

The 15th Conference on
Fungal Genetics
and
Molecular Biology

第 15 回糸状菌分子生物学コンファレンス

2015 年 11 月 19–20 日
ルミエール府中 (東京都府中市)



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
特別シンポジウム講演要旨	17
一般講演要旨	29
ポスター発表講演要旨	39
発表者索引	91
糸状菌分子生物学研究会会則	94
糸状菌分子生物学研究会運営委員名簿	95
糸状菌遺伝子研究会賛助会員	96

第 15 回糸状菌分子生物学コンファレンス

日時：2015 年 11 月 19 日(木)-20 日(金)

会場：ルミエール府中（府中市市民会館・中央図書館 複合施設）

東京都府中市府中町 2 - 2 4

主催：糸状菌分子生物学研究会

後援：糸状菌遺伝子研究会

11 月 19 日（木）

- 11:00 - 受付開始
- 12:00 - 12:05 開会の辞
- 12:05 - 14:05 口頭発表（O-1~10）
- 14:05 - 14:20 休憩
- 14:20 - 16:20 口頭発表（O-11~20）
- 16:20 - 18:20 ポスター発表（奇数番号）
- 18:30 - 20:30 懇親会

11 月 20 日（金）

- 9:30 - 受付開始
- 10:00 - 12:00 ポスター発表（偶数番号）
- 12:00 - 13:00 昼休み
- 13:00 - 16:35 第 15 回記念 特別シンポジウム
- 16:35 - 17:10 総会・表彰式
- 17:10 - 17:15 閉会の辞

発表演題および講演時間

第 15 回記念 特別シンポジウム 11 月 20 日 (金) 13:00 - 16:20

「糸状菌ゲノム解析・その後」

13:00-13:40 〔座長：町田 雅之（産業技術総合研究所）〕

SS-1 「ゲノム解析によるアカパンカビの研究手法の変化」

東洋大学 生命科学部
一石 明彦

13:40-14:20 〔座長：加藤 直樹（理化学研究所）〕

SS-2 「ポスト・ポストゲノム時代の糸状菌分子生物学を支える
Aspergillus fumigatus の遺伝子・ゲノム研究」

千葉大学 真菌医学研究センター
萩原 大祐

14:20-15:00 〔座長：川口 剛司（大阪府立大学大学院）〕

SS-3 「*Aspergillus* 属における多糖分解酵素生産制御の分子的背景」

名古屋大学大学院 生命農学研究科
小林 哲夫

15:00-15:15 休 憩

15:15-15:55 〔座長：阿部 敬悦（東北大学大学院）〕

SS-4 「植物病原糸状菌のゲノム解析と植物保護研究への展開」

東京農工大学 農学研究院
寺岡 徹

15:55-16:35 〔座長：五味 勝也（東北大学大学院）〕

SS-5 「ゲノム情報時代だからこそ、考えられること、考えるべきこと
－木材腐朽担子菌を利用した研究を通して理解できたこと－」

東京大学大学院 農学生命研究科
鮫島 正浩

一般講演 (O-1~O-10) 11月19日(木) 12:05 - 14:05

[座長: 櫻谷 英治 (O-1, 2), 加藤 直樹 (O-3, 4), 小笠原 渉 (O-5~7), 原田 賢 (O-8~10)]

- 12:05 O-1 メロテルペノイド terretonin 生合成に関与する新規異性化酵素 Trt14 の構造機能解析
岩瀬大輝, 松田侑大, 森貴裕, 阿部郁朗 (東大院・薬)
- 12:17 O-2 マツタケ (*Tricholoma matsutake*) 培養菌糸由来糖質分解酵素遺伝子群の発現解析
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)
- 12:29 O-3 昆虫病原性糸状菌 *Lecanicillium* sp. が生産するポリケタイド合成酵素 (PKS) と非リボソームペプチド合成酵素 (NRPS) 由来新規ハイブリッド化合物の同定
中村美有希, Minh Viet Nguyen, 石堂圭一, 木下浩, 仁平卓也 (阪大・生物学国際交流セ)
- 12:41 O-4 麴菌 astellolide 生合成遺伝子クラスターの同定
篠原靖智¹, 川谷誠², 二村友史², 長田裕之², 小山泰二¹ (¹野田産研, ²理研・CSRS)
- 12:53 O-5 麴菌における炭素源依存的な選択的転写開始機構を有する解糖系遺伝子の同定
井上大志, 田路洋紀, 高間充, 田中瑞己, 新谷尚弘, 五味勝也
(東北大院・農・生物産業創成)
- 13:05 O-6 Binding features of ManR and ManS involved in cellulase and mannanase regulation in *Aspergillus nidulans*
Nuo Li, Emi Kunitake, Kyoko Kanamaru, Makoto Kimura, Tetsuo Kobayashi
(Grad. Sch. Bioagric. Sci., Nagoya Univ.)
- 13:17 O-7 ウシグソヒトヨタケの傘形成に関与する Cag1 と相互作用するタンパク質の探索
増田亮, 村口元 (秋田県立大・生物資源)
- 13:29 O-8 大規模数理モデリングによる菌根菌感染関連遺伝子の同定と感染予測法の確立
石井一夫¹, 古崎利紀¹, 中川知巳² (東京農工大・農学府農学部¹、基生研²)
- 13:41 O-9 イネいもち病菌の非病原性タンパク質 AVR-Pia の構造と機能の解析
藤原志帆¹, 樋口裕也¹, 佐藤佑樹¹, 尾瀬農之², 神谷昌克³, 浅野行蔵¹, 曾根輝雄¹
(¹北大院農, ²北大院薬, ³北大院先端生命)
- 13:53 O-10 トウモロコシごま葉枯病菌の CLA4 と菌糸伸長の関連性
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)

一般講演 (O-11~O-20) 11月19日(木) 14:20 - 16:20

[座長: 樋口 裕次郎 (O-11~13), 竹下 典男 (O-14, 15), 國武 絵美 (O-16, 17), 坂本 裕一 (O-18~20)]

- 14:20 O-11 糸状菌の先端生長におけるアクチンケーブルと微小管の協調的重合制御
Anna Bergs¹, Yuji Ishitsuka², G. Ulrich Nienhaus², 竹下 典男^{1,3}
(¹Dept of Microbiol, ²Inst of Applied Physics, Karlsruhe Institute of Technology (KIT), ³筑波大学
生命環境系)
- 14:32 O-12 担子菌ヒトヨタケにおいて、2つのクロマチン構造変換因子をコードする *Cc.snf5* と
Cc.arp9 の変異は、互いに異なる影響によってキノコ発生開始不全を引き起こす
中沢威人^{1,2}, 安藤友貴², 秦武史², 中堀清² (¹京大・院農, ²岡山大・院自然)
- 14:44 O-13 BiFC 法による麴菌 *A. oryzae* 実用株の細胞融合能および不和合性の解析
岡部知弥¹, 中村英淳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)
- 14:56 O-14 ウリ類炭疽病菌の染色体タギング法を用いた細胞周期および GTPase CoTem1 局在の
解析
深田史美, 久保康之 (京都府大院・生環)
- 15:08 O-15 糸状菌 *Aspergillus nidulans* 由来の新規 poly (ADP-ribose) glycohydrolase の発見とその
生理学的役割
宮地雄大¹, 平野滯¹, 山本竜也¹, 高谷直樹², 志水元亨¹, 加藤雅士¹
(¹名城大・農, ²筑波大・生命環境)
- 15:20 O-16 麴菌 *A. oryzae* における CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集技術の確立
片山琢也¹, 中村英淳¹, 田中勇氣¹, 岡部知弥¹, 藤井渉², 北本勝ひこ¹, 丸山潤一¹
(¹東大院・農生科・応生工, ²東大院・農生科・応動)
- 15:32 O-17 麴菌カーボンカタボライト抑制関連遺伝子破壊株の細胞壁構成多糖の成分解析
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)
- 15:44 O-18 非特異的な変異導入を伴わずに育種した麴菌 *Aspergillus oryzae* 宿主
朽方康裕, 辻華奈, 利根川唯, 森谷翔太, 中島春紫 (明治大・農・農芸化)
- 15:56 O-19 糸状菌型 CRISPR/Cas システムを用いたイネいもち病菌における高効率標的遺伝子
ノックアウト・ノックイン・塩基置換導入法
荒添貴之^{1,2}, 三好健之介², 大和澄², 小川哲央², 大里修一², 有江力³, 桑田茂²
(¹神戸大院工・²明治大院農・³農工大院農)

16:08 O-20 糸状菌多糖分解酵素生産におけるキメラ転写因子の利用技術開発
山口楓絵, 國武絵美, 金丸京子, 木村真, 小林哲夫 (名大院・生命農)

ポスター発表 11月19日(木) 16:20 – 18:20 (奇数番号)

11月20日(金) 10:00 – 12:00 (偶数番号)

P-1 Investigation on the biosynthesis of stachybisbins from *Stachybotrys bisbyi*

Chang Li¹, Yudai Matsuda¹, Hao Gao², Xin Sheng Yao², Ikuro Abe¹

(¹ Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Univ. of Tokyo; ² College of Pharmacy, Jinan Univ.)

P-2 l-乳酸生産黄麹菌の乳酸生産能に対する中央代謝経路改変の影響

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 神戸大院・工, ² 神戸大・自然科学, ³ 月桂冠・総研)

P-3 コピー数多形とプロモーター強度を加味した黄麹菌でのマルチ遺伝子発現

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 神戸大院・工, ³ 月桂冠・総研)

P-4 糸状菌 *Emericella varicolor* IFM42010 由来ポリケタイド合成酵素遺伝子の機能解析

橋元 誠, 一條 眸, 藤原康太郎, 菅澤 仁, 藤井 勲 (岩手医大・薬)

P-5 麹菌界面活性タンパク質 hydrophobin RolA の負電荷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 麹菌由来ハイドロフォービン HypA の機能性付与による物性変化

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-7 麹菌 *A. oryzae* における CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集技術の確立

片山琢也¹, 中村英淳¹, 田中勇氣¹, 岡部知弥¹, 藤井渉², 北本勝ひこ¹, 丸山潤一¹

(¹ 東大院・農生科・応生工, ² 東大院・農生科・応動)

P-8 麹菌 *A. oryzae* を用いたシロアリ腸内共生原生生物由来セロビオヒドロラーゼの生産

北本真理奈¹, 川田純毅¹, 丸山潤一¹, 小田切正人², 守屋繁春², 有岡学¹

(¹ 東大院・農生科・応生工, ² 理化学研究所)

P-9 麹菌の hydrophobin RolA-cutinase CutL1 間相互作用に寄与する CutL1 側残基の探索

金允卿¹, 寺内裕貴¹, 田中拓未¹, 上原健二¹, 高橋徹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)

- P-10 麹菌のハイドロフォービンを利用した重金属回収システムの構築**
 中間聖, 大橋信太郎, 赤池大輝, 阿吹綾香, 中島春紫 (明治大院・農・農化)
- P-11 *Aspergillus* 属糸状菌のハイドロフォービン-クチナーゼ間相互作用に関する研究**
 田中拓未¹, 高橋徹², 山形洋平³, 阿部敬悦^{1,2}
 (¹東北大院・農・生物産業創成, ²東北大・未来研, ³農工大院・農)
- P-12 TILLING 法によるシイタケの育種手法の開発**
 坂本裕一, 金野尚武*, 佐藤志穂, 水野雅史**, 山内隆弘***, 枝克昌**, 後藤史和***
 (岩手生工研・生物資源, *宇都宮大・農, **神戸大・農, *** (株)北研)
- P-13 麹菌カーボンカタボライト抑制関連遺伝子破壊株の細胞壁構成多糖の成分解析**
 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-14 麹菌 hydrophobin RolA -cutinase CutL1 間相互作用における CutL1 側相互作用部位解析**
 寺内裕貴¹, 金允卿¹, 田中拓未¹, 高橋徹², 阿部敬悦^{1,2}
 (¹東北大院・農・生物産業創成, ²東北大・未来研)
- P-15 麹菌細胞壁の α -1,3-グルカンは液体培養におけるタカアミラーゼの細胞壁吸着性に関与する**
 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-16 麹菌 *Aspergillus oryzae* の非イオン性界面活性剤添加培養による遊離脂肪酸の高効率分泌**
 玉野孝一, 三浦愛, 小池英明, 神坂泰, 木村和義, 梅村舞子, 町田雅之
 (産総研・生物プロセス)
- P-17 非特異的な変異導入を伴わずに育種した麹菌 *Aspergillus oryzae* 宿主**
 朽方康裕, 辻華奈, 利根川唯, 森谷翔太, 中島春紫 (明治大・農・農芸化)
- P-18 *Coprinopsis cinerea* プロトプラスト凍結保存法の開発とプロモータ解析への応用**
 鈴木博子¹, 千葉洋史¹, 岡久聖実², 菅野茂夫², 刑部祐里子², 村口元³, 刑部敬史²
 (¹徳島大院・生命テクノ, ²徳島大・農工商, ³秋田県立大・生物資源)
- P-19 モデル担子菌 *Coprinopsis cinerea* におけるエレクトロポレーション法の開発**
 千葉洋史¹, 鈴木博子¹, 岡久聖実², 菅野茂夫², 刑部祐里子², 刑部敬史²
 (¹徳島大院・生命テクノ, ²徳島大・農工商)
- P-20 麹菌のアミラーゼ遺伝子を制御する転写因子 AmyR 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-21** 糸状菌多糖分解酵素生産におけるキメラ転写因子の利用技術開発
山口楓絵, 國武絵美, 金丸京子, 木村真, 小林哲夫 (名大院・生命農)
- P-22** 担子菌 *Coprinopsis cinerea* におけるセルソーティングの試み
菅野茂夫¹, 鈴木博子², 千葉洋史², 刑部祐里子¹, 刑部敬史¹
(¹徳島大・農工商, ²徳島大・生命テクノ)
- P-23** 糸状菌型 CRISPR/Cas システムを用いたイネいもち病菌における高効率標的遺伝子ノックアウト・ノックイン・塩基置換導入法
荒添貴之^{1,2}, 三好健之介², 大和澄², 小川哲央², 大里修一², 有江力³, 桑田茂²
(¹神戸大院工・²明治大院農・³農工大院農)
- P-24** 糸状菌の先端生長におけるアクチンケーブルと微小管の協調的重合制御
Anna Bergs¹, Yuji Ishitsuka², G. Ulrich Nienhaus², 竹下 典男^{1,3} (¹Dept of Microbiol, ²Inst of Applied Physics, Karlsruhe Institute of Technology (KIT), ³筑波大学生命環境系)
- P-25** 担子菌ヒトヨタケにおいて、2つのクロマチン構造変換因子をコードする *Cc.snf5* と *Cc.arp9* の変異は、互いに異なる影響によってキノコ発生開始不全を引き起こす
中沢威人^{1,2}, 安藤友貴², 秦武史², 中堀清² (¹京大・院農, ²岡山大・院自然)
- P-26** 麹菌のミトコンドリアに局在するホスホリパーゼ A₂ AoPlaA の機能解析
伊澤翔, 高柳亜由美, 駒井紀之, 北本勝ひこ, 有岡学 (東大院・農生科・応生工)
- P-27** 麹菌 *A. oryzae* の菌核形成に関与する転写因子の探索
中村英淳¹, 丸山潤一¹, 小川真弘², 小山泰二², 有岡学¹, 北本勝ひこ¹
(¹東大院・農生科・応生工, ²野田産研)
- P-28** BiFC 法による麹菌 *A. oryzae* 実用株の細胞融合能および不和合性の解析
岡部知弥¹, 中村英淳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** 黄麹菌 *Aspergillus oryzae* におけるエンドサイトーシス関連 AAA ATPase AipA と相互作用する因子の解析
柿本健一, 竹川薫, 樋口裕次郎 (九州大・農)
- P-30** ウリ類炭疽病菌の染色体タギング法を用いた細胞周期および GTPase CoTem1 局在の解析
深田史美, 久保康之 (京都府大院・生環)

- P-31 麹菌 *A. oryzae* の分生子および菌核形成における光応答関連遺伝子の機能解析**
川田純毅¹, Helge M. Dietrich¹, 渡邊泰祐², 外山博英³, 丸山潤一¹, 北本勝ひこ¹
(¹東大院・農生科・応生工, ²日大院・生資科・生資利用, ³琉球大農・亜熱生資)
- P-32 糸状菌の Fus3 オルソログと相互作用するタンパク質による細胞融合制御機構**
片山琢也, 丸山潤一 (東大院・農生科・応生工)
- P-33 麹菌 *A. oryzae* における AoFus3 と相互作用する RhoGAP タンパク質 FipB の標的解析**
原田堅伍, 矢萩大貴, 丸山潤一, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)
- P-34 麹菌における α -1,3-グルカン生合成関連遺伝子群の 5 重破壊株における培養性状と物質生産性の評価**
宮澤拳¹, 吉見啓², 張斯来¹, 佐野元昭³, 五味勝也¹, 阿部敬悦^{1,2}
(¹東北大院・農・生物産業創成, ²東北大・未来研, ³金工大・ゲノム研)
- P-35 RNA-seq データを活用した糸状菌ゲノムアノテーションの高精度化解析**
山岸秀規, 上村泰央 (株式会社ジナリスオミックス)
- P-36 酵母誘導発現系によるマイコウイルス由来抗菌性タンパク質の生育阻害評価の試み**
月本竣司, 木村優里, 一之瀬俊, 福原敏行, 森山裕充 (農工大・院農・生物制御)
- P-37 麹菌 *Aspergillus oryzae* の金属プロテアーゼ insulysin の機能解析**
鈴木遥香, 吉永良平, 竹内道雄, 山形洋平 (農工大院・応生化)
- P-38 麹菌における核の自食機構ヌクレオファジーの解析**
三谷隆宏, 菊間隆志, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)
- P-39 *Aspergillus fumigatus* の推定ガラクトフラノース転移酵素遺伝子群の機能解析**
¹李 秋実, ¹片渕 由佳子, ¹浴野 圭輔, ²竹川 薫, ²後藤 正利, ²岡 拓二 (¹崇城大院・工, ²九大院・農)
- P-40 *Aspergillus nidulans* におけるプロテインキナーゼ C の失活によるカルシウム応答シグナル伝達経路活性化機構の解析**
山本雄己, 片山琢也, 堀内裕之 (東大院・農生科・応生工)
- P-41 細胞壁多糖 α -1,3-グルカンが低減した麹菌をスクリーニングする方法の開発**
吉見啓¹, 平間美沙², 坪田康信², 川上和義³, 阿部敬悦^{1,4}
(¹東北大・未来研, ²(株)一ノ蔵, ³東北大院医, ⁴東北大院農・生物産業創成)
- P-42 麹菌 *A. oryzae* おけるオートファジー関連タンパク質 AoAtg26 の局在および機能解析**
菊間隆志, 有岡学, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)

- P-43** *Aspergillus nidulans* の分生子形成に関与する糖転移酵素様機能未知膜タンパク質の解析
川満 洋平¹, 石井 千尋¹, 浴野 圭輔¹, 竹川 薫², 後藤 正利², 岡 拓二² (¹崇城大院・工, ²九大院・農)
- P-44** *Aspergillus nidulans* におけるホスファチジルセリンデカルボキシラーゼ遺伝子の機能解析
吉川阿佳里¹, 高城景子², 福田良一², 堀内裕之²
(¹東京大・農・生化工, ²東大院・農生科・応生工)
- 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
片瀧由佳子¹, 泉実², 浴野圭輔¹, 竹川薫³, 後藤正利³, 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** 糸状菌 *Aspergillus nidulans* 由来の新規 poly (ADP-ribose) glycohydrolase の発見とその生理学的役割
宮地雄大¹, 平野滯¹, 山本竜也¹, 高谷直樹², 志水元亨¹, 加藤雅士¹
(¹名城大・農, ²筑波大・生命環境)
- P-47** 麹菌 *Aspergillus oryzae* AdmA, AdmB の局在解析
小林拓嗣, 前田浩, 竹内道雄, 山形洋平 (農工大院・応生科)
- P-48** 糸状菌二成分性情報伝達経路に対する新規阻害剤の出芽酵母を用いた評価系の構築
田畑風華¹, 中山真由美¹, 吉見啓², 藤岡智則³, 阿部敬悦^{1,2}
(¹東北大学院農・生物産業創成, ²東北大・未来研, ³クミアイ化学工業)
- P-49** メロテルペノイド terretonin 生合成に関与する新規異性化酵素 Trt14 の構造機能解析
岩瀧大輝, 松田侑大, 森貴裕, 阿部郁朗 (東大院・薬)
- P-50** *Aspergillus oryzae* 酸性プロテアーゼ欠損株の菌体外プロテアーゼの解析
上野絢子, 前田浩, 山形洋平, 竹内道雄 (農工大院・応生化)
- P-51** *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, 森貴裕, 淡川孝義, 阿部郁朗 (東大院・薬)
- P-52** 麹菌 *Aspergillus oryzae* の酸性ホスファターゼ遺伝子に関する研究
安田 (吉野) 庄子, 小野奈津子, 長谷川 撰, 間野博信 (あいち産科技総セ・食工技セ)
- P-53** マツタケ (*Tricholoma matsutake*) 培養菌糸由来糖質分解酵素遺伝子群の発現解析
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-54** *Lentinula edodes* (シイタケ) 培養菌体内プロテアーゼ遺伝子群の発現解析
福田泰久, 寺下隆夫, 白坂憲章 (近畿大・農応生)
- P-55** 糸状菌 *Trichoderma reesei* における BGLII の生理学的役割
中村彩奈¹, 高橋真智子¹, 松沢智彦², 志田洋介¹, 矢追克郎², 小笠原渉¹
(¹長岡技科大・生物, ²産総研)
- P-56** 糸状菌 *Aspergillus nidulans* が分泌する新規 GH 134 family に属する β -1,4-マンナーゼ
Man134A およびそのホモログの解析
酒井 杏匠¹, 望月 麻衣¹, 山田 みゆき¹, 金子 優平¹, 石原 紗彩耶¹, 新沢 祐大¹, 嶺澤 美帆¹,
木本 紗蘭¹, 神藤 定生¹, 志水 元亨¹, 小林 哲夫², 加藤 雅士¹ (¹名城大・農, ²名大院・生命農)
- P-57** 新たな NRPS-PKS 融合酵素によるかび毒テヌアゾン酸の生合成
尹忠鉄, 本山高幸, 長田裕之 (理研 CSRS・ケミカルバイオロジー)
- P-58** 担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* 由来新規 PQQ 依存性酸化還元酵素遺伝子の
発現応答解析
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-59** *Aspergillus nidulans* における β -D-ガラクトフラノシダーゼの諸性質の解析
豊田早紀, 八色奈央, 松永恵美子, 樋口裕次郎, 後藤正利, 竹川薫 (九州大・農学部)
- P-60** 大腸菌で高発現させた麹菌由来 D-乳酸脱水素酵素 (D-LDH) の酵素学的諸性質
渡部 昭, 佐藤陽子, 五味勝也 (東北大院農・生物産業創成)
- P-61** トランスクリプトーム解析による糸状菌 *Aspergillus fumigatus* の環境ストレス応答能の基盤
整備
高橋弘喜, 楠屋陽子, 高橋 (中口) 梓, 早川真理子, 五ノ井透 (千葉大・真菌センター)
- P-62** 休眠孢子および発芽孢子のトランスクリプトーム解析から示唆された休眠-発芽における
AtfA の機能
萩原大祐, 楠屋陽子, 高橋弘喜, 川本進, 亀井克彦, 五ノ井透 (千葉大・真菌センター))
- P-63** ウシグソヒトヨタケの傘形成に関与する Cag1 と相互作用するタンパク質の探索
増田亮, 村口元 (秋田県立大・生物資源)
- P-64** 黄麹菌セリンタイプカルボキシペプチダーゼ遺伝子のイントロン残存の配列依存性
石田健, 竹内道雄, 山形洋平 (農工大院・応生科)

