシーケンス解析を行い、耐性形質と連鎖する突然変異を同定した。その結果、*Pol2* は Ferrochelatase をコードし、C410Y のアミノ酸置換変異が、*Pol4* は Hydroxymethylbilane synthase (=Porphobilinogen deaminase) をコードし G241D のアミノ酸置換変異が生じていることが判明した。これらの遺伝子はいずれもヘム合成系の遺伝子であるため、培地にヘミンを添加し、耐性株表現型に対する影響を調べた。その結果、耐性株にみられる菌糸生育の低下が、部分的に改善することがわかった。現在、ヘム合成とポリオキシシン耐性化、あるいはアントラキノン蓄積の関連についての解析を行っているところである。

Identification of two polyoxin resistant genes in *Bipolaris maydis*.

Hiroshi Masumoto¹, Kosuke Izumitsu², Yuki Kitade¹, Chihiro Tanaka¹

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

P-24

植物病原菌 *Ustilago maydis* における初期エンドソーム動態の生理学的意義に関する解析

樋口 裕次郎¹, Gero Steinberg² (¹九大院・生資環・生命機能, ²エクセター大, 生命科学)

エンドサイトーシス経路におけるオルガネラである初期エンドソームでは、細胞膜から取り込まれたカーゴが選別され、細胞膜へと再びリサイクリングされるかもしくはリソソーム/液胞へと送られて分解される。本研究で用いた植物病原性のモデル二形成酵母である *Ustilago maydis* を含めた多くの生物種においては、初期エンドソームは動態を示す。その動態の分子メカニズムは比較的良く研究されてきたが、なぜ動態を示すのかに関してはほぼ未知であった。本発表では、初期エンドソームの動態の意義に対する一つの答えを提案する¹⁾。まず生細胞においてリボソームを可視化するため、40S および 60S のリボソームタンパク質である Rps3 と Rpl25 を選び、ORF の下流に蛍光タンパク質の遺伝子を融合させた。Rps3-mCherry および Rpl25-GFP は核を除く細胞質に観察されるものの、細胞質の一部を FRAP (光退色後蛍光回復) 解析すると、両タンパク質の共動態が確認され、リボソームは 80S として動態を示すことがわかった。その動態は微小管、キネシン・ダイニンモータータンパク質に依存し、初期エンドソームと共動態を示した。また、ストレス条件やタンパク質翻訳阻害剤を用いた解析から、動態を示すリボソームはタンパク質翻訳を行っており、ポリソームを形成していることが示唆された。さらに、温度感受性変異株を用いて初期エンドソームの動態を欠損させると、ポリソームの細胞内分布に異常が見られた。このことから、初期エンドソームの動態はポリソームを細胞内に均一に分布させるのに重要であることが示唆された。1) Higuchi et al. (2014) J Cell Biol 204, 343-357.

Analysis of physiological significance of early endosome motility in the plant pathogen *Ustilago maydis*

Yujiro Higuchi¹, Gero Steinberg² (¹Dept. of Biosci. Biotechnol., Kyushu Univ., ²Biosci., Univ. of Exeter)

P-25

ウシグソヒトヨタケの子実体未成熟突然変異体の原因遺伝子は **CHD1** ホモログをコードしていた。

村口 元, 畑中こずえ, 岡野桂樹 (秋田県立大・生物資源)

担子菌ウシグソヒトヨタケの子実体形成過程の発生突然変異体の中に、子実体原基が少し扁平となり、子実体成熟が起こらない突然変異体#1016があった。#1016株と野生型一核菌糸株KF3#2とを交配し、そのF1子孫の遺伝子型を調べたところ、野生型：突然変異=41：34に分離し、単一の遺伝子に突然変異が起こっていると思われ、その原因遺伝子座を *mall* と名付けた。上記F1子孫を使って *mall* 遺伝子座と連鎖する RAPD マーカーを探したところ、第 III 染色体上の G4-3000B マーカーが組換え率 12.5% で連鎖した。次世代シーケンサーを使って#1016株の全塩基配列を 1.4Gbp (約 30 倍カバー) 解読し、第 III 染色体上で変異部位を探した。その結果、遺伝子番号 CC1G_04478 (CHD1 相同タンパク質 1441 アミノ酸をコード) 中の 172 番目のコドン CAA (Q:グルタミン) が TAA (STOP) に変異していることを見出した。この野生型遺伝子領域を PCR 増幅し突然変異体に導入すると正常に子実体を形成したことから、*mall* は CC1G_04478 であると判明した。出芽酵母の CHD1 はクロマチンリモデリングに関与しており、ウシグソヒトヨタケでも Mal1 (Cc.Chd1) がクロマチン形成・再編を通じて多くの遺伝子の発現に影響を与えているものと思われる。

The gene responsible for a maturationless mutant of *Coprinopsis cinerea* encodes a CHD1 homolog.

Hajime Muraguchi, Kozue Hatanaka, Keiju Okano

(Dept. Biotech., Akita Pref. Univ.)

P-26

牧草共生糸状菌 *Epichloë festucae* の低分子量 G タンパク質 Cdc42 および RacA の相互作用因子特異性の機能解析

榎野友香, 竹本大吾 (名大院・生命農学)

E. festucae はイネ科牧草と共生関係を確立する糸状菌エンドファイトである。これまでに、本菌の宿主植物への共生的感染には、活性酸素生成酵素 NoxA およびその制御因子である NoxR と低分子量 G タンパク質 RacA が必要であり、これら遺伝子の破壊株は宿主植物を枯死させることを示している。NoxR は、RacA に加え、酵母では極性決定に関与することが知られる BemA および Cdc24 と結合することから、これら因子の複合体が NoxA の活性を制御していると推定している。また、RacA と極めて高い相同性を示す低分子量 G タンパク質 Cdc42 が BemA と特異的に結合すること、*cdc42* 破壊株が宿主植物への全体的感染能を失うことから、Nox 複合体と相互作用する両低分子量 G タンパク質が宿主への感染に異なる役割を果たすことを報告した。そこで、RacA-NoxR および Cdc42-BemA の特異的結合能を決定するアミノ酸を特定したところ、RacA の 32 番目のアラニンおよび 35 番目のグリニンが、Cdc42 の 59 番目のフェニルアラニンがそれぞれ必須であることが解った。アミノ酸置換により特異的相互作用を変化させた RacA および Cdc42 を用いて *racA* 破壊株の相補実験を行なったところ、NoxR との結合活性を持つ変異 Cdc42 によって、*racA* 破壊株の共生確立能の回復が認められた。一方、NoxR との結合性を失った変異 RacA では *racA* 破壊株の共生能を相補出来なかった。この結果から RacA と Cdc42 の共生確立における機能分化は 2 アミノ酸配列の違いによる NoxR 結合性によって決定されていることが示された。

Functional analysis of specific interactions between Cdc42-BemA and RacA-NoxR in fungal endophyte *Epichloë festucae*

Yuka Kayano, Daigo Takemoto

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

P-27

牧草共生糸状菌 *Epichloë festucae* における菌糸融合欠損株の探索と共生確立能の解析

岡村文音, 田中愛子, 竹本大吾 (名大院・生命農学)

E. festucae はイネ科牧草に共生的に感染する糸状菌エンドファイトであり, 種々のストレスに対する宿主植物の抵抗性を向上させる。*E. festucae* の宿主植物への感染に必要な因子として, 活性酸素生成酵素 NoxA, ヘテロ三量体 G タンパク質 α サブユニット GpaA, 機能未知の核タンパク質 NsiA などが見いだされており, これらの遺伝子破壊株では宿主植物との同調的な菌糸生育能を失い, 宿主の生育を著しく阻害することが明らかになっている。これまでに単離された共生変異株はすべて培地上での菌糸融合能を失っていることから, 菌糸融合能と共生確立能には密接な関係があると推定された。そこで今回, プラスミド挿入変異法を用いて, 菌糸融合能を欠損した RPA519 株および RPA112 株を単離した。またアカパンカビにおいて菌糸の膜融合に直接機能すると推定されている膜タンパク質をコードする *Ham8* の相同遺伝子を *E. festucae* から同定し, その破壊株を作出した。これら菌株を宿主植物に接種したところ, 菌糸融合欠損株である RPA519 株, RPA112 株および *ham8* 破壊株が感染した植物の矮化が観察され, *E. festucae* における菌糸融合能と共生確立機構の相関がさらに示された。現在, 融合変異株で破壊されている遺伝子の特定を進めており, その結果についても報告する。

Possible correlation between abilities of symbiotic infection and hyphal cell fusion of endophytic fungus *Epichloë festucae*.

Okamura ayane, Aiko Tanaka, Daigo Takemoto

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

P-28

BiFC 法を利用した麴菌 *A. oryzae* の菌糸融合の可視化と解析

岡部知弥¹, 塚崎和佳子¹, 金 鋒杰¹, 岩下和裕², 藤井郁雄³, 丸山潤一¹, 北本勝ひこ¹

(¹東大院・農生科・応生工, ²酒総研, ³阪府大院・理)

糸状菌は菌糸融合を行い, コロニー形成において菌糸どうしのネットワークを形成する。また, 菌糸融合は有性生殖および疑似有性生殖での第一段階であり, 交配育種を行ううえで重要な過程である。我々は最近, 麴菌 *Aspergillus oryzae* において, 2つの栄養要求性株を利用して菌糸融合を解析する方法を確立した^{1,2)}。しかし, この手法では *A. oryzae* がどの生育段階で菌糸融合を行っているのかについて解析することは困難であった。本研究では, BiFC (bimolecular fluorescent complementation)法を利用して菌糸融合が起こった細胞を可視化し, 直接観察することにより *A. oryzae* の菌糸融合能力に関して解析を行った。

BiFC 法による解析には, ヘテロダイマーとして結合するように設計されたタンパク質 LZA および LZB³⁾, および蛍光タンパク質 EGFP を使用した。*A. oryzae* の野生株 RIB40 に由来する 2 株の異なる栄養要求性株において, EGFP の N 末側と LZA を融合させた nEGFP-LZA, EGFP の C 末側と LZB を融合させた cEGFP-LZB をそれぞれ発現させ, 両株を混合して培養した。その結果, 菌糸融合により栄養要求性が相補された細胞において特異的に EGFP 蛍光が観察された。これにより, *A. oryzae* において菌糸融合した細胞を可視化することに成功した。さらに, 融合した細胞の形態を解析した結果, 分生子同士が融合した場合がもっとも多く, アカパンカビで報告されている CATs (conidial anastomosis tubes)による融合と類似していた。現在, 醸造で使われている *A. oryzae* 株の菌糸融合能を調べるため, BiFC 法による同様の解析を行っている。

1) Wada et al. (2013) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2) Tsukasaki et al. (2014) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*

3) Kojima et al. (2011) *J. Biosci. Bioeng.*

Visualization and analysis of hyphal fusion by bimolecular fluorescent complementation in *Aspergillus oryzae*

Tomoya OKABE¹, Wakako TSUKASAKI¹, Feng Jie JIN¹, Kazuhiro IWASHITA², Ikuo FUJII³, Jun-ichi

MARUYAMA¹, Katsuhiko KITAMOTO¹ (¹Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo, ²NRIB, ³Osaka Pref. Univ.)

P-29

麹菌 *Aspergillus oryzae* の菌糸融合における AoSO の機能解析

塚崎和佳子, 丸山潤一, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)

糸状菌においては一般に、菌糸融合を通じて同株もしくは異株が相互に接続されたコロニーを形成し、それを通じて細胞質や核の混合が起きるとされている。また、菌糸融合は有性生殖、疑似有性生殖の第一段階でもある。我々は以前、麹菌 *Aspergillus oryzae* において栄養要求性株を用いて菌糸融合効率を定量的に解析する手法を確立し¹⁾、AoSO という隔壁孔に凝集し溶菌の伝播を防ぐ機能をもつタンパク質²⁾が、菌糸融合に必須であることを示した¹⁾。AoSO は 1196 アミノ酸からなる巨大なタンパク質であり、C 末側 641 アミノ酸の領域が溶菌の伝播を防ぐ機能に十分であることを示したが、菌糸融合における作用機構についてはほとんど解明されていない。そこで今回、AoSO の様々な領域欠失体発現株を利用することにより、その菌糸融合における機能について解析した。

AoSO の領域欠失体発現株に対し *pyrG* および *adeB* 遺伝子破壊を行うことにより、ウリジン/ウラシル、アデニンそれぞれの栄養要求性株を作製した。混合培養における菌糸融合によって栄養要求性が相補されたヘテロカリオンの出現率をもとに、菌糸融合効率を調べた。その結果、AoSO が隔壁孔特異的に凝集するのに必要な C 末端 50 アミノ酸の領域が、菌糸融合にも重要な機能をもつことが示唆された。一方で、AoSO の N 末側 555 アミノ酸の領域は溶菌の伝播を防ぐ機能に必要でなく、機能が不明である。現在、AoSO の N 末側の領域やこれに含まれる WW ドメインについて、菌糸融合における役割を解析している。

1) Tsukasaki *et al.* (2014) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2) Maruyama *et al.* (2010) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*

Functional investigation of AoSO protein in hyphal fusion of *Aspergillus oryzae*

Wakako TSUKASAKI, Jun-ichi MARUYAMA, Katsuhiko KITAMOTO

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

P-30

麹菌 *A. oryzae* の子嚢胞子形成における有性生殖関連遺伝子の高発現の促進効果

田中勇気, 金 鋒杰, 丸山潤一, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)

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 *MAT1-1* あるいは *MAT1-2* 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¹⁾。他の糸状菌での研究から、*A. oryzae* は菌核内に子嚢果、子嚢、子嚢胞子を形成することにより、有性生殖を行うと予想される。我々の以前の研究で、菌核形成を抑制する転写因子 *EcdR* の欠損により菌核形成を促進し、さらに、酵母の有性生殖の主要制御因子 *Ime2p* と相同性をもつ *AoIme2* の高発現により、菌核内の子嚢果の形成を促進することに成功した。しかし、子嚢の内部に形成された子嚢胞子様の構造は小さいものが多く、有性生殖が不完全であることが示唆された。今回は、他の有性生殖関連遺伝子を高発現することにより、*A. oryzae* での子嚢胞子形成の促進効果を検討することを目的とした。

A. oryzae の *ecdR* 遺伝子が破壊された株において、近縁の糸状菌で有性生殖を促進する遺伝子 *laeA*, *nsdD* の *A. oryzae* における相同遺伝子の高発現株を作製した。これらの株を用いて異なる接合型どうしで対峙培養を行い、コロニーの境界線で菌糸融合して形成される菌核の内部構造を観察した。その結果、*ecdR* 破壊株における *laeA* および *nsdD* 遺伝子の高発現により、菌核内の子嚢果の形成効率が上昇した。さらに、子嚢胞子様の構造については、近縁の糸状菌の子嚢胞子と同様の大きさのものが観察されるようになった。現在、子嚢胞子様構造をマイクロマニピュレーターにより単離し、導入した遺伝子マーカーを調べることにより、有性生殖が行われているかどうかの解析を行っている。

1) Wada *et al.* (2011) *Appl. Environ. Microbiol.* 78; 2819-2829.

Promotion of ascospore formation by overexpressing sexual reproduction-related genes in *Aspergillus oryzae*

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

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

P-31

Investigation of the mechanism for septal association of Leashin protein in *Aspergillus oryzae*

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

Woronin body, a Pezizomycotina-specific organelle, is tethered to the septum in normal growth condition, and it plugs the septal pore in response to cellular wounding, preventing the excessive loss of cytoplasm. Recently, we identified a Woronin body tethering protein AoLAH in *Aspergillus oryzae*¹⁾. Deletion of the *Aolah* gene causes the disappearance of Woronin bodies near the septum. AoLAH is a single polypeptide with 5,727 amino acids; it is composed of a conserved N- and C-terminal regions and a long non-conserved middle region. We found that AoLAH N-terminal and C-terminal regions function for Woronin body association and tethering to the septum, respectively. AoLAH C-terminal region fused with EGFP was closely associated with the septum, and its deletion led to the failure of Woronin body tethering to the septum. However, how the AoLAH C-terminal region associates specifically with the septum is not known. The aim of this study is to investigate the mechanism for septal association of AoLAH. Deletion analysis of the AoLAH C-terminal region was performed to identify a part responsible for the septal association. AoLAH C-terminal region consists of approximately 1,000 amino acids. According to secondary structure prediction analysis, the former 500 amino acids of this region is mostly disordered while in the latter 500 amino acids several secondary structures such as α -helix and β -sheet were predicted. This structure prediction is similar to those of the C-terminal region of LAH proteins from other *Aspergillus* species. Based on these data, deletion of the AoLAH C-terminal region is being done to observe the effect on the septal association of AoLAH, and complementation analysis of the deletion fragment for Woronin body tethering will be performed.

1) Han *et al.* (2014) *Eukaryot. Cell* 13: 866-77.

P-32 (O-14)

麹菌 *A. oryzae* における光依存性の分生子形成抑制メカニズムに関する解析

Helge M. Dietrich, 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)

麹菌 *Aspergillus oryzae* における分生子形成は、種麹造りや菌株の植菌・保存などの産業的利用に影響する重要な過程である。我々は以前、光によって *A. oryzae* の分生子形成が抑制されることを報告した¹⁾。一方で、*Aspergillus nidulans* などで報告されているように、光がストレスとなって分生子形成が促進されるのが一般的であると考えられるが、*A. oryzae* の応答はこれとは正反対である。*A. oryzae* が家畜化される際に、暗い屋内の種麹造りで分生子を多く形成する株が選択されてきた可能性が考えられるが、その分子メカニズムは不明であった。今回は、照射する光の波長を選択できる LED 光源を使用することにより、*A. oryzae* が光に応答して分生子形成を抑制するメカニズムに関して解析を行った。

青色光および赤色光照射条件で *A. oryzae* RIB40 株の培養を行い、分生子の形成効率について調べた。その結果、青色光照射による分生子形成の抑制が見られたが、赤色光では光の影響は観察されなかった。このことから、光による分生子形成の抑制は青色光に依存することが示された。この光応答のメカニズムを解析するため、*A. oryzae* ゲノムデータベースより、*A. nidulans* の青色光受容体 *LreA* と赤色光受容体 *FphA* に相同なタンパク質をコードする遺伝子を見だし、それぞれ *AolreA*, *AofphA* と命名した。遺伝子破壊株を作製した結果、*AolreA* 破壊株において青色光による分生子形成の抑制が見られなくなった。一方で、*AofphA* 破壊株では、野生型株と同様に青色光により分生子形成が抑制された。したがって、*A. nidulans* の *LreA* と *FphA* は光に応答し、協調して分生子形成を促進するのに対し²⁾、*A. oryzae* では *AolreA* のみが光依存的に分生子形成を抑制し、*AofphA* はこの過程に関与しないことが明らかになった。

1) Hatakeyama *et al.* (2007) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71:1844-9. 2) Purschwitz *et al.* (2008) *Curr. Biol.* 18:255-9.

Investigation of light-dependent repression of conidiation in *Aspergillus oryzae*

Helge M. DIETRICH, Yuki TANAKA, Feng Jie JIN, Jun-ichi MARUYAMA, Katsuhiko KITAMOTO

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

P-33 (O-15)

カーボンカタボライト抑制制御因子 CreA は活性化条件において安定化する

田中瑞己, 新谷尚弘, 五味勝也 (東北大院農・生物産業創成)

糸状菌のカーボンカタボライト抑制は、C₂H₂型転写因子 CreA によって制御されることが知られている。*Aspergillus nidulans* では、カーボンカタボライト抑制に関わる他の因子としてユビキチン化や脱ユビキチン化に関与する因子が同定されており、これらが CreA の分解に関与する可能性が指摘されている。しかし、CreA の安定性についてはほとんど知見がない。本研究では、チアミン添加により発現抑制可能な *thiA* プロモーター制御下で 3FLAG タグ融合 CreA を麹菌で発現させ、様々な炭素源存在下における CreA の安定性を解析した。

前培養した 3FLAG タグ融合 CreA 発現株の菌体をチアミン添加培地に移して発現を抑制させた後、各種炭素源を添加し、経時的に CreA タンパク質量を調べた。その結果、炭素源を加えない場合やマルトース、フルクトース、キシロース、グリセロールを添加した場合には CreA は急速に分解された。一方、グルコースやマンノースを添加した場合には CreA が著しく安定化した。各種炭素源のカーボンカタボライト抑制への関与を調べるため、デンプン培地に各種炭素源を混合し、ハロー形成能を比較した。その結果、グルコースとマンノースを添加した場合に野生株のハロー形成能が *creA* 破壊株と比較して著しく抑制された。以上の結果から、CreA はカーボンカタボライト誘導条件において安定化されることが示唆された。現在、CreA の細胞内局在やユビキチン・脱ユビキチン化関連因子の CreA 安定性への関与について解析を行っている。本研究は「農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業」の支援を受けて行われた。

Stabilization of carbon catabolite repression regulator CreA under the activation condition in *Aspergillus oryzae*.

Mizuki Tanaka, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi

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

P-34

麹菌におけるオートファジーによる核の分解（ヌクレオファジー）の評価法

三谷隆宏, 菊間隆志, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)

【目的】オートファジーはオートファゴソームによって細胞質成分を囲い込み、液胞/リソソームで分解する過程であり、真核生物に広く保存されている。麹菌 *Aspergillus oryzae* は核全体をオートファゴソームで取り囲み、液胞へ輸送し分解することが知られている（ヌクレオファジー）。これは麹菌が多核生物であるために可能な現象である。しかし、その分子機構や生理学的意義の詳細は不明である。本研究では、*A. oryzae* がヌクレオファジーを誘導する条件・機構の解明を目的として、ヌクレオファジーの評価方法の確立を目指した。

【方法・結果】GFP 融合タンパク質がオートファジーによって液胞に取り込まれると、タンパク質分解酵素により分解され、GFP のみが残存する。この GFP のバンドをウェスタンブロット法で検出することで、オートファジーによる目的タンパク質の取り込みを評価する方法が酵母などで多く用いられる（Cleavage assay）。核質に局在するヒストン H2B に対して Cleavage assay を行ったところ、培養時間の経過に伴って検出される EGFP 量が増加した。また、蛍光顕微鏡で観察された液胞内の EGFP 蛍光も同様の傾向を示した。現在、オートファジー欠損株 $\Delta Aogat8$ 株において Cleavage assay を行い、EGFP のバンドの検出がオートファジー依存的であることを確認している。この評価法を用いて各種の栄養欠乏条件について検討したところ、炭素源・窒素源飢餓においてヌクレオファジーが誘導されるが、リン酸、カリウム、マグネシウムの欠乏では誘導されないことが示された。

Evaluation of nucleophagy, degradation of nucleus by autophagy, in *Aspergillus oryzae*

Takahiro MITANI, Takashi KIKUMA, Katsuhiko KITAMOTO

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

P-35

麹菌における Acyl-CoA binding protein (AoAcb1, AoAcb2)による特殊分泌経路の解析

川口航平, 菊間隆志, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)

小胞体 - ゴルジ体を経由しない特殊な分泌経路によるタンパク質分泌の一つとして、酵母において、Acyl-CoA-binding protein (Acb1)の細胞外への分泌が報告されている。Acb1は分泌シグナル配列を持たないタンパク質であるが、栄養飢餓条件で細胞外へ分泌される。その分泌機構にはオートファジー関連タンパク質などのタンパク質が必要とされる。酵母では特殊分泌経路の研究が行われているが、糸状菌においてはほとんど報告がない。また、酵母などではACBP (Acyl-CoA Binding Protein)モチーフを有するタンパク質は1つだけであるが、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。そこで本研究では、*A. oryzae*が有する2つのAcyl-CoA-binding proteinの機能を明らかにするとともに、糸状菌における特殊分泌経路を発見することを目的とした。

*S. cerevisiae*のAcb1のホモログ遺伝子*Aoacb1*と*Aoacb2*はそれぞれ365アミノ酸、143アミノ酸をコードしている。これまでの局在観察により我々は、AoAcb1が細胞内でドット状構造を形成して微小管依存的に移動すること、AoAcb2が酵母Acb1と同様に細胞質中に拡散することを示した。AoAcb1が有するACBPモチーフとTraPモチーフをそれぞれ欠損させたAoAcb1にEGFPを融合させて観察したところ、ACBPモチーフ欠損AoAcb1はドット状構造の移動が起こらなくなり、TraPモチーフ欠損AoAcb1は細胞質中に拡散していた。通常の方法では*Aoacb2*破壊株を得ることができなかったため、*thiA*プロモーター制御下で*Aoacb2*を発現させ、培地中にチアミンを添加して発現を抑制したところ、*Aoacb2*条件発現株と*Aoacb1*破壊*Aoacb2*条件発現株において、同程度のコロニー半径の減少が観察された。また、ウエスタンブロット法により、HAタグを融合させたAoAcb2が培養上清に検出された。現在、この結果が溶菌によるタンパク質の溶出でないことを確認するとともに、AoAcb1についても細胞外へ分泌されているかどうかを検討中である。

Analysis of unconventional secretion pathway of acyl-CoA binding proteins (AoAcb1, AoAcb2) in *A. oryzae*

Kouhei KAWAGUCHI, Takashi KIKUMA, Katsuhiko KITAMOTO

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

P-36

麹菌 *Aspergillus oryzae* のポリリン酸代謝関連遺伝子の機能解析

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、麹菌 *Aspergillus oryzae* におけるポリリン酸の詳細な機能については明らかにされていない。我々は、重金属ストレス、及び酸化ストレス存在下において *A. oryzae* のポリリン酸蓄積量が大きく変動することを明らかにし、昨年度報告した。

今回我々は、ポリリン酸代謝関連遺伝子の破壊株を作成し、その解析を行った。酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のポリリン酸ポリメラーゼ (Vtc1, Vtc2, Vtc3, Vtc4), エンドポリホスファターゼ (Ppn1), エキソポリホスファターゼ (Ppx1) のオルソログをコードする遺伝子を麹菌ゲノムデータベースより見出し、それぞれ *vtcA*, *vtcB*, *vtcD*, *ppnA*, *ppxA* とし、破壊株を作成した。各破壊株は、コントロール株と比較して、ポリリン酸の蓄積量に変化は見られたものの、菌糸成長、分生子形成に大きな変化は見られなかった。現在、重金属ストレス、酸化ストレス存在下における各破壊株の表現型について解析中である。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。

Functional analysis of polyphosphate related genes in *Aspergillus oryzae*

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

P-37 (O-11)

Maintenance of active directional growth by perpetual assembly and disassembly of polarity sites

Norio Takeshita^{1,4}, Yuji Ishitsuka², Natasha Savage³, Yiming Li², Anna Bergs¹, Daria Kohler², Rebecca Donnelly³, G. Ulrich Nienhaus², Reinhard Fischer¹ (¹Dept. of Microbiology, Inst. for Applied Bioscience, ²Inst. for Applied Physics, Karlsruhe Institute of Technology (KIT). ³Dept. of Functional and Comparative Genomics, Inst. of Integrative Biology, Univ. of Liverpool. ⁴Univ. of Tsukuba, Faculty of Life and Environmental Sciences.)

Polar cell extension depends on spatially very defined insertion of new membrane. In filamentous fungi, like *Aspergillus nidulans* hyphal tips (3 μm in diameter) extend with speeds of 0.3 – 1.0 μm per min, which means an increase of the membrane surface of $0.9\pi - 3\pi \mu\text{m}^2$ per min. Given that secretory vesicles are about 40 nm in diameter, massive exocytosis of about 600 – 2000 vesicles per min is required to ensure sufficient membrane supply even in the case that endocytosis is ignored. On the other hand, secretion at the hyphal tip depends on the exact positioning of landmark or cell-end marker proteins, anchored in the membrane. The active exocytosis in filamentous fungi has a potential to diffuse membrane associated polarity markers but they can maintain the polarity to form hyphae. Here, we discovered a mechanism how polar growth can be maintained despite the continuous, massive disturbance of cell-end marker positioning caused by membrane insertion. In *A. nidulans* the cell-end marker protein TeaR reaches the tip through microtubule- and actin-dependent transport. Once at the tip, TeaR recruits other proteins among which is the actin forming formin SepA. Thus the actin cytoskeleton assembles at the site of TeaR, and delivers more TeaR to this site. This positive feedback loop causes increased secretion, local membrane extension, but also dilution of the cell-end markers. To solve the contradiction, the polarity is reconstructed by microtubules repeatedly in addition the cell growth, membrane extension, occurs in a fluctuation manner. The localization and dynamic behavior of TeaR is investigated by super-resolution microscopy technique PALM (photoactivation localization microscopy).

P-38 (O-12)

分泌酵素生産に関与する *Aspergillus nidulans* SunA の機能解析

船山あずみ, 金丸京子, 木村真, 小林哲夫 (名大院・生命農学)

【目的】 AHP1102 はアミラーゼ, セルラーゼ, プロテアーゼなど分泌酵素の生産性が向上した変異株であり *sunA* 遺伝子は本変異を相補する。*A. fumigatus* において SunA のオルソログ Sun1 は細胞壁 β -1, 3-glucan に作用する酵素であることが近年示されている。本研究では SunA の機能, そして分泌酵素生産性に与える影響を解析した。

【方法・結果】 まず AHP1102 における *sunA* 遺伝子上の変異を同定した。その結果, この変異はクロモソーム I の *sunA* のプロモーター領域とクロモソーム VIII の AN0430 構造遺伝子内との組み換えにより生じたことが明らかとなった。SunA が分泌酵素生産性に影響を与えることを確認するため, 破壊株, 高発現株を作製した。破壊株では AHP1102 と同様に分泌酵素の生産性向上がみられたが, 高発現株では有意な影響は見られなかった。また, 菌体外タンパク質を SDS-PAGE で比較すると, 破壊株では野性株に比べ多様なタンパク質が菌体外に存在することが明らかとなった。SunA が細胞形態に与える影響を顕微鏡観察したところ, 破壊株では菌糸の形状がいびつになるなどの異常がみられた。更には細胞壁に作用する化学物質である Calucofluor white, Congo red などに対する破壊株の感受性を野性株と比較したところ, 破壊株では感受性を示した。これらのことから SunA の細胞壁合成・分解への関与が示唆された。一方で細胞壁の恒常性に関与する転写因子, 情報伝達因子と *sunA* 遺伝子発現との関係を検討したが, *nikA*, *mpkA*, *rlmA* いずれの破壊も *sunA* の発現に影響を与えなかった。

Functional analysis of *Aspergillus nidulans* SunA involved in extracellular enzymes production

Azumi Funayama, Kyoko Kanamaru, Makoto Kimura, Tetsuo Kobayashi

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

P-39

Aspergillus nidulans におけるプロテインキナーゼ C によるカルシウム応答シグナル伝達経路制御機構の解析

片山琢也¹, 志波優², 吉川博文³, 堀内裕之¹ (¹東大院・農生科・応生工, ²岩手医大・いわて東北メディカル・メガバンク機構, ³東農大・応生科・バイオ)

Aspergillus nidulans のプロテインキナーゼ C である PkcA は生育に必須であり, 細胞壁の完全性維持, 極性生長, 二次代謝産物の生産制御など様々な現象に関与することが示唆されているが, その機能の詳細については未解明な部分が多い。当研究グループでは *pkcA* 温度感受性株を用いた PkcA 失活条件における網羅的転写解析を行っており, その結果この条件では細胞内 Ca²⁺濃度の恒常性維持に関わる遺伝子の mRNA が増加することが明らかとなった。細胞内 Ca²⁺濃度の恒常性維持にはカルシウム応答シグナル伝達経路が重要な役割を担うが, この経路の転写因子である CrzA 依存的に誘導されることが知られている 25 遺伝子のうち, ほとんどの遺伝子の mRNA が PkcA 失活条件で増加していた。さらに *crzA* 欠失株を用いた定量 PCR 法による転写解析から, PkcA 失活条件でのこれらの遺伝子の mRNA 量の増加が部分的に CrzA に依存することが示唆された。CrzA は Ca²⁺に反応して細胞質から核に移行し, 遺伝子の転写を誘導するが, PkcA 失活条件では C 末端に EGFP を付加した CrzA の核に局在する割合が増加していた。これらのことから, PkcA が高温ストレス条件下でカルシウム応答シグナル伝達経路を負に制御する可能性が考えられた。現在, PkcA の下流で機能する MAP キナーゼである MpkA のカルシウム応答シグナル伝達経路の制御への寄与について検討中である。

Regulation of Ca²⁺ signaling pathway by protein kinase C in *Aspergillus nidulans*

Takuya Katayama¹, Yu Shiwa², Hirofumi Yoshikawa³, Hiroyuki Horiuchi¹ (¹Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo, ²Iwate Tohoku Medical Megabank Organization, Iwate Medical Univ., ³Dept. of Biosci., Tokyo Univ. of Agric.)

P-40 (O-13)

糸状菌ミトコンドリアの機能へのヒスチジンキナーゼ HysA の関与

林早紀, 小島憲介, 金丸京子, 木村真, 小林哲夫 (名大院・生命農)

糸状菌の環境応答には, 生物に広く保存された His-Asp リン酸リレー情報伝達機構が重要な役割を担っていることが知られている。このシステムでは, 環境センサーであるヒスチジンキナーゼ (HK) からのリン酸基転移によって情報が細胞内に伝達される。以前われわれは, モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* の HK 破壊株 (13 種類) における活性酸素種 (ROS) の発生を観察し, HysA の破壊株において ROS の発生レベルが高いことを見いだした。

酸素呼吸を行う生物では, ミトコンドリアの電子伝達系で ROS が発生することが知られている。ミトコンドリアが正常な際には ROS を無毒化することが可能だが, ミトコンドリアが機能を失うと発生した ROS が細胞内に蓄積し, タンパク質や DNA にダメージを与える。*hysA* 破壊株において発生した ROS は, ミトコンドリア機能の変化によって発生蓄積した可能性が考えられた。そこで, *hysA* 破壊株を 3 日間培養し, 膜電位の生じた活性化ミトコンドリアを検出する蛍光色素, Mito Tracker Red で染色し, 顕微鏡下で観察した。その結果, 破壊株では, 活性化ミトコンドリアが分生子柄において偏って局在していた。ROS の発生は分生子柄において最も強く観察されることから, この偏りが ROS 発生の原因であることが考えられた。本研究では, 緑色蛍光タンパク質 GFP を用いた HysA の局在解析の結果も併せ, 情報伝達因子である HysA がどのように糸状菌ミトコンドリアの機能に関与するか考察する。

Possible involvement of Histidine kinase HysA in mitochondrial function of *Aspergillus nidulans*

Saki Hayashi, Kensuke Kojima, Kyoko Kanamaru, Makoto Kimura, Tetsuo Kobayashi
(Graduate Sch. of Bioagric. Sci., Nagoya univ.)

P-41

糸状菌 *Aspergillus nidulans* におけるリン酸基伸介因子 YpdA とレスポンスレギュレーター SskA, SrrA の相互作用の解析

福間泰之¹, 緑川裕良¹, 萩原大祐^{2,3}, 古川健太郎⁴, 中山真由美², 吉見啓², 阿部敬悦^{1,2}

(¹東北大院・生物産業創成, ²東北大・未来研, (現)³千葉大・真菌センター, ⁴ヨーテボリ大)

His-Asp リン酸リレー情報伝達経路はバクテリアから高等植物に至るまで広く保存された普遍的な環境応答機構である。糸状菌にも本経路は保存されているが、本経路の構成要素であるリン酸基伸介因子 (HPt) の機能については不明な点が多い。モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* において、HPt をコードする *ypdA* 遺伝子の欠損は致死であることが遺伝学的に証明されているものの、欠損が致死となる要因の特定には至っていない。また、レスポンスレギュレーター (RR) である SskA, SrrA との相互作用についても詳細な情報は得られていない。そこで演者らは、*ypdA* 遺伝子の発現を制御可能な Conditional-*ypdA* 株 (CypdA 株) および CypdA 株を親株とした RR 破壊株 (CypdA-*sskAΔ*, CypdA-*srrAΔ*, CypdA-*sskAΔsrrAΔ*) を作成し、HPt と RR の関係について解析を進めてきた。

今回、*alcA* プロモーターによる *ypdA* の発現制御を最適化し、発現抑制条件での表現型を解析したので、その結果について報告する。まず、前培養時に CDTFY (CD+スレオニン、フルクトース、酵母エキス) 培地を用いることで、安定した *ypdA* の定常発現状態が実現することが明らかになった。また、本条件で培養した菌体を発現抑制培地に移したところ、各 CypdA 変異株とも *ypdA* の転写量が野生株の 10 分の 1 程度に低下し、*ypdA* の転写量変化に伴う下流遺伝子の応答も観察された。現在、Western 解析により YpdA タンパク質の発現量を解析するとともに、YpdA 発現変動に伴う生育悪化、菌糸形態の異常について解析を進めている。

(本研究は、農林水産業・食品産業科学技術推進事業の支援を受けて行われたものである。)

Analysis of the relationship between the histidine-containing phosphotransfer protein, YpdA, and the response regulators, SskA and SrrA, in *Aspergillus nidulans*.

¹Yasuyuki Fukuma, ¹Yura Midorikawa, ^{2,3}Daisuke Hagiwara, ⁴Kentaro Furukawa, ²Mayumi Nakayama, ²Akira

Yoshimi, ^{1,2}Keietsu Abe (¹Grad. Sch. Agric. Sci., ²NICHe, Tohoku Univ., ³MMRC, Chiba Univ., ⁴Göteborg Univ)

P-42

糸状菌 PKC に特異的な新規阻害剤に対する酵母スクリーニング系の最適化

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果たしており、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) の欠損は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。

これまでに我々は、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、数種の阻害剤候補化合物が見出され、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顕著な効果は認められず、化合物改変による活性向上が課題となっている。そこで本研究では、Z-705 の改変を見据え、Z-705 およびその類縁化合物の活性を評価する酵母スクリーニング系の開発を進めてきた。本評価系は、酵母 Pkc1 のキナーゼドメインを糸状菌由来のものに置換した、酵母-糸状菌キメラ PKC 発現株を用いており、糸状菌 PKC 阻害剤探索に有効であることが示唆されている。今回、さらに活性評価の精度向上を計るため、炭素源や培養温度などの培養条件を検討した。その結果、最少培地において、ガラクトースを炭素源にすることで、キメラ PKC 発現株の Z-705 に対する感受性を正確かつ再現よく評価することが可能となった。現在、Z-705 存在下での酵母の形態観察やコロニー形成試験により、本薬剤の菌体への作用をより詳細に解析している。

Improvement of the yeast-screening system for novel specific inhibitor of protein kinase C 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., ⁴

Grad. Sch. Agric. Sci. Tokyo Univ., ⁵Facul. Sci. Engin. Chuo Univ.)

P-43

Aspergillus nidulans の *wspA* の機能とキチン合成酵素局在化における役割

テイロ, 星 浩臣, 堀内 裕之 (東大院・農生科)

糸状菌の菌糸先端生長において、エンドサイトーシスにより取り込まれたタンパク質が再度先端に輸送されるリサイクリング機構が重要であることが示唆されている。一方、演者らのグループでは *Aspergillus nidulans* を用いて、菌糸先端生長に重要な働きを持つキチン合成酵素 ChsB, ミオシン様タンパク質融合型キチン合成酵素 CsmA が菌糸先端に局在することを示している。今回、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のオルソログなどでエンドサイトーシスへの関与が示唆されている *A. nidulans* の遺伝子 *wspA* について、その機能解析とキチン合成酵素の菌糸先端への局在における役割について解析した。その結果、*wspA* 破壊は野生型遺伝子とのヘテロカリオン株としてのみ取得でき、*wspA* が破壊された遺伝子のみをもつ分生子は発芽時に無方向性の生長をするだけで発芽管を形成せずに生長を停止した。これらのことから *wspA* は生育に必須の遺伝子で分生子発芽時の極性の確立に必須の機能を持つことが示された。さらに *wspA* の発現を制御できる株において、*wspA* の発現を抑えたところエンドサイトーシスが阻害されたことから *wspA* が菌糸におけるエンドサイトーシスに重要な機能を持つことが明らかとなった。一方 *wspA* の発現を抑えた株ではキチン合成酵素 CsmA の菌糸先端への局在パターンに変化が見られたことから、CsmA の菌糸先端への局在において重要な役割を持つことも示された。現在、ChsB の菌糸先端への局在における *wspA* の関与について検討中である。

Functions of *wspA* of *Aspergillus nidulans* and its role in the localization of chitin synthases

Lu Zheng, Hiro-omi Hoshi, and Hiroyuki Horiuchi (Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo)

P-44

麹菌 *Aspergillus oryzae admA, admB* 遺伝子欠損株の細胞壁構成多糖と RNA-Seq 解析

小林拓嗣¹, 前田浩¹, 古崎利紀², 石井一夫², 有江力², 竹内道雄¹, 山形洋平¹

(¹東農工大院・応生科, ²東農工大院・農学系ゲノム人材育成プログラム)

【背景および目的】 *admA, admB* 遺伝子は、麹菌 *Aspergillus oryzae* の ADAM (A Disintegrin And Metalloproteinase) をコードする遺伝子である。ADAM は、プロテアーゼドメインとディスインテグリンドメイン、膜貫通領域を持つタンパク質であり、哺乳類において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。これまでに、*admA, admB* 遺伝子の単独および二重欠損株を作製し、表現型を観察した。その結果、欠損株は calcofluor white や congo red に感受性を示し、分生子表面の構造が変化していたことから細胞壁構造に変化が生じていることが示唆された。今回は、欠損株の細胞壁に生じた変化をより詳細に調べるために細胞壁構成成分の分画および糖の定量を行った。さらに、変化が生じた理由を探るため、RNA-Seq 解析を行った。

【方法および結果】 熱水とアルカリ溶液により欠損株とコントロール株の分生子および菌糸の細胞壁構成成分を分画し、得られた画分についてフェノール・硫酸法によるヘキソース含量の定量、Blix 法によるヘキソサミン含量の定量を行った。その結果、各欠損株では細胞壁構成多糖が量的に変化しており、その変化が欠損株毎に異なることが明らかになった。RNA-Seq 解析は、分生子形成条件であるコムギフスマ固体培地で 72 時間培養した培養物から調製した total RNA を用いた。解析の結果、細胞壁構成多糖の量的変化と関連のある細胞壁合成関連遺伝子の発現変動が見られた。さらに、キナーゼ遺伝子や転写因子遺伝子の中にも変動している遺伝子が見られた。

なお、本研究の一部は生研センター基礎推進事業の一環として行われたものである

Analysis of polysaccharide composition of cell wall and RNA-Seq in *Aspergillus oryzae admA, admB* gene deletion strains

Takuji Kobayashi¹, Hiroshi Maeda¹, Toshinori Kozaki², Kazuo Ishii², Tsutomu Arie², Michio Takeuchi¹, Youhei Yamagata¹

(¹Dept. of Applied Life Science, Tokyo Univ. of Agriculture and Technology, ²Tokyo Univ. of Agriculture and Technology)

P-45

Aspergillus nidulans におけるガラクトフラノース転移酵素の機能解析

片淵由佳子¹, 篠塚早紀², 泉実², 浴野圭輔¹, 竹川薫³, 後藤正利³, 野村善幸¹, 岡拓二¹

(¹崇城大・生物生命, ²岡山大院・環境生命, ³九大院・農)

糸状菌 *Aspergillus nidulans* におけるガラクトフラノース (Gal_f) 転移酵素 GfsA は, 本研究室により同定された。これまでに GfsA は UDP-Gal_f を糖供与体として O-グリカン修飾タンパク質に Gal_f を転移する活性を有することが明らかとなっている。しかし GfsA の受容基質や, 合成される Gal_f 糖鎖の結合部位および立体配座は明らかとなっていない。本研究では受容基質として pNP-β-Gal_f 用いた GfsA の活性測定系の開発を試みた。糖供与体として UDP-Gal_f を用い, 精製した GfsA と 37°C で 24 時間反応させ, 反応産物を HPLC に供与したところ, 受容基質とは異なる新規なピークが 2 つ認められた。そこで得られた各ピークを分取し LC-MS および LC-MS/MS による質量分析を行った。その結果, 2 つのピークはそれぞれ UDP-Gal_f-Gal_f, UDP-Gal_f-Gal_f-Gal_f の分子量と一致した。以上のことより GfsA は pNP-β-Gal_f を受容基質として認識し, Gal_f 残基に Gal_f 残基を少なくとも 2 つまで転移する活性を有することが明らかとなった。一方, GfsA にはアミノ酸レベルでそれぞれ 27.5% と 26.0% の相同性を有する GfsB と GfsC が存在しているが, その発現量は低く, 酵素機能は不明である。そこで, *gfsB* および *gfsC* のプロモーター領域を構成的発現プロモーターである GAP プロモーターに置き換え, C-末端に 3xFLAG タグを挿入した株, GAP-GfsB-3xFLAG 株および GAP-GfsC-3xFLAG 株を構築した。抗-FLAG 抗体を用いたウエスタンブロットにより, GfsB および GfsC の発現を確認することができた。現在, GAP-GfsB-3xFLAG 株および GAP-GfsC-3xFLAG 株より精製した GfsB および GfsC を用いて酵素活性の検出を試みている。

Functional analysis of galactofuranose transferase in *Aspergillus nidulans*

Yukako Katafuchi¹, Saki Shinozuka², Minoru Izumi², Keisuke Ekino¹, Kaoru Takegawa³, Masatoshi Goto³, Yoshiyuki Nomura¹, Takuji Oka¹ (¹Univ. of Sojo, ²Univ. of Okayama, ³Univ. of Kyusyu)

P-46

麹菌 *Aspergillus oryzae* のザゼンソウ発熱関連遺伝子と相同性を示す遺伝子の発現比較

小笠原博信¹, 渡辺隆幸¹, 伊藤菊一², 五味勝也³

(¹秋田県総食研セ, ²岩手大農・寒冷バイオ, ³東北大院農・生物産業創成)

【目的】麴造りでは種麴菌の違いによって, 初期から温度が上がりやすい前急型と徐々に温度が上がる前緩型がある。菌株による発熱に関与する遺伝子発現の違いを想定し, 既に解明されている発熱植物ザゼンソウの発熱関連遺伝子である alternative oxidase 遺伝子 (SrAOX) と uncoupling protein 遺伝子 (SrUCPa, SrUCPb) の相同検索を行った。その結果, 2 種の AOX (AoAOX2, AoAOX7) と 3 種の UCP (AoUCPa2, AoUCPa3, AoUCPb5) を見出し, 麴温度特性の異なる菌株におけるそれら遺伝子の発現について検討した。

【方法】前急型味噌用麴菌 AOK209 株と前緩型 AOK139 株および RIB40 を用いて米麴を作成し, 24 時間と 48 時間目に定性 RT-PCR を行った。AOK139 株の高温処理による DNA トランスポゾン *Crawler* 変異株の中から 25°C における生育が良好で米麴の平均温度がより高い株 AOK139-LT4, LT33, LT40 を選抜した。24 時間目の麴から調製した total RNA を用いて qRT-PCR を行い, 各遺伝子の転写量比較を行った。

【結果】定性 RT-PCR では AoUCPa3 および AoUCPb5 が 24 時間目で発現が認められ, バンド強度は AOK209 >= RIB40 >> AOK139 であった。AOK139 の高温型 *Crawler* 変異株 LT4 では AoAOX7 と AoUCPb5, LT33 株では AoUCPa2 の転写上昇がそれぞれ認められた。さらに LT44 株では 5 種の遺伝子全ての転写比率が親株より高くなっていた。以上, これら発熱相同遺伝子は麴造りでの温度上昇に寄与していることが推定された。

Expression analysis of AOX and UCP genes homologous to plant thermogenesis genes in *Aspergillus oryzae*.