- P-65 麹菌のアミラーゼ生産におけるカーボンカタボライト抑制は窒素源の違いの影響を受ける
小川真弘, 小山泰二 (公益財団法人野田産業科学研究所)
- P-66 *Aspergillus terreus* における pH 依存的イタコン酸生産制御機構の研究
安藤祥生, 尾花克哉 (中部大院・応生) 金政 真 (中部大・環境生科)
- P-67 麹菌のヒドロフォービン HypD は固体培養時に発現する
石倉 幹大, 藤井 祐希, 土屋 貴寛, 稲葉 拓哉, 中島 春紫 (明治大・農)
- P-68 麹菌におけるカーボンカタボライト抑制制御因子 CreA の細胞内局在と安定性
田中瑞己, 新谷尚弘, 五味勝也 (東北大院農・生物産業創成)
- P-69 イネいもち病菌の相同組換え修復機構における Srs2 DNA ヘリカーゼの役割
小川哲央¹・荒添貴之²・佐久間哲史³・山本卓³・桑田茂¹・草野好司¹・大里修一¹
(¹明治大院農・²神戸大院工・³広島大院理)
- P-70 Transcriptional regulation mechanism of Trichodermapepsin in *Trichoderma reesei*
Nayani D. Daranagama, Hiroki Aita, Hiroki Hirasawa, Koki Shioya, Haruna Sato, Yoshiyuki Suzuki, Yosuke Shida, Wataru Ogasawara (Dept. of Bioeng., Nagaoka Univ. of Tech.)
- P-71 Binding features of ManR and ManS involved in cellulase and mannanase regulation in *Aspergillus nidulans*
Nuo Li, Emi Kunitake, Kyoko Kanamaru, Makoto Kimura, Tetsuo Kobayashi
(Grad. Sch. Bioagric. Sci., Nagoya Univ.)
- P-72 麹菌 *Aspergillus oryzae* のリン酸獲得系遺伝子の転写因子 PhoR の機能解析
多田 功生, 大口 ひかる, 鈴木 聡, 楠本 憲一 (農研機構 食総研)
- P-73 麹菌における炭素源依存的な選択的転写開始機構を有する解糖系遺伝子の同定
井上大志, 田路洋紀, 高間充, 田中瑞己, 新谷尚弘, 五味勝也 (東北大院・農・生物産業創成)
- P-74 麹菌転写因子 XlnR の誘導物質依存的リン酸化の生理的意義
浅井恒滋, 杉本賢吾, 石川周平, 金丸京子, 木村真, 小林哲夫 (名大院・生命農)
- P-75 麹菌における菌体内 α -グルコシダーゼ MaIT のアミラーゼ誘導生産への関与
渡辺崇健, 市川昂典, 長谷川-城祥子, 田中瑞己, 渡部昭, 新谷尚弘, 五味勝也
(東北大院・農・生物産業創成)
- P-76 *Aspergillus oryzae csrA* 遺伝子の natural antisense RNA は sense RNA と結合し, 発芽を制御する
辻井雅, 竹内道雄, 山形洋平 (農工大院・応生科)

- P-77** *Fusarium graminearum* における *Tri6 5'* 上流領域の機能解析
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** 抗摂食性物質 *citreoahyridonol* 合成を担うシトクロム P450 の発見
全智揚, 松田侑大, 阿部郁朗 (東大院・薬)
- P-79** An unusual chimeric terpene synthase from *Emericella varicolor*: Diterpene synthase or sesterterpene synthase?
Bin Qin, Takahiro Mori, Yudai Matsuda, Masahiro Okada, Takaaki Mitsuhashi, Zhiyang Quan, Ikuro Abe
(The University of Tokyo・Graduate School of Pharmaceutical Sciences)
- P-80** 昆虫病原性糸状菌 *Lecanicillium sp.* が生産するポリケタイド合成酵素 (PKS) と非リボソームペプチド合成酵素 (NRPS) 由来新規ハイブリッド化合物の同定
中村美有希, Minh Viet Nguyen, 石堂圭一, 木下浩, 仁平卓也 (阪大・生物工学国際交流セ)
- P-81** シクロピアゾン酸生合成における *cpaM* の機能解析
菊池友希¹, 小山哲史², 飯尾晋一郎², 篠原靖智³, 久保田高明^{4,5}, 小林淳一⁴, 小山泰二³, 徳岡昌文², 進藤斉², 穂坂賢² (¹東農大院・農, ²東農大・応生科, ³野田産研, ⁴北大院・薬, ⁵昭和薬大)
- P-82** 白麹菌 *Aspergillus kawachii* におけるクエン酸合成関連遺伝子の機能解析
門岡千尋¹, 泉津弘佑², 奥津果優¹, 吉崎由美子¹, 高峯和則¹, 後藤正利³, 玉置尚徳¹, 二神泰基¹
(¹鹿児島大・農, ²滋賀県大・環境科学, ³九州大・農)
- P-83** 麹菌 *astellolide* 生合成遺伝子クラスターの同定
篠原靖智¹, 川谷誠², 二村友史², 長田裕之², 小山泰二¹ (¹野田産研, ²理研・CSRS)
- P-84** 昆虫制御活性物質オカラミンの生合成遺伝子クラスターの同定
加藤直樹¹, 古谷章悟², 衣笠清美¹, 高橋俊二¹, 松田一彦², 長田裕之¹
(¹理研 CSRS・ケミカルバイオロジー, ²近畿大・農)
- P-85** Sirtuin 活性の制御による糸状菌の休眠二次代謝系遺伝子の活性化
茂本亮輔, 伊藤英里子, 張本修平, 松本貴良, 梶尾俊介, 高谷直樹 (筑波大院・生命環境)
- P-86** 大規模数理モデリングによる菌根菌感染関連遺伝子の同定と感染予測法の確立
石井一夫¹, 古崎利紀¹, 中川知巳² (東京農工大・農学府農学部¹、基生研²)
- P-87** プレオスポラ目菌にユニークな β -キシロシダーゼホモログの発現解析
吉田裕史, 住田卓也, 田中千尋 (京都大院・農)

- P-88** キャベツ萎黄病菌は生存に必須でない複数の小型染色体を保持する
 鮎川侑¹, 柏毅², 小松健^{3, 4}, 寺岡徹³, 有江力³
 (¹農工大院連農・²理研 CSRS・³農工大院農・⁴農工大テニユアトラック機構)
- P-89** イネいもち病菌の非病原性タンパク質 AVR-Pia の構造と機能の解析
 藤原志帆¹, 樋口裕也¹, 佐藤佑樹¹, 尾瀬農之², 神谷昌克³, 浅野行蔵¹, 曾根輝雄¹
 (¹北大院農,²北大院薬, ³北大院先端生命)
- P-90** *Aspergillus fumigatus* における銅恒常性維持機構に関与する遺伝子の探索
 楠屋陽子, 早川真理子, 五ノ井透, 高橋弘喜 (千葉大・真菌センター)
- P-91** トマト萎凋病菌の病原性関連遺伝子の変異の多様性
 赤井浩太郎¹, 田村咲子², 小松健¹, 寺岡徹¹, 有江力¹ (¹農工大院・農, ²農工大・農)
- P-92** キュウリ褐斑病菌のジカルボキシイミドおよびフェニルピロール耐性変異の同定
 塚田淑仁, 堀内玲菜, 一石昭彦, 藤村真 (東洋大院・生命科学)
- P-93** エンバクいもち病菌のコムギ品種 Hope に対する非病原力遺伝子の同定および分子マッピング
 小松 香織, 森 亮太, 井上 喜博, Vy Trinh Thi Phuong, 中馬 いづみ, 土佐 幸雄 (神戸大院・農)
- P-94** *Epichloae* (*Epichloë/Neotyphodium* 属) エンドファイトの疑似有性生殖様の現象を介した雑種菌の出現と染色体の再編成
 磯部仁美¹, 増中章², 菅原幸哉³, 月星隆雄², 田中愛子¹, 竹本大吾¹ (名大院・生命農学, ¹畜草研, ²東北農研)
- P-95** ウリ類炭疽病菌の 26S プロテアソームサブユニット *RPN10* ホモログは病原性に関与する
 住田卓也¹, 泉津弘佑², 田中千尋¹ (¹京大院・農, ²滋賀県大・環境科学)
- P-96** 牧草共生菌 *Epichloë festucae* の共生および細胞融合を制御する情報伝達因子の解析
 神谷昇汰¹, 岡村文音¹, 尾崎よしの¹, 亀岡慎一¹, 榎野友香¹, Barry Scott², 丸山潤一³, 田中愛子¹, 竹本大吾¹ (¹名大院・生命農学, ²Inst. Fund. Sci., Massey Univ., ³東大院・農生科・応生工)
- P-97** *Colletotrichum orbiculare* species complex に属する炭疽病菌は類似したゲノム構造を有し、宿主範囲を部分的に共有している
 小川真実¹, 田中 薫¹, 上中谷 瞳², 山下 純³, Pamela Gan⁴, 白須 賢⁴, 多賀正節², 久保康之¹
 (¹京府大院・生環, ²岡大院・自然, ³岡大資源植物科学研, ⁴理研)

- P-98** 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 TOR 経路を介し準活物寄生の制御に関わる
原田 賢¹, 西内 巧², 久保康之¹ (京府大院・生環¹, 金沢大・学際センター²)
- P-99** *Aspergillus fumigatus* の生産するフコース特異的レクチンの機能解析
酒井香奈江, 五ノ井透 (千葉大・真菌セ)
- P-100** 病原真菌 *Aspergillus fumigatus* を弱毒化するマイコウイルスの遺伝子発現解析
宋戸絵里香¹, 高橋梓², 森山裕充³, 五ノ井透² (¹千葉大・医学薬学府, ²千葉大・真菌センター, ³農工大)
- P-101** トウモロコシごま葉枯病菌の *CLA4* と菌糸伸長の関連性
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-102** ウリ類炭疽病菌 MOR 経路因子変異株のトランスクリプトーム比較による植物シグナル認識を介した付着器形成メカニズムの解析
小玉紗代¹, 石塚隼也¹, 宮下一糸¹, 西内 巧², 石井孝昭¹, 三芳秀人³, 久保康之¹
(¹京府大院生環, ²金沢大・学際センター, ³京大院農)
- P-103** 麹菌株群の比較ゲノムとアスピロクロリン生産性
齊藤 亮太, 大田 民, 梅尾 美幸, 織田 健, 岩下 和裕 (酒総研・基盤)
- P-104** *Aspergillus aculeatus* セルロース資化能欠損株の表現型解析
片山椋平, 遊亀翔太, 谷修治, 炭谷順一, 川口剛司 (阪府大院・生環科)

糸状菌分子生物学コンファレンス
第 15 回記念特別シンポジウム

「糸状菌のゲノム解析・その後」

糸状菌分子生物学コンファレンス 第 15 回記念特別シンポジウム 「糸状菌のゲノム解析・その後」 SS-1

ゲノム解析によるアカパンカビの研究手法の変化

一石 昭彦

(東洋大学生命科学部)

1. はじめに

アカパンカビ (*Neurospora crassa*) は、パリのパン屋さんで生じるオレンジ色のカビとして 1843 年にはじめて記載された。研究材料としてのアカパンカビの基礎は、1930 年代から 1940 年代にかけて、B. O. Dodge や C. C. Lindegren によって築かれた。これ以後、アカパンカビの特性から遺伝学の研究に用いられるようになった。また、G. W. Beadle と E. L. Tatum による『一遺伝子一酵素説』の発見につながる実験に使用され、それまでの遺伝学とはことなる遺伝生化学や分子生物学と行った新しい学問分野が生じ、その最先端分野におけるモデル微生物としての地位を獲得した。しかし、1950 年代になると遺伝生化学や微生物遺伝学で使用される生物は、アカパンカビから大腸菌に移っていき、さらに 1960 年代後半から 1970 年代には酵母が真核微生物研究の中心となり、アカパンカビは 1940 年頃のような華やかな舞台で語られることが少なくなっていた。しかしながら、アカパンカビを研究材料とした研究を続けていた研究者のグループは、*Neurospora Information Conference* を中心に引き続き研究情報の交換を続けてきた⁽¹⁾。

2. ゲノム解析以前

1980 年代になると分子生物学的研究が盛んに行われるようになり、遺伝子のクローニングやシーケンシングが行われるようになった。アカパンカビでも、効率的な形質転換法は 1979 年⁽²⁾、1984 年の RFLP マッピング法⁽³⁾、1986 年の DNA ライブラリーの構築⁽⁴⁾、1987 年の RIP 現象の発見⁽⁵⁾などなされ、1980 年代に遺伝子組換え技術やツールがそろってきた。また、ライブラリーや RFLP マッピングに使用する菌株等は、広く公開され、Fungal Genetic Stock Center (FGSC) から取り寄せることができた。もともと、アカパンカビは遺伝学に適したバックグラウンドをもっており、あらためて見直されるようになった。また、概日リズムや DNA メチル化などの研究においては優れたモデル生物であることが示された。

その頃の遺伝子クローニング法は、DNA ライブラリーを突然変異株に形質転換し、その形質を相補する DNA 断片をクローニングしてくるといった手法がとられていた。その後、1990 年代になり、他の生物のゲノム情報が利用できるようになるとともに、PCR 法が開発されたことで、遺伝子のクローニング手法はがらりと変わった。また、研究の進め方も逆遺伝学 (reverse genetics) による研究が増えていった。

3. ゲノム解析後

アカパンカビのゲノム解析は、糸状菌の中では最も早く 2000 年より開始され、2003 年

にアカパンカビゲノム解析結果が公開された⁽⁶⁾。それらをもとにしたポストゲノム研究がアカパンカビで進められるとともに、アカパンカビ研究者だけではなく多くの糸状菌研究者の研究に役立っている。

アカパンカビではRIP現象により遺伝子破壊を行ってきた。RIP法による遺伝子破壊は、確実に行うことができたが、RIP現象が減数分裂時に起こるため、必ず交配を行う必要があり、最低でも1ヶ月を必要とする。しかし、2004年にNinomiyaらの遺伝子置換による遺伝子破壊法が開発され⁽⁷⁾、効率よく短時間に遺伝子欠損株の取得ができるようになった。さらに、アカパンカビの全遺伝子についてこの方法を用いた網羅的な遺伝子ノックアウト株(KO株)の作成が開始され、現在FGSCから作成されたKO株の取得が可能であり⁽⁸⁾、KO株を用いた研究が現在の主流になってきている。

アカパンカビは、麹菌などのカビに比べ産業的に有用なカビではなく、また病原性カビでもないが、糸状菌の優れたモデル生物であると考えている。アカパンカビにおいて、基本的な遺伝学、分子生物学などの研究成果を示すことで、今後も他の糸状菌における新たな現象の発見に寄与できると考えている。

引用文献

- 1: Davis and Perkins. 2002. Nat Rev Genet 3:397-403
- 2: Case et al. 1979. Proc Natl Acad Sci USA 76:5259-63
- 3: Metzenberg et al. 1984. Neurospora Newslett 31:35-39
- 4: Vollmer and Yanofsky. 1986. Proc Natl Acad Sci USA 83:4869-4873
- 5: Selker et al. 1987. Cell 51:741-752
- 6: Galagan et al. 2003. Nature 422:859-868
- 7: Ninomiya et al. 2004. Proc Natl Acad Sci USA 101:12248-12253
- 8: Colot et al. 2006. Proc Natl Acad Sci U S A. 103:10352-10357

Transition of Neurospora's research method by genome analysis.

Akihiko Ichiishi

(Faculty of Life Sciences, Toyo University)

ご略歴

- 1987年 埼玉大学理学部生体制御学科 卒業
- 1995年 埼玉大学大学院理工学研究科生物環境科学専攻 修了
- 1997年 東洋大学生命科学部 講師
- 2001年 東洋大学生命科学部 助教授
- 2010年 東洋大学生命科学部 教授

糸状菌分子生物学コンファレンス第 15 回記念特別シンポジウム 「糸状菌のゲノム解析・その後」 SS-2

ポスト・ポストゲノム時代の糸状菌分子生物学を支える *Aspergillus fumigatus* の遺伝子・ゲノム研究

萩原 大祐

(千葉大学・真菌医学研究センター)

2003~2005 年に複数の糸状菌ゲノムが公開され、逆遺伝学的な手法に依って糸状菌分子生物学研究を遂行できるようになった。それまでの古典遺伝学の主役であった *Neurospora crassa* や *Aspergillus nidulans* に加えて、ゲノム解読の完了した菌も分子生物学研究の新たな対象となった。糸状菌ゲノム解読後の 10 年は、いわゆるポストゲノム時代として、ゲノム、トランスクリプトーム、プロテオームなどのオミクス研究が多様な糸状菌を対象に進められることとなり、その中でもヒト病原真菌である *Aspergillus fumigatus* は現在の糸状菌分子生物学研究において欠かせない中心的な役割を果たすようになった。

全世界で毎年 60 万人もの人が真菌症により命を落としており、*A. fumigatus* はヒト病原真菌のモデル菌として重要な研究対象となっている。特に、病原性（感染）メカニズムの理解や新規な抗真菌薬および予防・診断・治療法の開発が最重要課題である。使用可能な抗真菌薬が限られている上に薬剤耐性菌の蔓延が世界的に加速しており、病原真菌研究の重要性は今後一層高まると予想される。このような背景が *A. fumigatus* の分子生物学研究へ多数の研究者の参入を後押ししてきたと推測される。

病原性解明や抗菌剤開発の観点とは別に *A. fumigatus* を実験材料とする際に享受できる利点を二点挙げるができる。一つ目は、ゲノムデータベース AspGD (<http://www.aspgd.org>) において異なる 2 株 (Af293, A1163) のドラフトゲノム情報が整備されている点である。比較ゲノム解析から、これら 2 株はそれぞれに 143、218 個のユニークな遺伝子を持っており、同種でも菌株が異なると遺伝的な相違が多数存在する可能性を示している¹⁾。このことは、ポストゲノム時代の糸状菌分子生物学研究の多くが、一株のゲノム参照株に依拠したデータの積み上げとなっていることに対する警鐘となる。例えばストレス適応のように多元的で複雑な応答機構や、二次代謝のように菌株ごとに遺伝的多様性の高い生命現象の場合、遺伝子機能解析で同種異株では異なる結果が得られる可能性がある。従って、真に生命現象を理解する上で、普遍性と多様性を考慮したアプローチが今後は重要になると考えられる。その点、*A. fumigatus* 研究では上記 2 株のゲノム株を対象とした解析がすでに同レベルで展開しており、strain-specific な興味深いデータも得られている。

二つ目の利点は、多数の臨床分離株が継続的に入手可能な点である。上記の利点に関連づけて説明すれば、より多様な表現型を示す株を大量に入手することにより、対象とする表現型のメカニズムを多角的にアプローチすることが可能となる。例えば、臨床から分離される *A. fumigatus* には孢子形成能が低下した株が散見される。この理由は定かではないが、

感染中に遺伝的変異を獲得して変質したのではないかと推測される。必要であれば、これからの時代は高速シーケンサーによるゲノム解析で、そのような原因変異も特定できよう。いずれにしても、ゲノム参照株では見られなかった多様な表現型、特に臨床と結びつきの強い薬剤耐性や病原性などに関しては、その解析のための重要な手掛かりを臨床分離株が提供する可能性は高いと考える。

我々の機関では病原真菌の臨床検体を取り扱っており、原因菌の同定や薬剤耐性試験、耐性メカニズム解析の業務を行っている。これらの臨床分離株は National BioResource Project (NBRP) により収集、保存、提供しており、臨床分離株を研究に活用することも可能で、近年は高速シーケンサーを活用したゲノム解析なども精力的に進めている^{2,3)}。従って、*A. fumigatus* を対象とした糸状菌分子生物学研究を、前述のような視点に立って臨床株を活用しながら展開して行きたいと考えている。ごく近年、筆者らは孢子特異的な二次代謝産物の解析に着手し興味深いデータが得られており、本講演ではその一端を紹介したい。

遺伝子からゲノム研究へと伸展したポストゲノム時代を経て、生命を理解するには要素還元的な理解の集約では限界があることが解った。これからの時代にはまた新たなアプローチが必要になるであろう。種間、属間の比較ゲノムよりも解像度を上げた、株間のマルチゲノム情報を土台にした分子生物学研究も、新しい知見を提供してくれるものと期待している。従って、遺伝子-ゲノム-マルチゲノムの研究体制が先行する *A. fumigatus* は、糸状菌の分子生物学研究のモデルとして今後も大きく貢献すると考えられる。

引用文献

- 1: Fedorova ND, et al. *PLoS Genet.* 2008; 4:e1000046
- 2: Hagiwara D, et al. *J Clin Microbiol.* 2014; 52:4202-9
- 3: Takahashi-Nakaguchi A, et al. *Med Mycol.* 2015; 53:353-60

An essential role of *Aspergillus fumigatus* in fungal genetic biology in the next era

Daisuke Hagiwara (MMRC, Chiba Univ.)