Hironobu Ogasawara¹, Takayuki Watanabe¹, Kikukatsu Ito², Katsuya Gomi³

(¹Akita Res. Inst. Food & Brewing, ²Cryobiofrontier Res. Center Agri. Iwate Univ., ³Div. Biosci. Biotech. Future Bioind., Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ.)

P-47

麴菌における Ustiloxin B 生合成遺伝子クラスター転写因子 *ustR* 高発現による Ustiloxin B 生産

吉見啓¹, 梅村舞子², 長野希美³, 小池英明², 町田雅之², 阿部敬悦^{1,4}

(¹ 東北大・NICHe, ² 産総研・生物プロセス, ³ 産総研・CBRC, ⁴ 東大院農・生物産業創成)

Ustiloxin B は, *Ustilagoidea virens* によって生合成されることが知られている二次代謝産物である。最近, *Aspergillus flavus* においても本化合物の生産が確認され, 子嚢菌では報告例のない ribosomal peptide synthetic (RiPS) 化合物として, その生合成に関与する遺伝子クラスターが同定された¹⁾。また, 麴菌 *A. oryzae* においても相同な遺伝子クラスターが存在することも明らかになっている¹⁾。一方, *A. oryzae* の野生株において, Ustiloxin B の生産は確認されておらず, クラスター内転写因子 (*ustR*) 周辺領域の欠損が生合成制御に関与すると推定されている。本研究では, *A. oryzae* において Ustiloxin B 生合成遺伝子クラスターの機能を解析するため, *ustR* の高発現株を造成し, Ustiloxin B の生産性を評価することを目的とした。まず, 麴菌用高発現プロモーター (PglA142, PenA142) によって *ustR* の発現を制御し, クラスター内遺伝子の発現応答を解析した。その結果, CD 最小培地, V8 培地において, *ustR* の高発現に伴うクラスター内遺伝子の発現上昇が確認できた。さらに, CD 培地では生産しないが, V8 培地において Ustiloxin B の生産が確認された。以上の結果から, 麴菌野生株における Ustiloxin B の非生産には *ustR* の機能不全が関与すること, クラスター内遺伝子の発現状況だけでなく, 培地栄養成分が Ustiloxin B の生合成には重要であることが示唆された。

(本研究は, 経済産業省委託事業「革新的バイオマテリアル実現のための高機能化ゲノムデザイン技術開発」の一部として実施された。) ¹⁾ Umemura et al., Fung. Genet. Biol., 68 (2014) 23-30.

Production of ustiloxin B by overexpression of the *ustR* gene in *Aspergillus oryzae*

Akira Yoshimi¹, Myco Umemura², Nozomi Nagano³, Hideaki Koike², Masayuki Machida², Keietsu Abe^{1,4}

(¹ NICHe, Tohoku Univ., ² BRI, AIST, ³ CBRC, AIST, ⁴ Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ.)

P-48 (O-5)

白色腐朽菌によるリグニン生分解に必須な遺伝子の同定にむけた基盤整備

中沢 威人¹, 宮崎 安将², 本田 与一¹ (¹ 京大・農, ² 森林総研)

担子菌門に分類される白色腐朽菌は, 超難分解性高分子リグニンを単独で生分解 (無機化) 可能な地球上唯一の生物である。長年, そのリグニン生分解に関わる酵素群の研究は盛んに行われてきた。近年では, 各種オミックス解析が盛んに行われ, 白色腐朽菌に関する生態・進化など各方面で興味深い知見が得られ始めている。しかし今日に至っても, なぜ白色腐朽菌がリグニンを生分解できるのか・それを可能にしている主要要素は実際何なのか, 特に遺伝子レベルでは上記肝心の点不明なままである。そこで本研究では, 白色腐朽菌ヒラタケを用いた順遺伝学 (リグニン生分解に必須な遺伝子の同定) を通じて, 上記の謎に迫ることを目標としている。本発表では, その実現のために行った種々の検討結果について報告する。

本研究では検討実験として, リグニン生分解能と相関を示す色素 (基質) 脱色能を指標とした突然変異体スクリーニングを行った。ゲノム解読され, 交配可能なモノカリオン PC9・PC15 間の F₁ 子孫において, 安定的に脱色能を保持する基質・培養条件を決定した後, PC9 株に対して UV 変異を導入した。結果, 約 150 株に 1 株の割合で基質脱色不全をきたす突然変異体が再現よく分離できた。次に, PC9・PC15 間における特定のゲノム配列差異を, PCR によって簡便かつ効率的に識別できる実験系を確立した。F₁ 分析において, 変異表現型が単一遺伝子の変異に起因すると示唆された突然変異体 B84×PC15 間の F₁ 子孫集団を, 上記 PCR による遺伝解析に供した。結果, 特定のゲノム領域が, 変異表現型と強く連鎖して分配されることを見いだした (PC9×PC15 では, そうではなかった)。以上を踏まえて現在は, ゲノム・リシーケンスを通じた変異箇所特定, そして推定変異遺伝子の相補実験によって, 原因変異遺伝子を特定することを試みている。

Forward Genetics in the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*: Towards understanding molecular mechanisms underlying wood decay

Takehito Nakazawa¹, Yasumasa Miyazaki², Yoichi Honda¹ (¹ Kyoto Univ., ² FFPRI)

P-49

担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* 由来 PQQ 依存性酸化還元酵素遺伝子のクローニングおよび発現

戸谷光平¹, 梅澤究², 石田卓也¹, 吉田誠², 五十嵐圭日子¹, 鮫島正浩¹ (¹東大院・農生科, ²農工大・農)

近年, 担子菌 *Coprinopsis cinerea* から PQQ 依存性糖質脱水素酵素 (CcSDH) が発見された。本酵素は, ヘムドメイン, PQQ を補酵素とした触媒ドメイン, および糖質結合モジュールから構成されている。この触媒ドメインを用いたゲノムデータベースの相同性検索の結果, 多くの真核生物が本 PQQ 酵素を有していることが示唆されたが, 機能解析されたものは *C. cinerea* 由来のみであり, 他の酵素に関する知見は乏しい。そこで, 本研究では, *Phanerochaete chrysosporium* から PQQ 酵素様遺伝子のクローニング, および発現解析を行った。

P. chrysosporium を, グルコースおよびセルロースを炭素源とした培地で培養し, 得られた菌体から一本鎖 cDNA を合成した。これを鋳型にして RACE 法を用いた PCR を行い, 目的遺伝子の 5'末端および 3'末端の配列を決定し, その後, 全長配列を決定した。この遺伝子の推定アミノ酸配列を, CcSDH の PQQ ドメインのアミノ酸配列と比較したところ, PQQ との結合に関与すると予想されるアミノ酸残基 5 つがすべて保存されていた。また, グルコース培地およびセルロース培地で同程度の発現が確認された。本タンパク質の機能解析を行うために, 現在, メタノール資化性酵母を用いた異種宿主発現を行っている。

Cloning and expression of a pyrroloquinoline quinone-dependent oxidoreductase gene from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*

Kohei Toya¹, Kiwamu Umezawa², Takuya Ishida¹, Makoto Yoshida², Kiyohiko Igarashi¹, Masahiro Samejima¹

(¹Univ. Tokyo, ²Tokyo Univ. of Agric. and Technol.)

P-50

担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* のセルラーゼ, ヘミセルラーゼ生産におけるキシログルカン添加効果

川村智樹, 中村彰彦, 石田卓也, 五十嵐圭日子, 鮫島正浩 (東大院・農生科)

【緒言】担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* はセルロースを炭素源として成長する際, セルロースやヘミセルロースを分解する酵素群を菌体外に分泌することが知られている。私たちのグループでは, セルロースに加えキシランを培地に添加することで本菌の初期成長がよくなり, セルロース分解酵素の生産量が増加することを明らかにした。しかしながら, 本菌のセルロース培養系にキシラン以外のヘミセルロース及びペクチンを添加した例はない。そこで本研究では *P. chrysosporium* の培地に各種のヘミセルロース及びペクチンを添加した際の菌体外の酵素活性の測定しキシラン添加時との比較を行った。

【方法と結果】*P. chrysosporium* を 2% のセルロースを炭素源とし, 各種のヘミセルロース及びペクチン (キシログルカン, キシラン, グルコマンナン, ペクチン) を 0.1% 添加した Wood 培地で振とう培養した。24 時間ごとにサンプリングを行い, 得られた菌体外液を用いて菌体外タンパク質濃度と *p*-ニトロフェノール (*p*NP) 配糖体の加水分解活性を測定した。キシログルカンを添加した培地で培養した場合は, キシランを添加した場合と同様に, セルロースのみを炭素源とする場合に比べ菌体外タンパク濃度および *p*NP- β -キシロシド加水分解活性が顕著に高くなることが明らかになった。また, *p*NP- β -ラクトシドの分解活性がキシランを添加した場合と比較して高くなることが明らかになった。

Effects of xyloglucan on cellulose and hemicellulase production by *Phanerochaete chrysosporium*

Satoki Kawamura, Akihiko Nakamura, Takuya Ishida, Kiyohiko Igarashi, Masahiro Samejima, (Univ. of Tokyo)

P-51

Aspergillus oryzae 由来新規なアセチルキシランエステラーゼの特徴づけ

大塚基広, 渡邊裕也, 塩野義人, 小関卓也 (山形大・農)

【目的】フェルラ酸エステラーゼあるいはアセチルキシランエステラーゼは植物細胞壁ヘミセルロースに存在するフェルラ酸あるいはアセチル基と糖のエステル結合を加水分解する酵素で、効率的なバイオマス分解や有用な生理活性物質であるフェルラ酸の抽出に寄与している。フェルラ酸エステラーゼは合成基質のフェルラ酸メチル(MFA), p-クマル酸メチル(MpCA), カフェ酸メチル(MCA), およびシナピン酸メチル(MSA)に対する特異性とアミノ酸配列の相動性に基づきタイプ A-D の 4 つに分類されている。今回, *Aspergillus oryzae* 由来でタイプ D に相同なフェルラ酸エステラーゼ様遺伝子の機能解析について発表する。

【方法】*A.oryzae* の遺伝子情報からタイプ D フェルラ酸エステラーゼに特徴づけされたものと相同性のある遺伝子(Ao090701000884)をクローン化し, *Pichia pastoris* GS115 を用いて発現させた。リコンビナント酵素は各種クロマトグラフィーにより精製し, 精製酵素を用いて特徴づけを行った。

【結果】分子量は SDS-PAGE で約 27kDa で計算値とほぼ一致した。最適 pH 及び温度はそれぞれ, pH8 および 30°C で, pH8-10 の領域および 40°C まで安定であった。α-ナフチルエステルに対する活性では, 酪酸エステルに対して最も活性が高く, 短鎖の脂肪酸エステルに対しては活性を示したものの, 長鎖の脂肪酸エステルでは活性を示さなかった。フェルラ酸エステラーゼ基質に対する活性は全く示さず, タンナーゼ基質の没食子酸メチル, パラベンエステラーゼ基質の 4-ヒドロキシ安息香酸メチルに対しても同様であった。一方, アセチル化したキシロースおよびグルコースから酢酸を遊離し, また小麦フスマからも酢酸を遊離するとともに, キシランナーゼとの相乗効果も示された。よって本酵素はタイプ D のフェルラ酸エステラーゼとアミノ酸配列は類似しているものの, タイプ D からの新規なアセチルキシランエステラーゼと特徴づけされた。

Characterization of a novel acetyl xylan esterase from *Aspergillus oryzae*

Motohiro Otsuka, Yuya Watanabe, Yoshihito Siono, Takuya Koseki

(Fac. Agric., Yamagata Univ.)

P-52

マツタケ (*Tricholoma matsutake*) 由来セルラーゼ遺伝子の cDNA クローニング

大沼広宜¹, 福田泰久¹, 楠田瑞穂², 寺下隆夫¹, 白坂憲章¹

(¹近畿大院・農応生化, ²大阪府大院・生命応生化)

マツタケ(*Tricholoma matsutake*)等の樹木に共生して生育するタイプのきのこは菌根菌と呼ばれ, 生育のための糖質等を, 菌根を介して得ているとされている。そのため, 菌根形成菌の人工培地上での生育は非常に遅いだけでなく, デンプンやセルロースといった天然の多糖を分解する能力が低く, 他の腐生性のきのこと同様の栽培法では人工栽培に成功していない。これまで, 当研究室においては, マツタケはセルロースを分解する酵素系として極めて強いβ-グルコシダーゼ活性を示すことを明らかにしたが, β-グルコシダーゼの基質となるセロオリゴ糖を供給するエンド型もしくはエキソ型セルラーゼの活性は極めて弱いと報告されている。菌根形成菌, 特にマツタケの生産する菌体外セルラーゼに関する報告例はこれまでにないことから, 我々は, Avicel を基質としてマツタケ由来のセルラーゼの単離・精製を試みた。その結果, 分子量約 80,000 の部分精製酵素を得ることができた。さらに, N 末端アミノ酸配列解析情報を基に BLAST 解析による相同性検索を行ったところ, GH ファミリー3 に属する cellulose-binding beta-glucosidase と相同性を示した。マツタケ改変液体培地で 30 日間静置培養した本研究室保存のマツタケ Z-1 株の菌糸体から total RNA を抽出した後, 逆転写反応により cDNA を合成した。この cDNA と配列情報を基に設計したプライマーを用いて PCR により, 本セルラーゼ遺伝子をクローニングした。現在, 本酵素の大量取得および酵素化学的諸性質の解明を目指し, 酵母もしくは大腸菌内での異種発現を試みている。

cDNA cloning of cellulase gene from *Tricholoma matsutake*.

Hiroki Onuma, Yasuhisa Fukuta, Mizuho Kusuda, Takao Terashita, Norifumi Shirasaka

(¹Grad-Sch. Agri., Kinki Univ., ²Grad-Sch. Life Env. Sci. Osaka Prefec Univ.)

P-53

特徴的な基質特異性を持つ麹菌由来新規 β -グルコシダーゼ (BglH) の酵素学的諸性質

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

我々は、麹菌(*Aspergillus oryzae*)ゲノム情報を元に未解析の新規 β -グルコシダーゼの機能解明をこれまで行ってきており、今回新たに特徴的な基質特異性を持つ β -グルコシダーゼを見出したので報告する。

探索した推定 β -グルコシダーゼ遺伝子を麹菌 RIB40 株のゲノム DNA を鋳型とした PCR 反応で取得し、麹菌高発現用ベクター pNGA142 に組み込み、*A. oryzae* AOK11 株に導入して推定新規 β -グルコシダーゼ遺伝子の高発現株を作製した。このうち、液体培養で pNPG を基質とした際活性が検出された BglH について、硫酸塩析、陰イオン交換クロマトグラフィーを用いて本酵素を精製した。BglH の至適温度、pH はそれぞれ 50°C、pH4.5 であった。また、本酵素は 60°C まで安定であり、麹菌由来の酵素中最も温度安定性が高かった。次に、基質特異性を検討したところ本酵素は合成基質の pNPG、天然オリゴ糖のゲンチオビオースに非常に高い特異性を示し、他の基質はほとんど分解しなかった。BglH は、既に報告した同じ麹菌由来の BglA とアミノ酸レベルで 62% と麹菌ゲノムに存在する GH3 ファミリー酵素の中では最も高い相同性を有していたが、BglA が大豆イソフラボンのような配糖体分解活性を有する酵素であるのに対して、BglH はこうした活性を示さず、両者の基質特異性には大きな違いが見られた。BglH の他の諸性質を合わせて報告する。(本研究は「復興促進プログラム (A-STEP) 探索タイプ」の一貫として JST の委託を受けて実施された。)

Characterization of a novel β -glucosidase (BglH) from *Aspergillus oryzae* with characteristic substrate specificity

Akira Watanabe, Moe Suzuki, Kanako Kudo, Seiryu Ujiie, Katsuya Gomi

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

P-54 (O-6)

糸状菌が細胞外に分泌する β -マンナン分解に関与する新規タンパク質の解析

金子優平¹, 石原紗彩那¹, 望月麻衣¹, 山本竜也¹, 前林正弘¹, 大場正春¹, 小林哲夫², 志水元亨¹, 加藤雅士¹ (¹名城大・農, ²名大院・生命農)

[目的] β -マンナンは様々な植物に含まれる難分解性多糖で、未利用バイオマスの一つであるため、バイオエタノールの原料などとして注目を集めている。我々は、 β -マンナンのみを唯一の炭素源として糸状菌 *Aspergillus nidulans* を生育させた際に、*endo*-1,4- β -マンナーゼと共に細胞外に多量に生産される機能未知タンパク質 (HP) を同定した。HP は既知のタンパク質と全く相同性を有しておらず、推定される機能ドメインも含まれていなかった。本研究では、糸状菌による β -マンナン分解における HP の役割を明らかにすることを目的とした。

[結果および考察] *hp* 遺伝子破壊株 (Δ HP 株) を作製し、 β -マンナンを唯一の炭素源とした培地で生育させたところ、野生株と比較して生育が抑制された。グルコース、セルロースなどを唯一の炭素源とした場合、野生株と同様に生育したことから、HP は β -マンナンの分解に関与すると考えられた。また、精製したリコンビナントおよびネイティブの HP を用いて解析したところ、HP は、ゲル化した β -マンナンの主鎖を加水分解せずに β -マンナン溶液の粘度を大きく低下させた。さらに、HP と *endo*-1,4- β -マンナーゼを混合すると、 β -マンナーゼによる β -マンナンの分解が促進された。これらのことから、HP は β -マンナン分子間の水素結合を切断し、繊維構造を緩める働きを持つエクспанシン様の機能を有していることが考えられた。

本研究の一部は生研センター「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。

Novel protein involved in β -mannan degradation from filamentous fungus *Aspergillus nidulans*

Yuhei Kaneko¹, Saaya Ishihara¹, Mai Mochizuki¹, Tatsuya Yamamoto¹, Masahiro Maebayashi¹, Masaharu Ohba¹, Tetsuo Kobayashi², Motoyuki Shimizu¹, Masashi Kato¹ (¹Meijo Univ., ²Nagoya Univ.)

P-55

麹菌 *Aspergillus oryzae* の持つ分泌型ホスホリパーゼ A₂ の酵素学的性質の解析

高柳亜由美¹, 宮川拓也², 大塚淳², 田之倉優², 北本勝ひこ¹, 有岡学¹

(¹東大院・農生科・応生工,²東大院・農生科・応生化)

【背景】ホスホリパーゼ A₂(PLA₂)はグリセロリン脂質の sn-2 位エステル結合を加水分解する酵素であり、動物においては盛んに研究が行われているが、微生物については、酵母が PLA₂ 遺伝子を持たないため知見が乏しく、その酵素学的性質や生理機能はほとんどわかっていない。これまでに我々は *A. oryzae* ゲノム中に 2 つの sPLA₂ オルソログ sPlaA と sPlaB を見出し、それぞれの異なる局在性などを明らかにしている。本発表では、sPlaA と sPlaB の酵素学的性質の解析を行い、sPlaB が予想外にも PLA₁ 活性を持つことを明らかにした。

【結果と考察】大腸菌で生産した組換え sPlaA および sPlaB について、1-パルミトイル-2-[¹⁴C]オレオイル-ホスファチジルコリン(PC)を基質に用いたアッセイを行ったところ、sPlaA については PLA₂ 活性に由来する [¹⁴C]オレイン酸の生成が認められたが、sPlaB では予想外にも PLA₁ 活性に由来する 2-[¹⁴C]オレオイルリゾ PC と考えられるスポットが検出された。マススペクトロメトリーによる測定においても上述の結果と一致したピークが検出された。これらの結果から、sPlaA は配列から予測された通り PLA₂ 活性を持つのに対し、sPlaB は PLA₂ のオルソログであるにも関わらず PLA₁ 活性を示すことがわかった。さらに、sPLA₂ において保存された活性中心残基であるヒスチジンをアラニンに置換した変異 sPlaB タンパク質を作製し、[³H]オレイン酸標識した大腸菌膜画分を基質としたアッセイを行ったところ、活性が見られなくなった。このことから、sPlaB の持つ PLA₁ 活性が他の sPLA₂ と同様の触媒機構によるものであることが示唆された。

Analysis of two secretory phospholipases A₂ in *Aspergillus oryzae*

Ayumi Takayanagi¹, Takuya Miyakawa², Jun Ohtsuka², Masaru Tanokura², Katsuhiko Kitamoto¹, Manabu Arioka

(¹Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo; ² Dept. of Appl. Biol. Chem., Univ. of Tokyo)

P-56

黄麹菌 *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・応生化)

【目的】ゲノム解析の結果、黄麹菌 *A. oryzae* RIB40 には酸性条件下で作用しペプスタチンに阻害されるエンド型プロテアーゼであるアスパルティックプロテアーゼ (APase) をコードすると推定される遺伝子が 11 個存在することが明らかとなった。この 11 の APase は液胞局在、膜局在、菌体外分泌型の 3 種に分類されることが推測されており、*pepO* 遺伝子は 5 つある菌体外分泌型のうちのひとつである。以前の報告より、APase 遺伝子すべてで mRNA の存在が確認され、転写されていることが示唆された。その一方で菌体外においてタンパク質として検出されたのは PepO のみであった。以上の結果を受け、本研究では $\Delta pepO$ を作製し、その欠損が他の菌体外の酸性で作用する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】 $\Delta pepO$ 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カゼインを基質として行ったところ、野生株 RIB 40 に比べ約 3~4 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、また、残存活性の主なものは antipain により強く阻害を受けることが明らかとなった。antipain に阻害され酸性で作用するエンド型プロテアーゼである AorsinA の基質 Z-Arg-Arg-MCA に対して、AMC を遊離する活性が認められた。以上のことから $\Delta pepO$ 株は酸性で作用する AorsinA を生産していることが明らかになった。 $\Delta pepO \Delta aorsinA$ を作製した。この株と RIB40 の酸性で作用するエンド型プロテアーゼについて検討している。

なお、本研究の一部は生研センター基礎推進事業の一環として行われたものである

Analysis of extracellular endoproteases in *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-57

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)

5つの炭素からなるイソプレン単位をその構成単位とするテルペノイドは天然に大きな割合を占める化合物群であるが、この中において5つのイソプレン単位に由来するセスタテルペン類は報告例の少ない比較的稀な化合物群として知られる。加えて、セスタテルペン類においてはその生合成経路に関しても未だ研究例が少ない。そこで本研究では、セスタテルペン生合成関連酵素遺伝子の同定とその機能解析に取り組むこととした。

昆虫、高等植物、海綿動物など幅広い生物種からの単離報告があるセスタテルペンであるが、糸状菌もその主要な生産者のひとつとして知られている。我々は、多様な骨格ならびに生物活性を有するセスタテルペン類の単離が報告されている糸状菌 *Emericella varicolor* に着目し、ゲノムマイニングの手法を用いて本菌のゲノム情報からセスタテルペン合成酵素遺伝子を検索した。加えて、糸状菌の二次代謝物の生合成に関わる酵素遺伝子はゲノム上で局在化する傾向にあることからセスタテルペン合成酵素遺伝子の周辺領域を検索し、セスタテルペンの修飾に関わると予想される酵素遺伝子を見出した。

これら遺伝子の機能解析は、異種糸状菌 *Aspergillus oryzae* にて発現系を構築し、その代謝物を解析することによって行った。その結果、 $C_{25}H_{40}$ の分子式を持つ環状テルペノイドを産物として与えるセスタテルペン合成酵素遺伝子の取得に成功した。また、その環化産物は当該遺伝子の近傍に存在するシトクロム P450 によって既知セスタテルペンである stellatic acid へと変換されることも判明し、stellatic acid 生合成の分子基盤を明らかにするに至った。

The search for sesterterpene synthases from *Emericella varicolor*

Takaaki Mitsuhashi, Yudai Matsuda, Takayoshi Awakawa, Ikuro Abe

(Graduate School of Pharmaceutical, Univ. of Tokyo)

P-58

シイタケ (*Lentinula edodes*) における GABA 生成に関与する酵素について

岩本和子, 福田泰久, 白坂憲章 (近畿大・農・応生化)

γ -アミノ酪酸 (GABA) は自然界に広く分布する非タンパク質構成アミノ酸の一種であり、血圧上昇抑制作用、利尿作用、糖尿病の予防などに効果があるといわれていることから、近年、機能性食品素材として注目を集めている。一般的に GABA はピリドキサル 5'-リン酸依存酵素であるグルタミン酸デカルボキシラーゼ (GAD) による L-グルタミン酸の脱炭酸反応によって生成されることが明らかになっており、これまでに動物、植物、細菌、菌類由来の GAD が精製され、その性質が報告されている。一方、食用きのこにおいても GABA が多く含まれているという報告があるにも関わらず含量や生成経路について詳細に検討された例は少なく、食用きのこを含む担子菌由来 GABA 蓄積に関与する酵素についての報告は少ない。そこで、食用きのこ中の GABA 含量を明らかにすると共に、GABA 生合成に関与する酵素を精製し、その性質を明らかにすることを試みた。

市販シイタケ子実体を 50mM 酢酸バッファー (pH4) と共に破碎後、遠心分離より得られた上清を硫酸塩析、陰イオン交換クロマトグラフィー、陽イオン交換クロマトグラフィーを用いて精製し、収率 7.14%、精製倍率 9.28 倍で、電気泳動的に単一の酵素を得た。精製酵素の分子量は SDS-PAGE より約 49kDa、HPLC-GPC より約 131kDa であったことから、本酵素は二量体であることが示唆された。最大活性は 37°C、37°C まで活性は安定であった。精製酵素の内部アミノ酸配列を解析し、相同性を森林総合研究所より提供されている ForestGEN の *Lentinula edodes* データベース内で検索したところ、phosphatidyl serin decarboxylase (psd) と 100% の相同性を示した。また、psd 遺伝子の塩基配列を基にプライマーを設計し、cDNA クローニングを行った。

Study on the enzyme related with GABA formation in *Lentinula edodes*

Kazuko Iwamoto, Yasuhisa Fukuta, Norifumi Shirasaka

(Div. Appl. Biochem., Agr. Sci, Kin-ki Univ.)

P-59

異なる温度で培養した *Aspergillus fumigatus* 胞子の比較トランスクリプトーム解析

萩原大祐¹, 酒井香奈江¹, 鈴木聡², 亀井克彦¹, 五ノ井透¹, 川本進¹ (¹千葉大・真菌センター, ²食総研)

病原真菌 *Aspergillus fumigatus* は肺アスペルギルス症の主要な原因菌であり, 胞子は重要な感染因子である。環境中に遍在する胞子は, 実験室における均質な培養で着生したのとは異なり, 自然環境中の多様な条件のもとで着生したものが混在している。そこで我々は, 培養条件の違いにより着生する胞子の諸性質が変化するという仮説を立て検証した。本発表では培養温度の影響を検討している。

最適培養温度である 37°Cに加えて, 生育速度が低下する 25°Cおよび 45°Cにおいて, *A. fumigatus* を PDA に植えて 7days 培養後の胞子を回収した。25°C培養で回収した胞子 (25°C胞子) は他の試料に比べて濃い灰緑色を呈し, UV に対して優勢な耐性を示したことからメラニン量の増加が示唆された。さらに, 25°C胞子は他の試料に比べて熱ストレスに対して感受性が増大しており, 胞子内のトレハロース量も減少している事がわかった。培養温度による影響をゲノムワイドに理解するため, 胞子内の mRNA から RNA-sequencing によるトランスクリプトーム解析を行った。その結果, 1) 37°Cの培養において菌糸と胞子とで比較すると 1079 遺伝子が胞子特異的な発現を示した。2)メラニン合成系遺伝子群の発現は 25°C胞子で顕著に高い値を示した。3) 25°C胞子で特異的に発現している二次代謝クラスターを見出した。現在, 25°C胞子に特異的な二次代謝クラスター内に含まれる PKS と推定転写制御因子の遺伝子破壊株を作製中であり, 本クラスター内の転写制御メカニズムの解明や最終産物の同定を目指している。

Comparative transcriptome analysis for conidia harvested from different culture temperatures

Daisuke Hagiwara¹, Kanae Sakai, Satoshi Suzuki², Katsuhiko Kamei¹, Tohru Gonoi¹, Susumu Kawamoto¹

(¹MMRC, Chiba Univ., ²NFRI)

P-60

白麹菌における推定転写制御因子 *NosA* と *RosA* の解析

二神泰基¹, 田代智史², 梶原康博³, 高下秀春³, 竹川薫², 玉置尚徳¹, 後藤正利² (¹鹿児島大・農, ²九大院・農, ³三和酒類)

先研究において, 麦麹造りににおける白麹菌 *Aspergillus kawachii* の DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析を行った。その結果, 製麹過程 (40°Cから 30°C への培養温度低下後) において顕著に発現変動する遺伝子の中に推定転写制御因子をコードする *nosA* と *rosA* を同定した。*NosA* と *RosA* は, モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* においては有性生殖に関与することが報告されていた。しかし, 白麹菌には有性世代は見出されていないため, これらの推定転写制御因子が白麹菌においてどのような生理機能をもつのかに興味をもたれて解析を行った。

まず, *nosA* と *rosA* の単独遺伝子破壊株, および二重遺伝子破壊株を構築した。これらの菌株の表現型を観察した結果, *nosA* 破壊株と *rosA* 破壊株は野生株と同様の表現型を示した。一方, *nosA rosA* 二重破壊株は, 分生子形成能が野生株の約 20%に低下した。次に, 各遺伝子破壊株を宿主として, Tet-On 発現誘導システムにより *NosA*-GFP および *RosA*-GFP を発現する相補株を構築した。蛍光顕微鏡による観察の結果, *NosA*-GFP と *RosA*-GFP は核に局在することが示唆された。以上の結果より, *NosA* と *RosA* は白麹菌において生子形成に関わる遺伝子発現制御に関与する可能性が示唆された。

Characterization of putative transcription factors, *NosA* and *RosA*, in *Aspergillus kawachii*

Taiki Futagami¹, Satoshi Tashiro², Yasuhiro Kajiwara³, Hideharu Takashita³, Kaoru Takegawa², Hisanori Tamaki¹,

Masatoshi Goto² (¹Kagoshima Univ., ²Kyushu Univ., ³Sanwa shurui Co. Ltd)

P-61

鉄恒常性に関わる転写因子 HapX と CCAAT-box 結合因子 HapB/C/E との相互作用

中村隼人, 金子優平, 志水元亨, 加藤雅士 (名城大学・農学部)

[背景・目的]

HapX は、我々の研究グループが初めて CCAAT-box 結合因子 (HapB/C/E 複合体) と相互作用する因子として見出した真菌類に特有の転写因子である。HapX は鉄欠乏時に鉄を含むタンパク質の遺伝子発現を抑制するなどして、鉄の恒常性維持機構の中心的な役割を果たしている。我々は既に、HapB/C/E 複合体存在下での HapX の DNA 結合様式についての研究を詳細に進めてきた。今回は HapX と HapB/C/E 複合体との相互作用の分子機構を明らかにすることを目的とした。本研究では、*Aspergillus nidulans* における HapX の HapB/C/E 複合体との推定相互作用ドメインに着目し、HapX と HapB/C/E 複合体との相互作用を *in vivo*, *in vitro* 両面から詳細に解析した。

[方法・結果]

HapB/C/E 複合体との推定相互作用ドメイン (HCI ドメイン) を欠失させた変異 *hapX* 遺伝子を作製し、*hapX* 欠失株 ($\Delta hapX$ 株) を形質転換することで、HapX の HCI ドメイン欠失株 ($\Delta hcid$ 株) を作製した。HCI ドメインを欠失させた $\Delta hcid$ 株は、 $\Delta hapX$ 株と同様に鉄制限下での生育が著しく悪くなった。このことから、このドメインが HapX の機能に重要な働きをしていることが示された。さらに、HCI ドメインの機能を詳細に調べるために、それぞれのリコンビナントタンパク質を大腸菌に発現させ精製した。精製したリコンビナントタンパク質を用いて、ゲルモビリティシフトアッセイを行ったところ、HCI ドメインを欠失させた変異 HapX は、野生型の HapX に比べ HapB/C/E 複合体との相互作用が著しく低下していた。以上の結果より、HCI ドメインが HapB/C/E 複合体との相互作用に必要であることが強く示唆された。

Interaction of HapX, involved in iron homeostasis, with the fungal CCAAT-binding factor, HapB/C/E complex.

Hayato Nakamura, Yuhei Kaneko, Motoyuki Shimizu, Masashi Kato (Faculty of Agriculture, Univ. of Meijo)

P-62 (O-9)

麹菌の転写因子 FlbC は固体培養特異的発現を示すグルコアミラーゼ遺伝子 (*glaB*) の発現を制御する

吉村緑, 田中瑞己, 新谷尚弘, 五味 勝也 (東北大院・農・生物産業創成)

麹菌の固体培養特異的に生産されるグルコアミラーゼ GlaB は、菌糸成長阻害条件、低水分活性条件、高温培養条件という 3 条件によりプレート培養でも誘導生産が可能である。この条件を満たす培養条件として、50%マルトースを含む寒天培地 (低水分活性) に載せたナイロン膜上 (菌糸成長阻害) で麹菌を培養し、ナイロン膜に分泌吸着された GlaB を抗体反応で再現性高く検出することに成功した。この方法を用いて転写因子破壊株ライブラリー434 株のスクリーニングを行い、選抜した 19 株について小麦ふすまを用いた固体培養を行い、グルコアミラーゼ活性と α -アミラーゼ活性を測定した。その結果、 α -アミラーゼ活性に対するグルコアミラーゼ活性が *glaB* 破壊株と同程度まで低下した株が 1 株得られた。この株は分生子形成に関わることが報告されている C₂H₂ 型転写因子 FlbC の遺伝子破壊株であったことから、FlbC と同様の経路で機能する他の転写因子破壊株について GlaB 生産を調べたが、顕著な生産低下は認められなかった。さらに、GlaB と同様に固体培養で特異的に生産されるプロテアーゼとチロシナーゼを測定したところ、*flbC* 破壊株では酸性プロテアーゼ活性の低下がみられ、FlbC は GlaB の発現だけでなく酸性プロテアーゼ遺伝子の発現にも関与する可能性が示唆された。(本研究は「農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業」の支援を受けて行われた。)

The *Aspergillus oryzae* transcription factor FlbC involved in the expression of the *glaB* gene specifically expressed in solid-state culture

Midori Yoshimura, Mizuki Tanaka, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi

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

P-63

Aspergillus oryzae 転写因子 XlnR/AraR による転写制御機構の解析

石川香南, 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 型の転写因子であり, いずれもペントース代謝系遺伝子群を正に制御する。いくつかの遺伝子は XlnR, AraR 双方により制御されているが, その機構は未だ明らかとなっていない。そこで本研究では, アラビノース代謝系酵素をコードする *lxrA*, *xdhA*, *xkiA* のプロモーター領域に存在する XlnR, AraR の結合部位を同定した。また, ペントース代謝系の第一の酵素をコードする *larA* 及び XlnR 制御下遺伝子である *xynF1* のプロモーター領域に存在する XlnR, AraR 結合配列を基準とし, XlnR, AraR それぞれの結合配列の自由度を解析した。

【結果・考察】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, *lxrA*, *xdhA*, *xkiA* プロモーターに存在する DNA 結合部位を同定したところ AraR は *lxrA* では 1 箇所, *xdhA* では 2 箇所 *xkiA* では 1 箇所の 5'-CGGNNA(A/T)(A/T)-3' というコンセンサス配列に結合し, XlnR も同配列に結合することが示唆された。これを受け *xdhA* プロモーターに存在する AraR 結合配列をプローブとし XlnR, AraR 共存在下での結合の様子を確認したところ, XlnR と AraR が同時に結合することはなかった。これは両者の結合が競合することを示している。*larA* プロモーター内の AraR 結合配列と *xynF1* プロモーター内の XlnR 結合配列を用いて XlnR, AraR の結合配列の自由度を解析した結果, AraR 特異的, XlnR 特異的, ならびに両者共有の結合配列が存在することが明らかとなった。また, XlnR に関しては, 配列によって結合分子数が変化した。これらはわずかな塩基配列の違いにより, 結合部位の転写制御機能が大きく変化する可能性を示唆している。

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と農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業の一貫として行われたものである。

The mechanism of regulation by XlnR/AraR in *Aspergillus oryzae*

Kana Ishikawa, Kyoko Kanamaru, Makoto Kimura, Tetsuo Kobayashi

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

P-64 (O-8)

Functional binding characteristics of ManR/ClrB to regulate cellulase and mannanase production in *Aspergillus nidulans*

Nuo Li, Emi Kunitake, Kyoko Kanamaru, Makoto Kimura, Tetsuo Kobayashi

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

ManR in *Aspergillus oryzae* and ClrB in *A. nidulans*, which are orthologous to each other, were identified independently as transcriptional activators involved in mannanase and cellulase genes. Cellulase genes are under control of not only ManR/ClrB but also McmA that contributes to activation of cellulase genes via recruiting ManR/ClrB to CeRE (Cellulose Responsive Element). In the case of mannanase genes, McmA is generally not required. It has been shown that ManR binds to the promoter region of *mndB* that encodes β -mannosidase without assistance of McmA.

To identify the functional binding site for ManR *in vivo*, DNA fragments of three binding sites (CGGN₈CCG) on the *mndB* promoter were independently fused to the coding region of *A. oryzae* α -amylase gene (*taaG2*) and integrated at the *argB* locus of *A. nidulans* genome. The transformants that exhibited highest amylase activity in response to cellulose carried the sequence CGGAGCGAAACCCG that located at -547 ~ -560 relative to the translation start site of *mndB*, which indicated that this region works as the recognition site of ManR *in vivo*. Meanwhile, the recognition sequence of ManR on the promoter of the endoglucanase gene *eglB* was examined *in vitro* by supershift assay. The ManR-Mc mA binding site of *eglB* consists of two overlapped CeRE in the opposite direction (CCGN₂CCN₆GGN₂CCG). Mutation of CCG and CGG led to stronger binding of Mc mA and loss of Mc mA assisted ManR binding. This implies that ManR binding to CeRE is supported by interaction with Mc mA as well as the CGG triplet. All above discoveries will help to understand the binding property of ManR that involved in regulatory function.

This work was supported by the Program for Promotion of Basic and Applied Researches for Innovations in Bio-oriented Industry and the Science and technology research promotion program for agriculture, forestry, fisheries and food industry.

P-65

麹菌マルトース資化遺伝子クラスターのアミラーゼ誘導生産への関与

市川昂典, 長谷川一城祥子, 田中瑞己, 新谷尚弘, 五味勝也 (東北大院・農・生物産業創成)

【背景】麹菌 *Aspergillus oryzae* はアミラーゼを始めとするデンプン分解酵素を多量に生産することから、清酒醸造に利用されている。麹菌におけるアミラーゼの遺伝子発現には転写因子 AmyR が関与しており、AmyR はマルトース、イソマルトースによって活性化されるものと考えられている。そのためアミラーゼ生産には誘導基質であるマルトースの細胞内への取り込みが重要な過程であると考えられる。麹菌においてマルトーストランスポーターMalP は転写因子 MalR の制御を受けている。そこで *malP* 破壊株, *malR* 破壊株を作製し、マルトース資化遺伝子のアミラーゼ生産への関与を解析した。

【結果】デンプンを炭素源に用いたプレートアッセイを行った結果、*malP* 破壊株および *malR* 破壊株において生育の悪化が観察された。また、両破壊株ともにマルトース液体培地における α アミラーゼの誘導生産の低下が観察された。同時に培地中のマルトース濃度を測定することで、菌体内へのマルトースの取り込みの測定を行った結果、これらの破壊株でマルトースの取り込みの遅延が認められた。特に *malP* 破壊株でアミラーゼ生産の低下、および取り込み遅延が顕著であった。このことから麹菌のアミラーゼ生産にはマルトーストランスポーターによるマルトースの取り込みが重要であることが示唆された。

Involvement of maltose-utilizing (*MAL*) cluster in inducible production of α -amylase, in *Aspergillus oryzae*

Takanori Ichikawa, Sachiko Hasegawa-Shiro, Mizuki Tanaka, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi

(Div. Biosci. and Biotechnol. FutureBioind., Grad. Sch. Agric., Tohoku Univ.)