ご略歴

- 2000年 早稲田大学 理工学部 応用化学科 卒業
- 2006年 名古屋大学大学院 生命農学研究科 修了
- 同年 名古屋大学 農学部 COE 研究員
- 2007年 東北大学 未来科学技術共同研究センター 日本学術振興会 特別研究員
- 2010年 中央大学 理工学部 機構助教
- 2011年 千葉大学 真菌医学研究センター 特任助教

糸状菌分子生物学コンファレンス第 15 回記念特別シンポジウム
「糸状菌のゲノム解析・その後」
SS-3

Aspergillus 属における多糖分解酵素生産制御メカニズムの解明を
目指したポストゲノム研究

小林 哲夫

(名古屋大学大学院生命農学研究科)

植物細胞壁を構成するセルロース・ヘミセルロースや貯蔵多糖のデンプンは自然界の主要多糖である。糸状菌はこれら多糖の分解酵素の生産能を有しているがその生産は条件特異的であり、分解酵素の基質となる多糖の存在下で生産が誘導される一方、グルコースのような容易に資化される炭素源の存在下ではカーボンカタボライト抑制を受ける。多糖分解酵素の生産制御機構については *Aspergillus* 属において早くから研究され、1998 年にはキシラナーゼ・セルラーゼ遺伝子群の転写活性化因子 XlnR が、ついで 1999 年にはアミラーゼ遺伝子群の転写活性化因子 AmyR が相次いで同定された。また、カーボンカタボライト抑制に関わる転写抑制因子 CreA の同定については 1989 年までさかのぼる。その後、ゲノム情報を利用してセルラーゼの生産制御の中核となる転写因子である ManR/ClrB と McmA が同定された。本シンポジウムでは多糖分解に関わるこれら転写因子の標的遺伝子、DNA 結合配列、制御メカニズムについて現在までの知見を述べる。

1. XlnR と AraR の競合によるキシラン分解・代謝遺伝子群の転写制御機構

XlnR はキシラナーゼだけでなくセルラーゼ生産誘導にも関わる。DNA マイクロアレイによれば *A. oryzae* では少なくとも 75 遺伝子が XlnR の制御下にあり、その中にはキシラン分解酵素遺伝子に加えてセルロース分解酵素遺伝子も含まれている¹⁾。また、ペントース代謝系遺伝子やトランスポーター遺伝子も XlnR の制御下にある。*A. oryzae* XlnR は誘導物質の D-キシロースに応答して速やかにリン酸化され、その後キシラナーゼ遺伝子の転写が起こる。また、キシロースを除去すると脱リン酸化されるため、リン酸化が XlnR 活性の制御に関与していることが示唆される²⁾。

A. oryzae は XlnR の相同因子として AraR を有している。DNA マイクロアレイによれば、AraR は L-アラビノースを誘導物質としてキシラン側鎖のアラビノースやガラクトースの遊離に関わる酵素遺伝子を制御すると考えられ、また XlnR と重複してペントース代謝系酵素遺伝子も制御する。ペントース代謝系酵素の制御においては XlnR も AraR も転写活性化に働くが、寄与の程度は遺伝子によってまちまちであり、キシリトールデヒドロゲナーゼ (*xdhA*) や L-アラビノースデヒドロゲナーゼ (*ladA*) 遺伝子では一方の転写因子遺伝子破壊により転写レベルが上昇する。これは XlnR と AraR の DNA 結合コンセンサスが極めて類似しているためであり、少なくとも *in vitro* では両者の共存下で DNA 結合を巡って競合が起こる。XlnR 遺伝子の発現は構成的であり、常に DNA に結合していることが示唆されている。一方、AraR 遺伝子の発現は誘導的であるため、L-アラビノース誘導条件では DNA

に結合した XlnR が AraR の濃度上昇に伴って排除されると考えられる。

XlnR の結合コンセンサスが既報のものとは異なることも明らかとなった。今まで GGCTAA やその類似配列と考えられていたが、ペントース代謝系では XlnR は CGGNTAA(T/A) の 8 塩基を認識して強く結合する。また、XynF1 や G2 などのキシラナーゼのプロモーターでは、従来の GGCTAA に加えて上流配列も重要であり、*xynF1* の例を示すと結合配列は aTTAGgCTAA_t と逆位反復配列を形成している。8 塩基の認識配列には 1 分子の、逆位反復配列には 2 分子の XlnR が結合するようであり、これら 2 種の結合配列の生理学的意味の解明が必要である。

2. ManR/ClrB と McmA の協調によるセルラーゼ遺伝子群の転写制御機構

上述したように XlnR はセルラーゼの生産制御にも関わる。しかし、産業用糸状菌 *A. oryzae* やモデル糸状菌 *A. nidulans* ではセルラーゼ誘導への XlnR の関与の程度は小さく、ほかに重要な転写因子が存在することは明白であった。ゲノム解析が終了してしばらくたった 2012 年、網羅的遺伝子破壊株ライブラリーを用いた探索によりついに決定的な転写因子 ManR/ClrB が同定された。ManR は *A. oryzae* においてマンナナーゼ遺伝子群の発現に必須な転写活性化因子として見出されたためこの名を持つ³⁾。ClrB は *Neurospora crassa* の破壊株ライブラリーの探索で見出されたセルラーゼレギュレーター CLR-2 の *A. nidulans* におけるオルソログとして報告された⁴⁾。ManR と ClrB は 63% の配列同一性を有し、いずれもセルラーゼとヘミセルラーゼの生産制御に関わる。しかし、ManR がセルラーゼ・マンナナーゼの生産に必須であるのに対して、ClrB のマンナナーゼ生産への関与は限定的である。その理由は、*A. nidulans* には *A. oryzae* には存在しない ManR/ClrB の相同因子 ManS が存在するためであり、これが主としてマンナナーゼ生産に関わる。セルラーゼ遺伝子群と一部のヘミセルラーゼ遺伝子群の発現制御には SRF-MADS タンパク質である McmA も関与している⁵⁾。McmA の関与は破壊株ライブラリーの利用ではなく、*A. nidulans* エンドグルカナーゼ A (*eglA*) のプロモーターに存在する誘導配列が SRF-MADS タンパク質の結合コンセンサスを含むという知見が契機となって見出された。RNA sequencing によれば ClrB 標的遺伝子と McmA 標的遺伝子のオーバーラップは 11 遺伝子に過ぎないが、高発現するセルラーゼ遺伝子は全てその中に含まれている。

McmA の役割は ClrB のプロモーターへの結合を補助することにある。エンドグルカナーゼをコードする *eglA* や *eglB* のプロモーターへの ClrB の結合には McmA の存在が必要である。一方、 β -mannosidase をコードする *mndB* の誘導は McmA に依存せず、そのプロモーターには ClrB が単独で結合する。ClrB 単独の DNA 結合配列と McmA 依存的な DNA 結合配列は異なっており、単にセロビオースなどの誘導物質の存在だけでなく、McmA が活性化することもセルラーゼ遺伝子発現のための必要条件と考えられる。つまり、McmA は ClrB 標的遺伝子群をクラス分けする因子となるが、McmA の活性化条件については未だ不明である。

ゲノム情報の恩恵を受けて多糖分解酵素遺伝子群の発現制御に関わる主要転写因子はほぼ明らかとなり、因子間の相互作用も明らかになりつつある。しかし、活性制御について

の知見は甚だ乏しい。XlnR や AmyR は誘導物質依存的にリン酸化されるためこれが鍵となると考えられるが、関与するプロテインキナーゼは未同定である。セルラーゼ誘導にはトランスポーターとレセプター機能を兼ね備えたトランセプターが関与することが示されているが、これと転写因子を繋ぐシグナル伝達経路は全く不明である。ゲノム情報を利用して環境情報から転写因子に至る経路を解明していくことにより、多糖分解酵素遺伝子群の情報伝達・転写制御ネットワークの全体像に迫ることが今後の課題となろう。

なお、本報告内容の一部は「農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業」の支援を受けて行った研究の成果である。

引用文献

- 1: Noguchi Y et al. 2009. Appl Microbiol Biotechnol 85:141-154.
- 2: Noguchi Y et al. 2011. Biosci Biotechnol Biochem 75:953-959.
- 3: Ogawa M et al. 2012. Fungal Genet Biol 49:987-995.
- 4: Coradetti ST et al. 2012. Proc Natl Acad Sci USA 109:7397-7402.
- 5: Yamakawa Y et al. 2013. Biochem Biophys Res Commun 431:777-782.

Post-genomic approaches to understanding molecular mechanisms underlying regulation of polysaccharide-degrading enzyme production in *Aspergillus*

Tetsuo Kobayashi

(Dept of Biological Mechanisms and Functions, Grad Sch of Bioagricultural Sciences, Nagoya Univ.)

ご略歴

- 1979年 東京大学農学部農芸化学科 卒業
- 1984年 東京大学大学院農学系研究科博士課程 修了（農学博士）
- 1984年 理化学研究所 研究員補
- 1985年 理化学研究所 研究員
- 1993年 理化学研究所 前任研究員
- 1995年 名古屋大学農学部 助教授
- 1999年 改組により 名古屋大学大学院生命農学研究科 助教授
- 2003年 名古屋大学大学院生命農学研究科 教授 現在に至る

ご兼任等

- 1986年-1988年 ニュージャージー州立大学ワックスマン微生物研究所博士研究員
- 1990年-1994年 海洋科学技術センター深海環境プログラム研究員（兼任）

糸状菌分子生物学コンファレンス第 15 回記念特別シンポジウム 「糸状菌のゲノム解析・その後」

SS-4

植物病原糸状菌のゲノム解析と植物保護研究への展開

寺岡 徹

(東京農工大学大学院)

植物病理学分野ではブロモモザイクウイルス (BMV)、タバコモザイクウイルス (TMV) の遺伝子操作系が 1980 年代中頃に確立されたことを皮切りに、病原菌特有の遺伝子構造と機能解析の研究が始まったと言える。その後、1997 年に大腸菌 (*Escherichia coli* K-12 株) の全塩基配列が公表され、相次いで出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) のデータが公表されたことを契機に、植物病原細菌、糸状菌のゲノム解析も 1988 年夏に相次いで開催された第 2 回国際いもち病会議(仏・モンペリエ)、第 7 回国際植物病理学会(英、エジンバラ)で国際共同研究がいくつか企画提起されて、大きく推進してきた。加えて、モデル植物のシロイヌナズナやイネを含む主要な農作物のゲノム解析も進み、感染の場における植物-病原菌相互作用を遺伝子レベルで解析することが可能となってきた。ただし、ゲノム解析の完了した植物病原糸状菌の数はまだ数少なく、イネいもち病菌を含めて 7 種しかない。現時点で draft レベルのものが 13 種、進行中のものが 14 種ある。人工培養の困難な絶対寄生性の菌など、EST レベルで滞っているものも数多い。

一方、病原性関連遺伝子の同定ならびに機能解析は、例えばイネいもち病菌の場合、ほとんどすべての遺伝子操作手法が適用可能で、遺伝子破壊法、RNAi 法が有効な手法として汎用され、植物病原糸状菌に特有な様々な病原性関連遺伝子が報告されてきている。その例として、感染特異的な付着器形成関連遺伝子とそのエネルギー生成に必須なオートファジー関連遺伝子、侵入時の品種抵抗性を決める非病原性遺伝子、侵入菌糸の *biotrophic* な共存状況を制御する遺伝子など、ユニークなものも数多く見出されてきている。同時に、そのような病原性関連遺伝子群が CD(conditionally dispensable)染色体と呼ばれる小型染色体に集中して座乗していることも、*Alternaria* 菌や *Fusarium* 菌で報告されてきている。また、次世代シーケンサーの登場により、ゲノム情報を元にして、直接感染の場における病原菌と宿主植物の相互の遺伝子発現を垣間見ることも可能となってきた、ただし、今後それら遺伝子群のより詳細な宿主植物-病原菌相互作用における機能を解析する上、遺伝子増幅に有効なプロモーター類、部位発現特異性ないしは時期発現特異性を制御するような配列情報の整備が望まれる。

このような成果は植物保護研究分野に有効活用されることが期待される。特に、病原菌に特異的な遺伝子を見出すことができれば、検出・診断システムとして、病害発生の危険度を知る圃場診断や明瞭な病徴発現のない潜伏期の診断に広く応用できる。また、その特異的遺伝子が病害発生のキー・タンパク質として機能していることが明らかとなれば、それを標的として理論的により安全性の高いゲノム創薬のスクリーニングも夢ではない。加えて、宿主範囲を決定づけるような病原菌因子、品種抵抗性を決める非病原性遺伝子類が明らかとなってくれば、その菌に感染しない非宿主植物の創成や新たな抵抗性品種の創成

に、大きなメルク・マークになることが期待される。そのような展望の一端を紹介したい。

Genome analyses of phytopathogenic fungi and the application to plant protection

Tohru TERAOKA (Tokyo Univ. of Agric. & Techno.)

ご略歴

1975年 東京農工大学 農学部 植物防疫学科卒業

1977年 東京農工大学大学院 農学研究科 修了

1977年 三菱化成工業 総合研究所 生化研究所

1983年 東京農工大学 農学部 助手

1993年 同大学 農学部 助教授

1999年 同大学 農学部 教授

糸状菌分子生物学コンファレンス第 15 回記念特別シンポジウム 「糸状菌のゲノム解析・その後」 SS-5

ゲノム情報時代だからこそ、考えられること、考えるべきこと - 木材腐朽担子菌を利用した研究を通して理解できたこと -

鮫島 正浩

(東京大学大学院農学生命科学研究科 生物材料科学専攻)

1. はじめに

マインドとして、私は明らかにプレゲノムの人間なのですが、その一方で、ゲノム情報時代、つまりポストゲノムの恩恵を最も受けてきている人間の一人でもあるかとも思っています。

私の専門は林産学ですが、この分野は、木材をはじめとする林産物の利用を考えていく学問分野です。そのようなことから、木材の生産者である樹木を構成する成分に関する研究を行って来ましたが、1980 年前後からは、木材を建材用途以外で用いる場合、バイオマスという用語の中で扱われるようになってきましたので、少し分野が広がりました。一方、私の研究室では、おそらく 100 年くらい前から、木材防腐という立場から木材腐朽担子菌に関する研究を行ってきております。その後、40 年程前から、木材腐朽担子菌を利用した食用きのこの生産が産業として成長し、さらに木材腐朽担子菌はバイオマスを有用物質に変換するためのツールになるのではないかという期待に基づき研究が展開されてきました。また、木材腐朽担子菌には、木材を構成するセルロースやヘミセルロースのみならず、リグニンも完全分解できるという他の微生物にはない特徴を有する菌が存在することが知られていたことが特に注目されました。

このような背景に基づき、糸状菌の中で、もっとも早くゲノム情報が公開されたのが、木材腐朽担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* なのです。

2. プレゲノム時代の研究

木材腐朽担子菌 *P. chrysosporium* については、リグニンを分解できるモデル菌として 1970 年代から研究が開始され、1990 年頃には、世界的に広く研究されるモデル菌として位置付けられるに至ったかと思えます。そのような中で、後発であるのですが、私たちも *P. chrysosporium* を用いた研究を進めることになりました。そこで、取り上げたのが、セロピオース脱水素酵素でした。この酵素と私が出会ったのは、1990 年に米国のジョージア大学に留学していた時で、木材を構成する成分の分解において、この酵素がどのような位置付けにあるのかを明確にすることが研究の目的でした^{1),2)}。その後、2004 年に *P. chrysosporium* のゲノム解析が公表されるまでの期間、この酵素の機能を明らかにすること、また併行して、この酵素の用途を考えていくことを中心に研究を進めてきました。一つの酵素に拘り、これを極めることが研究の真髄と考えることが、プレゲノム時代での研究の特徴であったかと思えます。言い換えると、点を明らかにして、点と点を線で結ぶような学問の進め方

ではなかったかと言えます。一方、それを極めるためには、技術的には組換え発現系を利用してモノコンポーネント酵素を多量に生産することや酵素の三次元構造を解析すること等が課題となり、実際、私たちも、酵母菌 *Pichia pastoris* の発現系を用いてセロビオース脱水素酵素を組換え酵素として生産し³⁾、さらにその三次元構造に基づいて変異酵素を作出し、その触媒機能について解析を行いました^{4),5)}。

3. ポストゲノム時代の研究

酵素遺伝子をクローニングして、これを発現生産できる技術、そして、酵素の構造と機能を解析するために必要な技術を、プレゲノム時代に一通り身につけることができていたことは私たちにとっては大変に幸いでした。そのような中で、担子菌 *P. chrysosporium* のゲノムが 2004 年に JGI から開示されたからです⁶⁾。

私たちは、ゲノム情報のユーザーという立場で、ゲノム情報に基づき酵素遺伝子を探索し、これをクローニングし、さらにモノコンポーネント酵素として発現生産し、酵素の機能と構造解析することを繰り返しました。そして、酵素の利用に生かすことが、今日に至るまでの私たちの研究の基本的な姿勢です。実は、そのことはプレゲノム時代とは変わっていないのですが、プレゲノム時代には、セロビオース脱水素酵素しか取り扱えなかったのに対して、私たちが取り扱っている酵素は、現在、数十種類にも及んでいるかと言えます。そのような意味では、ゲノム解析は、酵素を研究する立場としての私たちのポテンシャルを数十倍も高めたということになります。

このことは、バイオマス変換に対して酵素を利用する能力のポテンシャルも著しく高めました。その結果として、私たちの研究室では、モノコンポーネント酵素の再構成によって、効率的な酵素糖化に必要な酵素剤を作ることに成功しています⁷⁾。また、その成果を、バイオマスの構成成分の解析にも利用していますが、驚くべきことに、草本性植物と木本性植物では結晶性セルロースとキシランとの相互関係が大きく異なることも示唆されています⁸⁾。

また、JGI では、現在、最終的に 1,000 種類の糸状菌のゲノム情報を解析するプロジェクトが推進されています⁹⁾。その中で、31 種類の木材腐朽担子菌についての比較ゲノム解析を行った結果、木材腐朽担子菌のリグニン分解能力の獲得と欠落の進化において、これまでは想定をしていなかったような新事実も明らかにされて来ています¹⁰⁾。

4. おわりに

これまで述べてきたように、木材腐朽担子菌のゲノム解析は、その後の研究の展開に大きな影響を与えており、プレゲノムでは考えられなかったことを可能にできています。一方、ゲノム情報があるからこそ、考えるべきこともあるのではないかと考えています。その一つはゲノム情報を基礎研究だけで自己完結させるのではなく、しっかりと応用研究に繋げるべきということです。ただ、そのためには、ゲノム解析技術だけを学んでいるだけでは研究の展開はありません。ゲノム情報を生かす目的と、その目的を達成するためにスキルを身につけることがより求められていると言えます。また、ゲノム解析によって、学問は、点と点を結ぶ思考から、物事を面で捉えて、これを多層化して解析する思考に変

わってきたかと思います。このこと自体は良いとしても、一方で、点について思考する時間、点に対する掘り下げが疎かになっていないでしょうか。ゲノム時代だからこそ、個々の点に的確に対応するマインドとそれを実行する能力を養うことが要求されているように思われてなりません。

引用文献

- 1: Samejima, M., Eriksson, K.-E. L.: *FEBS Lett.*, **292**, 151-153 (1991)
- 2: Samejima, M., Eriksson, K.-E. L.: *Eur. J. Biochem.*, **207**, 103-107 (1992)
- 3: Yoshida, M. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**, 2050-2057 (2001)
- 4: Igarashi, K. *et al.*: *Biochem. J.*, **365**, 521-526 (2002)
- 5: Igarashi, K. *et al.*: *FEBS J.*, **272**, 2869-2877 (2005)
- 6: Martinez, D. *et al.*: *Nature Biotech.*, **22**, 695-700 (2004)
- 7: <http://www.nedo.go.jp/content/100551833.pdf>
- 8: 鮫島正浩ほか: 第65回日本木材学会研究発表集, p. 65, 東京 (2015)
- 9: <http://genome.jgi.doe.gov/programs/fungi/1000fungalgenomes.jsf>
- 10: Floudas D. *et al.*: *Science*, **336**, 1715-1719 (2012)

What can we think and what shall we think in the age of genomic information

– My understanding from the research on wood-decaying fungi –

Masahiro Samejima

(Department of Biomaterial Sciences, Univ. of Tokyo)

ご略歴

- 1977年 東京大学農学部 林産学科卒業
- 1982年 東京大学大学院農学研究科 博士課程修了
- 1982年 日本学術振興会 奨励研究員
- 1983年 東京大学農学部 助手
- 1994年 改組により 東京大学大学院農学生命科学研究科 助手
- 1995年 東京大学大学院農学生命科学研究科 助教授
- 2001年 東京大学大学院農学生命科学研究科 教授