P-66

黄麹菌 *Aspergillus oryzae pepO* 遺伝子の *cis*-element の探索

山崎周平, 前田浩, 竹内道雄, 山形洋平 (農工大院・農)

【目的】RNA-Seq による *A. oryzae* RIB40 における菌体外分泌型アスパルテックプロテアーゼ遺伝子の転写解析の結果、小麦フスマ固体培地において、エンド型プロテアーゼをコードする *pepO* が最も高い転写量を示した。そのため *pepO* 遺伝子上流には転写促進に寄与する *cis*-element が存在すると考えられた。本研究では、*pepO* プロモーターの *cis*-element の同定を目的として、*amylase* 三重破壊株を宿主に用い、 α -amylase をレポーターとしたレポーターアッセイ法により *pepO* のプロモーター活性を調べることにした。また、*amylase* 三重破壊株を用いたレポーターアッセイ法を確立することも目的としている。

【方法・結果】*pepO* プロモーターの *cis*-element を明らかとするため、*pepO* 上流 2,000 bp から 500 bp ずつ欠失させた配列と α -amylase 遺伝子を連結したプラスミドを作成し、*amylase* 三重破壊株に導入した。獲得した 4 種の α -amylase 発現株について、*pepO* プロモーター活性を比較するため、*amylase* 活性をヨウ素デンプン反応により測定した。その結果、*pepO* 上流 1,000 bp を連結した株の *amylase* 活性は、1,500 bp を連結した株と比較して約 4 分の 1 にまで減少した。このことから、*pepO* 上流 1,500 bp から 1,000 bp の間に *pepO* の転写を正に制御する *cis*-element が存在することが示唆された。現在、*cis*-element を絞り込むために *pepO* プロモーター 1,500 bp から 1,000 bp を 100 bp ずつ欠損された株について解析を進めている。

Identification of *cis*-elements for *pepO* in *Aspergillus oryzae*

Shuhei YAMAZAKI, Hiroshi MAEDA, Michio TAKEUCHI, Youhei YAMAGATA

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

P-67

糸状菌 *Trichoderma reesei* のアスパラギン酸プロテアーゼの発現誘導機構の解明

塩屋幸樹, 雪真弘, 佐藤春菜, 志田洋介, 小笠原渉 (長岡技科大・生物)

糸状菌 *T. reesei* において、セルロース・キシラン系誘導物質によるセルラーゼ・ヘミセルラーゼ発現誘導機構が広く研究されている。これらの遺伝子の転写制御において中心的な役割を担う転写因子 Xyr1 が報告されている。一方、*T. reesei* が自然界で生育する環境中には様々な栄養源が存在し、それらに応答して誘導される未知のタンパク質発現機構の存在が考えられている。これまでに *T. reesei* を様々な植物細胞壁構成成分を炭素源として培養を行った結果、単糖で高い誘導性を示したアスパラギン酸プロテアーゼ (TrAsP) を同定した。本研究では TrAsP の発現誘導機構の解明を行った。

TrAsP の誘導は、単糖のなかでもガラクトースでもっとも強く誘導されることが示された。そこで、ガラクトースとセルラーゼ誘導基質であるソフォロースを炭素源としたときの誘導実験を行った。その結果、ガラクトースでセルラーゼ関連遺伝子群が誘導されないのに対し、TrAsP は強く誘導されていた。一方、ソフォロース誘導では、セルラーゼ関連遺伝子群は誘導されていたが、TrAsP は誘導されなかった。次に、両基質存在下で誘導実験を行った結果、セルラーゼおよび TrAsP の発現量の減少が確認された。また、様々な窒素源を用いて同様な実験を行い、TrAsP が窒素源特異的 (特に BSA) で誘導されることを確認した。しかし、BSA とガラクトースを含む培地で誘導実験を行ったところ、TrAsP の発現量は BSA 単独より低くなった。これらのことより、TrAsP の発現はガラクトースで強く誘導され、既知のセルラーゼ発現誘導機構とは異なる制御下にあることが示唆された。また、ガラクトースによる TrAsP の発現誘導機構は窒素源による発現誘導機構とも異なることも示唆された。さらに、マイクロアレイを用いて TrAsP と協調的に発現する遺伝子の探索を行った結果、TrAsP と同じ発現パターンを示すプロテアーゼの存在も示唆された。

Transcriptional mechanism of *Trichoderma reesei* aspartic protease

Koki Shioya, Masahiro Yuki, Haruna Sato, Yosuke Shida, Wataru Ogasawara

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

P-68

Aspergillus nidulans セルラーゼ・ヘミセルラーゼの発現に関わるトランスポーターの解析

國武絵美, 金丸京子, 木村真, 小林哲夫 (名大院生命農・生物機構)

Aspergillus nidulans はセルロースの分解産物であるセロビオース存在下で、2種の転写因子 ManR/C1rB と McmA に依存して誘導的にセルラーゼを生産する。すなわち、セロビオースの認識や取り込みがこれら転写因子の機能制御に重要である。そこでセロビオースの輸送に関与すると予想される糖トランスポーターを探索し、それらの破壊や高発現がセロビオースを始めとする各種糖類の資化に及ぼす影響を解析した。

セロビオース誘導条件下での RNA-seq 解析より、セロビオース存在下で発現する推定糖トランスポーターを4種見出した。これら遺伝子の破壊株及び高発現株を作製し、セロビオースを単一炭素源とした培地での生育を観察した。高発現株においてセロビオース培地での生育の亢進が認められた3種について *cdtA*, *cdtB*, *cdtC* と命名した。*cdtA* と *cdtB* はそれぞれセロビオーストランセプターとして報告されている *Neurospora crassa cdt-1* 及び *cdt-2* のオルソログである。セロビオース培地での生育低下が認められた破壊株はなかったが、*cdtA* 破壊株はラクトースでの生育が低下していた。次にセルラーゼ及びマンナーゼ生産性を調べたところ、いずれにおいても CMC プレート上でのハロの変化は見られなかったが、ガラクトマンナンでは *cdtA*, *cdtB*, *cdtC* の高発現株でハロが拡大し *cdtA* 破壊株では縮小したことから、これらがマンナーゼ発現誘導物質の認識や取り込みに関与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」と農林水産省「農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業」の支援を受けて行われた。

Possible transporters involved in cellulase and hemicellulase expression in *Aspergillus nidulans*

Emi Kunitake, Kyoko Kanamaru, Makoto Kimura, Tetsuo Kobayashi

P-69

トランスポーター改変によるコウジ酸の大量生産

佐野元昭, 北川治恵, 大箸信一 (金沢工大)

【目的】 コウジ酸は麹菌(*Aspergillus oryzae*)で生産される二次代謝産物で,チロシナーゼ活性を阻害することによりメラニンの生成を抑制する。コウジ酸は培地中に少量の硝酸ナトリウムを添加すると,生産が著しく阻害されることが知られている¹⁾。そこで今回我々は,麹菌の硝酸ナトリウムの取り込みに関わるトランスポーターを見出し, その遺伝子を破壊することでコウジ酸の生産系の改変を目指した。

【方法と結果】 麹菌データベース中より,硝酸ナトリウムの取り込みに関わるトランスポーター遺伝子(*nrtA*)を見出した。次に,この遺伝子の破壊株を取得しコウジ酸生産の影響の解析を行った。その結果, $\Delta nrtA$ 株は高濃度に硝酸ナトリウムが存在する条件下でもコウジ酸の生産が確認された。また, $\Delta nrtA$ 株ではコウジ酸生産条件下でコウジ酸生産に関わる遺伝子(*kojiA,R,T*)が,コントロール株に対して高発現していることが確認された。現在,更なる詳細な解析を進めている。

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

Over expression of kojic acid synthesis genes by the transporter modification

Motoaki Sano, Harue Kitagawa, Shinichi Ohashi (KIT)

P-70

麹菌のエルゴステロール生合成を制御する転写因子 AtrR と SrbA の機能および細胞内局在解析

杉山航平, 大場歩, 萩原大祐¹, 田中瑞己, 新谷尚弘, 川本進¹, 五味勝也

(東北大院・農・生物産業創成,¹千葉大・真菌センター)

日和見感染症として医療上深刻な問題となっているアスペルギルス症の主な原因菌である *Aspergillus fumigatus* に対する有効な薬剤としてアゾール系薬剤が汎用されているが,糸状菌の示す薬剤多剤耐性が真菌症治療の大きな障害となっている。麹菌 *A.oryzae* が示すアゾール系薬剤耐性には ABC トランスポーターの関与が予想され, これら遺伝子群は Zn2Cys6 型転写因子 AtrR によって制御されている。また, *AfatrR* 破壊株の RNA-seq 解析により, AtrR は ABC トランスポーターのみならず, bHLH 型転写因子 SrbA 制御下のエルゴステロール生合成酵素遺伝子群の発現にも関わっていた。この事は AtrR と SrbA がエルゴステロール生合成経路を協調的に制御していることを示唆しており, その制御機構の解明を目指した。

atrR/srbA 二重破壊株を作成し, アゾール系薬剤を含む培地において生育試験を行ったところ, 二重破壊株は *atrR* 単独破壊株と同等の感受性を示した。これより, *atrR* はエルゴステロール生合成経路を直接的に制御している可能性が示唆された。次に, 各転写因子の両末端に GFP を連結させたプラスミドを構築し, 各転写因子破壊株に導入することで細胞内局在解析を行った。その結果, AtrR は構成的に核に局在し, SrbA は核膜/小胞体に局在していた。現在, SrbA の細胞内での更なる挙動を解析中である。

Functional and subcellular localization analyses of transcription factors, AtrR and SrbA, involved in ergosterol biosynthesis in *Aspergillus oryzae*

Kohei Sugiyama, Ayumi Ohba, Daisuke Hagiwara¹, Mizuki Tanaka, Takahiro Shintani, Susumu Kawamoto¹, Katsuya Gomi (Div. Biosci. Biotechnol. Future Bioind., Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ.,¹MMRC, Chiba Univ)

P-71

Aspergillus nidulans の sirtuin アイソザイムによる二次代謝系の発現制御

伊藤英里子, 茂本亮輔, 榎尾俊介, 高谷直樹 (筑波大院・生命環境)

sirtuin はヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) クラスⅢに分類される NAD⁺依存的 HDAC であり生物界に広く保存されている。sirtuin はヒストン H4 の脱アセチル化を促進することによって、ヘテロクロマチン構造の形成の促進と当該遺伝子のジーンサイレンシングを行う。我々は、糸状菌のモデル生物である *Aspergillus nidulans* の sirtuin (SirA)が、NAD⁺依存的にヒストン H4K16 を脱アセチル化することによってステリグマトシスチンおよびペニシリン G の生合成遺伝子発現とその生産を抑制することを見出した。しかし、SirA が制御する他の二次代謝系や SirA 以外の sirtuin タンパク質の機能については不明である。

今回我々は、DNA マイクロアレイ解析によって SirA が複数の二次代謝系遺伝子の発現を抑制していることを見出した。さらに、本菌の sirtuin 様タンパク質をコードする AN1226, AN1782, AN7461 および AN11873 のうち、AN1782 および AN7461 に対応する組換えタンパク質が sirtuin 活性を有することを発見した。また、*sirA*, AN1226, AN1782, AN7461 および AN11873 の遺伝子破壊株の菌体を HPLC によって解析したところ、各遺伝子破壊株は野生株と異なる代謝産物を生産することが見出された。このうち、*sirA*, AN1782 および AN11873 遺伝子の欠損によって austinol および dehydroaustinol の生産量が増加し、これらの生合成遺伝子の発現が上昇していた。これらのことから、austinol および dehydroaustinol は *sirA*, AN1782 および AN11873 によってエピジェネティックに制御されることが明らかとなった。また、各 sirtuin が影響を与える代謝産物が異なっていたことから、各 sirtuin はそれぞれ異なる二次代謝系の遺伝子の発現を制御すると考えられた。

Aspergillus nidulans sirtuins regulate secondary metabolisms

Eriko Ito, Ryosuke shigemoto, Shunnsuke Masuo, and Naoki Takaya (Faculty of Life and Environmental Sciences, Univ. of Tsukuba)

P-72

黄麹菌セリントイプカルボキシペプチダーゼ遺伝子におけるイントロン残存性の解析

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

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* のセリントイプカルボキシペプチダーゼ遺伝子 *ocpG* ではイントロン残存が起こり、*ocpG* 遺伝子中に存在する 3 つのイントロンはそれぞれ残存割合が異なることを一昨年の本コンファレンスで報告した¹⁾。*ocpG* 遺伝子のイントロンの配列と位置のいずれかがスプライシングパターンに影響を与えているのか明らかにするために、イントロン配列のみを入れ替えた *ocpG* 遺伝子を作製しそれぞれのイントロンのスプライシングパターンの変化を検討した。

ocpG 遺伝子欠損株を宿主として、*ocpG* 遺伝子の第 1 イントロン配列と第 2 イントロン配列の位置を入れ替えた株を作製した。この株を、スキムミルクを唯一の窒素源とした Czapek-Dox 液体培地で 24 時間培養し、得られた菌体から mRNA を精製し、cDNA 合成を行なった。得られた cDNA を鋳型として *ocpG* 特異的プライマーを用いて PCR を行ない、これらの PCR 産物をプラスミドに挿入してライブラリーを作製した。制限酵素処理または PCR によってスプライシングパターンを確認した。野生型の *ocpG* 遺伝子をもつ株についても同様の解析を行ない、スプライシングパターンを比較した。その結果、*ocpG* イントロン入れ替え株は野生型の *ocpG* 遺伝子とは異なるスプライシングパターンを示した。一般的にイントロン残存が生じる要因として、イントロン配列中に存在するスプライシングシグナルと、mRNA の分子内塩基対により形成される二次構造が考えられているが、*ocpG* イントロン入れ替え株は塩基配列に依存的なスプライシングパターンを示さなかった。そこで *ocpG* の mRNA の二次構造を予測した結果、二次構造中におけるスプライシングシグナルの位置の変化とスプライシング割合の変化との間に関係性が見られた。

なお、本研究の一部は生研センター基礎推進事業の一環として行われたものである。

1) 石田ら, 第 12 回糸状菌分子生物学コンファレンス 公演要旨集, p.56

The intron retention analysis of serine-type carboxypeptidase gene in *Aspergillus oryzae*

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

P-73

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

辻井雅, 奥田聡, 竹内道雄, 山形洋平 (東京農工大・応生科)

【背景と目的】黄麹菌の分生子及び発芽分生子の EST 解析の結果, 分生子の EST の中では 331-25 遺伝子領域から転写された antisense RNA 由来の EST が最も多く, 528 のうち 43 を占めていた。一方, 酒類総合研究所によって公開されている CAoGD (Comprehensive *Aspergillus oryzae* Genome Database) では, 331-25 遺伝子領域からは sense RNA (SN RNA), antisense RNA (AS RNA) の両方が転写されることが示されている。また, 我々の以前の研究において, 定量 PCR による SN RNA と AS RNA の存在量の検討で, AS RNA は分生子には存在するが, 発芽分生子, 菌糸, 分生子着生直前菌体には存在しないことを明らかにした。また, SN RNA は分生子と分生子着生直前菌体に存在し, 膨潤した分生子には僅かに見られ, 菌糸には存在していないことを示した。さらに, 331-25 遺伝子領域欠損株において, 分生子形成能が低下することを確認した(1)。今回の発表では, SN RNA と AS RNA の機能を明らかにするために, SN RNA 過剰発現株, AS RNA 過剰発現株の作製を行ったので, これについて報告する。

【方法及び結果】はじめに, RIB40 株から抽出した RNA を用いて, AS RNA のシーケンス解析を行った。その結果, AS RNA は 60 アミノ酸残基以上のペプチドをコードできないことが明らかとなった。次に, SN RNA 過剰発現株を作製し, SN RNA のシーケンス解析を行った結果, SN RNA は 444 アミノ酸残基のタンパク質をコードしていることが示された。また, SN RNA 過剰発現株では気中菌糸の伸長が見られず, 分生子形成能が低下していることが示された。一方, AS RNA 過剰発現株は, 表現形に変化は見られなかった。現在, さらに詳細な解析を行っている。

(1) 辻井ら, 第 13 回糸状菌分子生物学カンファレンス要旨集 p. 50 (2013)

(2)

Analysis of 331-25 sense RNA, 331-25 antisense RNA in *Aspergillus oryzae*

Masaru Tsujii, Satoshi Okuda, Michio Takeuchi, Youhei Yamagata

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

P-74 (O-10)

Aspergillus aculeatus における dipeptidyl peptidase 4 の機能解析

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)

我々は, *A. aculeatus* T-DNA 挿入変異株ライブラリーから単離したセルロース誘導能欠損株において, dipeptidyl peptidase 4 (*dpp4*) 遺伝子が破壊されていることを見いだした。*A. aculeatus* DPP4 は *A. fumigatus* 及び哺乳類の DPP4 とそれぞれ 67 %, 31 % の相同性を有しており, DPP4 は生物において広く保存されている酵素である。哺乳類 DPP4 は, ペプチドホルモンの N 末端側から 2 番目の Pro または Ala の C 末端側を切断することで様々なシグナル伝達を制御している。*Aspergillus* には, *dpp* 遺伝子が 4 種存在するがいずれの酵素も生理機能に関する報告はない。そこで我々は, 糸状菌における DPP4 の機能を解明することを目的として研究を進めている。

新たに作出した *dpp4* 破壊株 ($\Delta dpp4$) において cellobiohydrolase I 遺伝子等のアビセルやセロビオースにより誘導される遺伝子の発現は, 誘導初期に限定的に減少していた。一方, xylanase Ib 遺伝子等のキシランやキシロースにより誘導される遺伝子の発現量は変化していなかったことから, DPP4 はセルロース誘導の制御に関与していることが示された。次にコントロール株, $\Delta dpp4$, *dpp4* 高発現株 (*dpp4*-OE) における DPP 活性を Gly-Pro-pNA を基質に用いて測定した結果, *dpp4*-OE において有意に DPP 活性が上昇していた。また, $\Delta dpp4$ ではコントロール株と比較して菌体破碎後の可溶性画分の活性には大きな違いがなかったが, 菌体残渣の Triton X-100 可溶性画分では約 2/3 に低下していることが認められた。このことから, DPP4 が膜に結合していることが推測されたため, 現在 DPP4 の局在解析を行っている。また, $\Delta dpp4$, *dpp4*-OE における形質の変化も現在解析中である。

Functional analysis of dipeptidyl peptidase 4 in *Aspergillus aculeatus*

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

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

P-75

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

早川英佑華, 石田千絵, 山川結, 千代優, 中島春紫 (明治大院・農・農化)

ハイドロフォービンは、糸状菌・担子菌類が生産する細胞表層タンパク質である。低分子量(70~150 a.a.)の両親媒性タンパク質であり、気中の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。1つの菌株は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。

筆者らは *Aspergillus oryzae* のハイドロフォービン HypA/RolA, B, C の発現と局在性について検討し、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* と *hypB* のプロモーターを交換した時、HypA と HypB の局在部位も入れ替わることを観察し、HypA と HypB の局在性は各々のプロモーターに依存することを明らかにしている。分生子に局在するハイドロフォービンはHypA だけであることから、本研究ではその分生子特異的な発現機構を解析するため、段階的に欠失させた *hypA* プロモーターに蛍光タンパク質遺伝子を連結し、*A. oryzae* に導入した。その結果、分生子特異的な発現に寄与する領域が *hypA ORF* 上流(-1200~-400)および(-280~-200)領域に独立して存在することを見出した。(-280~-200)領域内には、分生子形成を制御する転写因子 *AbaA* の推定結合領域(ARE)が3つ存在し、*hypA* の分生子特異的な発現との関与が強く示唆されたことから、この3つのAREを欠失させたところ、分生子特異的な発現が消失し、AREが*hypA*の分生子特異的な発現に重要であることを明らかにした。

Characterization and localization of hydrophobins in *Aspergillus oryzae*

Fuyuka Hayakawa, Chie Ishida, Yui Yamakawa, Yu Chiyo, Harushi Nakajima

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

P-76 (O-7)

出芽酵母・糸状菌での植物-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、エチレンによってその HK 活性が制御される。本研究では、この植物由来のエチレン結合ドメインと酵母唯一の HK である ScSln1p 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 AnTcsB に加え、浸透圧感受に関係する AnNikA のヒスチジンキナーゼドメインと融合した HK をそれぞれ設計し、エチレン応答性の HK に機能改変した分子の造成を試み、酵母・糸状菌での HK 機能相補性とエチレン応答性について検証した。これまでに発芽酵母 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、ScSln1p および AnTcsB の融合 HK が ScSln1p の HK 活性を相補することを確認した。また、融合 HK を導入した株ではエチレン処理で生育の抑制と HOG 経路の制御が認められたことより、エチレン応答性を確認した。加えて、AnNikA の融合 HK についても同様に HK 機能相補性とエチレン応答性を確認し、浸透圧刺激の感受に重要とされる HAMP ドメインの機能が融合 AnNikA に維持されていることを確認した。現在、発芽酵母において HK 機能相補性を確認した融合 HK について糸状菌での発現系を構築し、解析を進めている。(本研究は、生研センターイノベーション創出基礎的研究推進事業と農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業の支援を受けて行われたものである。)

Functional complementation and ethylene response of plant-fungal fusion histidine kinase in budding yeast and filamentous fungi.

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

(¹ NICHe., Tohoku Univ., ² Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku, Univ., ³ Univ. of Gothenburg)

P-77

Fusarium graminearum および *Fusarium sporotrichioides* における転写因子 TRI6 の機能互換性

中嶋佑一, 前田一行, 金丸京子, 小林哲夫, 木村真 (名大院・生命農)

Fusarium graminearum は二次代謝によりタイプ B トリコテセンを生産し, *Fusarium sporotrichioides* はタイプ A トリコテセンを生産する。両者はトリコテセン生合成クラスターを有しており, この活性化にはクラスター内転写因子 *Tri6* が中心的な役割を担う。ここに, *F. graminearum* はスクロースを炭素源とした培地 (YS 培地) ではトリコテセンを生産するが, グルコースを炭素源とした培地 (YG 培地) においてはトリコテセンをほとんど産生しない一方で *F. sporotrichioides* は YS, YG 培地のいずれにおいてもトリコテセンを高生産するといった特徴をもつ。2 種間でのこのような違いを生み出す要因に関して知見を得るため, 本研究では *Tri6* 遺伝子産物の機能の差異や *Tri6* 転写誘導の違いに焦点を絞り解析を行った。

まず, *F. graminearum* において *FgTri6* を *FsTri6* にスワップした株を作製し, トリコテセン生産性や経路酵素の転写誘導を解析した。また, *F. graminearum* は YG 培養条件下において *Tri6* の転写がほとんど生じていないことから 2 種間の YG 培養条件でのトリコテセン生産性の違いは *Tri6* の転写誘導能に起因すると推定し, *F. graminearum* において *FgTri6* または *FsTri6* を構成的に過剰発現させた株を作製し, YG 培養条件でのトリコテセン生産性ならびに経路酵素遺伝子の転写状況の解析を行った。これらの結果をふまえ, 2 種間における TRI6 の機能互換性や *Tri6* 転写誘導能のトリコテセン生産制御への影響を報告する。本研究の一部は生研センターの支援を受け行われた。

Functional compatibility of Transcription factor TRI6 between *Fusarium graminearum* and *Fusarium sporotrichioides*.

Yuichi Nakajima, Kazuyuki Maeda, Kyoko Kanamaru, Tetsuo Kobayashi, Makoto Kimura

(Nagoya Univ.)

P-78

糸状菌 *Trichoderma reesei* における pH 依存的セルラーゼ生産メカニズムの解析

平沢大樹, 塩屋幸樹, 志田洋介, 小笠原渉 (長岡技科大・生物)

糸状菌 *Trichoderma reesei* は, セルラーゼ高生産菌として知られている。これまでに突然変異導入により更なる高生産変異株が取得され, 日本においても世界的標準株 QM9414 株より高生産変異株 PC-3-7 株が取得されている。現在までに高生産に寄与する要因の特定に向け, 様々な条件に対するセルラーゼ生産性を観察した。その中で, 環境 pH に対するセルラーゼ生産応答を評価した結果, QM9414 株では pH が増加するにつれて, セルラーゼ生産性が減少していたのに対し, PC-3-7 株ではわずかに増加していた。糸状菌は, pH シグナル伝達機構を保持しており, Pal タンパク質群により pH 応答転写調節因子 PacC が活性化され, 様々な遺伝子の発現制御を行っていることが報告されている。本研究では, *T. reesei* における pH 依存的セルラーゼ生産メカニズムの解明を試みた。

T. reesei においても, Pal タンパク質群および PacC ホモログが存在し, 比較ゲノム解析からこれらの遺伝子に変異が入っていないことを確認した。そのため, 両株において同様に pH シグナル伝達機構が作用しており, セルラーゼ生産性の違いは PacC により直接的ではなく, 間接的な制御であることが示唆された。そこで, PacC 破壊株を構築した結果, QM $\Delta pacC$ 株において, 高 pH 側でのセルラーゼ生産性が増加した。このことから, PacC により調節される何らかの因子の存在が強く示唆された。さらに, マイクロアレイ解析の結果から, 変異株間でセルラーゼ生産に必須な転写調節因子 *xyl1* およびセルラーゼ・ヘミセルラーゼ遺伝子が異なる転写傾向であることが確認された。以上のことより, 高 pH 側において PacC によって調節される何らかの因子により転写調節因子 *xyl1* が抑制され, セルラーゼ生産が減少することが示唆された。現在, 日本型系統樹変異株における pH 応答性について解析し, セルラーゼ生産抑制因子の特定を試みている。

Analysis of the pH-dependent cellulase production mechanism in filamentous fungus *Trichoderma reesei*

Hiroki Hirasawa, Koki Shioya, Yosuke Shida, Wataru Ogasawara (Dept. of Bioeng., Nagaoka Univ. of Tech.)