ご兼任等

- 1983年 カナダ紙パルプ研究所生物化学部門 客員研究員
- 1990年-1992年 米国ジョージア大学生化学科 客員研究員

Oral Session

O-1 (P-49)

メロテルペノイド terretinin 生合成に関与する新規異性化酵素 Trt14 の構造機能解析

岩瀬大輝, 松田侑大, 森貴裕, 阿部郁朗 (東大院・薬)

メロテルペノイドはポリケタイドとテルペノイドからなる特異なハイブリッド型化合物である。前回、糸状菌 *Aspergillus terreus* の生産するメロテルペノイド terretinin について、その生合成機構の全容解明に成功したことを報告した。また、terretinin 生合成に関与する酵素 Trt14 については相同性検索の結果、機能既知タンパク質とほとんど配列相同性を示さなかったため、L- [methyl-¹³C] methionine を用いた同位体標識実験を行った。その結果、メチルエステル基の形成は Trt14 依存的な分子内メトキシ基転位反応によって生じることが示唆された¹⁾。そこで、新規の異性化反応を担う酵素として Trt14 の構造機能解析に着手した。

Trt14 全長を His₆ タグ融合組み換えタンパク質として大腸菌にて発現し、ニッケルアフィニティークロマトグラフィーおよびゲル濾過クロマトグラフィーにより精製、蒸気拡散法により結晶化を行ったところ、再現性良く単結晶を取得することに成功したため、現在は X 線による結晶構造解析を行っている。また、Trt14 のホモログ間で高度に保存されている複数の酸性および塩基性アミノ酸残基について変異を導入し、Trt14 の基質認識や反応機構のより詳細な解析を進めている。

また、異種糸状菌 *A. oryzae* NSAR1 株を宿主とし、terretinin 生合成遺伝子を andrastin A や austinol といった別種のメロテルペノイド生合成遺伝子と共発現させることによって Trt14 の推定基質類縁体となる非天然型新規化合物の取得に成功した。精製した Trt14 を用いてこの類縁体を酵素変換したところ複数の変換産物が得られたため、これらについても詳細を併せて報告したい。

1) Matsuda, Y., Iwabuchi, T., Wakimoto, T., Awakawa, T., Abe, I. *J. Am. Chem. Soc.*, **137**, 3393-3401 (2015)

Structural and functional studies on Trt14, a unique isomerase involving in the biosynthesis of terretinin

Taiki Iwabuchi, Yudai Matsuda, Takahiro Mori, Ikuro Abe

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

O-2 (P-53)

マツタケ (*Tricholoma matsutake*) 培養菌糸由来糖質分解酵素遺伝子群の発現解析

大沼広宣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い。当研究室において、マツタケは α -アミラーゼや極めて強い β -グルコシダーゼ活性を示すことを明らかにしてきたが、グルコアミラーゼやエンド型セルラーゼ等の活性については殆ど検出されていない。そのため、他の腐生性のきのこと同様の栽培法では人工栽培が困難であるとされている。マツタケの人工栽培化においては、マツタケがどのような糖質分解系を発現しているかを解析し、生育に有効な糖質を探索することは重要である。そこで本研究では、糖質分解酵素遺伝子誘導性を明らかにすることを目的とし、リアルタイム PCR による発現解析を行った。

T. matsutake NBRC30605 株を各種糖質 1%, Yeast Extract 0.5% の液体培地に接種後 30 日間静置培養した各培養菌糸体より mRNA を抽出し、逆転写により合成した cDNA を鋳型として、リアルタイム PCR により発現量を定量した。アラビノガラクトサン、グルコマンナンなどのヘミセルロースを唯一の炭素源とした培地で生育させたところ、グルコアミラーゼ遺伝子の発現量がグルコース培養と比較して増加した。このことから、ヘミセルロースの添加によりデンプンの加水分解活性が高くなることが示唆された。現在、他の糖質による誘導性についても検討を進めている。

Expression analysis of polysaccharide hydrolyzing enzyme genes from *Tricholoma matsutake*.

Hiroki Onuma¹, Yasuhisa Fukuta¹, Mizuho Kusuda², Takao Terashita¹, Norifumi Shirasaka¹

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

O-3 (P-80)

昆虫病原性糸状菌 *Lecanicillium* sp. が生産するポリケタイド合成酵素 (PKS) と非リボソームペプチド合成酵素 (NRPS) 由来新規ハイブリッド化合物の同定

中村美有希, Minh Viet Nguyen, 石堂圭一, 木下浩, 仁平卓也 (阪大・生物工学国際交流セ)

糸状菌において PKS と NRPS は生理活性物質の主骨格を合成する主要な酵素である。当研究室で *Lecanicillium* sp. MAFF635047 のゲノム解析を行った際、PKS 遺伝子と NRPS 遺伝子が隣接して存在し、さらに、その周辺の遺伝子配座が他菌株でも保存されていたことから、この PKS, NRPS 遺伝子を含む領域は一つの化合物の合成に関与していると予想した。糸状菌において PKS と NRPS によって合成されるハイブリッド化合物の報告例は少ないため、本研究ではこれらの産物の単離・同定を目指した。

Lecanicillium sp. MAFF635047 の親株と PKS 遺伝子破壊株, NRPS 遺伝子破壊株を同条件で培養し、その培養抽出液について HPLC で解析を行った。その結果、親株のプロファイルでは検出されるが破壊株のプロファイルでは検出されない化合物を発見した。この化合物を精製後、MS 解析, NMR 解析によって構造決定した。その結果、fusaristatin の新規類縁体であることが明らかとなった。

Identification of a novel hybrid compound synthesized by PKS and NRPS from *Lecanicillium* sp. MAFF635047

Miyuki Nakamura, Minh Viet Nguyen, Keiichi Ishido, Hiroshi Kinoshita, Takuya Nihira (ICBiotech, Osaka Univ.)

O-4 (P-83)

麹菌 *astellolide* 生合成遺伝子クラスターの同定

篠原靖智¹, 川谷誠², 二村友史², 長田裕之², 小山泰二¹ (¹野田産研、²理研・CSRS)

ゲノム解析の結果、麹菌は多くの二次代謝関連遺伝子を有していることが明らかとなったが、生産物が明らかになっている二次代謝産物遺伝子クラスターは非常に少ない。近年、クロマチンリモデリングが二次代謝関連遺伝子の発現に関与していることが明らかとなってきた。そこで、我々は、麹菌の転写制御関連遺伝子破壊株ライブラリーを用い、麹菌が生産する二次代謝産物および、その生合成遺伝子の同定を試みた。

ライブラリー株を二次代謝産物のプロファイルの変化でスクリーニングした結果、ヒストン 3 リジン 4 のメチル化に寄与する遺伝子 *cclA* の麹菌ホモログを破壊した株 ($\Delta cclA$) において、いくつかの代謝物の産生が増加することを見出した。また、産生量の変化が顕著であった 2 つの代謝物を単離し構造解析を行い、14-deacetyl *astellolide* A (14-DAA) および B (14-DAB) であることを明らかとした。各化合物の生物活性を調べたところ、14-DAB にがん細胞生育阻害活性が見出された。いずれの化合物も過去に麹菌から単離の報告はあるものの生合成遺伝子に関する知見は全くないことから、*astellolide* 生合成遺伝子クラスターの同定を試みた。マイクロアレイ解析を用い、 $\Delta cclA$ 株で発現量が増加している二次代謝関連遺伝子の探索を行ったところ、NRPS をコードすると予測されている遺伝子 *astA* の発現が $\Delta cclA$ 株で顕著に増加していた。そこで、この遺伝子を $\Delta cclA$ バックグラウンドで破壊し、得られた破壊株 ($\Delta cclA \Delta astA$) の代謝物の LC-MS 解析を行った。その結果、 $\Delta cclA \Delta astA$ 株では、14-DAA および 14-DAB に相当するピークが消失していたことから、*astA* が *astellolide* の生合成に関与していることが明らかとなった。

Identification of *astellolide* biosynthetic gene cluster in *Aspergillus oryzae*.

Yasutomo Shinohara¹, Makoto Kawatani², Yushi Futamura², Hiroyuki Osada², Yasuji Koyama¹

(¹Noda Ins. Sci. Res., ²RIKEN CSRS)

O-5 (P-73)

麹菌における炭素源依存的な選択的転写開始機構を有する解糖系遺伝子の同定

井上 大志, 田路 洋紀, 高間 充, 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 *Aspergillus oryzae* のゲノムデータと EST データの比較から、解糖系遺伝子であるエノラーゼ遺伝子 *enoA* とグリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素遺伝子 *gpdA* において 2 つの転写開始点が見出された。その後の解析により、これら 2 つの遺伝子は解糖系または糖新生で代謝される炭素源に応じて異なる転写開始が行われ、特に *enoA* においては炭素源の種類に応じて 2 つの転写開始点が厳密に使い分けられることが明らかとなった。さらに興味深いことに、上流から転写される際の 5' UTR では、下流からの転写開始点を含んだ配列がイントロンとしてスプライシングされる。構成的に発現すると考えられていた可逆反応を制御する 2 つの解糖系遺伝子においてこのような現象は初めての発見であり、その生理学的意義や分子機構の解明は学術上重要な課題であると考えられる。本研究では 5' RACE と qRT-PCR 解析により、*enoA* と *gpdA* 以外の解糖系遺伝子においても同様の現象がみられるかどうかを検討した。その結果、解糖系と糖新生の両経路において重要だと考えられる可逆反応を制御する 3 遺伝子と不可逆反応を制御する 1 遺伝子において、複数の転写開始点と 5' UTR 内のイントロンの存在が確認され、炭素源に応じて異なる転写開始が起こることが新たに明らかとなった。またその中でも特にアルドラーゼ遺伝子 *fbA* には、*enoA* と同様に炭素源に応じた厳密な転写開始点の使い分けが見られた。一方で糖新生の制御に重要とされる転写因子 *AcuK*、*AcuM* は *enoA* の上流からの転写に関与することを既に報告しているが (2015 農芸化学会)、興味深いことに *fbA* やその他の複数の転写開始点を有する遺伝子の ORF 上流にも、*AcuK*、*AcuM* の結合モチーフが存在した。現在はこれらの遺伝子と *AcuK*、*AcuM* の関連について解析を進めている。

Identification of glycolytic genes transcribed alternatively depending on carbon sources in *Aspergillus oryzae*

Taishi Inoue, Hiroki Toji, Mitsuru Takama, Mizuki Tanaka, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi

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

O-6 (P-71)

Binding features of ManR and ManS involved in cellulase and mannanase regulation in

Aspergillus nidulans

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

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

In *A. nidulans*, ManR regulates the expression of cellulolytic genes together with McmA by being recruited to CeRE (Cellulose Responsive Element). Regulation of mannanase production is under control of both ManR and its paralog ManS. Cellobiose induces some mannanase genes (*manB*, *manC*, *mndB*) in a ManR dependent manner, while galactomannan induces a different set of mannanase genes (*manC*, *manE*, *manF*), for which ManS is responsible. In this report, we identified the sequence in CeRE recognized by ManR and showed the relationship between ManR and ManS in binding to some manannase genes.

Mutation analysis by EMSA on CGG/CCG that is within and close to CeRE on the promoter of endoglucanase gene, *eglA* and *eglB*, showed that CCG triplet in CeRE serves as ClrB recognition sequence. ManS could bind to the same 3 sites (CGGN₈CCG) as ManR does on the promoter of *mndB*. However the 2nd binding site which showed the weakest binding affinity by ManR turned out to be bound most strongly by ManS among the three binding sites. In addition, promoter activity assay showed reporter gene with the 2nd binding site was induced in galactomannan, concerning that it is inactive in CMC. These findings indicates that ManR and ManS may possess opposite effect in regulating *mndB* under different inducers. In the case of binding to *manB*, *manE* and *manF*, both ManR and ManS can recognize CGGN₉CC/GG, while most interestingly is, when they were added together to the reaction, ManR-ManS heterodimer was formed. This result aroused our interest in investigating the roles of ManR and ManS in regulation of mannanase genes. Further study will focus on the clarification of inductive mechanism mediated by ManR and ManS, and the necessity of heterodimer formation.

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-7 (P-63)

ウシグソヒトヨタケの傘形成に関与する Cag1 と相互作用するタンパク質の探索

増田亮, 村口元 (秋田県立大・生物資源)

担子菌ウシグソヒトヨタケの子実体形成過程において、子実体原基の傘部分が成長せずに子実体原基の状態で止まってしまう突然変異体 *cap-growthless1* を見出した。この突然変異体の子実体原基では、石突上部で傘部分が膨らみはしているものの、子実層が分化していないように思われた。相補活性に基づき、原因遺伝子 *cag1* 遺伝子を特定したところ、*cag1* 遺伝子は出芽酵母の Tup1 と相同なタンパク質をコードしていることが分かった。ウシグソヒトヨタケのゲノムには、もう1つの Tup1 相同遺伝子があり、*Cc.tupA* と命名した。出芽酵母やショウジョウバエの Tup1 タンパク質は、直接 DNA には結合せずに、DNA 結合タンパク質に結合することで、転写抑制を行っていると予想されている。そこで Cag1 タンパク質と結合するタンパク質を探索するため、野生型の子実体を形成する #326 株の傘組織から、Total RNA を抽出して cDNA を合成した。Cag1 タンパク質をベイトにして、Yeast two hybrid 法を用いて、約 484000 の cDNA クローンをスクリーニングしたところ、3つのクローンで相互作用が確認できた。Cag1 Interacting Protein という意味で CIP2、CIP3、CIP13 と命名した3つのタンパク質は、それぞれ CC1G_15287、CC1G_11698、CC1G_12764 由来のタンパク質断片であった。PSORTII によって細胞内局在性を予測すると、いずれのタンパク質も核内に存在する可能性が高いことが分かった。現在、これらのタンパク質と Cag1 タンパク質の相互作用部位を特定しようとしているところである。

A screen to identify proteins interacting with Cag1 involved in cap growth of *Coprinopsis cinerea*.

Ryo Masuda, Hajime Muraguchi

(Dept. of Biotechnology, Akita Prefectural Univ.)

O-8 (P-86)

大規模数理モデリングによる菌根菌感染関連遺伝子の同定と感染予測法の確立

石井一夫¹, 古崎利紀¹, 中川知巳² (東京農工大・農学府農学部¹、基生研²)

菌根菌は、菌根を作って植物と共生する菌類で、土壌中の糸状菌が植物の根の表面または内部に着生したものを菌根と言う。我々は菌根菌感染の見られるフタバネゼニゴケを材料に菌根菌感染植物と非感染植物をトランスクリプトーム解析で比較することにより菌根菌共生のメカニズムを解析してきた(宮本ら, 第54回日本植物生理学会, 2012年)。今回これらのデータを基に、判別分析による判別関数を求め、菌根菌感染の予測数理モデルを作成することを試みた。次世代シーケンサーを用いた RNA-Seq データから感染予測指標遺伝子を、無作為抽出法(ブートストラップ)により自動抽出し、スパコンを用いた並列分散処理により感度、特異度、ウィルクスのラムダ統計量を自動計算し最適化を試みた。その結果、極めて感度及び特異度の高い判別関数が得られ、菌根菌感染の予測を判別分析で実施することが可能となったので報告する。

Mathematical Modeling for Mycorrhizal Infection using Biological Big Data and Combinatorial Optimization

Kazuo Ishii¹, Toshinori Kozaki¹, Tomomi Nakagawa²

(¹Tokyo Univ. Agricul. Technol., ²Natl. Inst. Basic Biol.)

O-9 (P-89)

イネいもち病菌の非病原性タンパク質 AVR-Pia の構造と機能の解析

藤原志帆¹, 樋口裕也¹, 佐藤佑樹¹, 尾瀬農之², 神谷昌克³, 浅野行蔵¹, 曾根輝雄¹ (¹北大院農,²北大院薬,³北大院先端生命)

イネいもち病はイネの最重要病害であり, その防除に抵抗性品種が使用されている. 抵抗性反応は, 病原菌の AVR 遺伝子産物を宿主の R 遺伝子産物が認識することによって起こるとされているが, その詳細は未だわかっていない. イネいもち病菌の AVR 遺伝子の 1 つである AVR-Pia はイネの R 遺伝子 *Pia* に対応しており, その遺伝子産物は, *Pia* 遺伝子産物の 1 つの RGA5-A の C 末端部分と相互作用することが知られている.

Yeast two hybrid 解析により AVR-Pia は多量体化すると推測された. さらに, 2 アミノ酸置換体 (AVR-Pia^{F38AV40A}) が AVR-Pia 同士の相互作用を弱くすることが判明した. また, AVR-Pia^{F38AV40A} は宿主の *Pia* 遺伝子産物の 1 つの RGA5-A の C 末端部分と野生型と同等の相互作用を示したが, 接種試験において AVR-Pia^{F38AV40A} を発現するいもち病菌は, *Pia* イネへの感染能を示した.

大腸菌にて封入体として発現させ, 変性, リフォールディング後, ゲル濾過により精製した AVR-Pia の NMR 法による構造解析を行った. AVR-Pia は, 6 つの逆並行 β ストランドからなる β サンドイッチ構造をとっており, 既に構造解析がなされているイネいもち病菌の AVR タンパク質 AVR-Pizt や *Pyrenophora tritici-repentis* の宿主特異的毒素 ToxB と構造類似性を示した.

Structure and Function of AVR-Pia Protein of Magnaporthe oryzae

Shiho Fujiwara¹, Yuya Highchi¹, Yuki Satoh¹, Toyoyuki Ose², Masakatsu Kamiya³, Kozo Asano¹, Teruo Sone¹

(¹Grad. Sch. Agriculture, ²Fac. Pharmaceutical Sci., ³Fac. Adv. Life Sci., Hokkaido Univ.)

O-10 (P-101)

トウモロコシごま葉枯病菌の CLA4 と菌糸伸長の関連性

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原菌の一つである. これまでに本菌の 2 種類の PAK 様キナーゼ STE20 ならびに CLA4 を同定し, *Acla4* が感染行動や有性・無性世代における様々な形態形成において異常を示すことを報告してきた. 今回我々は, *Acla4* の形態形成不全の原因の一つと推察される菌糸伸長の異常に注目し解析を進めた. *Acla4* では細胞の膨張が観察され, 分枝頻度の増加が認められた. カルコフルオルホワイトとヘキストの二重染色を行ったところ, *Acla4* の核および隔壁の局在は正常であり, 核分裂および細胞質分裂において顕著な影響はないことが分かった. また, タイムラプス撮影により, 野生株は側方分枝するのに対し, *Acla4* は高頻度で先端分裂することを確認した. FM4-64 染色を行ったところ, 野生株では常に先端に 1 個の Spitzenkörper が存在した一方で, *Acla4* では 0~2 個と流動的であった. よって CLA4 は細胞極性決定において重要であることが明らかとなった. さらに, 高頻度で変異セクターを形成する *Acla4* の不安定な形質を利用し, 20 株のセクターを分離したところそのうち 1 株で側方分枝頻度の回復が認められた. このセクター株は CLA4 の欠損を相補する突然変異を有していると推定し, 現在解析を進めている.

Relationship between the CLA4 homologue and hyphal growth 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.)

O-11 (P-24)

糸状菌の先端生長におけるアクチンケーブルと微小管の協調的重合制御

Anna Bergs¹, Yuji Ishitsuka², G. Ulrich Nienhaus², 竹下典男^{1,3} (1Dept of Microbiol, 2Inst of Applied Physics, Karlsruhe Institute of Technology (KIT), 3筑波大学生命環境系)

The highly polarized growth of filamentous fungi requires a continuous supply of proteins and lipids to the hyphal tip. This transport is managed by vesicle trafficking along the actin and microtubule cytoskeletons and their associated motor proteins. Although actin cables originating from the hyphal tip are essential for hyphal growth, and specific marker proteins to visualize the actin cables have been developed in filamentous fungi, the exact organization and dynamics of actin cables have remained elusive. Here we visualized actin through tropomyosin (TpmA) and Lifeact fused to fluorescent proteins in *Aspergillus nidulans* and studied actin dynamics and the interrelation of actin cables and microtubules. Comparison of TpmA and Lifeact as markers revealed that high concentrations of Lifeact affect the actin dynamics. Visualization of actin and microtubules at the same time revealed timely and spatially cooperated polymerization and depolymerisation between the two cytoskeletons. In addition, Ca²⁺ oscillation was visualized at hyphal tips using the Ca²⁺ sensor, cameleon. The frequency of this oscillation correlated with that of actin cable disassembly and microtubules reaching hyphal tips. Our results provide new insights into the molecular mechanism of ordered polarized growth regulated by actin cables and microtubules.

Cooperative polymerization between actin cables and microtubules in *Aspergillus nidulans*

Anna Bergs¹, Yuji Ishitsuka², G. Ulrich Nienhaus², and Norio Takeshita^{1,3}

(¹Dept of Microbiol, ²Inst of Applied Physics, Karlsruhe Institute of Technology (KIT), ³Faculty of Life and Environmental Sciences, Univ. Tsukuba)

O-12 (P-25)

担子菌ヒトヨタケにおいて、2つのクロマチン構造変換因子をコードする *Cc.snf5* と *Cc.arp9* の変異は、互いに異なる影響によってキノコ発生開始不全を引き起こす

中沢威人^{1,2}, 安藤友貴², 秦武史², 中堀清² (¹京大・院農, ²岡山大・院自然)

我々は以前、真正担子菌ウシグソヒトヨタケ (*Coprinopsis cinerea*) において、クロマチン構造変換複合体 SWI/SNF の構成因子をコードする *Cc.snf5* 遺伝子の変異が、キノコ発生開始不全およびクランプ細胞形成不全を引き起こすことを発表した (Ando *et al.*, 2013)。このことは、Cc.Snf5 が A 経路上で機能していることを示唆していた。これに関連して、本研究では、新たに分離したキノコ発生開始不全をきたす突然変異体 Xba43 の原因変異遺伝子が、SWI/SNF および別の複合体 RSC 両方の構成因子であり、アクチン様タンパク質をコードする *Cc.arp9* であることを明らかとした。本変異体では、無性胞子の生産抑制と発芽率・若干の温度感受性といった変異表現型が観察されたが、*Cc.snf5* 変異体のようなクランプ形態形成異常は観察されなかった。幾つかの追加調査の結果、Cc.Snf5 については A 経路上で機能していることが改めて裏付けられた一方、Cc.Arp9 に関しては A 経路上で機能していることを支持する結果は何一つ得られなかった。

一方、今年発表した本菌におけるマーカーリサイクル法 (Nakazawa and Honda, 2015) を利用して *Cc.arp9/Cc.snf5* の二重遺伝子破壊株を作成し、*Cc.snf5* 変異と *Cc.arp9* 変異では、相反する影響を生じた無性胞子の生産 (A 経路 OFF および *Cc.snf5* 変異で活性化され、*Cc.arp9* 変異では“A 遺伝子と独立した影響”で不活性化される) に関するエピスタシス解析を行った。これらの結果と、過去のヒトヨタケにおける遺伝学知見を踏まえて、*Cc.arp9* 変異がどのような影響でキノコ発生開始不全を生じているのかを議論する。本研究の一部は、岡山大学・鎌田堯教授 (当時) の指導のもとで行った。

Cc.Arp9, a putative nuclear actin-related protein, is involved in developmental regulation in *Coprinopsis cinerea*

Takehito Nakazawa^{1,2}, Yuki Ando², Takeshi Hata², Kiyoshi Nakahori²

(¹Grad. School of Agr. of Kyoto Univ., ²Grad. School of Nat. Sci. of Okayama Univ.)

O-13(P-28)

BiFC 法による麴菌 *A. oryzae* 実用株の細胞融合能および不和合性の解析

岡部知弥¹, 中村英淳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)

糸状菌は有性生殖時だけでなく、栄養生長時にも細胞融合を行うことが知られている。我々は最近、麴菌 *Aspergillus oryzae* において BiFC (bimolecular fluorescent complementation) 法により細胞融合を可視化する方法を確立し、野生株である RIB40 株が細胞融合能をもつことを示した¹⁾。また、他の糸状菌では、特定の株の組み合わせで融合体として存在できない不和合性という現象が知られている。*A. oryzae* には多数の実用株が存在するが、それらの細胞融合能および不和合性に関する知見はほとんどない。本研究では、BiFC 法を利用して *A. oryzae* の実用株の細胞融合能および不和合性を解析した。

A. oryzae の実用株のうち系統および用途を考慮して株を選び、BiFC 法により細胞融合能の解析を行った。まずは、同じ株どうしで混合培養を行ったところ、ほとんどの場合で BiFC の蛍光が観察され、多くの株が細胞融合能を有することがわかった。また、異なる株どうしで混合培養を行ったところ、ほとんどの場合で細胞融合が観察されず、不和合性である可能性が考えられた。不和合性についてさらに検討するため、混合培養の実験で細胞融合が観察されなかった株の組み合わせにおいて、プロトプラスト化して強制的に融合させ、融合体の有無を観察する実験を行った。その結果、BiFC の蛍光を発する菌糸が観察されず、不和合性であることがより強く示唆された。現在、*A. oryzae* の実用株の系統や用途と、細胞融合能および不和合性の関連を検討している。

1) 岡部ら 第 14 回糸状菌分子生物学コンファレンス要旨集 p.49 (2014)

Analysis of cell fusion and incompatibility by BiFC in *Aspergillus oryzae* industrial strains

Tomoya Okabe¹, Hidetoshi Nakamura¹, Kazuhiro Iwashita², Ikuo Fujii³, Jun-ichi Maruyama¹, Katsuhiko Kitamoto¹

(¹Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, ²NRIB, ³Osaka Pref. Univ.)

O-14 (P-30)

ウリ類炭疽病菌の染色体タギング法を用いた細胞周期および GTPase CoTem1 局在の解析

深田史美, 久保康之 (京都府大院・生環)

ウリ類炭疽病菌における Rab GAP 複合体 CoBub2/CoBfa1 が GTPase CoTem1 を介して G1/S 期の進行を制御し、宿主の病原性に関与することを報告してきた。今回、糸状菌において初となる LacO/LacI-GFP システムによる染色体タギング法を本菌に導入し、G1 期から S 期への移行時期を細胞学的に検討した。この系は、大腸菌由来の DNA 結合能をもつ LacI タンパク質に GFP を付加し、LacI の結合配列である LacO のタンデムリピート配列をゲノムに挿入することで染色体を可視化する手法である。蛍光顕微鏡観察の結果、野生株では培養 2 時間後に胞子発芽に伴って S 期へ移行する細胞の頻度が増加したのに対し、*cobub2* 破壊株では培養 1 時間までに半数の未発芽胞子において S 期が開始された。そこで S 期への移行と CoBub2/CoBfa1 が制御する CoTem1 の関与を検討するために、付着器形成過程における細胞周期と CoTem1 の局在の関連性を評価した。その結果、CoTem1 蛍光は G1 期に核膜上に 1 点検出され、S 期に倍加し、核分裂期には紡錘体の両末端に局在した。よって、CoTem1 は紡錘体極体に局在し、細胞周期に応じて局在様式を変化させると考えられた。以上より、ウリ類炭疽病菌は未発芽胞子段階において CoBub2/CoBfa1 による G1 期から S 期への移行停止制御を受け、胞子発芽と同調化して CoTem1 の局在変化を伴い S 期へ移行することが示唆された。

Analyses of cell cycle using chromosome tagging system and localization of GTPase CoTem1 in *Colletotrichum orbiculare*.

Fumi Fukada and Yasuyuki Kubo

(Life and Environmental Sciences, Kyoto Prefectural Univ.)

O-15 (P-46)

糸状菌 *Aspergillus nidulans* 由来の新規 poly (ADP-ribose) glycohydrolase の発見とその生理学的役割

宮地雄大¹, 平野滯¹, 山本竜也¹, 高谷直樹², 志水元亨¹, 加藤雅士¹ (¹名城大・農, ²筑波大・生命環境)

ポリ (ADP-リボース) (PAR) 化は真核生物に特異的な可逆的翻訳後修飾である。この反応には、PAR を合成する poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) と分解する poly (ADP-ribose) glycohydrolase (PARG) が関与することが知られている。PARP は、酵母を除く全ての真核生物に保存され、DNA 修復、転写調節、細胞死、中心体の分裂制御に関与していると考えられている。*Aspergillus nidulans* のゲノム中にも *parp* の ortholog が 1 つ存在するが、酵母及び *A. nidulans* を含む糸状菌のゲノムの中には、既知の *parg* の ortholog は見出されていない。本研究では、糸状菌の *parg* 遺伝子を特定し、その生理学的役割を明らかにすることを目的とする。

A. nidulans のゲノム中から *parg* 候補遺伝子を 7 種選抜し、リコンビナントタンパク質を異種発現させ、精製した。これらの PARG 活性を測定したところ、1 種のみ Mg^{2+} 依存的に PAR を分解した。PAR の分解産物を LC-MS/MS にて解析したところ、ADP-リボースが検出されたことから、このタンパク質を fungal PARG (fPARG) と命名した。

次に、 $\Delta fparg$ 株を作製し、3 種の DNA 損傷剤に対する影響を検討した。その結果、野性株に比べて、 $\Delta fparg$ 株は DNA 損傷剤に対して感受性を示した。さらに、PAR の分解を経時的に追跡したところ、 $\Delta fparg$ 株では PAR の分解が抑制されていた。以上のことから、糸状菌では fPARG が PARG として機能していることが示唆された。

Novel poly (ADP-ribose) glycohydrolase in *Aspergillus nidulans*.

Yuta Miyachi¹, Mio Hirano¹, Tatuya Yamamoto¹, Naoki Takaya², Motoyuki Shimizu¹, Masashi Kato¹

(¹ Faculty of Agriculture, Univ. of Meijo ² Univ. of Tsukuba)

O-16 (P-7)

麹菌 *A. oryzae* における CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集技術の確立

片山琢也¹, 中村英淳¹, 田中勇氣¹, 岡部知弥¹, 藤井渉², 北本勝ひこ¹, 丸山潤一¹ (¹東大院・農生科・応生工, ²東大院・農生科・応動)

宿主ベクター系の開発や非相同末端結合に関わる遺伝子の欠失によって、糸状菌の遺伝子改変は効率よく行われるようになった。しかし、産業上用いられる株や新たに単離された株では、遺伝子改変に多大な労力を必要とする。近年、迅速かつ簡便なゲノム編集技術として、*Streptococcus* 属のエンドヌクレアーゼ Cas9 を用いた CRISPR/Cas9 システムが、酵母から動物・植物まで幅広く利用されるようになった。このシステムでは、Cas9 がガイド RNA に依存してゲノム上の標的部位にリクルートされ、このヌクレアーゼ活性による DNA 二本鎖切断に対する修復の際に変異が導入される。本研究では、CRISPR/Cas9 システムを利用して、麹菌 *Aspergillus oryzae* におけるゲノム編集技術の確立を目的とした。

まず、*A. oryzae* で安定に発現させるためにコドン改変を行った *cas9* 遺伝子、およびガイド RNA を発現させるプラスミドを構築した。標的遺伝子として、分生子の色素合成に関わる遺伝子 *wA* および *yA*, ウリジン/ウラシル生合成に必要な *pyrG* を選択した。構築したプラスミドを *A. oryzae* *niaD300* 株に *niaD* マーカーを用いて導入し、各遺伝子の標的配列中に塩基の欠失や挿入をもつ株の取得に成功した。また、*wA*, *yA* のそれぞれの変異株では分生子の色が変化し、*pyrG* 変異株はウリジン/ウラシル要求性を示したことから、期待された表現型が得られた。以上の結果から、CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集技術が *A. oryzae* において利用可能であることが示された。

Development of CRISPR/Cas9 system for genome editing in *Aspergillus oryzae*

Takuya Katayama¹, Hidetoshi Nakamura¹, Yuki Tanaka¹, Tomoya Okabe¹, Wataru Fujii², Katsuhiko Kitamoto¹,

Jun-ichi Maruyama¹ (¹Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, ²Dept. of Animal Res. Sci., The Univ. of Tokyo)

O-17 (P-13)

麹菌カーボンカタボライト抑制関連遺伝子破壊株の細胞壁構成多糖の成分解析

一瀬桜子, 田中瑞己, 新谷尚弘, 五味勝也 (東北大院農・生物産業創成)

麹菌は多様な多糖類分解酵素を生産するものの、その発現はグルコースによるカタボライト抑制を受ける。糸状菌におけるグルコース抑制制御因子として、広域制御型転写因子 CreA 及び脱ユビキチン化酵素 CreB が同定されており、これらの遺伝子破壊株を作製し液体培地での生育を観察した結果、野生株及び *creB* 破壊株の菌体形態はペレット状を示すのに対して、*creA* 破壊株はパルプ状または小さなペレット状に形態が変化するという興味深い現象が認められた 1)。そこで本研究では、これらの破壊株における液体培養時の形態変化の要因の解明を目指した。

まず、形態変化による液体培地における生育への影響を解析した結果、*creA* 破壊株は形態がパルプ状になることで野生株と *creB* 破壊株よりも菌体量が増加した。さらに、熱水・アルカリ抽出により細胞壁成分を分画した結果、*creA* 破壊株では α -1,3-グルカンを多く含む画分の重量が減少していた。また、Congo Red 及び Calucofluor white に対する感受性試験を行った結果、興味深いことに野生株と *creA* 破壊株は感受性を示さないのに対し、*creB* 破壊株は感受性を示したことから、CreA 及び CreB は細胞壁構成多糖である α -グルカンやキチンの分解及び合成に関与することが示唆された。現在は、各破壊株の細胞壁構成多糖の成分解析を進めている。(本研究は「農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業」の支援を受けて行われた。)

1) Ichinose et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **98**, 335–343 (2014).

Polysaccharides composition of the cell wall of *Aspergillus oryzae* disruptants of genes involved in carbon catabolite repression

Sakurako Ichinose, Mizuki Tanaka, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi

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

O-18 (P-17)

非特異的な変異導入を伴わずに育種した麹菌 *Aspergillus oryzae* 宿主

朽方康裕, 辻華奈, 利根川唯, 森谷翔太, 中島春紫(明治大・農・農芸化)

麹菌 *Aspergillus oryzae* は高いタンパク質分泌能を有する日本の代表的な醸造微生物であり、さまざまな酵素タンパク質の生産宿主に用いられている。現在国内で遺伝子工学研究に幅広く用いられている *A. oryzae* の宿主菌株は紫外線照射等による突然変異誘発処理を繰り返して育種されている。そのため、非意図的な変異の蓄積により、分子機構への影響による表現形質の変化が懸念される。実際に、代表的な宿主株は標準的な野生株 (RIB40 株) と比較して分生子形成能が低下していることを観察している。そこで、本研究では野生型 RIB40 株に対して突然変異誘発処理を行わずに新たな宿主の作製を試みた。

野生型 RIB40 株は非相同組換えの頻度が高く導入遺伝子のターゲティングが困難であるため、非相同組換えに関与する *ligD* 遺伝子を相同組換えにより欠失した。さらに栄養要求性付与のため、ウラシルの生合成に関与する *pyrG* 遺伝子の欠失も同様にを行い、新規宿主 HiMe10 株 (Δ *ligD*, Δ *pyrG*) を作製した。HiMe10 株は従来型宿主の 3~4 倍、野生型 RIB40 株と同等の分生子形成能を示した。また、*Trichoderma reesei* 由来セルラーゼ遺伝子 *Tregl3* を *enoA* プロモーター制御下で異種発現させたところ、従来型宿主と比較して *Tregl3* の生産性が約 40%向上していた。

さらに、外来タンパク質生産能の向上のため、タンパク質生産および精製の障害となりうる *amyR* (アミラーゼ系転写因子)、*tpaA* (トリペプチジルペプチダーゼ)、*pepE* (酸性プロテアーゼ) を欠失した HiMe20 株 (Δ *ligD*, Δ *pyrG*, Δ *amyR*, Δ *pepE*, Δ *tpaA*) を作製し、外来タンパク質生産性の検討を行っている。

Construction of non-mutagenized host strains in *Aspergillus oryzae*

Yasuhiro Kuchikata, Kana Tsuji, Yui Tonegawa, Shota Moriya, Harushi Nakajima

(Meiji Univ.)

O-19 (P-23)

糸状菌型 CRISPR/Cas システムを用いたイネいもち病菌における高効率標的遺伝子ノックアウト・ノックイン・塩基置換導入法

荒添貴之^{1,2}, 三好健之介², 大和澄², 小川哲央², 大里修一², 有江力³, 桑田茂² (¹神戸大院工・²明治大院農・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。特に細菌の獲得免疫機構を応用した CRISPR/Cas システムは、簡便かつ高効率に DSB を導入できる人工ヌクレアーゼとして多くの生物種においてその有用性が認められてきている。我々は、植物病原糸状菌であるイネいもち病菌をモデルとして、CRISPR/Cas システムの糸状菌への最適化をおこなった。内生遺伝子を標的とした CRISPR/Cas ベクターと薬剤耐性遺伝子を含む破壊ベクターとを共導入することにより、標的遺伝子ターゲティング効率を大幅に上昇 (36.1-100%) させることに成功した。また、シングルクロスオーバーを人為的に誘導することにより、標的ゲノム領域への高効率塩基置換導入およびノックインが可能であることを確認した。本システムは多くの糸状菌に適用可能であることが予想され、複数遺伝子の同時改変や遺伝子サイレンシング、エピゲノム改変等の基盤技術となることが期待される。

Highly efficient targeted gene knock-out, knock-in and base substitution using fungal CRISPR/Cas system in the rice blast fungus

Takayuki Arazoe^{1,2}, Kennosuke Miyoshi², Tohru Yamato², Tetsuo Ogawa², Shuichi Ohsato², Tsutomu Arie³, Shigeru Kuwata²

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

O-20 (P-21)

糸状菌多糖分解酵素生産におけるキメラ転写因子の利用技術開発

山口楓絵, 國武絵美, 金丸京子, 木村真, 小林哲夫 (名大院・生命農)

【目的】 糸状菌の多糖分解酵素の生産は、高分子基質に由来する低分子誘導物質とこれに応答する特異的転写活性化因子に依存して誘導生産される。それぞれの転写因子の標的遺伝子群は N 末端側に存在する DNA 結合ドメイン(DBD)により決定され、誘導物質への応答や転写活性化は残りのドメイン(調節ドメイン; RD)が担う。本研究では、DBD の入れ替えによる誘導物質と標的遺伝子群との対応関係の改変を目指した。

【方法・結果】 モデル糸状菌である *Aspergillus nidulans* を用い、転写制御メカニズムについて知見の多い AmyR(アミラーゼ), XlnR(キシラナーゼ), ManR/ClrB(セルラーゼ・マンナーゼ)を対象として、DBD と RD の由来が異なる各種キメラ転写因子を構築した。これまでに AmyR::XlnR によるキシランに応答したアミラーゼ生産に成功している。今回は XlnR::AmyR, ManR::AmyR, ManR::XlnR について検討した。その結果、AmyR の RD を融合した転写因子は機能しなかったが、ManR::XlnR 導入株でキシランに応答した顕著なセルラーゼ生産の増強が確認された。本菌株におけるキシラナーゼ生産量は野生株と同等であるため、単一条件でのセルラーゼとキシラナーゼの同時生産が可能となった。現在 ManR RD についても検討を加えている。また、VP16 の転写活性化ドメインを用いた構成的活性型転写因子の構築についても併せて報告する予定である。

本研究は農林水産省「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。

Chimeric transcription factors for process improvement in production of fungal polysaccharide-degrading enzymes

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

Poster Session

P-1

Investigation on the biosynthesis of stachybisbins from *Stachybotrys bisbyi*

Chang Li¹, Yudai Matsuda¹, Hao Gao², Xin Sheng Yao², Ikuro Abe¹

(¹ Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Univ. of Tokyo; ² College of Pharmacy, Jinan Univ.)

Bisabosquals are meroterpenoids with unique ring system, which were isolated from fungi in the genus *Stachybotrys*. They exhibit obvious inhibitory activities against the microsomal squalene synthase [1]. In our previous study, two new bisabosquals stachybisbins A-B have been isolated from wetland fungi *Stachybotrys bisbyi* [2], whose biosynthesis has attracted our attention. They were hybrid natural products possibly derived from orsellinic acid and farnesyl pyrophosphate (FPP). With an aim to clarify the biosynthetic pathways of stachybisbins and to find out clues on how to create the unique molecular scaffold, we set out to investigate the molecular basis for the biosynthesis of these compounds.

The draft genome sequencing of *Stachybotrys bisbyi* was performed, and we successfully found two possible biosynthetic gene clusters, which may be responsible for the biosynthesis of stachybisbins A and B. Then we proposed the possible biosynthetic pathway based on the information of the enzymes encoded by the clusters. To confirm the hypothesis, the genes were introduced one by one into *Aspergillus oryzae* according to the predicted pathway, and the metabolites of the transformants were analyzed by HPLC, MS, and NMR. Up to now, the functions of the first two genes of the pathway have been established on the basis of the heterologous expression method. Functional investigation of the other genes in the cluster is in progress.

[1] Kazuyuki Minagawa, Shuichi Kouzuki, Kazuhide Nomura et al. Bisabosquals, novel squalene synthase inhibitors. *The Journal of Antibiotics*, 2001, 54 (11): 890-895.

[2] Yan Ru Bao, Guo Dong Chen, Yue Hua Wu et al. Stachybisbins A and B, the first cases of seco-bisabosquals from *Stachybotrys bisbyi*. *Fitoterapia*, 2015, 105: 151-155.

P-2

L-乳酸生産黄麹菌の乳酸生産能に対する中央代謝経路改変の影響

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神戸大院・工, ²神戸大・自然科学, ³月桂冠・総研)

本研究の目的は、黄麹菌 *Aspergillus oryzae* を用いた L-乳酸の高効率生産である。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り、植物バイオマスから微生物変換による生産が可能である。これまでに栄養要求性黄麹菌 *A. oryzae* NSPID1 株に牛由来の lactate dehydrogenase (LDH) 遺伝子を導入して作製した L-乳酸生産株で、グルコースから約 45 g/L の L-乳酸生産に成功している。本研究では L-乳酸生産の競合経路の破壊による代謝改変の影響を検討した。

L-乳酸生産株では、L-乳酸の対糖収率が約 45%と低いため、L-乳酸の生産に必要なピルビン酸が中央代謝経路の他の経路に流れている可能性が考えられる。そこで、L-乳酸生産株のエタノールの生産量を調べた。すると、100 g/L のグルコースから約 10 g/L のエタノール生産が確認された。すなわち、消費した糖の約 10% がエタノール生合成経路に流出している。したがって、エタノール生合成経路に存在するピルビン酸デカルボキシラーゼをコードする遺伝子を破壊した株を作製し、乳酸生産量への影響を調べた。その結果、エタノール生産をほぼゼロにすることに成功したが、乳酸は 5 g/L の増加にとどまった。一方で、リンゴ酸等の有機酸が 7.5 g/L も蓄積しており、TCA 回路への流出量を制御する必要性が明らかになった。現在、ピルビン酸から TCA 回路への経路上に存在するピルビン酸カルボキシラーゼの破壊株の構築を進めており、今後、二重破壊株の乳酸生産について評価する予定である。

Effect of metabolic engineering on the L-lactate productivity by L-lactate producing *Aspergillus oryzae*.