P-79

糸状菌 *Trichoderma reesei* のセルラーゼ生産制御因子の網羅的解析

会田宏樹, 塩屋幸樹, 志田洋介, 小笠原渉 (長岡技科大・生物)

糸状菌 *Trichoderma reesei* はセルラーゼ・ヘミセルラーゼの高生産菌として、世界中で工業的に利用されている。現在、*T. reesei* のセルラーゼ・ヘミセルラーゼ生産機構の解明に向けた研究が進められており、これまでの研究でいくつかの転写調節因子の機能が同定されたが、制御機構の全容解明には至っていない。一方、研究が先行している糸状菌の *Aspergillus* 属や *Neurospora* 属などでは、多種の転写調節因子の機能が解明されてきた。これらの研究により、*T. reesei* のセルラーゼ・ヘミセルラーゼ生産機構も、多種多様な転写調節因子により複雑に制御されていることが示唆されている。そこで本研究では、*T. reesei* における *Aspergillus* 属や *Neurospora* 属の既知転写調節因子オルソログの機能解析を行い、セルラーゼ・ヘミセルラーゼ生産制御機構の全容解明を目的とした。

Aspergillus 属や *Neurospora* 属の既知転写因子のオルソログ探索の結果、*T. reesei* のゲノム中に、42 個の推定転写制御因子遺伝子を発見した。そのうち、セルラーゼ生産へ関与すると思われる 15 個の推定転写調節因子遺伝子を選抜し、*T. reesei* QM9414 株の各遺伝子破壊株の構築を行った。まずは、セルラーゼ生産へ強く関与すると考えられる推定炭素源異化抑制制御因子に着目して機能解析を行った。その中で、推定脱ユビキチン化酵素 *cre2* の破壊株では、グルコース存在下でもセルラーゼ生産性を示すことを確認した。現在、推定転写調節因子破壊株を用いたセルラーゼ生産性の評価および *T. reesei* におけるオルソログの機能解析を行っている。

Global analysis of cellulase production regulators in filamentous fungi *Trichoderma reesei*

Hiroki Aita, Koki Shioya, Yosuke Shida, Wataru Ogasawara

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

P-80

イネ科植物いもち病菌の Argonaute3 は RNA サイレンシングを負に制御する

入谷彰英, 横矢佳奈, 中屋敷均 (神戸大院・農)

RNA サイレンシングは自己のゲノムをウイルスやトランスポゾンといった外来性の因子から防御する役割を担う真核生物全般に保存されている機構である。イネ科植物いもち病菌(*Magnaporthe oryzae*)にもこの機構が存在するが、本研究室では同菌ゲノム中に存在する RNA サイレンシング関連遺伝子の破壊株が網羅的に作製されている。本研究ではモデル生物であるアカパンカビにホモログが存在せず、その機能が未知な Argonaute3(Ago3)を解析した。

Ago3 をハイグロマイシン耐性遺伝子(Hph)で置換して作製した破壊株に Hph をターゲットとした 2 種類のサイレンシングコンストラクト(pSilent-Hyg, pMGY70-Hyg)をそれぞれ導入した。pSilent-Hyg はヘアピン RNA の産生により RNA サイレンシングを誘導し、pMGY70-Hyg では LTR レトロトランスポゾン MAGGY に Hph 配列の一部を組み込むことでトランスポゾンと同時に Hph がサイレンシングされることが期待される。その結果、コントロールであるダイサー(MoDCL2)破壊株では WT 株と比較してサイレンシング効率が顕著に低下したのに対し、Ago3 破壊株においては、特に pSilent-Hyg によるサイレンシング効率が大きく上昇した。しかし MAGGY の転移頻度やメチル化率には Ago3 破壊株と野生株で大きな違いは認められなかった。以上のことから Ago3 は dsRNA により誘導される RNA サイレンシングを抑制的に制御していることが示唆された。

Argonaute3 negatively regulates RNA silencing in *Magnaporthe oryzae*

Akihide Iritani, Kana Yokoya, Hitoshi Nakayashiki

(Grad. Sch. Agr. Kobe Univ.)

P-81

育種への応用を目的としたシイタケゲノム配列整備

坂本裕一, 佐藤志穂, 金子真也¹, 浅野さとみ¹, 宮崎安将², 白石進³, 宮崎和弘² (岩手生工研,¹東工大・生命理工,²森林総研, ³九大・農学研究院)

育種に利用可能な形でシイタケゲノム配列を整備する事を目的として, *de novo* アッセンブルを行うとともに, アッセンブルされた contig を, 既存の連鎖地図へ対応付けた。シイタケ核菌系体である G408PP-4 株よりゲノム DNA を抽出し, Illumina 社の Hi-seq2500 及び GAIIX を用いてペアエンド法及びメイトペア法によりシーケンスを行うとともに, PacBio によるロングリードのシーケンスを行った。*de novo* アッセンブルには, CLC Genomics Workbench を用い, メイトペアリード及び PacBio リードを用いた scaffold 化には SSPACE 及び PBjelly を用いた。また, シイタケの各組織から RNA を抽出して RNA-seq を行い, G408PP-4 ゲノム配列に対してマッピング後, Augustus により遺伝子予測を行った。G408PP-4 と D703P-9 のドラフトゲノム配列と比較する事で Allele-specific primer を設計し, 連鎖解析を行う事で, 各 contig を連鎖地図上に対応させた。ペアエンドライブラリーより得た総塩基長約 4.6Gbp のシーケンスリードを用いて *de novo* アッセンブルを行ったところ, contig 数=4,731, N50=36kb となった。メイトペアリード, 及び PacBio リードを用いて scaffold 化を行ったところ, scaffold 数=1,963, N50=102kb, 総塩基長 39Mbp となり, 良好な N50 値を得る事が出来た。ゲノム配列及び RNA-seq データを用いて, 遺伝子予測を行った結果, 約 13,000 遺伝子が予測された。これまで 257 遺伝子座についてマッピングを行い, マッピングされた scaffold の総塩基長は 32Mbp となり, scaffold の総塩基長の約 8 割をカバーできた。

De novo genome sequence of *Lentinula edodes* for molecular breeding strategies

Yuichi Skamoto, Shiho Sato, Shinya Kaneko¹, Satomi Asano¹, Yasumasa Miyazaki², Susumu Shiraishi³, Kazuhiro Miyazaki²

(IBRC; ¹Life Sci., Tokyo Inst. Tech.; ²For. For. Prod. Res. Inst.; ³Grad. School of Agr., Kyushu Uni.)

P-82

メロテルペノイド terretonin 生合成機構の解明および関連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)

糸状菌 *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。すでに全 10 遺伝子からなる terretonin 生合成遺伝子クラスターが *A. terreus* NIH2624 株のゲノムデータベースから同定されており, その生合成経路については遺伝子破壊や生合成酵素の異種発現などにより大部分が明らかにされている。しかしながら, terretonin 生合成への関与が判明している酵素群のうち, Trt6 (P450), Trt7 (non-heme iron-dependent dioxygenase), Trt14 (hypothetical protein) の 3 つの酵素については, その触媒機能が未だ解明されていない。我々は, terretonin 生合成において特徴的な反応である環拡大反応を含む修飾反応をこれらの酵素が担うと考え, そのメカニズムならびに terretonin 生合成機構の全容解明を目指した。

Terretonin 生合成遺伝子クラスター中に含まれる全 10 遺伝子を異種糸状菌 *Aspergillus oryzae* に導入し, 生合成系の再構築を試みたところ, terretonin およびその前駆体である terretonin A を得た。なお, *trt14* を含まない 9 遺伝子発現系は terretonin のメチルエステル基が欠失した terretonin C およびその前駆体を与えることが判明した。10 遺伝子発現系で terretonin が生産されたことから, これらの遺伝子群は terretonin を生産するのに必要十分であると考えられる。また, Trt14 の発現の有無によりメチルエステル基の有無が変化したことから, Trt14 はこのメチルエステル基の形成に関与していることが示唆された。現在, Trt6, Trt7, Trt14 の詳細な機能解析を *in vivo* ならびに *in vitro* で行っており, その結果についても併せて報告したい。

Biosynthetic Studies on a fungal meroterpenoid terretonin and functional analyses of the tailoring enzymes

Taiki Iwabuchi, Yudai Matsuda, Takayoshi Awakawa, Ikuro Abe

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

P-83 (O-16)

メロテルペノイド *anditomin* 生合成の全容解明

松田侑大, 淡川孝義, 脇本敏幸, 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 variegator* の産生する *anditomin* は、特異な分子内架橋構造を有しており、その生合成の分子基盤に興味を持たれる。我々は、昨年度の本会にて *anditomin* 生合成遺伝子クラスターの同定を報告した。これまでに、生合成初期段階を担う 5 つの酵素の機能解析を行い、五環性の分子骨格を有する生合成中間体 (化合物 **1**) の単離に成功している。今回新たに、本遺伝子クラスターのコードする 7 つの修飾酵素の機能解析を行い、*anditomin* 生合成の分子基盤解明を目指した。

化合物 **1** 以降の生合成経路を予測することは困難であったため、異種糸状菌 *Aspergillus oryzae* にて種々の組み合わせの修飾酵素発現系を構築し、得られた形質転換体に **1** を投与後、その代謝物を分析することで、各修飾酵素の機能ならびに生合成経路を推定した。各生合成中間体の単離、構造決定にあたっては、化合物 **1** の合成に関わる 5 つの遺伝子も合わせて発現する系を順次構築した。加えて、一部酵素については大腸菌にて大量発現、精製後 *in vitro* の試験に供した。以上により、*anditomin* の全生合成経路の解明に成功した。本生合成においては、Fe(II)および α -ケトグルタル酸依存型ジオキシゲナーゼ *AndA* が二段階の反応を触媒し、特異な bicyclo[2.2.2]octane 骨格形成を担うことが判明した。また、生合成の最終段階では、やはりジオキシゲナーゼである *AndF* が酸化的転位反応により *anditomin* の分子骨格を与えることを見出した。

Complete biosynthetic pathway of fungal meroterpenoid *anditomin*

Yudai Matsuda, Takayoshi Awakawa, Toshiyuki Wakimoto, Ikuro Abe

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

P-84

Emericella variegator 由来新規メロテルペノイド生合成遺伝子クラスターの機能解析

全智揚, 松田侑大, 三橋隆章, 阿部郁朗 (東大院薬・天然物化学)

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。中でも、3,5-dimethylorsellinic acid (DMOA) を起源とするメロテルペノイドには、とりわけ多様な分子骨格が見られる。*Andrastin A* は、DMOA に由来する protein farnesyltransferase 阻害剤であるが、我々はすでに *Penicillium chrysogenum* Wisconsin 54-1244 株のゲノムデータベース中に当該化合物の生合成遺伝子クラスター (*adr* クラスター) を見出し、その生合成の全容解明に成功している。今回、当研究室でドラフトゲノムシーケンス解析を実施した糸状菌 *Emericella variegator* のゲノム中に *adr* クラスターと類似した遺伝子クラスターを見出したため、その機能解析に着手した。

本遺伝子クラスターには、*andrastin A* 生合成に関わると推定される遺伝子群に加えて、*adr* クラスター中の遺伝子とは類似性の低い遺伝子が 3 つ存在しており、これらがコードする酵素群によって *andrastin A* がさらに修飾された化合物へと変換されることが期待された。そこで、これら 3 遺伝子の機能解析を行うべく、*andrastin A* 生合成遺伝子群とともに糸状菌 *Aspergillus oryzae* において異種発現系を構築した。得られた形質転換体を誘導培養後、培養上清抽出物を HPLC ならびに LC-MS 分析に供したところ、新たに分子量が 14 増加した化合物の生成を確認した。現在、本化合物の構造決定ならびに各酵素遺伝子の詳細な機能解析を行っており、その結果についても合わせて報告したい。

Functional Analysis of a novel meroterpenoid biosynthesis gene cluster from *Emericella variegator*

Zhiyang Quan, Yudai Matsuda, Takaaki Mitsuhashi, Ikuro Abe

(Dept. of Natural Products Chemistry, Univ. of Tokyo)

P-85

***Penicillium purpurogenum* における *Monascus* 色素生合成関連ポリケチド生合成遺伝子の探索**

荻原淳, 小嶋涼, 茂木美樹, 齋藤亮, 新居鉄平, 加藤順, 春見隆文 (日大・生物資源・生命化学)

我々は、東アジアにて発酵微生物として利用されてきた子のう菌 *Monascus* と不完全子のう菌 *Penicillium* の生産する共通した二次代謝産物について解析している。不完全菌 *Penicillium* の有性世代は次第に明らかにされつつあるが、*Penicillium* と子のう菌 *Monascus* の間の生殖世代と代謝産物生合成遺伝子の水平伝播との関連性は不明である。そこで、本研究では *Penicillium purpurogenum* における *Monascus* 色素同族体生合成に関連した遺伝子を特定するために、*Penicillium purpurogenum* のもつポリケチド生合成遺伝子を検索し、*Aspergillus*, *Monascus*, *Penicillium*, *Talaromyces* 等他の糸状菌由来ポリケチド生合成遺伝子との比較およびドメイン構造の系統解析を行った。当研究室において解析した *Penicillium purpurogenum* のゲノムドラフトシーケンセスを用いて *Aspergillus*, *Penicillium* 等の糸状菌から見出されている既知のポリケチド合成関連遺伝子の塩基配列情報を基に、local BLAST search により検索した。その結果、26 個のポリケチド遺伝子の存在を確認した。さらに、確認できたドメイン構造のうち KS ドメインを対象に分子系統解析を行った。この結果、PKS/NRPS ハイブリッド型、Lovastatin nonaketide synthase, conidial yellow pigment biosynthesis PKS 等と相同性の高い 6 グループの特徴的なポリケチド生合成遺伝子の存在を確認した。本糸状菌由来 *Monascus* 色素同族体に特徴的な *n*-octanoyl 基、isoquinoline 骨格構造からポリケチド生合成遺伝子の絞り込みを行った。現在、この遺伝子の機能を相同組換えにより確認している。

The search of *Monascus* pigment biosynthesis polyketide synthases gene in *Penicillium purpurogenum*.

Jun Ogihara, Ryo Kojima, Yoshiki Motegi, Ryo Saito, Teppei Arai, Jun Kato and Takafumi Kasumi (Dept. of Chem.

Life Science, Nihon Univ.)

P-86 (O-17)

糸状菌 *Aspergillus nidulans* による土壌フミン酸の構造変化

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、植物リグニン等に由来する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、自然界では生物的または非生物的に分解されることによって地球上の炭素循環の維持に貢献している。しかしながら、一部の細菌や白色腐朽菌を除いた菌類とフミン酸との相互作用についてはほとんど未解明である。本研究では、これまでに、*Aspergillus nidulans* の DNA マイクロアレイ解析から、フミン酸の添加によって本菌の複数の酸化酵素遺伝子の発現が上昇することを見出してきた (2013 度、本コンファレンス発表 P-22)。

そこで、本研究では、*A. nidulans* の培養に伴うフミン酸の構造変化の解析を試みた。*A. nidulans* は培養に伴って培地中のフミン酸を吸着した。菌に吸着したフミン酸と培養液中のフミン酸をそれぞれ回収し、フーリエ変換型赤外分光解析 (FTIR) を行ったところ、どちらも脂肪族、アシルエーテル、フェノールの増加が観察された。培養後の培養液中のフミン酸の固体 ¹³C NMR より、カルボキシ基とメトキシ基の増加が、電位差滴定による官能基分析より、カルボン酸とフェノールの含量が増加することが示された。また、ゲルろ過分析により、培養に伴ってフミン酸が高分子化することが明らかとなった。以上のことから、フミン酸は発現誘導された *A. nidulans* の酸化酵素群の働きによって酸化重合されていると考えられた。フミン酸の添加によって顕著に誘導される Flavin-containing monooxygenase (AN10582) の遺伝子破壊株を作製して培養後のフミン酸の FTIR 解析を行ったが、官能基の変化は野生型株と変わらなかった。現在、フミン酸の酸化に関わる遺伝子の特定を試みている。

Structural changes of soil humic acid by the fungus *Aspergillus nidulans*

Nami Nakazawa, Ken-Ichi Oinuma, Naoki Takaya

(Faculty of Life and Environmental Sciences, Univ. of Tsukuba)

P-87

ハイグロマイシン B 処理によるルシラクタエン生産糸状菌 *Fusarium sp.* RK97-94 における二次代謝産物生産誘導

加藤翔^{1,2}, 本山高幸^{1,3}, 鎌倉高志², 長田裕之^{1,3} (¹理研・抗生物質, ²東京理科大, ³理研・CSRS)

【目的】ルシラクタエンは糸状菌 *Fusarium sp.* RK97-94 が生産する低分子化合物であり, 細胞周期阻害活性を示し, 8 遺伝子からなる生合成遺伝子クラスターで生合成される。我々はルシラクタエン生合成遺伝子の破壊体取得にハイグロマイシン B 耐性遺伝子マーカーを用いているが, 形質転換体の一部においてハイグロマイシン B 存在下で菌体の黒色化が観察された。ハイグロマイシン B 処理による菌体の黒色化は野生型株においても起こった。黒色化はメラニン生合成阻害剤で抑制されることから, メラニン生産が誘導されていることが示唆された。今回, ハイグロマイシン B の二次代謝産物生産への影響を解析した。

【方法と結果】ハイグロマイシン B 処理した培養液では, ルシラクタエンの生産性が 5 倍程度上昇していることが明らかになった。ルシラクタエン生合成は糸状菌における二次代謝グローバルレギュレーター *LaeA* のオルソログ *Lae1* により制御されていることを見出しているが, *lae1* 破壊株においてはハイグロマイシン B 添加による生産誘導は認められなかった。このことから, ハイグロマイシン B の作用点は *Lae1* の上流に存在していることが示唆された。一方, ルシラクタエン生合成遺伝子クラスター中の制御因子候補の遺伝子破壊株においては, ハイグロマイシン B の効果が認められた。今回の結果より, ルシラクタエン生産の制御モデルを推定した。

Induction of secondary metabolite production in the lucilactaene producing fungus *Fusarium sp.* RK97-94 treated with hygromycin B

Sho Kato^{1,2}, Takayuki Motoyama^{1,3}, Takashi Kamakura², Hiroyuki Osada^{1,3} (¹Antibiotics Lab, RIKEN, ²Tokyo Univ. of Sci., ³CSRS, RIKEN)

P-88

エキセチンからフサリセチン A への変換に関わる酵素遺伝子の探索

加藤直樹¹, 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活性を指標にして *Fusarium sp.* FN080326 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るエキセチンを生合成中間体に, 特徴的な環構造を有する本化合物に変換されると予想されている。生合成経路解明を目的にこれまで, 生産菌 FN080326 株のドラフトゲノム解読より見出した PKS-NRPS ハイブリッド酵素遺伝子を含む生合成遺伝子 (*fsa*) クラスターを候補に解析を行ってきた。本研究では, 遺伝学的解析により *fsa* クラスターに含まれる生合成遺伝子の役割の同定, 特に予想中間体エキセチンからフサリセチン A への変換に関わる遺伝子の同定を試みた。

PKS-NRPS ハイブリッド酵素, および C6 型転写活性化因子をそれぞれコードしている *fsa1*, *fsa5* の遺伝子破壊により, フサリセチン A ならびにエキセチンの生産が消失した。この結果は, 本遺伝子クラスターが *Fusarium sp.* FN080326 においてフサリセチン A 生合成に関与していることを示している。また, これら破壊株の培養液にエキセチンを添加することでフサリセチン A 生産が回復することから, エキセチンがフサリセチン A の生合成中間体であることが確認された。クラスターに含まれる遺伝子の発現が大幅に低下している *fsa5* 遺伝子破壊株においても変換が検出されたこと, クラスターに含まれる他の遺伝子の破壊実験を行っても, エキセチンからフサリセチン A への変換活性が失われた変異株が得られなかったことから, 変換を担う酵素遺伝子は *fsa* クラスターの外に存在していることが強く示唆された。

Search for genes involved in the conversion from equisetin to fusarisetin A

Naoki Kato¹, Jae-Hyuk Jang², Shunji Takahashi¹, Jong Seog Ahn², Hiroyuki Osada¹
(¹RIKEN CSRS, ²KRIBB)

P-89

Aspergillus nidulans の低酸素誘導性脱ユビキチン化酵素の機能

阿部央行, 榊尾俊介, 高谷直樹 (筑波大院・生命環境)

チオレドキシン (Trx) は抗酸化タンパク質として知られ, 活性部位を構成する CXXC アミノ酸配列モチーフによって特徴付けられる。Trx は全ての生物に普遍的に存在し, その機能は真菌, 植物および動物を含むタクソンで保存されている。近年, 私達は糸状菌 *Aspergillus nidulans* が低酸素条件下で Trx 様のタンパク質をコードする遺伝子の発現が誘導されることを明らかにしたが, それらの生理学的機能は未だ明らかにされていなかった。低酸素誘導性 Trx 様タンパク質の一つである AN6915 は, タンパク質の脱ユビキチン化に関わると予想される PUL ドメインと PPPDE ドメイン, そして酸化還元活性を担うと予想される Trx ドメインからなるドメイン構造を有するが, このようなドメイン構造を持つタンパク質はカビに特徴的に見られる。

本研究では, 私達は, *in vitro* の実験系を用い, 組換え AN6915 がタンパク質の脱ユビキチン化およびジスルフィド結合の還元活性を持つことと, 組換え AN6915 がユビキチン化タンパク質の代謝に重要なシャペロン様 ATPase である Cdc48p (AN7254) と相互作用することを明らかにした。また, ウェスタンブロットティング解析によって, AN6915 の遺伝子破壊株では, 細胞内のユビキチン化タンパク質のパターンが野生型株のそれと異なることを見出した。以上の結果から, *A. nidulans* が低酸素環境に応答し, AN6915 の働きを通してユビキチン代謝を変化させることによって細胞内タンパク質の分解を制御していることが明らかとなった。

Aspergillus nidulans thioredoxin-like protein functions under hypoxic conditions.