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

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

P-3

コピー数多形とプロモーター強度を加味した黄麹菌でのマルチ遺伝子発現

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神戸大院・工, ³月桂冠・総研)

石油資源の代わりにセルロースバイオマスをエネルギー・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、セルロース結晶は難分解性で複数の酵素による触媒が必要であり、効率的に分解して利用することが難しい。この問題を解決するために、我々は、黄麹菌のタンパク質分泌生産能力を利用し、複数の酵素を同時発現させてセルロースを効率的に分解することを目指している。

現在までに、黄麹菌を用いて四種類のセルラーゼをそれぞれ単独で高発現させて紙パルプを効率的に分解することや、三種類のセルラーゼを同時に発現させる菌株の構築に成功している。本研究では、これまでに蓄積した cotransformation による遺伝子導入時のコピー数多形とプロモーター強度を加味した組み合わせにより、単独で結晶性セルロースを分解する黄麹菌の構築を目指した。

紙パルプの効率的な分解で決定した三種セルラーゼカクテルの配合を参考に、セルラーゼ遺伝子とプロモーター/ターミネーターセットの組み合わせを決定し、cotransformation により三種セルラーゼ遺伝子のマルチコピー導入株を構築した。構築した菌株の培養液の培養上清には、導入したセルラーゼ遺伝子の発現産物に該当する三つの酵素の発現が確認でき、この培養上清を用いて結晶性セルロースをグルコースまで分解することに成功した。現在、培養上清の濃縮液を用いて各種バイオマスの分解能を評価しており、既に構築済みの乳酸生産黄麹菌との共培養によるセルロースからのポリマー原料としての乳酸生産の検討を進めている。

Designed-expression of multi-copy genes in genetically engineered *Aspergillus oryzae*

Satoshi Wakai¹, Nanami Asai¹, Chiaki Ogino², Hiroko Tsutsumi³, Yoji Hata³, Akihiko Kondo²

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

P-4

糸状菌 *Emericella varicolor* IFM42010 由来ポリケタイド合成酵素遺伝子の機能解析

橋元 誠, 一條 眸, 藤原康太郎, 菅澤 仁, 藤井 勲 (岩手医大・薬)

asteltoxin はビスフラン環を有するマイコトキシンとして酸化的リン酸化や F₁-ATPase の阻害作用などが知られており、ポリケタイド合成酵素 (PKS) により生成したポリエンピロンが酸化酵素によりポリエポキシ化された後、環構築反応を経て生合成されると考えられている。我々は asteltoxin 生合成遺伝子の同定と機能解析により、その特徴的なビスフラン環の生成機構解明を目標として研究を行っている。今回、asteltoxin 生産菌のドラフトゲノムデータより見出した候補 PKS 遺伝子をクローニングし、麹菌を宿主とした異種発現を試みたので報告する。

E. varicolor IFM42010 ゲノムデータに対して BLAST 検索を行ったところ、22 個の還元型 PKS 遺伝子の存在を見出した。さらに PKS のドメイン構造や酸化酵素を多く含む遺伝子群を探索し、この条件に合致した Ev460PKS を含む遺伝子群が asteltoxin 生合成遺伝子クラスターと予想した。そこで、Ev460PKS 遺伝子の機能を明らかにするために、*amyB* プロモーター下に組み込んだ発現プラスミド pTA-Ev460PKS を構築し、*Aspergillus oryzae* に形質転換・導入した。誘導培養物を HPLC 分析した結果、形質転換体の培養液中にコントロールには見られない複数の化合物の生産を確認した。2 つの化合物について単離、構造解析を進めたところ、その一つが asteltoxin の生合成中間体と予想されるヘキサエン β-ケトラクトン、もう一方はトリエン β-ケトラクトンであることを明らかにした。このことから、Ev460PKS を含む本遺伝子クラスターが asteltoxin 生合成遺伝子クラスターであることが強く示唆された。現在、PKS 遺伝子とメチル基転移酵素遺伝子を導入した形質転換体の代謝物について解析を進めている。

Functional analysis of a polyketide synthase gene from *Emericella varicolor* IFM42010

Makoto Hashimoto, Hitomi Ichijo, Koutaro Fujiwara, Hitoshi Sugasawa, Isao Fujii

(School of Pharmacy, Iwate Med. Univ.)

P-5

麴菌界面活性タンパク質 hydrophobin RolA の負電荷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 の分泌する界面活性タンパク質である hydrophobin RolA は PBSA (Polybutylene succinate-co-adipate) に吸着した後, PBSA 分解酵素 cutinase CutL1 と相互作用して CutL1 を PBSA 表面に濃縮し, 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, 接触角測定と AFM (Atomic Force Microscope) を用いて, QCM (Quartz Crystal Microbalance) 電極の SAM (Self-Assembled Monolayer) 化の形成状態を評価する方法を確立し, SAM 化によって疎水的な性質を持つ 1-undecanethiol SAM 化表面を作製した。その疎水性表面と RolA との親和性を QCM で測定し, RolA の吸着した表面を AFM で観察することで, 異なる pH 緩衝液条件下により RolA 吸着の動力学的性質が異なること, RolA の吸着構造が異なることを見出した。

本報告では, 負の荷電性を持つ 10-carboxy-1-decanethiol SAM 化表面を作製し, 接触角測定及び AFM で改質の均一性を確認した。さらに, その負電荷表面に対して異なる pH の緩衝液条件下で RolA を吸着させ, 表面観察の結果と QCM を用いた負電荷表面への RolA の親和性解析の結果を比較することで, 負の荷電性を持つ固体表面に対する 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 negatively charged surfaces.

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

P-6

麴菌由来ハイドロフォービン HypA の機能性付与による物性変化

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)

ハイドロフォービンは, 気中構造を形成するカビやキノコが生産する両親媒性の低分子量タンパク質である。気相-液相および液相-固相界面への自己集合性や, 基材表面の「ぬれ性」の変化, 免疫回避能など物理化学的にユニークな性質をもつ。一方, ハイドロフォービンは吸着性が非常に強く, タンパク質の精製に用いられる一般的な取り扱い手法の多くが適用できず, 回収・精製が困難なタンパク質である。

筆者らは, 清酒や醤油などの醸造微生物である麴菌 *Aspergillus oryzae* より, ハイドロフォービンをコードする遺伝子 *hypA* ~*D* を単離し, 各々の遺伝子について発現時期や局在性の解析を行なった。その結果, **HypA/RolA** が固体培養時に最も多く発現し, 分生子の表層に特異的に局在することを見出している。

筆者らはハイドロフォービンの強い吸着性に着目し, **HypA** を介した各種基材表層の機能性修飾をめざしている。そこで, C 末端に重金属吸着ペプチドを融合した機能性 **HypA** を設計し, 麴菌の高生産株の作製, および機能性 **HypA** の生産・精製に成功している。精製した各ハイドロフォービン溶液を各種基材上に滴下して乾燥させることにより, 機能性 **HypA** がテフロン板等の疎水性表面に強く吸着すること, 特有の吸着パターンを示すこと, 水接触角測定により表面の「ぬれ性」が変化することを観察し, ハイドロフォービンとしての吸着性が保持されていることを確認した。

Analysis of the physical property change of the functional Hydrophobin HypA from *Aspergillus oryzae*.

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

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

P-7 (O-16)

麹菌 *A. oryzae* における CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集技術の確立

片山琢也¹, 中村英淳¹, 田中勇氣¹, 岡部知弥¹, 藤井渉², 北本勝ひこ¹, 丸山潤一¹

(¹東大院・農生科・応生工、²東大院・農生科・応動)

宿主ベクター系の開発や非相同末端結合に関わる遺伝子の欠失によって、糸状菌の遺伝子改変は効率よく行われるようになった。しかし、産業上用いられる株や新たに単離された株では、遺伝子改変に多大な労力を必要とする。近年、迅速かつ簡便なゲノム編集技術として、*Streptococcus* 属のエンドヌクレアーゼ Cas9 を用いた CRISPR/Cas9 システムが、酵母から動物・植物まで幅広く利用されるようになった。このシステムでは、Cas9 がガイド RNA に依存してゲノム上の標的部位にリクルートされ、このヌクレアーゼ活性による DNA 二本鎖切断に対する修復の際に変異が導入される。本研究では、CRISPR/Cas9 システムを利用して、麹菌 *Aspergillus oryzae* におけるゲノム編集技術の確立を目的とした。

まず、*A. oryzae* で安定に発現させるためにコドン改変を行った *cas9* 遺伝子、およびガイド RNA を発現させるプラスミドを構築した。標的遺伝子として、分生子の色素合成に関わる遺伝子 *wA* および *yA*、ウリジン/ウラシル生合成に必要な *pyrG* を選択した。構築したプラスミドを *A. oryzae* *niaD300* 株に *niaD* マーカーを用いて導入し、各遺伝子の標的配列中に塩基の欠失や挿入をもつ株の取得に成功した。また、*wA*, *yA* のそれぞれの変異株では分生子の色が変化し、*pyrG* 変異株はウリジン/ウラシル要求性を示したことから、期待された表現型が得られた。以上の結果から、CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集技術が *A. oryzae* において利用可能であることが示された。

Development of CRISPR/Cas9 system for genome editing in *Aspergillus oryzae*

Takuya Katayama¹, Hidetoshi Nakamura¹, Yuki Tanaka¹, Tomoya Okabe¹, Wataru Fujii², Katsuhiko Kitamoto¹, Jun-ichi Maruyama¹ (¹Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, ²Dept. of Animal Res. Sci., The Univ. of Tokyo)

P-8

麹菌 *A. oryzae* を用いたシロアリ腸内共生原生生物由来セロビオヒドロラーゼの生産

北本真理奈¹, 川田純毅¹, 丸山潤一¹, 小田切正人², 守屋繁春², 有岡学¹

(¹東大院・農生科・応生工、²理化学研究所)

【目的】 シロアリは木材の分解・資化効率が高いことが知られており、これには腸内に共生する原生生物が生産するセルラーゼが寄与していると考えられている。このようなセルラーゼは、バイオエタノール製造におけるセルロース系バイオマスの糖化の効率化に貢献する可能性があるとして期待される。我々は組換えによる原生生物由来のセルラーゼ生産を試みてきたが、結晶性セルロースの分解に重要な役割を持つセロビオヒドロラーゼの生産は成功していなかった。今回、麹菌 *Aspergillus oryzae* を用い、オオシロアリ腸内に共生する原生生物由来のセロビオヒドロラーゼの生産に成功したため、これを報告する。

【方法及び結果】 オオシロアリの腸内に共生する *Eucomonympha* 属原生生物由来のセロビオヒドロラーゼについて、 α -アミラーゼ AmyB との融合タンパク質として発現するプラスミドを作製した。セロビオヒドロラーゼが発現したのち分離できるように、AmyB との間に Kex2 様プロテアーゼ切断配列を挿入し、さらに検出・精製できるように HA-His₆ タグを付加した。この発現プラスミドを *Aspergillus aculeatus* β -グルコシダーゼを発現する *A. oryzae* 株に導入した。得られた株を培養し、培地上清の濃縮および Ni-NTA 樹脂による精製を行ったところ、HA 抗体を用いたウエスタン解析により目的タンパク質と思われるバンドが検出された。現在、生産されたタンパク質の酵素活性、および β -グルコシダーゼの有無による生産への影響について検討を行っている。

Production of cellobiohydrolase from a symbiotic protist in the hindgut of the termite using *Aspergillus oryzae*

Marina Kitamoto¹, Junki Kawada¹, Jun-ichi Maruyama¹, Masato Odagiri², Shigeharu Moriya², Manabu Arioka¹

(¹Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, ²RIKEN)

P-9

麴菌の hydrophobin RolA-cutinase CutL1 間相互作用に寄与する CutL1 側残基の探索

金允卿¹, 寺内裕貴¹, 田中拓未¹, 上原健二¹, 高橋徹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)

化石燃料消費抑制を目的に、石油化学系プラスチックから植物性生分解性プラスチックへの転換が進んでいる。*Aspergillus oryzae* は、生分解性ポリエステル polybutylene succinate-co-adipate (PBSA) を唯一の炭素源として培養すると hydrophobin RolA, PBSA 分解酵素 cutinase CutL1 を共発現する。hydrophobin は糸状菌に特有の両親媒性タンパク質で、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 の相互作用は RolA 側の H32, K34 と CutL1 側の E31, D73, D142, D171 が多価効果をもって協奏的に作用するイオンの相互作用であることが明らかになった。¹⁾ しかし、イオンの相互作用を打ち消した高塩濃度下での相互作用解析実験から、CutL1 側の既知の残基である E31, D73, D142, D171 以外にも、RolA-CutL1 間のイオンの相互作用に寄与するアミノ酸残基の存在が示唆された。

本報告では、CutL1 立体構造モデルと CutL1 ホモログのアミノ酸配列間のアラインメント解析から新たに E109, D145, D203 を RolA との相互作用候補残基として推定した。次いで、それらの Ser 置換変異体 E109S, D145S, D203S を作製して、各変異体と RolA との相互作用を分子間相互作用解析装置 QCM で解析した。

1) Takahashi T., et al. *Mol. Microbiol.* 96:14-27 (2015)

Screening of fungal cutinase CutL1 amino acid residues involving in the interaction with hydrophobin RolA.

Yoonkyung Kim¹, Yuki Terauchi¹, Takumi Tanaka¹, Kenji Uehara¹, Toru Takahashi², Keietsu Abe^{1,2}

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

P-10

麴菌のハイドロフォービンを利用した重金属回収システムの構築

中間聖, 大橋信太郎, 赤池大輝, 阿吹綾香, 中島春紫 (明治大院・農・農化)

ハイドロフォービンは糸状菌や担子菌が生産する低分子量の細胞表層タンパク質である。単量体で細胞外に分泌された後、細胞表層で疎水性面を外側に向けて自己集合することにより強固な単層を形成して菌体に撥水性を付与する。筆者らは麴菌 *Aspergillus oryzae* のハイドロフォービンの局在性がプロモーターの発現特性に依存することを明らかにし、HypA タンパク質は主として分生子の表層に、HypB タンパク質は菌糸の表層に局在することを観察している。

ハイドロフォービンの吸着性に着目し、麴菌の細胞表層に機能性ペプチドを固定化するアンカーとしての有用性について検討した。重金属吸着能を持つ His8 配列を C 末端に連結した HypB-His8 を菌糸表層へ提示するため *hypB* プロモーター制御下で発現させ、菌体の表層へ His8 ペプチドを固定化した麴菌株を作製した。組換え菌株をポリエステル綿上で培養することにより綿を担体として生育させ、綿を重ねてシリンジに詰めることにより生物性の重金属回収カラムを作製して水溶液中の Ni²⁺ の回収を試みた。カラムに吸着した Ni²⁺ を回収し、誘導結合プラズマ発光分光分析法により定量したところ His8 配列を細胞表層に固定化した組換え菌株では Ni²⁺ 回収量が約 40% 上昇することを見出した。

Construction of heavy metal recovery systems using hydrophobins derived from *Aspergillus oryzae*

Satoshi Nakama, Shintaro Ohashi, Daiki Akaike, Ayaka Abuki, Harushi Nakajima

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

P-11

Aspergillus 属糸状菌のハイドロフォビン-クチナーゼ間相互作用に関する研究

田中拓未¹, 高橋徹², 山形洋平³, 阿部敬悦^{1,2}

(¹東北大院・農・生物産業創成,²東北大・未来研,³農工大院・農)

[背景/目的] hydrophobin は糸状菌に広く保存された低分子量の両親媒性タンパク質で、気中菌糸・分生子表面に局在する。麹菌 *Aspergillus oryzae* の hydrophobin RolA は生分解性ポリエステル PBSA 等の固体表面に吸着し、PBSA 分解酵素 cutinase CutL1 と相互作用して CutL1 を固体表面に濃縮する。これまでの研究で、この相互作用は RolA N 末端側の正電荷残基と CutL1 分子表面の負電荷残基が関与するイオンの相互作用であること、RolA は CutL1 のホモログ CutC とも相互作用することを明らかとした。hydrophobin- 固体高分子分解酵素間の相互作用は、糸状菌の生理学的に新規に発見された機能である。本報告では、このようなタンパク質同士の組み合わせが他の *Aspergillus* 属糸状菌一般に存在するかどうか検証することを目的とした。

[方法/結果] 系統解析とアラインメント解析により、担子菌類及び子囊菌類の糸状菌において、N 末端側に正電荷残基が多い hydrophobin や、CutL1 と分子表面負電荷残基の保存性が高い CE5 family esterase が存在することを見出した。また、CutL1 と、モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* の RodA (RolA オルソログ) との間にイオンの相互作用が働くことを見出し、*Aspergillus* 属糸状菌において RolA オルソログ-CutL1 オルソログの組み合わせに相互作用が存在する可能性が高いことを推測した¹⁾。現在、*A. nidulans* の Cut1, Cut2 (CutL1 オルソログ) と RodA との間の親和性を、PBSA 分解試験や、分子間相互作用解析装置によって検証している。

1) Takahashi T., et al. *Mol. Microbiol.* 96:14-27 (2015)

Analysis of interaction between *Aspergillus hydrophobin* and *Aspergillus cutinase*

Takumi Tanaka¹, Toru Takahashi², Youhei Yamagata³, Keietsu Abe^{1,2}

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

P-12

TILLING 法によるシイタケの育種手法の開発

坂本裕一, 金野尚武*, 佐藤志穂, 水野雅史**, 山内隆弘***, 枝克昌***, 後藤史和***

(岩手生工研・生物資源, *宇都宮大・農, **神戸大・農, *** (株)北研)

近年担子菌類のゲノム情報が充実してきたことから、遺伝子組換えを行わないゲノム育種手法の導入が可能となってきた。そこで、シイタケにおいてゲノム配列の解読を行うとともに、目的遺伝子に変異が導入された菌株をスクリーニングすることを目的に、UV 照射変異株の作出とシイタケにおける TILLING 法の適用を行った。選抜する変異株として、シイタケに含まれる免疫賦活活性を持つβ-グルカンである、レンチナンの分解酵素 (EXG2) をコードする遺伝子をターゲットとした。レンチナン分解酵素を抑制することで、収穫後のレンチナン分解が抑制された菌株を得ることを最終目的とした。

シイタケ菌株 SR-1 のプロトプラストを作出し、UV 照射後再生した 2 核菌糸体を回収し、935 株の UV 照射菌株を得た。UV 照射した菌株 935 株から TILLING 法により変異が導入された菌株を選抜したところ、1 株の変異が認められた (Mu789)。得られた菌株の配列を確認したところ、1 アミノ酸置換 (チロシン→アスパラギン酸) を伴う塩基置換であった。EXG2 の立体構造の推定から、活性中心付近のアミノ酸の変異であることが確認された。グルカナーゼの活性中心には酸性アミノ酸が保存されており、その近辺に新たな酸性アミノ酸が入ることで活性に変化が生じることが期待された。そこで、Mu789 の子実体のレンチナン量を測定したところ、収穫直後で親株である SR-1 の約 2 倍、収穫後 4 日目では約 4 倍のレンチナン量であった。

Breeding of *Lentinla edodes* that suppressed lentinan degradation

Yuichi SAKAMOTO, Naotake KONNO*, Shiho SATO, Masashi MIZUNO**, Takahiro YAMAUCHI***, Katsumasa Eda***, Fumikazu GOTO***

(IBRC; *Fac. of Agri., Utsunomiya Uni.; **Grad. School of Agri. Sci., Kobe Uni.; ***Hokken Co. Ltd.)

P-13 (O-17)

麴菌カーボンカタボライト抑制関連遺伝子破壊株の細胞壁構成多糖の成分解析

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を生産するものの、その発現はグルコースによるカタボライト抑制を受ける。糸状菌におけるグルコース抑制制御因子として、広域制御型転写因子 CreA 及び脱ユビキチン化酵素 CreB が同定されており、これらの遺伝子破壊株を作製し液体培地での生育を観察した結果、野生株及び creB 破壊株の菌体形態はペレット状を示すのに対して、creA 破壊株はパルプ状または小さなペレット状に形態が変化するという興味深い現象が認められた 1)。そこで本研究では、これらの破壊株における液体培養時の形態変化の要因の解明を目指した。

まず、形態変化による液体培地における生育への影響を解析した結果、creA 破壊株は形態がパルプ状になることで野生株と creB 破壊株よりも菌体量が増加した。さらに、熱水・アルカリ抽出により細胞壁成分を分画した結果、creA 破壊株では α -1,3-グルカンを多く含む画分の重量が減少していた。また、Congo Red 及び Calucofluor white に対する感受性試験を行った結果、興味深いことに野生株と creA 破壊株は感受性を示さないのに対し、creB 破壊株は感受性を示したことから、CreA 及び CreB は細胞壁構成多糖である α -グルカンやキチンの分解及び合成に関与することが示唆された。現在は、各破壊株の細胞壁構成多糖の成分解析を進めている。(本研究は「農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業」の支援を受けて行われた。)

1) Ichinose et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **98**, 335–343 (2014).

Polysaccharides composition of the cell wall of *Aspergillus oryzae* disruptants of genes involved in carbon catabolite repression

Sakurako Ichinose, Mizuki Tanaka, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi

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

P-14

麴菌 hydrophobin RolA -cutinase CutL1 間相互作用における CutL1 側相互作用部位解析

寺内裕貴¹, 金允卿¹, 田中拓未¹, 高橋徹², 阿部敬悦^{1,2}

(¹東北大院・農・生物産業創成, ²東北大・未来研)

hydrophobin は糸状菌に広く保存された両親媒性タンパク質であり、細胞壁表面に局在する。生分解性ポリエステルの一種である PBSA (Polybutylene succinate-co-adipate)を唯一の炭素源として麴菌 *Aspergillus oryzae* を培養すると、hydrophobin RolA と共に PBSA 分解酵素 CutL1 を共発現する。RolA は PBSA に吸着した後 CutL1 と相互作用し、PBSA 表面に CutL1 を誘導・濃縮することで PBSA の分解を促進する。この相互作用は、RolA N 末端側の H32, K34 と CutL1 分子表面の E31, D142, D171 が協奏的に働くイオンの相互作用であることが分かっている。¹⁾しかし、分子間相互作用解析において、NaCl 存在下における RolA 野生型 -CutL1 野生型間の親和性が、NaCl 非存在下における RolA 二重変異体 (H32S/K34S) -CutL1 三重変異体 (E31S/D142S/D171S)間の親和性に比べ顕著に低かった。ここから、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存在する可能性が示唆され、CutL1 の立体構造モデルとホモログ間アラインメント解析から、D30, D34, D73, D117 が候補として選択された。このうち、D73 が新たな相互作用部位であることが既に明らかとなっている。本報告では候補として選択した残りのアミノ酸残基である D30, D34, D117 をセリンに置換した点変異体 (CutL1-D30S, D34S, D117S) を作製し、RolA 野生型との相互作用について検証した。

1) Takahashi T., et al. *Mol. Microbiol.* 96:14-27 (2015)

Analysis of CutL1 amino acid residues involving in interaction between *Aspergillus oryzae* hydrophobin RolA and cutinase CutL1

Yuki Terauchi¹, Yoonkyung Kim¹, Takumi Tanaka¹, Yusei Tsushima¹, Kenji Uehara¹, Toru Takahashi², Keietsu Abe^{1,2}

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

P-15

麹菌細胞壁の α -1,3-グルカンは液体培養におけるタカアミラーゼの細胞壁吸着性に関する

張斯來、田中瑞己、新谷尚弘、五味勝也（東北大院・農・生物産業創成）

麹菌が培地中に分泌生産する Taka-amylase (TAA) は培養後期において培養液中から消失し、細胞壁に吸着することが知られている。我々は麹菌細胞壁構成成分 α -1,3-グルカン (AG) と分泌タンパク質の細胞壁吸着性の関係について研究を進めている。AG 合成酵素遺伝子(*agsA*, *agsB*, *agsC*)のいろいろな組み合わせの破壊を *Cre/loxP* システムを用いて行ったところ、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。液体培養における TAA 活性を調べた結果、 Δ *agsB* 株では培養前期においても TAA が細胞壁に吸着していることが明らかとなった。このことから、AG の生合成が主に *agsB* 遺伝子に依存しており、AG が TAA の細胞壁への吸着を阻害する因子であることが示唆された(張ら、2014)。

agsB 破壊株にそれぞれの AG 合成酵素遺伝子を α -アミラーゼ遺伝子プロモーター (*PamyB*) で高発現した株を作製した。得られた株の形態変化と TTA 細胞壁への吸着性を調べた結果、*agsA* 高発現株では WT と同様のペレット状の形態を示し、TAA も培地中に分泌されていることが確認された。このことから、*agsA* 遺伝子は *agsB* 遺伝子の機能を相補することが示唆された。一方、*agsB* と *agaC* 高発現条件下では培地中の菌体が著しく減少し、フラスコのガラス壁面に吸着しやすくなっていることが観察された。また、*PamyB* より転写活性の低いアクチン遺伝子プロモーター (*PactA*) で *ags* 遺伝子を発現させた株を作製し、培養菌体形態および TTA の細胞壁への吸着性についても報告する。

張ら、第 13 回糸状菌分子生物学コンファレンス講演要旨集、p.43

Alpha-1,3-Glucan is involved in Taka-amylase adsorption on the *Aspergillus oryzae* cell wall in liquid culture

Silai Zhang, Mizuki Tanaka, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi

P-16

麹菌 *Aspergillus oryzae* の非イオン性界面活性剤添加培養による遊離脂肪酸の高効率分泌

玉野孝一、三浦愛、小池英明、神坂泰、木村和義、梅村舞子、町田雅之（産総研・生物プロセス）

微生物の生産する遊離脂肪酸やその誘導体は、医薬品・バイオ燃料・農薬やその原料等に利用が期待される。そこで我々は、物質分解と合成の能力に優れた麹菌を用いて、代謝工学的な遺伝子改変を駆使することにより、遊離脂肪酸を高生産する技術開発を進めてきた。その結果、アシル CoA 合成酵素遺伝子を破壊することで、野生型の 9.2 倍に遊離脂肪酸生産性を向上させることができた。しかし、遊離脂肪酸は菌体内に蓄積されるため、実際にこれを利用するには多大な労力と費用をかけて菌体を破碎する必要があった。一方、もし遊離脂肪酸が分泌されれば、菌体破碎は行わなくて良い。そこで、麹菌に遊離脂肪酸を分泌させる技術開発に取り組んだ。

酵母では、アシル CoA 合成酵素遺伝子を破壊すると、標準的な液体培地での培養で遊離脂肪酸は分泌されるようになる。そのため、麹菌の当破壊株も、たとえば細胞膜の透過性を高めるといった細胞表層に作用する可能性のある何らかの刺激を与えると、遊離脂肪酸は分泌されるようになるのではと推察した。このような考えで複数の条件を麹菌当破壊株で試した結果、非イオン性界面活性剤存在下での培養の間、菌は正常に生育すると共に、遊離脂肪酸が培地に分泌されるようになることを見出した。この分泌量は、遊離脂肪酸の全生産量の 80%以上に相当した。しかし、この分泌化は麹菌野生株でも共通して行われたことから、遺伝子破壊とは無関係であった。現在、この分泌化の機構を解析している。

High Efficient Secretion of Free Fatty Acids from *Aspergillus oryzae* by Supplementation of Non-Ionic Surfactants to the Culture Medium

Koichi Tamano, Ai Miura, Hideaki Koike, Yasushi Kamisaka, Kazuyoshi Kimura, Myco Umemura, Masayuki Machida

(AIST)

P-17 (O-18)

非特異的な変異導入を伴わずに育種した麹菌 *Aspergillus oryzae* 宿主

朽方康裕, 辻華奈, 利根川唯, 森谷翔太, 中島春紫(明治大・農・農芸化)

麹菌 *Aspergillus oryzae* は高いタンパク質分泌能を有する日本の代表的な醸造微生物であり、さまざまな酵素タンパク質の生産宿主に用いられている。現在国内で遺伝子工学研究に幅広く用いられている *A. oryzae* の宿主菌株は紫外線照射等による突然変異誘発処理を繰り返して育種されている。そのため、非意図的な変異の蓄積により、分子機構への影響による表現形質の変化が懸念される。実際に、代表的な宿主株は標準的な野生株 (RIB40 株) と比較して分生子形成能が低下していることを観察している。そこで、本研究では野生型 RIB40 株に対して突然変異誘発処理を行わずに新たな宿主の作製を試みた。

野生型 RIB40 株は非相同組換えの頻度が高く導入遺伝子のターゲティングが困難であるため、非相同組換えに関与する *ligD* 遺伝子を相同組換えにより欠失した。さらに栄養要求性付与のため、ウラシルの生合成に関与する *pyrG* 遺伝子の欠失も同様に行い、新規宿主 HiMe10 株 ($\Delta ligD, \Delta pyrG$) を作製した。HiMe10 株は従来型宿主の 3~4 倍、野生型 RIB40 株と同等の分生子形成能を示した。また、*Trichoderma reesei* 由来セルラーゼ遺伝子 *Tregl3* を *enoA* プロモーター制御下で異種発現させたところ、従来型宿主と比較して *Tregl3* の生産性が約 40% 向上していた。

さらに、外来タンパク質生産能の向上のため、タンパク質生産および精製の障害となりうる *amyR* (アミラーゼ転写因子)、*tpaA* (トリペプチジルペプチダーゼ)、*pepE* (酸性プロテアーゼ) を欠失した HiMe20 株 ($\Delta ligD, \Delta pyrG, \Delta amyR, \Delta pepE, \Delta tpaA$) を作製し、外来タンパク質生産性の検討を行っている。

Construction of non-mutagenized host strains in *Aspergillus oryzae*

Yasuhiro Kuchikata, Kana Tsuji, Yui Tonegawa, Shota Moriya, Harushi Nakajima

(Meiji Univ.)

P-18

Coprinopsis cinerea プロトプラスト凍結保存法の開発とプロモータ解析への応用

鈴木博子¹, 千葉洋史¹, 岡久聖実², 菅野茂夫², 刑部祐里子², 村口元³, 刑部敬史²

(¹徳島大院・生命テクノ, ²徳島大・農工商, ³秋田県立大・生物資源)

担子菌のモデル *Coprinopsis cinerea* では順遺伝学的研究が多くなされてきたが、ゲノム情報を利用した逆遺伝学的研究は動物や植物に比べてあまり進んでいない。その要因として、安定的に形質転換に使用可能なサンプル調製の労力が大きいことが挙げられ、これが迅速な逆遺伝学的研究の妨げになっていると考えられる。そこで私たちは迅速かつ安定な形質転換を実現するため、プロトプラスト凍結保存技術の開発を目指した。

まず形質転換に用いるプロトプラスト状態での凍結保存を目指し、保存溶液の条件検討を行った。その結果、0.5M Sorbitol + 10% DMSO の溶液条件において -80°C で約 3 週間保存した時の再生効率は、即時調製した新鮮なプロトプラストと同等であることが明らかとなった。また形質転換の効率については、GFP 発現コンストラクトを導入した一過的遺伝子発現による評価と、形質転換体の獲得による評価を行った結果、新鮮なプロトプラストを用いた場合と同等の効率が得られた。次に、開発した系を用いて Luciferase assay の検討を行った。*C. cinerea* においてホタル由来 Luciferase (ffLuc) と β -glucuronidase が利用できないと報告されていたため (Collins et al. 2010)、ウミシイタケ由来 Luciferase (reLuc) とゲオキヒオドシエビ由来 Luciferase (nanoLuc) について Luciferase assay を試みた結果、nanoLuc で発光が確認できた。最後に、nanoLuc を用いて *C. cinerea* RNAseq データから抽出した強発現遺伝子のプロモータ解析を行った。その結果、汎用的に用いられている *A. bisporus* 由来 *gpd2* 遺伝子プロモータよりも 10 倍近く高発現のプロモータを複数見出した。今後これら高発現プロモータを用いた新たな逆遺伝学ツールとしてゲノム編集ベクターを作製予定である。

Development of protoplasts' cryopreservation and its application to the promoter analyses in *Coprinopsis cinerea*.

Hiroko Suzuki¹, Hirofumi Chiba¹, Kiyomi Okahisa², Shigeo S Sugano², Yuriko Osakabe², Hajime Muraguchi³, Keishi Osakabe² (¹Life Tech., Tokushima Univ., ²CCAIC, Tokushima Univ., ³Biotech., Akita Pref Univ.)

P-19

モデル担子菌 *Coprinopsis cinerea* におけるエレクトロポレーション法の開発

千葉洋史¹, 鈴木博子¹, 岡久聖実², 菅野茂夫², 刑部祐里子², 刑部敬史²

(¹徳島大院・生命テクノ, ²徳島大・農工商)

キノコの育種において、短期間に新品種が開発できるよう、ゲノム情報やオミックス解析情報を利用した分子育種技術の導入が望まれている。特に、近年開発されたゲノム編集技術は、すでに動物などでは RNA あるいはタンパク質を一過的に導入し、外来遺伝子を残さずに狙った遺伝子座を制御できるので、担子菌類でも組み換え体とならない育種法として利用が着目されている。しかしながら、担子菌類では RNA やタンパク質を安定に導入する手段が未だ確立されていない。そこで本研究では、担子菌のモデル生物である *Coprinopsis cinerea* #326 株を用いて、タンパク質の導入を可能にするエレクトロポレーション法の開発を試みた。

まず、*C.cinerea* の無性胞子から作製したプロトプラストに、3 µg GFP 発現プラスミドをエレクトロポレーション法で導入し、電圧や buffer などの条件を検討した。当研究室で開発されたハイスループットな導入系を利用して、約 300 条件を比較検討した結果、プロトプラストをマンニトール、MgCl₂ のバッファーに溶解し、900 V の電圧をかけた後、ソルビトール、Tris-HCl (pH 7.5)、25 mM CaCl₂ のバッファー (STC buffer) を加え 24 時間培養することで、最も高いプラスミド DNA 導入効率 (3~10%程度) が得られた。さらにこの最適条件を用いて、GFP タンパク質を用いてエレクトロポレーションを行うと、プロトプラストへの導入が確認された。しかし、導入後約 2 時間で GFP 蛍光が確認できなくなったため、導入した GFP が速やかに分解されることが示唆された。そこで、タンパク質の分解を押さえるためにバッファーを改良することで、48 時間経過しても GFP 蛍光が確認された。

Development of the electroporation method for a model mushroom *Coprinopsis cinerea*

Hirofumi Chiba¹, Hiroko Suzuki¹, Kiyomi Okahisa², Sigeo S Sugano², Yuriko Osakabe², Keishi Osakabe²

(¹Life Tech., Tokushima Univ., ²CCAIC, Tokushima Univ.)

P-20

麹菌のアミラーゼ遺伝子を制御する転写因子 AmyR 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)

AmyR はデンプン分解酵素遺伝子群を直接制御する転写因子である。これまでの研究で我々は 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存在下で速やかに核移行することを明らかにした。このことからマルトースから生じるイソマルトースが AmyR の核移行を活性化する誘導基質である可能性が考えられた。一方で、グルコース制御因子 (CreA) 破壊株においてはグルコース存在下でもアミラーゼ遺伝子が発現することを明らかにした (1)。

そこで本研究では、0.1% のグルコース、マルトース、イソマルトースを添加して AmyR が核移行するのに要する時間を比較した。また極めて低濃度の炭素源を添加し AmyR が核移行するのに要する濃度についても比較した。0.1% 炭素源添加時における細胞内局在解析の結果、マルトース・イソマルトースでは 20 分以内に核移行が観察されたのに対し、グルコースでは 45 分後に観察された。次に、低濃度炭素源添加時における細胞内局在を解析した。その結果、マルトース・イソマルトースは 0.3 µM で AmyR の核移行が観察された。一方でグルコースでは 0.3 µM では核移行は見られず、3 mM で核移行が観察された。以上の結果から、グルコースは AmyR の核移行を誘導するが、その働きはマルトース・イソマルトースを比べ微弱であることが明らかになった。現在、グルコースアナログを添加時の AmyR の細胞内局在についても解析中である。

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) Suzuki *et al.*, Appl Microbiol Biotechnol. 99: 1805-1815 (2015)

Intracellular localization of AmyR involved in amylase gene expression of *Aspergillus oryzae* in the presence of various carbon sources

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

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

P-21 (O-20)

糸状菌多糖分解酵素生産におけるキメラ転写因子の利用技術開発

山口楓絵, 國武絵美, 金丸京子, 木村真, 小林哲夫 (名大院・生命農)

【目的】 糸状菌の多糖分解酵素の生産は、高分子基質に由来する低分子誘導物質とこれに応答する特異的転写活性化因子に依存して誘導生産される。それぞれの転写因子の標的遺伝子群はN末端側に存在するDNA結合ドメイン(DBD)により決定され、誘導物質への応答や転写活性化は残りのドメイン(調節ドメイン; RD)が担う。本研究では、DBDの入れ替えによる誘導物質と標的遺伝子群との対応関係の改変を目指した。

【方法・結果】 モデル糸状菌である *Aspergillus nidulans* を用い、転写制御メカニズムについて知見の多い AmyR(アミラーゼ), XlnR(キシラナーゼ), ManR/ClrB(セルラーゼ・マンナーゼ)を対象として、DBDとRDの由来が異なる各種キメラ転写因子を構築した。これまでに AmyR::XlnR によるキシランに応答したアミラーゼ生産に成功している。今回は XlnR::AmyR, ManR::AmyR, ManR::XlnR について検討した。その結果、AmyRのRDを融合した転写因子は機能しなかったが、ManR::XlnR 導入株でキシランに応答した顕著なセルラーゼ生産の増強が確認された。本菌株におけるキシラナーゼ生産量は野生株と同等であるため、単一条件でのセルラーゼとキシラナーゼの同時生産が可能となった。現在 ManR RD についても検討を加えている。また、VP16の転写活性化ドメインを用いた構成的活性型転写因子の構築についても併せて報告する予定である。

本研究は農林水産省「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。

Chimeric transcription factors for process improvement in production of fungal polysaccharide-degrading enzymes

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

P-22

担子菌 *Coprinopsis cinerea* におけるセルソーティングの試み

菅野茂夫¹, 鈴木博子², 千葉洋史², 刑部祐里子¹, 刑部敬史¹ (1 徳島大・農工商, 2 徳島大・生命テクノ)

担子菌類の子実体形成において、時空間的に遺伝子発現変動を調べるためには、組織レベルで切り分けて分析するだけでなく、マーカー遺伝子を用いた細胞レベルでの分画が重要である。細胞壁をもつ多細胞生物におけるセルソーティングを用いた分画は、植物の根・茎頂では知られているものの、菌類子実体で利用された例はない。我々は、*Coprinopsis cinerea* を用い、セルソーティングを試みた。

まず、PEG法を使用してGFP発現ベクターを導入した *C.cinerea* プロトプラストを、浸透圧調整剤中に保持したまま、Bio-Rad社のセルソーターS3eを用いて、細胞分析を行った。流速8 $\mu\text{L}/\text{min}$ において、GFP蛍光を発する胞子を含む液滴と、蛍光を発しない胞子を含む液滴に分画できた。本条件でセルソーティングを行うと、30分間で 5×10^4 細胞のGFP蛍光を示す細胞が分画でき、回収した細胞をMYG培地で培養すると、 $1/10^3$ 程度の割合で再生し、これら再生個体はGFP発現を保持していた。次に当研究室で開発したエレクトロポレーション法を用いて、一過的にGFPタンパク質をプロトプラストに導入し、セルソーティングを行った。PEG法でGFP発現ベクターを導入した場合とは異なり、エレクトロポレーション法でGFPタンパク質を導入したプロトプラストでは、液滴の散乱光が著しく変化し、適切なドロップレットが作製されなかった。液滴の散乱光は、時間を経るごとに変化していたため、エレクトロポレーションを行ったプロトプラストは、時間と共に凝集していく性質を持つと考えられた。以上の知見を踏まえ、セルソーターを用いた子実体形成の解析や、ゲノム編集個体の効率的取得の可能性について議論する。

Exploring application of cell sorting analyses of *Coprinopsis cinerea*

Shigeo S Sugano, Hiroko Suzuki, Hirofumi Chiba, Yuriko Osakabe, and Keishi Osakabe

(CCAIC, Tokushima Univ., Life Tech., Tokushima Univ.)

P-23 (O-19)

糸状菌型 CRISPR/Cas システムを用いたイネいもち病菌における高効率標的遺伝子ノックアウト・ノックイン・塩基置換導入法

荒添貴之^{1,2}, 三好健之介², 大和澄², 小川哲央², 大里修一², 有江力³, 桑田茂² (¹神戸大院工・²明治大院農・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。特に細菌の獲得免疫機構を応用した CRISPR/Cas システムは、簡便かつ高効率に DSB を導入できる人工ヌクレアーゼとして多くの生物種においてその有用性が認められてきている。我々は、植物病原糸状菌であるイネいもち病菌をモデルとして、CRISPR/Cas システムの糸状菌への最適化をおこなった。内生遺伝子を標的とした CRISPR/Cas ベクターと薬剤耐性遺伝子を含む破壊ベクターとを共導入することにより、標的遺伝子ターゲティング効率を大幅に上昇 (36.1-100%) させることに成功した。また、シングルクロスオーバーを人為的に誘導することにより、標的ゲノム領域への高効率塩基置換導入およびノックインが可能であることを確認した。本システムは多くの糸状菌に应用可能であることが予想され、複数遺伝子の同時改変や遺伝子サイレンシング、エピゲノム改変等の基盤技術となることが期待される。

Highly efficient targeted gene knock-out, knock-in and base substitution using fungal CRISPR/Cas system in the rice blast fungus

Takayuki Arazoe^{1,2}, Kennosuke Miyoshi², Tohru Yamato², Tetsuo Ogawa², Shuichi Ohsato², Tsutomu Arie³, Shigeru Kuwata²

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

P-24 (O-11)

糸状菌の先端生長におけるアクチンケーブルと微小管の協調的重合制御

Anna Bergs¹, Yuji Ishitsuka², G. Ulrich Nienhaus², 竹下 典男^{1,3} (¹Dept of Microbiol, ²Inst of Applied Physics, Karlsruhe Institute of Technology (KIT), ³筑波大学生命環境系)

The highly polarized growth of filamentous fungi requires a continuous supply of proteins and lipids to the hyphal tip. This transport is managed by vesicle trafficking along the actin and microtubule cytoskeletons and their associated motor proteins. Although actin cables originating from the hyphal tip are essential for hyphal growth, and specific marker proteins to visualize the actin cables have been developed in filamentous fungi, the exact organization and dynamics of actin cables have remained elusive. Here we visualized actin through tropomyosin (TpmA) and Lifeact fused to fluorescent proteins in *Aspergillus nidulans* and studied actin dynamics and the interrelation of actin cables and microtubules. Comparison of TpmA and Lifeact as markers revealed that high concentrations of Lifeact affect the actin dynamics. Visualization of actin and microtubules at the same time revealed timely and spatially cooperated polymerization and depolymerisation between the two cytoskeletons. In addition, Ca²⁺ oscillation was visualized at hyphal tips using the Ca²⁺ sensor, cameleon. The frequency of this oscillation correlated with that of actin cable disassembly and microtubules reaching hyphal tips. Our results provide new insights into the molecular mechanism of ordered polarized growth regulated by actin cables and microtubules.