Hiroyuki Abe, Shunsuke Masuo, Naoki Takaya

(Faculty of Life and Environmental Sciences, Univ. of Tsukuba)

P-90

麹菌アシル CoA 合成酵素欠失株による遊離脂肪酸の高生産

玉野孝一¹, Kenneth S. Bruno², 小池英明¹, 石井智子¹, 三浦愛¹, 山根倫子¹, 梅村舞子¹, Scott E. 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, 菌体内脂肪酸量等を調べた。その結果, 当ホモログの内の 1 個の欠失株で, 菌体内脂肪酸量が大きく向上した。一方, 他の 5 個は欠失しても, 菌体内脂肪酸量が向上しなかった。現在, 脂肪酸生産量が向上した当欠失株のゲノム発現情報を解析し, 脂肪酸合成の律速となっている代謝反応を予測して, それを組換えにより強化することで, 更なる向上を目指している。

Increased Production of Free Fatty Acid by the Acyl-CoA Synthetase Disruptant of *Aspergillus oryzae*

Koichi Tamano¹, Kenneth S. Bruno², Hideaki Koike¹, Tomoko Ishii¹, Ai Miura¹, Noriko Yamane¹, Myco Umemura¹, Scott E. Baker², Masayuki Machida¹ (¹AIST, ²PNNL)

P-91

イネいもち病菌の *Ehs1* のノックアウト、ノックダウンにおける表現型の比較と次世代シーケンサーによるトランスクリプトーム解析

村野慶奈, 廣澤拓巳, 成川恵, 荒添貴之, 新井和良, 大鐘潤, 桑田茂, 鎌倉高志 (東理大院理工・応生科)

イネいもち病菌はイネに感染しイネいもち病を引き起こす植物病原糸状菌である。本菌の分生子は宿主表面に付着すると発芽し、感染に必須な付着器という構造を形成する。この際、発芽管伸長時や付着器形成時の付着器内部で Ca^{2+} 濃度が上昇することが知られており、これまでの研究で Ca^{2+} チャネル阻害剤の添加によって、付着器形成率が濃度依存的に低下することが分かっている。当研究室では、病原性関連遺伝子として、分裂酵母における機械刺激作動型の伸展活性化 Ca^{2+} チャネルのホモログであると推定される *Ehs1* の機能解析を行っており、ノックアウト株を作製したところ国産野生株 P2 と比較して付着器形成率、栄養菌糸成長において有意な差が見られなかった。しかし、イネいもち病菌 Br48 株由来の *Ehs1* ノックダウン株では野生株と比較して付着器形成率、栄養菌糸成長、胞子形成能が減少しているという報告がなされた (Nakayashiki, et al., 2008)。そこで当研究室で P2 株由来の *GFP* 恒常発現株 MK2-2 を用い、*Ehs1* ノックダウン株を作製したところ、付着器形成率、栄養菌糸成長の低下が見られ、その他にもコントロールと比較していくつか形質に差異が生じた。以上のことから、本研究ではノックアウト株とノックダウン株で形質に差が見られた原因を解明することを目的とし、解析を行った。これまでの結果より、ノックアウト株で何らかの機能相補が起きた可能性が考えられたため、野生株 P2 と *Ehs1* ノックアウト及びノックダウン株について次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析を行い、相補因子の探索を行った。

Transcriptome analysis and comparison of phenotype with disruptant and knockdown mutant of *Ehs1* in *Pyricularia oryzae*

Keina Murano, Takumi Hirose, Megumi Narukawa, Takayuki Arazoe, Jun Ohgane, Shigeru Kuwata, Takashi Kamakura (Dept. of Applied Biological Sci, Tokyo Univ. of Science)

P-92 (O-18)

化合物アレイを用いたメラニン生合成阻害剤探索

本山高幸^{1,2}, 田中陽子², 長田裕之^{1,2} (¹理研・抗生物質, ²理研・CSRS)

【目的】イネいもち病菌の二次代謝産物メラニンには病原性に必須であるが生育には必要とされないため、生合成系の酵素は環境負荷が低い農薬の標的として注目されてきた。メラニン生合成系の 2 種類の標的酵素 (3HNR, Sdh1) に対する農薬 (MBI-R, MBI-D) が開発されてきたが、既存の農薬は耐性菌などの問題を抱えており、新たな制御薬剤の開発が求められている。我々は、天然化合物バンク NPDepo を設立し、標的タンパク質に対する結合化合物探索を超ハイスループットで行うことが可能な化合物アレイを開発してきた。今回、化合物アレイを用いた NPDepo 化合物からのメラニン生合成阻害剤探索について報告する。

【方法と結果】メラニン生合成系の標的酵素として、非還元型ポリケチド合成酵素 (NR-PKS) Alb1, ヒドロキシナフトレン還元酵素 3HNR, シタロン脱水酵素 Sdh1 を選択した。Sdh1 については、野生型酵素 Sdh1-WT と農薬耐性型酵素 Sdh1-V75M を用いた。それぞれの標的酵素を大腸菌で発現・精製し、化合物アレイスクリーニングを行った。NPDepo の約 3 万化合物の中から、Alb1, 3HNR, Sdh1-WT, Sdh1-V75M に対してそれぞれ、21 個、21 個、4 個、8 個のヒット化合物を得た。3HNR のヒット化合物の阻害活性を解析したところ、1 化合物 (リファマイシン誘導体) が阻害活性を示した ($\text{IC}_{50}=25 \mu\text{M}$)。従来のスクリーニング法と化合物アレイによるスクリーニング法との違いについて報告する。

本研究の一部は、農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業による支援を受けた。

Chemical array screening of melanin biosynthesis inhibitors

Takayuki Motoyama^{1,2}, Yoko Tanaka², Hiroyuki Osada^{1,2}

(¹Antibiotics Lab, RIKEN, ²CSRS, RIKEN)

P-93

MAP キナーゼ Pmk1 は H3K4 ヒストンメチル基転移酵素 MoSET1 の上流で機能する

Nguyen Hieu Hanh, Kieu Thi Minh Pham, 池田健一, 中屋敷均 (神戸大・院農)

当研究室では、イネ科植物いもち病菌の H3K4 メチル化を担う MoSET1 の破壊株 (Δ moset1) を作成し、その性格付けについて昨年の本学会で報告した。 Δ moset1 では、付着器形成率が大幅に低下し、宿主植物における病原性を完全に消失していた。これらの観察やいくつかの遺伝子の発現パターンの解析から、 Δ moset1 と MAP キナーゼである Pmk1 の破壊株の表現型には類似点があることが示唆された。そこで今回、MoSET1 と Pmk1 の遺伝的上位性について検討した。当研究室で使用している Br48 株の Pmk1 の破壊株 (Δ pmk1) を作成し、ChIP-qPCR 解析を行った所、野生株では付着器形成時に H3K4me2 レベルの上昇が認められる遺伝子座位でも、 Δ pmk1 ではそのレベル上昇が認められなかった。また、RNA-seq 解析等で同定された Mo-SET1 に依存して発現上昇する多くの遺伝子が Δ pmk1 では反応性を示さなくなっていた。一方、 Δ moset1 においても Pmk1 遺伝子の発現レベルは有意な影響を受けていなかった。以上のことから Pmk1 は MoSET1 より遺伝的上位に位置し、直接あるいは間接的に MoSET1 の活性を調節し、いもち病菌における付着器形成等に必要遺伝子の発現を制御していることが考えられた。

The MAP kinase, Pmk1 is epistatic to MoSET1, H3K4 methyltransferase for infection-related morphogenesis in *Magnaporthe oryzae*

Nguyen Hieu Hanh, Kieu Thi Minh Pham, Ken-ichi Ikeda, Hitoshi Nakayashiki

(Grad. Sch. Agr., Kobe Univ.)

P-94 (O-19)

ウリ類炭疽病菌における出芽酵母ストレス応答制御因子 *WHI2* のホモログ *CoWHI2* は宿主防御応答の誘導と準活物寄生性の制御に関与する

原田 賢, 久保康之 (京府大院・生環)

昨年度の本会にて、ウリ類炭疽病菌の CoRas2 は感染器官の形成過程にダイナミックな局在を示すことを報告した。出芽酵母の Whisky2(Whi2)は Ras の細胞内局在の制御やフォスファターゼをコードする Psr1 と結合することにより転写因子 Msn2 を脱リン酸化し、STRE(Stress response element)を有するストレス誘導遺伝子の発現を制御することが報告されている。そこで、Ras の時空間的な制御と感染器官の形態形成の関係について調べるために、我々はウリ類炭疽病菌における *WHI2* のホモログ *CoWHI2* に着目し、機能解析を行った。まず、*CoWHI2* が病原性や感染器官の形態形成に関与するのか、 Δ cowhi2 株を作出し、検討した。その結果、 Δ cowhi2 株のキュウリに対する病原性は野生株と比較し、低下した。また、 Δ cowhi2 株の侵入菌糸は野生株と比較し、死物寄生性様の細い形態を示した。興味深いことに、 Δ cowhi2 株は野生株と比較し、宿主植物のカロース形成を顕著に誘導した。そこで、 Δ cowhi2 株はカロース形成に関わるカロース合成酵素遺伝子の発現を誘導するのか、 Δ cowhi2 株接種葉のカロース合成酵素遺伝子の発現量を qRT-PCR を用い、経時的に測定した。その結果、 Δ cowhi2 株接種葉では野生株接種葉と比較し、早期にシロイヌナズナ *ATGSL4*, *ATGSL8* のホモログの発現量が増加した。このことから、*CoWHI2* によるカロース形成の誘導はこれらのカロース合成酵素遺伝子に起因する可能性が示唆された。次に Δ cowhi2 株は死物寄生様侵入菌糸を形成したことから、死物寄生菌に対し発現が増加するシロイヌナズナの *PDF1.2* のキュウリにおけるホモログ *DEFENSIN19* の発現量を qRT-PCR を用い、検討した。その結果、 Δ cowhi2 株接種葉の *DEFENSIN19* の発現量は野生株接種葉と比較し、顕著に増加した。以上から、*CoWHI2* は宿主防御応答の誘導と準活物寄生性の制御に関与することが示唆された。

CoWHI2, the homolog of stress response regulator *WHI2* of *Saccharomyces cerevisiae*, is involved in induction of host defense response and regulation of hemibiotrophic infection in *Colletotrichum orbiculare*.

Ken Harata Yasuyuki Kubo (Life and Environmental Sciences, Kyoto Prefectural Univ.)

P-95

ウリ類炭疽病菌 GAP 複合体 CoBub2/CoBfa1 は GTPase CoTem1 を介して G1/S 期進行制御および植物感染に寄与する

深田史美, 坂口 歩, 久保康之 (京都府大院・生環)

ウリ類炭疽病菌は感染過程において、単細胞の胞子から発芽管、付着器、侵入菌糸の形成といった劇的な形態分化を核分裂と同調化して行う。我々は出芽酵母においてM期終了機構を制御するBUB2のホモログCoBUB2を同定し、本遺伝子がG1/S期の進行を制御し、侵入器官の形態分化および病原性に必須であることを一昨年度の本会にて報告した。今回、CoBub2のシグナルカスケードの解析を行った。まず、出芽酵母においてBub2とGTPase活性化タンパク質 (GAP) 複合体を形成するBFA1のホモログCoBFA1の破壊株を作出し、形質の評価を行った。その結果 $\Delta cobfa1$ は $\Delta cobub2$ と同様の欠損形質を示し、G1/S期の移行時期の促進、侵入器官の形態異常と宿主植物への病原性の低下が認められた。さらに、出芽酵母においてBub2/Bfa1により不活性化の制御を受ける低分子量GTPase Tem1に着目し、 $\Delta cobub2$ および $\Delta cobfa1$ に恒常不活性型CoTEM1を導入することにより、破壊株の欠損形質が相補されるか検討した。その結果、恒常不活性型CoTEM1導入株では破壊株で認められる細胞周期および形態形成、病原性の欠損形質が相補され、野生株と同様の表現形を示した。以上より、CoBub2はCoBfa1と協同してGTPase CoTem1を介したG1/S期の進行制御および侵入器官形成、宿主への病原性に関与することが示された。

Colletotrichum orbiculare CoBub2/CoBfa1 GAP complex regulates G1/S progression and plant infection via GTPase CoTem1

Fumi Fukada, Ayumu Sakaguchi, Yasuyuki Kubo

(Life and Environmental Sciences, Kyoto Prefectural Univ.)

P-96

ウリ類炭疽病菌における MOR シグナル伝達経路は宿主植物滲出液中のクチンモノマー認識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)

前回、我々は植物病原糸状菌ウリ類炭疽病菌において植物表面の物理的シグナル受容を介した付着器形成に細胞極性制御因子 CoKel2 が関与する一方で、植物特異的シグナル受容を介した付着器形成には出芽酵母の細胞極性成長や分離などを制御する MOR [morphogenesis-related NDR (nuclear Dbf2-related) kinase network] の構成因子 Pag1 と相同性をもつ CoPag1 が関与することを報告した。また、CoPag1 は MOR 構成因子 Ndr キナーゼ CoCbk1 の活性制御に関与し、MOR は植物特異的シグナル受容経路に関与する可能性を示した。今回、CoPag1 の植物表面物質認識を介した付着器形成への関与を評価するために、キュウリ滲出液存在下の人工基質上における付着器形態を観察した。その結果、*cokel2Δ* は滅菌水培養時と比較してキュウリ滲出液存在下で正常付着器形成が回復したのに対して、*copag1Δcokel2Δ* の正常付着器形成は回復しなかった。このことから、CoPag1 は宿主植物滲出液中の物質認識を介した付着器形成に関与することが示唆された。次に、植物特異的シグナル受容経路により認識される植物シグナルを同定するために、クチンモノマーの一つである 1,16-hexadecanediol およびキュウリ滲出液中から同定した Octadecanal 存在下の人工基質上における付着器形態を観察した。その結果、*cokel2Δ* は正常付着器形成が顕著に回復したのに対して、*copag1Δcokel2Δ* の正常付着器形成は回復しなかった。以上の結果から、CoPag1 が関与する植物特異的シグナル受容経路はクチンモノマーの認識を介した付着器形成に関与する可能性が示唆された。

Colletotrichum orbiculare MOR signaling pathway is involved in appressorium development triggered by cutin monomers in the host plant exudate

Sayo Kodama, Ayumu Sakaguchi, Yasuyuki Kubo

(Life and Environmental Sciences, Kyoto Prefectural Univ.)

P-97

出芽酵母セプチンリング解離因子 *RTS1* のウリ類炭疽病菌ホモログ *CoRTS1* は付着器、侵入菌糸形成段階のアクチン動態を制御し病原性に関与する

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 *RTS1* のホモログ *CoRTS1* の破壊株を得ている。出芽酵母において *Rts1* は細胞質分裂完了時に分裂溝に局在し、細胞質分裂関連分子の足場であるセプチンリングを解離する機能を持つ。一方、ウリ類炭疽病菌 *corts1* 破壊株は細胞質分裂が未完了の状態の胞子が存在し付着器形成率が顕著に減少した。*CoRTS1* の付着器形成段階における機能を調べるため、出芽酵母において *Rts1* の局在決定部位である N 末端アミノ酸 100 残基をコードする塩基を欠失させた *corts1* Δ 100 を作出した。*corts1* Δ 100 は M 期の遅延やアクチン動態の異常を示し、発芽管が伸長し波打った異常付着器を形成して病原性が低下した。出芽酵母では極性成長時のセプチン動態に欠損が生じた際、M 期が遅延し極性成長が続くことが知られており、この結果から *CoRTS1* は出芽酵母と異なり、極性成長時にもセプチン動態に関与する可能性が示された。この可能性を検証するためセプチン変異株 Δ *cocdc12* を作出し、表現型を調べた結果 *corts1* Δ 100 同様に発芽管が伸長した形態を示し、仮説を支持する結果が得られた。現在、セプチン動態の欠損に対応するため細胞周期を遅延させる *SWE1* のホモログ *CoSWE1* と形態形成の関係について解析を進めている。

***CoRTS1*, the homolog of *Saccharomyces cerevisiae RTS1*, a septin ring disassembling factor, is involved in pathogenicity by regulating actin dynamics during appressorium and invasive hyphae formation in *Colletotrichum orbiculare*.**

Kou Kawabata, Fumi Fukada, Ayumu Sakaguchi, Yasuyuki Kubo

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

P-98

灰色かび病菌における 26S プロテアソームサブユニット *RPN10* ホモログの解析

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)

ユビキチン・プロテアソーム系 (UPS) はユビキチン鎖によって標識されたタンパク質を選択的に分解する細胞内自己分解系であり、真核生物に広く保存されている。しかし糸状菌類においては UPS に関する知見は未だ少なく、とりわけ UPS において基質分解を担うタンパク質分解酵素複合体プロテアソームの役割についてはほとんど明らかにされていない。

出芽酵母プロテアソームのサブユニット *RPN10* は、ユビキチン受容体として標的タンパク質を認識するとともに、プロテアソーム自身の安定化にも寄与しているとされる。本研究では世界的に重要な多犯性植物病原菌である灰色かび病菌において、出芽酵母 *RPN10* のホモログ *BcRPN10* の遺伝子破壊株を作出し、その機能解析を行った。*BcRPN10* 破壊株は野生型株と比べコロニー生育がやや遅く、分生子形成数が著しく低下した。低温条件下では、野生型株が盛んに菌核を形成するのに対し、*BcRPN10* 破壊株は菌核を全く形成しなかった。また、インゲンマメに対して菌叢片を用いた接種試験を行ったところ、*BcRPN10* 破壊株は宿主上で感染器官である付着器および感染座を形成することができたが、病斑を形成することができなかった。その一方で、*BcRPN10* 破壊株は有傷接種においては病斑を形成することができた。これらの結果から、灰色かび病菌においてプロテアソームを介した基質分解が各種形態形成、宿主侵入に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

Characterization of 26S proteasome subunit gene *RPN10* of *Botrytis cinerea*.

Takuya Sumita¹, Kosuke Izumitsu², Chihiro Tanaka¹

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

P-99

トウモロコシごま葉枯病菌の CHK1 MAPK 経路の推定上流因子の機能解析

北出雄生¹, 泉津弘佑², 住田卓也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の最重要病害菌のひとつである。我々は本菌感染における初期段階である付着器形成に必須な CHK1 MAP キナーゼ経路に注目し、その関連因子を同定・機能解析することにより、付着器形成時におけるシグナル伝達の全容解明を目指している。我々は昨年度の本会において、本経路の推定上流因子である 2 種類の PAK 様キナーゼについて、CLA4 が付着器形成や形態形成全般に重要な役割を持ち、STE20 は有性生殖のみに部分的に関与することを報告した。今回我々は PAK 様キナーゼの推定上流因子である低分子量 G タンパク質 CDC42 ならびに RAC1 をコードする遺伝子の破壊株を新たに形態形成試験に供試した。これら全ての破壊株の形態形成異常は *Δchk1* より軽度であり、各 2 種類の因子が一定の重複した機能を持つ可能性が示唆された。*Δrac1* は付着器形成能や有性生殖能の喪失など、*Δcla4* とほぼ同様であるが、より重度な異常を示した。また両破壊株は菌糸成長時の膨潤や二叉分枝など、*Δchk1* にはない特有の形質を共有していた。一方、*Δcdc42* は付着器形成数や分生子形成数の低下など、*Δste20* ならびに *Δcla4* の中間的な形質を示した。以上の結果から、RAC1 は CLA4 を介して菌糸成長ならびに形態形成を制御するが、CHK1 経路よりむしろセプチン動態やアクチン再構成といった細胞分裂・細胞極性の制御因子として作用する可能性が示唆された。また、CDC42 は STE20 だけでなく、CLA4 やその他の因子の上流因子として作用している可能性が示唆された。現在これら上流因子間の相互作用に関与する可能性が示唆されるアダプタータンパク質 BEM1 の遺伝子破壊株作出を試みており、本発表では BEM1 の機能についても併せて検討する予定である。

Characterization of putative upstream factors of CHK1 MAPK pathway in *Bipolaris maydis*

Yuki Kitade¹, Kosuke Izumitsu², Takuya Sumita¹, Chihiro Tanaka¹

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

P-100

非病原性 *Alternaria alternata* 菌株への宿主特異的 AAL 毒素生合成遺伝子クラスターの導入

高尾和実¹, 赤木靖典², 柘植尚志³, 児玉基一朗¹ (¹鳥取連大・²鳥取大農・³名大院生農)

トマトアルターナリア茎枯病菌 (*Alternaria alternata* tomato pathotype, 茎枯病菌) は宿主特異的 AAL 毒素を生産することで、特定のトマト品種に病気を引き起こす。本毒素の生合成は、少なくとも 13 遺伝子からなる AAL 毒素生合成遺伝子 (*ALT*) クラスターが関与するとされている。*ALT* クラスターは茎枯病菌のみが保有する 1 Mb の CD 染色体に約 100 kb にわたって座乗している。当研究室では CD 染色体の水平移動により、非病原性菌が病原性を獲得することを報告している。一方で、本クラスター遺伝子のみで、菌に毒素生産能を賦与できるかは明らかとなっていない。本研究では、4 断片に分割した *ALT* クラスター遺伝子を、AAL 毒素を生産しない非病原性 *A. alternata* 菌株に導入した。その結果、13 の *ALT* 遺伝子すべてが導入された可能性のある菌株が得られた。導入菌株は AAL 毒素生産および病原性が確認された。

Introduction of entire *ALT* cluster genes to nonpathogenic *Alternaria alternata*

Kazumi Takao¹, Yasunori Akagi², Takashi Tsuge³, Motoichiro Kodama¹

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

P-101

トマトアルターナリア茎枯病菌におけるセラミド合成酵素遺伝子の機能解析

赤木靖典¹, 石原 亨¹, 柘植尚志², 児玉基一朗³ (¹鳥取大農, ²名大院生農, ³鳥取連大)

植物病原糸状菌トマトアルターナリア茎枯病菌 (茎枯病菌) により生産される AAL 毒素は, sphinganine analog mycotoxins であり, 宿主トマトのセラミド合成を阻害することで細胞死を誘起すると考えられている。AAL 毒素生成遺伝子クラスター上には, セラミド合成酵素遺伝子 (Cer) ホモログ (AAL 毒素抵抗性遺伝子 *Asc1* ホモログ) である *ALT7* (*AaLAG3*) が存在するが, 本遺伝子破壊株では, AAL 毒素生産能および AAL 毒素耐性に変化は認められなかった。茎枯病菌のドラフトゲノム解析により, 本菌は *AaLAG3* 以外に 2 つの Cer ホモログ (*AaLAG1* および *AaLAG2*) を有していることが示された。これら遺伝子の破壊実験を行った結果, *AaLAG1* 破壊株の成長は, PDA および V8 培地上で著しく遅延することが明らかとなった。また, *AaLAG2* 破壊株では V8 培地でわずかに成長遅延が認められたが, *AaLAG3* 破壊株では親株と差異はみられなかった。一方, *AaLAG2/AaLAG3* ダブル破壊株においては, 著しい成長遅延と AAL 毒素生産の失活が認められた。

Functional analysis of the ceramide synthase genes in the tomato pathotype of *Alternaria alternata*

Yasunori Akagi¹, Atsushi Ishihara¹, Takashi Tsuge², Motoichiro Kodama³

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

P-102

植物病原卵菌 *Phytophthora infestans* の付着器形成阻害物質の探索

川本真也, 甲斐建次, 谷修治, 炭谷順一, 川口剛司 (阪府大院・生環科)

Phytophthora infestans はナス科植物に感染し疫病を引き起こす植物病原卵菌である。*P. infestans* の遊走子嚢は 15°C 以上の環境では直接発芽し菌糸を伸長するが 15°C 以下では遊走子を放出する傾向にある。放出された遊走子は走化的に植物側に遊泳後, シスト, 付着器へと分化し植物に感染する。この低温に応答した遊走子嚢分化が疫病蔓延の主要経路であるものの, クロミスタ界に属する *Phytophthora* の遊走子嚢分化機構は未解明な部分が多い。そこで本研究では, *P. infestans* 遊走子嚢各分化段階を特異的に阻害する物質を放線菌が産生する二次代謝産物を対象としてスクリーニングし, 同定した物質をツールとして遊走子嚢分化機構を分子レベルで解明することを目的とした。

まずフミン酸を単一炭素源とした培地を用いて放線菌を選択的に単離した。放線菌の培養液に等量のアセトンを加えたものをサンプルとして *P. infestans* 遊走子嚢に添加し, 10°C に静置して 18 時間後の形態を顕微鏡下で観察した。約 800 株の抽出サンプルについて探索した結果, 各分化段階を阻害する活性を有すサンプルを取得し, その中でも付着器形成を阻害した 2 サンプルに着目して解析を進めた。取得したサンプルで処理した遊走子嚢は未処理の遊走子嚢と比較してトマトの葉への感染能が著しく低下したが, 18°C での菌糸伸長および遊走子嚢形成には影響が観察されなかった。付着器形成阻害物質を生産する 2 株の 16S ribosomal RNA 系統解析を行ったところ, 共に *Streptomyces chartreusis* の近縁種であった。現在, 付着器形成阻害活性のより高かった no. 287 株由来の付着器形成阻害物質を種々のクロマトグラフィーにより精製している。

Screening for substances inhibiting appressorium formation of plant pathogenic oomycete *Phytophthora infestans*

Masaya Kawamoto, Kenji Kai, Shuji Tani, Jun-ichi Sumitani, Takashi Kawaguchi

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

P-103

多犯性炭疽病菌 (*Colletotrichum fioriniae*) の感染プライミング因子の探索

大高潤之介, 瀬尾茂美, 西村麻里江 (生物研)

植物には、糸状菌に特徴的な細胞壁構成多糖 (chitin, β -1,3-glucan) などの分子パターンを異物 (PAMPs) として認識し攻撃する免疫機構 (PTI) が備わっている。一方、病原菌は宿主の PTI を避けて植物内に侵入し感染する。これまでのイネ病原性糸状菌 (子囊菌類: イネいもち病菌, イネゴマ葉枯病菌, 担子菌類: イネ紋枯病菌) の感染機構に関する研究から、これらの菌では植物成分がプライミング (呼び水) 因子となって作用し、植物にとって難分解性の α -1,3-glucan を菌体表層に蓄積し自身を保護するとともに、細胞壁 PAMPs を覆い隠すことで宿主 PTI を回避することが明らかになった。以上のことから、病原性糸状菌では宿主由来のプライミング因子が感染成立に重要であると推測される。

現在、我々は色々な植物 (モロヘイヤ, リンゴ, ウメなど) を宿主とする多犯性炭疽病菌 (*Colletotrichum fioriniae*) を用いて、本菌にプライミング因子として作用する宿主植物由来因子を明らかにするために、 α -1,3-glucan の蓄積や感染器官形成などを指標に探索を進めている。本発表では得られた成果について報告する。

Investigation of priming factor(s) for *Colletotrichum fioriniae* infection from host plants

Junnosuke Otaka, Shigemi Seo, Marie Nishimura

(NIAS)

P-104 (O-20)

マイコウイルス感染による糸状菌細胞壁の構造変化

望月翔子, 鈴木信弘, 笠原紳 (宮城大・食産業・環境, 岡山大・植物研)

糸状菌 *Cryphonectria parasitica* (旧 *Endothia parasitica*) は凝乳活性を示す酸性プロテアーゼを高産生し、わが国でも古くから研究対象とされてきた糸状菌であるが、クリなどの果樹に対して胴枯病を引き起こす植物病原菌でもある。100 年余り前に日本から米国東部にもたらされた本菌が、感受性の高いアメリカグリ (American chestnut) を山野からほぼ一掃したことは植物病理学史上、特に有名である。*C. parasitica* はウイルス (マイコウイルス) 感染により菌糸成長速度や孢子形成能が低下し、病原性もほぼ消失することが知られている。また、ウイルス感染により細胞壁溶解酵素への感受性が増大するなど、細胞壁の構造が影響を受けているとの予備的知見があり、非ウイルス感染株とウイルス感染株のそれぞれの細胞壁に着目して細胞壁構成多糖の分画と定量、構成糖分析等を行った。キチン結合性の蛍光色素 Calcofluor White による *C. parasitica* 細胞壁中キチンの局在観察では、非ウイルス感染株である EP155 株、ウイルス感染株である EP713 株、CHV2/EP155 株、MyRV1/EP155 株でそれぞれ蛍光強度が変化していた。細胞壁多糖の分画実験では、非ウイルス感染株とウイルス感染株間で、キチンを含む AI 画分の質量に有意差は見られなかったが、 α -1,3-グルカンを含むとされる AS2 画分においては、ウイルス感染株の多くで質量が減少していた。また、構成糖分析の結果より、非ウイルス感染株とウイルス感染株では、細胞壁多糖を構成する各単糖成分の比率に大きな違いは見られなかった。これらの結果より、ウイルス感染により細胞壁中の α -1,3-グルカン量が有意に減少し、このことが病原性と関連している可能性が示唆された。

Structural changes in fungal cell wall caused by mycovirus infection.

Shoko Mochizuki, Nobuhiro Suzuki* & Shin Kasahara

(Miyagi Univ. School of Food, Agric. & Environ. Sci., *IPSR, Okayama Univ.)

P-105

病原真菌 *Aspergillus fumigatus* を弱毒化するマイコウイルス遺伝子の同定

宍戸絵里香¹, 高橋梓¹, 森山裕充², 五ノ井透¹ (¹千葉大・真菌医学研究センター, ²農工大)

アスペルギルス症は, 主に *Aspergillus fumigatus* によって引き起こされる。同菌は呼吸器疾患およびアレルギーの原因となるほか, 全身に感染して重篤化する。しかし医薬用抗真菌薬は種類が極端に少なく, 薬剤耐性菌の出現といった問題を抱えており, 新たな薬剤の開発が強く望まれている。このような状況下で我々は, *A. fumigatus* に存在し同菌を弱毒化するマイコウイルスに着目し, 新規抗真菌薬としての応用を目指して研究を行ってきた。本研究ではこれまでにマウスを用いた感染実験で病原性抑制効果を持つことを発見したマイコウイルスの遺伝子の全ゲノム配列の決定と, 病原性を抑制するマイコウイルス遺伝子の同定を試みた。

2株の *A. fumigatus* よりそれぞれ検出した病原性抑制効果を持つマイコウイルス2種のゲノムを, 次世代シーケンサー (illumina 社 Miseq) を用いて解読し, 得られた配列についてノーザンハイブリダイゼーションおよび 5' RACE 法を用いることによりウイルスゲノムの全長を決定した。RdRp (RNA dependent RNA polymerase)の保存領域を用いた比較系統解析により, 2種のウイルスはともにこれまで報告例のない新種であることがわかった。

次に, ウイルスフリーの *A. fumigatus* 分離株 (KU 株) にウイルスゲノムの ORF をそれぞれ強制発現させ, 宿主の形態・生育速度・浸透圧耐性・薬剤耐性などの表現型, およびマウスへの病原性を比較した。本学会では, これらの解析結果の報告を予定している。

Study of mycoviral genes which attenuate virulence of human pathogen, *Aspergillus fumigatus*

Erika Shishido¹, Azusa Takahashi-Nakaguchi¹, Hiromitsu Moriyama², Tohru Gono¹

(¹MMRC, Chiba Univ., ²Tokyo Univ. of Agric. & Tech.)

P-106

Aspergillus fumigatus の生産するレクチンによる炎症誘発作用について

酒井香奈江¹, 舘野浩章², 比江森恵子², 平林淳², 五ノ井透¹ (千葉大・真菌センター¹, 産総研²)

A. fumigatus はアスペルギルス症の主な原因菌であり, 感染・播種のメカニズムを知るために様々な研究が行われている。その中の一つとして, 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クチンが感染防御で重要な働きをしていることが報告されてきた。一方で, 真菌側のレクチンが感染・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, 近年我々は *A. fumigatus* の生産するレクチンに焦点をあてて病原性との関わりについて研究を行っている。

本研究では, これまでに *A. fumigatus* のレクチンとして同定されたもののうち, fucose に結合特異性を持つ AFL について詳しく調べた。まず6つの糖鎖結合領域のアミノ酸置換を行った AFL を大腸菌において作成し, 糖鎖との結合に変異がどのような影響を与えるか調べた。その結果6領域のうち1領域では変異を入れるとタンパクの生産がなくなり, 他の1領域では変異を入れると, fucose との結合が大幅に減少することが分かった。現在は, 糖鎖との結合が炎症誘発にどのような影響を与えるのかを調べているところである。

The pro-inflammatory reaction of lectin from *Aspergillus fumigatus*.

Kanae Sakai¹, Hiroaki Taten², Keiko Hiemori², Jun Hirabayashi², Tohru Gono¹

(MMRC, Univ. of Chiba¹, AIST²)

発表者索引

- A*
- Anna Bergs 31, 54
 Arthur F. J. Ram.... 16
- B*
- Boris Tefsen 16
- C*
- Cees A.M.J.J. van den
 Hondel 16
- D*
- Daria Kohler... 31, 54
- E*
- Ellen Lagendijk 16
- G*
- G. Ulrich Nienhaus 31,
 54
 Gero Steinberg 47
- H*
- Helge M. Dietrich. 32,
 51
- I*
- Irma van Die 16
- J*
- Jae-Hyuk JANG 79
 Jong Seog AHN 79
 Joohae Park 16
- K*
- Kenneth S. Bruno .. 80
 Kieu Thi Minh Pham
 82
- M*
- Mark Arentshorst .. 16
- N*
- Natasha Savage 31, 54
 Nguyen Hieu Hanh 82
 Nuo Li 29, 67
- P*
- Pei HAN 51
 Pushpa S Murthy ... 36
- R*
- Rebecca Donnelly . 31,
 54
 Reinhard Fischer... 31,
 54
- S*
- Scott E. Baker 80
- Y*
- Yiming Li 31, 54
 Yuji Ishitsuka .. 31, 54
- あ*
- 会田宏樹 75
 赤木靖典 85, 86
 明石貴裕 40
 浅井潔 26, 41
 浅井大貴 46
 浅井菜々実 ... 27, 42,
 44
 浅野さとみ 76
 阿尻雅文 40
 東春奈 36
 阿部郁朗 . 33, 64, 76,
 77
 阿部敬悦 . 26, 27, 29,
 38, 39, 40, 41, 56,
 59, 73
 阿部央行 80
 新井和良 81
 新居鉄平 78
 荒添貴之 46, 81
- 有江力 46, 57
 有岡学 63
 有田稔彦 38
 淡川孝義 . 33, 64, 76,
 77
 安藤晃規 45, 46
- い*
- 五十嵐圭日子 60
 池田健一 82
 石井一夫 57
 石井恵子 40
 石井智子 80
 石川香南 67
 石田健 71
 石田卓也 60
 石田千絵 73
 石原紗彩那 28, 62
 石原亨 86
 泉津弘佑 84, 85
 泉津弘祐 47
 泉実 58
 市川昂典 68
 一瀬桜子 43
 井出綾菜 24
 伊藤英里子 71
 伊藤菊一 58
 伊波朋哉 36
 入谷彰英 75
 岩下和裕 37, 49
 岩渕大輝 76
 岩本和子 64
- う*
- 上野絢子 63
 上原健二 .. 27, 38, 39
 上村泰央 37
 氏家成隆 62
 打矢恵一 40
 梅澤究 60
 梅村舞子 . 26, 41, 59,
 80
- 梅山秀明 56
- え*
- 浴野圭輔 58
- お*
- 老沼研一 34, 78
 大鐘潤 81
 大口ひかる 53
 大里修一 46
 大城彩音 36
 大高潤之介 87
 大塚淳 63
 大塚基広 61
 大沼広宜 61
 大場歩 70
 大箸信一 70
 大場正春 28, 62
 大類景子 27, 38
 小笠原博信 58
 小笠原渉 .. 69, 74, 75
 岡拓二 58
 岡野桂樹 48
 岡部知弥 49
 岡村文音 49
 岡本綾子 71
 小川賢二 40
 小川順 45, 46
 小川哲也 46
 荻野千秋 42, 44
 奥田聡 72
 藤木耕平 41
 奥村 欣由 40
 長田裕之 .. 34, 79, 81
 織田健 37
- か*
- 甲斐建次 86
 柿菌ダララット .. 26,
 44
 笠原紳 35, 87
 梶原康博 65

- 加瀬明日香 39
- 片瀨由佳子 58
- 片山琢也 55
- 加藤順 78
- 加藤翔 79
- 加藤直樹 79
- 加藤雅士.. 28, 62, 66
- 金丸京子. 29, 31, 32,
54, 55, 67, 69, 74
- 金子真也 76
- 金子優平.. 28, 62, 66
- 鎌倉高志 79, 81
- 亀井克彦 65
- 榎野友香 48
- 荻野千秋 27
- 河合清 56
- 川上和義 40
- 川口航平 53
- 川口剛司.. 30, 72, 86
- 川端昂 84
- 川村智樹 60
- 川本進 65, 70
- 川本真也 86
- 全智揚 77
- き
- 菊川寛史 45, 46
- 菊間隆志.. 41, 52, 53
- 北川治恵 70
- 北出雄生 47, 85
- 北本勝ひこ ... 32, 41,
42, 49, 50, 51, 52,
53, 63
- 金允卿 27, 38, 39
- 金鋒杰 32, 42
- 木村真29, 31, 32, 54,
55, 67, 69, 74
- く
- 楠田瑞穂 61
- 楠本憲一 36, 53
- 朽方康裕 39
- 工藤佳那子 62
- 國武絵美. 29, 30, 67,
69, 72
- 久保島恵 71
- 久保康之. 35, 82, 83,
84
- 桑田茂 46, 81
- こ
- 小池英明. 26, 41, 59,
80
- 古崎利紀 57
- 児玉基一朗 85, 86
- 小島憲介 32, 55
- 小嶋涼 78
- 小関卓也 61
- 小玉紗代 83
- 後藤正利 58, 65
- 五ノ井透 65, 88
- 小林拓嗣 57
- 小林哲夫. 28, 29, 31,
32, 54, 55, 62, 67,
69, 74
- 五味勝也. 30, 33, 37,
43, 52, 58, 62, 66,
68, 70
- 小森由美子 40
- 近藤昭彦.. 27, 42, 44
- 今野友維 37
- さ
- 齋藤亮 78
- 酒井香奈江 65, 88
- 坂口歩 83, 84
- 阪本鷹行 45
- 坂本裕一 76
- 佐久間哲史 46
- 櫻谷英治 45, 46
- 笹倉直也 27, 44
- 佐藤志穂 76
- 佐藤大貴 40
- 佐藤春菜 69
- 佐野元昭 70
- 鮫島正浩 60
- し
- 塩野義人 61
- 塩屋幸樹 ..69, 74, 75
- 茂本亮輔 71
- 宍戸絵里香 88
- 志田洋介 ..69, 74, 75
- 篠塚早紀 58
- 島純 45
- 清水志保 24
- 志水元亨 ..28, 62, 66
- 韓錦順 26, 44
- 庄司郁央 56
- 白石進 76
- 白坂憲章 61, 64
- 志波優 55
- 金鋒杰 49, 50, 51
- 新谷尚弘. 30, 33, 37,
43, 52, 66, 68, 70
- 新家一男 26, 41
- す
- 杉山航平 70
- 鈴木空太 37
- 鈴木聡 36, 65
- 鈴木信弘 35, 87
- 鈴木萌 62
- 砂川忠広 19
- 住田卓也 84, 85
- 炭谷順一 ..30, 72, 86
- せ
- 瀬尾茂美 87
- た
- 高尾和実 85
- 高木忍 25
- 高下秀春 65
- 高橋梓 88
- 高橋俊二 79
- 高橋慎太郎 40
- 高橋徹 27, 38, 39, 40
- 高橋徹 26, 44
- 高見誠一 40
- 高谷直樹. 34, 71, 78,
80
- 高柳亜由美 63
- 竹内道雄. 57, 63, 68,
71, 72
- 竹川薫 58, 65
- 竹下典男 31, 54
- 竹本大吾 48, 49
- 田代智史 65
- 多田功生 53
- 館野浩章 88
- 田中愛子 49
- 田中拓未.. 27, 38, 39
- 田中千尋.. 47, 84, 85
- 田中瑞己. 30, 33, 37,
43, 52, 66, 68, 70
- 田中勇氣.. 32, 50, 51
- 田中陽子 34, 81
- 田邊弘毅 27, 38
- 谷修治 30, 72, 86
- 田之倉優 63
- 玉置尚徳 65
- 玉野孝一.. 26, 41, 80
- ち
- 張斯来 43
- 千代優 73
- つ
- 塚崎和佳子 49, 50
- 塚原正俊 36
- 柘植尚志 85, 86
- 辻井雅 72
- 對馬裕誠 39
- 堤浩子 27, 42, 44
- て
- 寺内裕貴 39
- 寺下隆夫 61
- テイ ロ 57
- と
- 堂前圭佑 39
- 富樫貴成 40
- 渡久地政汰 36

- 戸谷光平..... 60
 外山博英..... 36
- な
- 中沢威人..... 28, 59
 中澤奈美..... 34, 78
 中島春紫..... 39, 73
 中嶋佑一..... 74
 中辻諒平..... 45, 46
 長野希美.. 26, 41, 59
 中野宏軌..... 39
 中村彰彦..... 60
 中村隼人..... 66
 中村幸宏..... 21
 中屋敷均..... 75, 82
 中山真由美... 29, 56,
 73
 永山恵美..... 38
 成川恵..... 81
- に
- 二改 俊章..... 40
 西村麻里江..... 87
- の
- 野村善幸..... 58
- は
- 萩原淳..... 78
 萩原大祐.. 56, 65, 70
 長谷川一城祥子... 68
 畑中こずえ..... 48
 秦洋二 21, 27, 42, 44
 早川芙佑華..... 73
- 林早紀..... 32, 55
 原田賢..... 35, 82
 春見隆文..... 78
- ひ
- 比江森恵子..... 88
 樋口剛志..... 38
 樋口裕次郎..... 47
 平沢大樹..... 74
 平林淳..... 88
 平松穂乃花..... 40
 廣澤拓巳..... 81
- ふ
- 深田史美..... 83, 84
 福田泰久..... 61, 64
 福岡泰之..... 56
 福本学..... 40
 藤井郁雄..... 49
 藤岡智則..... 56
 二神泰基..... 65
 二瀬彩子..... 24
 船山あずみ... 31, 54
 古川健太郎... 29, 56,
 73
- ほ
- 星浩臣..... 57
 堀内裕之.. 55, 56, 57
 本田与一..... 28, 59
- ま
- 前田一行..... 74
 前田浩 57, 63, 68, 71
- 前林正弘..... 28, 62
 榊尾俊介..... 80
 榊尾俊介..... 71
 升本宙..... 47
 町田雅之.. 26, 41, 59,
 80
 松田侑大.. 33, 64, 76,
 77
 松村香菜..... 40
 丸山潤一.. 32, 42, 49,
 50, 51
- み
- 三浦愛..... 80
 水谷治..... 26, 44
 三谷隆宏..... 52
 三橋隆章..... 64, 77
 緑川裕良..... 56
 宮川拓也..... 63
 宮崎和弘..... 76
 宮崎安将.. 28, 59, 76
- む
- 村垣公英..... 40
 村口元..... 48
 村野慶奈..... 81
- も
- 望月翔子..... 35, 87
 望月麻衣..... 28, 62
 茂木美樹..... 78
 本山高幸.. 34, 79, 81
 森田寛人..... 71
 森山裕充..... 88
- や
- 山形洋平.. 57, 63, 68,
 71, 72
 山川結..... 73
 山崎周平..... 68
 山下伸雄..... 40
 山田修..... 26, 36, 44
 山根倫子..... 80
 山本卓..... 46
 山本竜也..... 28, 62
- ゆ
- 遊亀翔太..... 30, 72
 雪真弘..... 69
- よ
- 横矢佳奈..... 75
 吉川博文..... 55
 吉田誠..... 60
 吉見啓 29, 56, 59, 73
 吉村緑..... 30, 66
- わ
- 若井暁..... 27, 42, 44
 脇本敏幸..... 33, 77
 渡部昭..... 62
 渡辺国晴..... 24
 渡邊泰祐..... 36
 渡辺隆幸..... 58
 渡邊裕也..... 61
 渡邊祐里絵..... 40

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

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 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

糸状菌遺伝子研究会賛助会員（50音順）

株式会社秋田今野商店
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
スパイバー株式会社
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

糸状菌遺伝子研究会 25周年記念講演会

25th anniversary of Japan Society For
Molecular Biology of Filamentous Fungi

基調講演

北本勝ひこ 先生

特別講演

別府 輝彦 先生

記念講演

町田 雅之 先生

五味 勝也 先生

山田 修 先生

森川 康 先生

秦 洋二 先生

長田 裕之 先生

第36回例会

同時開催

奨励賞講演

技術賞講演

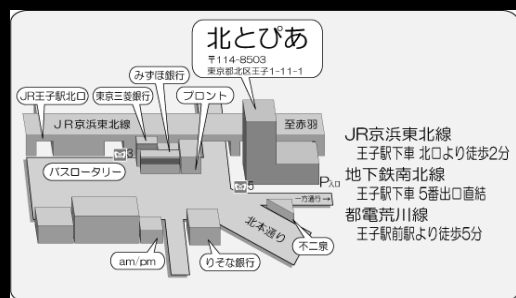
(12月末まで
公募予定)

講演会は参加無料、懇親会費用は後日ご連絡の予定です。

詳しくは以下の連絡先(URL)をご覧ください。

<http://fungi.mysterious.jp/MAIN-J/Welcome.html>

是非ご参加ください



期日：平成27年6月19日（金）

会場：北とぴあ つつじホール

東京都北区王子1丁目11番地1号

お問い合わせ：岩下和裕、織田 健

(酒類総合研究所内 糸状菌遺伝子研究会事務局)

広島県東広島市鏡山3-7-1

Tel: 082-420-0824

E-mail: info@fungi.mysterious.jp

第 14 回糸状菌分子生物学コンファレンス要旨集

平成 26 年 10 月 20 日 印刷

平成 26 年 10 月 20 日 発行

発行者

糸状菌分子生物学研究会

編集者

山形 洋平

〒183-8509 東京都府中市幸町 3-5-8

東京農工大学大学院農学研究院応用生命化学部門