Cooperative polymerization between actin cables and microtubules in *Aspergillus nidulans*

Anna Bergs¹, Yuji Ishitsuka², G. Ulrich Nienhaus², and Norio Takeshita^{1,3}

(¹Dept of Microbiol, ²Inst of Applied Physics, Karlsruhe Institute of Technology (KIT), ³Faculty of Life and Environmental Sciences, Univ. Tsukuba)

P-25 (O-12)

担子菌ヒトヨタケにおいて、2つのクロマチン構造変換因子をコードする *Cc.snf5* と *Cc.arp9* の変異は、互いに異なる影響によってキノコ発生開始不全を引き起こす

中沢威人^{1,2}, 安藤友貴², 秦武史², 中堀清² (¹京大・院農,²岡山大・院自然)

我々は以前、真正担子菌ウシグソヒトヨタケ (*Coprinopsis cinerea*) において、クロマチン構造変換複合体 SWI/SNF の構成因子をコードする *Cc.snf5* 遺伝子の変異が、キノコ発生開始不全およびクランプ細胞形成不全を引き起こすことを発表した (Ando *et al.*, 2013)。このことは、*Cc.Snf5* が A 経路上で機能していることを示唆していた。これに関連して、本研究では、新たに分離したキノコ発生開始不全をきたす突然変異体 Xba43 の原因変異遺伝子が、SWI/SNF および別の複合体 RSC 両方の構成因子であり、アクチン様タンパク質をコードする *Cc.arp9* であることを明らかとした。本変異体では、無性胞子の生産抑制と発芽率・若干の温度感受性といった変異表現型が観察されたが、*Cc.snf5* 変異体のようなクランプ形態形成異常は観察されなかった。幾つかの追加調査の結果、*Cc.Snf5* については A 経路上で機能していることが改めて裏付けられた一方、*Cc.Arp9* に関しては A 経路上で機能していることを支持する結果は一つ得られなかった。

一方、今年発表した本菌におけるマーカーリサイクル法 (Nakazawa and Honda, 2015) を利用して *Cc.arp9/Cc.snf5* の二重遺伝子破壊株を作成し、*Cc.snf5* 変異と *Cc.arp9* 変異では、相反する影響を生じた無性胞子の生産 (A 経路 OFF および *Cc.snf5* 変異で活性化され、*Cc.arp9* 変異では“A 遺伝子と独立した影響”で不活性化される) に関するエピスタシス解析を行った。これらの結果と、過去のヒトヨタケにおける遺伝学研究知見を踏まえて、*Cc.arp9* 変異がどのような影響でキノコ発生開始不全を生じているのかを議論する。本研究の一部は、岡山大学・鎌田堯教授 (当時) の指導のもとで行った。

Cc.Arp9*, a putative nuclear actin-related protein, is involved in developmental regulation in *Coprinopsis cinerea

Takehito Nakazawa^{1,2}, Yuki Ando², Takeshi Hata², Kiyoshi Nakahori²

(¹Grad. School of Agr. of Kyoto Univ., ²Grad. School of Nat. Sci. of Okayama Univ.)

P-26

麹菌のミトコンドリアに局在するホスホリパーゼ A₂ AoPlaA の機能解析

伊澤翔, 高柳亜由美, 駒井紀之, 北本勝ひこ, 有岡学 (東大院・農生科・応生工)

グリセリン脂質の sn-2 位のエステル結合を加水分解し、脂肪酸と 1-アシルリゾリン脂質を生成する酵素はホスホリパーゼ A₂ (PLA₂) と総称される。このうち細胞質型 PLA₂ (cPLA₂) は、哺乳類ではアラキドン酸を膜リン脂質から遊離することで脂質メディエーターであるエイコサノイド類生成を誘起し免疫応答に関与することが知られている。我々は麹菌 *Aspergillus oryzae* のゲノム中に cPLA₂ と約 40% のアミノ酸配列上の相同性を有する唯一の cPLA₂ 様タンパク質遺伝子 *AoplaA* を見出し、その生理機能の解明を目指して研究を行ってきた。*AoPlaA* は、予想活性中心残基等は cPLA₂ と類似しているが、哺乳類 cPLA₂ が持つ、Ca²⁺ 依存的にリン脂質に結合する C2 ドメインを持たず、哺乳類 cPLA₂ とは働きが異なると考えられる。これまでの解析から、*AoPlaA* は N 末端にミトコンドリア局在シグナルを持ち、ミトコンドリア内膜と外膜の間の膜間スペースに局在すること、また *AoplaA* 高発現株では PE が特異的に減少し、特に長鎖脂肪酸からなる PE が大きく減少することが明らかとなっている。本研究では、*AoPlaA* の酵素学的性質及び生理機能をより詳細に検討した。まず、大腸菌で組換え生産した *AoPlaA* の各種リン脂質に対する分解活性を調べたところ、ホスファチジルエタノールアミン (PE) に対するホスホリパーゼ活性、1-アシルリゾ PE に対するリゾホスホリパーゼ活性が認められたが、ホスファチジルコリンなどのリン脂質に対してはほぼ作用しないことがわかった。また、予想活性中心残基のセリンをアラニンに置換した S266A 変異体は活性を失った。続いて麹菌 *AoplaA* 高発現株の生育が 15°C での培養でコントロール株に比べて弱く遅延することを見出した。S266A 変異体の高発現株では生育遅延が見られないため、*AoPlaA* 活性が過剰に働くことで生育遅延が起これると考えられた。以上の結果から、*AoPlaA* はミトコンドリア膜間スペースに局在し、PE を特異的に分解する酵素であることが示唆された。

Functional analysis of mitochondria-localized phospholipase A₂ *AoPlaA* in *Aspergillus oryzae*

Sho Izawa, Ayumi Takayanagi, Noriyuki Komai, Katsuhiko Kitamoto, Manabu Arioka

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

P-27

麹菌 *A. oryzae* の菌核形成に関与する転写因子の探索

中村英淳¹, 丸山潤一¹, 小川真弘², 小山泰二², 有岡学¹, 北本勝ひこ¹

(¹東大院・農生科・応生工,²野田産研)

【目的】 菌核は、一部の糸状菌で観察される耐久性の休眠構造であり、*Aspergillus flavus* などではその内部に有性生殖器官が形成されることが報告されている。日本酒、醤油、味噌などの製造に利用されている麹菌 *Aspergillus oryzae* においては、有性世代が見つかっていない。その理由の一つとして、野生株 RIB40 を含む一部の株では菌核形成能が低く、その他大部分の株は菌核を全く形成しないことが考えられる。一方、*A. oryzae* では basic helix-loop-helix 型転写因子 ScIR と EcdR が菌核形成を、それぞれ正と負に制御することが明らかになっている。しかし、菌核形成に関与する転写因子はあまり多く知られていない。そこで本研究では、*A. oryzae* において菌核形成に関与する転写因子の探索を試みた。

【方法・結果】 *A. oryzae* RIB40 株に由来する転写因子破壊株ライブラリー約 400 株より、菌核形成能が変化したものをスクリーニングした。その結果、菌核の数が減少したものが約 50 株見出だされ、これらは菌核形成を正に制御する ScIR の欠損株と同様の表現型であった。また、反対に菌核の数が増加したのも約 50 株見出だされ、これらは菌核形成を負に制御する EcdR の欠損株と同様の表現型であった。以上より、*A. oryzae* において菌核形成に関与する転写因子の候補を選び出すことに成功した。これらの中には他の糸状菌において機能未知のものも含まれていた。現在、菌核形成に関与する転写因子について、それぞれで知られている機能（有性生殖、無性生殖、窒素源代謝、炭素源代謝、二次代謝）との関連を解析している。

Screening for transcription factors involved in sclerotia formation of *A. oryzae*

Hidetoshi Nakamura¹, Jun-ichi Maruyama¹, Masahiro Ogawa², Yasuji Koyama², Manabu Arioka¹, Katsuhiko Kitamoto¹

(¹Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, ²Noda Inst. Sci. Res.)

P-28 (O-13)

BiFC 法による麹菌 *A. oryzae* 実用株の細胞融合能および不和合性の解析

岡部知弥¹, 中村英淳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)

糸状菌は有性生殖時だけでなく、栄養生長時にも細胞融合を行うことが知られている。我々は最近、麹菌 *Aspergillus oryzae* において BiFC (bimolecular fluorescent complementation) 法により細胞融合を可視化する方法を確立し、野生株である RIB40 株が細胞融合能をもつことを示した¹⁾。また、他の糸状菌では、特定の株の組み合わせで融合体として存在できない不和合性という現象が知られている。*A. oryzae* には多数の実用株が存在するが、それらの細胞融合能および不和合性に関する知見はほとんどない。本研究では、BiFC 法を利用して *A. oryzae* の実用株の細胞融合能および不和合性を解析した。

A. oryzae の実用株のうち系統および用途を考慮して株を選び、BiFC 法により細胞融合能の解析を行った。まずは、同じ株どうして混合培養を行ったところ、ほとんどの場合で BiFC の蛍光が観察され、多くの株が細胞融合能を有することがわかった。また、異なる株どうして混合培養を行ったところ、ほとんどの場合で細胞融合が観察されず、不和合性である可能性が考えられた。不和合性についてさらに検討するため、混合培養の実験で細胞融合が観察されなかった株の組み合わせにおいて、プロトプラスト化して強制的に融合させ、融合体の有無を観察する実験を行った。その結果、BiFC の蛍光を発する菌糸が観察されず、不和合性であることがより強く示唆された。現在、*A. oryzae* の実用株の系統や用途と、細胞融合能および不和合性の関連を検討している。

1) 岡部ら 第 14 回糸状菌分子生物学コンファレンス要旨集 p.49 (2014)

Analysis of cell fusion and incompatibility by BiFC in *Aspergillus oryzae* industrial strains

Tomoya Okabe¹, Hidetoshi Nakamura¹, Kazuhiro Iwashita², Ikuo Fujii³, Jun-ichi Maruyama¹, Katsuhiko Kitamoto¹

(¹Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, ²NRIB, ³Osaka Pref. Univ.)

P-29

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* におけるエンドサイトーシス関連 AAA ATPase AipA と相互作用する因子の解析

柿本健一, 竹川薫, 樋口裕次郎 (九州大・農)

真核生物に広く保存された機構であるエンドサイトーシスは、モデル真核微生物である出芽酵母等ではその分子機構の解析が進んでいるもの、黄麹菌 *Aspergillus oryzae* を含む糸状菌では詳細な分子機構は未だ明らかになっていない。これまでに黄麹菌において、エンドサイトーシス関連因子である AoAbp1 と相互作用するタンパク質として AipA を同定している¹⁾。AipA は推定 AAA ATPase であるが、その機能に関してはほとんどわかっていない。そこで本研究では、AipA を bait に、黄麹菌の cDNA ライブラリーを prey にして、yeast two-hybrid (YTH) 法によるスクリーニングを実施した。その結果、いくつかの相互作用因子の候補を見出したが、現在までのところ再現性は確認できていない。出芽酵母においては、AipA のオルソログとして Sap1p と Yta6p が存在し、共にエンドサイトーシス関連因子の Las17p とエイソソーム構成要素の Pil1p と相互作用することが報告されている。そこで YTH 法によって、AoLas17, AoPil1 と AipA の相互作用を調べた。その結果、AoPil1 と AipA の相互作用が確認された。さらに、蛍光顕微鏡解析により、AoPil1-EGFP は細胞膜近傍でパッチ状に局在していた。EGFP-AipA は、主に菌糸先端部の細胞膜近傍にパッチ状に局在することから、AipA と AoPil1 の細胞膜近傍での相互作用が示唆された。今後は AipA, AoPil1 の共局在解析や、遺伝子二重破壊株の作製を行うと同時に、相互作用以外の観点による AipA を中心とした機能解析を計画している。

1) Higuchi et al. (2011) FEMS Microbiol Lett 320, 63-71.

Analysis of interacting proteins with the endocytosis-associated AAA ATPase AipA in *Aspergillus oryzae*

Ken-ichi Kakimoto, Kaoru Takegawa, Yujiro Higuchi

(Dept. of Biosci. Biotechnol., Kyushu Univ.)

P-30 (O-14)

ウリ類炭疽病菌の染色体タギング法を用いた細胞周期およびGTPase CoTem1局在の解析

深田史美, 久保康之 (京都府大院・生環)

ウリ類炭疽病菌における Rab GAP 複合体 CoBub2/CoBfa1 が GTPase CoTem1 を介して G1/S 期の進行を制御し、宿主の病原性に関与することを報告してきた。今回、糸状菌において初となる LacO/LacI-GFP システムによる染色体タギング法を本菌に導入し、G1 期から S 期への移行時期を細胞学的に検討した。この系は、大腸菌由来の DNA 結合能をもつ LacI タンパク質に GFP を付加し、LacI の結合配列である LacO のタンデムリピート配列をゲノムに挿入することで染色体を可視化する手法である。蛍光顕微鏡観察の結果、野生株では培養 2 時間後に孢子発芽に伴って S 期へ移行する細胞の頻度が増加したのに対し、*cobub2* 破壊株では培養 1 時間までに半数の未発芽孢子において S 期が開始された。そこで S 期への移行と CoBub2/CoBfa1 が制御する CoTem1 の関与を検討するために、付着器形成過程における細胞周期と CoTem1 の局在の関連性を評価した。その結果、CoTem1 蛍光は G1 期に核膜上に 1 点検出され、S 期に倍加し、核分裂期には紡錘体の両末端に局在した。よって、CoTem1 は紡錘体極体に局在し、細胞周期に応じて局在様式を変化させると考えられた。以上より、ウリ類炭疽病菌は未発芽孢子段階において CoBub2/CoBfa1 による G1 期から S 期への移行停止制御を受け、孢子発芽と同調化して CoTem1 の局在変化を伴い S 期へ移行することが示唆された。

Analyses of cell cycle using chromosome tagging system and localization of GTPase CoTem1 in *Colletotrichum orbiculare*.

Fumi Fukada and Yasuyuki Kubo

(Life and Environmental Sciences, Kyoto Prefectural Univ.)

P-31

麹菌 *A. oryzae* の分生子および菌核形成における光応答関連遺伝子の機能解析

川田純毅¹, Helge M. Dietrich¹, 渡邊泰祐², 外山博英³, 丸山潤一¹, 北本勝ひこ¹

(¹東大院・農生科・応生工, ²日大院・生資科・生資利用, ³琉球大農・亜熱生資)

麹菌 *Aspergillus oryzae* では光照射により分生子形成が抑制されるが、これは他の多くの糸状菌とは正反対の特異な光応答である。最近我々は、*A. oryzae* の光依存性の分生子形成抑制に青色光受容体 AoLreA が必要であることを明らかにしたが、その作用機序についてはほとんど不明である。菌核は菌糸が凝集してできる構造であり、*Aspergillus flavus* では菌核の内部に有性生殖器官が形成されることが報告されている。*A. oryzae* の一部の株では菌核を形成することができるが、菌核形成に対する光照射の影響について解析は行われていない。本研究では、光応答関連遺伝子の分生子および菌核形成における機能解析を行うことにより、*A. oryzae* の光応答の分子機構を明らかにすることを目的とした。

暗所および光照射下で *A. oryzae* 野生型株の培養を行い、菌核の形成効率を調べた。その結果、暗所では菌核が形成されたが、光照射下で菌核形成は抑制された。同様の条件で、*AolreA* 遺伝子破壊株の培養を行った結果、暗所に加え光照射下でも菌核が形成された。*A. nidulans* において LreB は LreA と協同して光応答を制御することが報告されていることから、*A. oryzae* の相関タンパク質 AoLreB についても機能解析を行った。*AolreB* 遺伝子破壊株では、*AolreA* 遺伝子破壊株と同様に、光照射下でも分生子および菌核が形成された。これらの結果から、*A. oryzae* における光依存性の分生子および菌核の形成抑制には、AoLreA と AoLreB が必要であることが示された。

Functional analysis of light-response related genes in conidiation and sclerotia formation of *Aspergillus oryzae*

Junki Kawada¹, Helge M. Dietrich¹, Taisuke Watanabe², Hirohide Toyama³, Jun-ichi Maruyama¹, Katsuhiko Kitamoto¹

(¹Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, ²Dept. Biores. Util. Sci., Grad. Sch. Biores. Sci., Nihon Univ., ³Dept. of Biosci. Biotech., Fac. of Agr., Univ. of Ryukyus)

P-32

糸状菌の Fus3 オルソログと相互作用するタンパク質による細胞融合制御機構

片山琢也, 丸山潤一 (東大院・農生科・応生工)

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の接合は細胞融合のモデルとしてよく研究されており、mitogen-activated protein キナーゼ Fus3p とその下流の転写因子 Ste12p が中心的に働くことが示されている。一方で、糸状菌では有性生殖時だけでなく栄養生長時にも細胞融合が起こることが知られている。当研究グループではこれまでに、麹菌 *Aspergillus oryzae* の *FUS3* オルソログ (*Aofus3*) 破壊株では細胞融合が見られないことを示し¹⁾、TAP タグを用いたアフィニティー精製により AoFus3 と相互作用するタンパク質として、Ste12p オルソログ AoSte12 とともに FipC (Fus3-Interacting Protein C) を同定した。FipC は機能未知のタンパク質であり、子囊菌門に属する糸状菌に保存されているが、酵母には保存されていない。本研究では、糸状菌の Fus3 オルソログによる細胞融合の制御機構を明らかにするため、*A. oryzae* の AoFus3, FipC, AoSte12 の機能的関連について解析を行った。

Yeast two hybrid 法により AoFus3, FipC, AoSte12 の相互作用について検討したところ、いずれの組み合わせにおいても相互作用が確認された。次に、*fipC* 破壊株と *Aoste12* 破壊株にウリジン/ウラシルまたはアデニン要求性を付与し、これらの株の栄養要求性の相補を指標として細胞融合能を定量的に解析した。その結果、*Aoste12* 破壊株では野生型株の 1/3 程度、*fipC* 破壊株では 1/60 程度まで細胞融合能が低下した。また、FipC に EGFP を融合して細胞内局在を観察した結果、核に局在することが示された。以上の結果から、*A. oryzae* では AoFus3, FipC, AoSte12 が複合体を形成し、細胞融合を制御している可能性が考えられた。

1) Tsukasaki et al. (2014) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 78:1254–62

Regulation mechanism of cell fusion by Fus3 ortholog and its interacting proteins in filamentous fungi

Takuya Katayama, Jun-ichi Maruyama (Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo)

P-33

麹菌 *A. oryzae* における AoFus3 と相互作用する RhoGAP タンパク質 FipB の標的解析

原田堅伍, 矢萩大貴, 丸山潤一, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)

【目的】 麹菌 *Aspergillus oryzae* は多細胞生物であり, 隔壁にある小さな穴である隔壁孔を通じて細胞間連絡を行う。一方で, この細胞間連絡は, 菌糸が損傷すると隣接する細胞に溶菌が伝播する危険をはらんでいる。糸状菌特異的なオルガネラ Woronin body は隔壁孔をふさぎ溶菌の伝播を防ぐ機能を有するが, 他の因子の関与については解析が進んでいない。我々はこれまでに, MAP キナーゼのひとつである AoFus3 およびその相互作用タンパク質 FipB が隔壁孔を囲む局在を示し, 溶菌の伝播を防ぐ機能に関与することを報告している。FipB は, Rho GTPase を不活性型 (GDP 結合型) にする RhoGAP (Rho GTPase activating protein) ドメインをもつ。本研究では FipB の機能を解析するために, 標的となる Rho GTPase への作用を解析した。

【方法と結果】 相同性をもつ他の RhoGAP タンパク質での知見から, FipB は AoCdc42 および AoRac1 に対し RhoGAP として作用すると予想した。酵母ツーハイブリッド解析の結果, FipB は活性型 AoCdc42 と相互作用することが確認されたが, 活性型 AoRac1 とは相互作用を示さなかった。また AoCdc42 および AoRac1 の局在を観察したところ, 野生型株では隔壁孔周辺に顕著な局在はみとめられなかったが, *fipB* 破壊株や *Aofus3* 破壊株において AoCdc42 のみ隔壁孔を囲む局在がみられるようになった。また, FipB の RhoGAP 活性欠損変異発現株において, AoCdc42 は *fipB* 破壊株と同じく隔壁孔を囲む局在を示した。これらの結果から, *A. oryzae* では FipB が AoCdc42 に対し特異的に RhoGAP として作用することが示唆され, その作用は AoFus3 によって制御されている可能性が考えられた。

Investigation of target GTPase of FipB, a RhoGAP protein interacting with AoFus3, in *A. oryzae*

Kengo Harata, Daiki Yahagi, Jun-ichi Maruyama, Katsuhiko Kitamoto

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

P-34

麹菌における α -1,3-グルカン生合成関連遺伝子群の 5 重破壊株における培養性状と物質生産性の評価

宮澤拳¹, 吉見啓², 張斯来¹, 佐野元昭³, 五味勝也¹, 阿部敬悦^{1,2} (¹ 東北大院・農・生物産業創成, ² 東北大・未来研, ³ 金工大・ゲノム研)

糸状菌を用いた物質生産では, 液体培養において菌糸が絡まり合い高密度培養が達成できていないことが大きな課題である。当研究室において作製されたモデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* の α -1,3-グルカン合成酵素 (AGS) 遺伝子のうち *agsB* 破壊株 (Δ *agsB*) は, 菌糸が液体培地中に均一分散した¹⁾。一方, 麹菌 *A. oryzae* では AGS 遺伝子の 3 重破壊株 (Δ *agsA* Δ *agsB* Δ *agsC*) でも, 菌糸は完全分散せず小さな菌糸の塊を形成しながら生育した。最近, *A. nidulans* において, *agsB* 近傍の二つの α -アミラーゼ遺伝子 (*agtA*, *amyG*) の機能が解析され²⁾, *amyG* も菌糸分散性に関与していることが報告された。麹菌において *agtA*, *amyG* の機能は未知であり, 今回我々は, これらの遺伝子の菌糸分散性への寄与を解析することとした。まず, 麹菌の AGS 遺伝子 3 重破壊株に対して, *agtA*, *amyG* 遺伝子を破壊した 5 重破壊株 (Δ *agsA* Δ *agsB* Δ *agsC* Δ *agtA* Δ *amyG*) を作製した。次に, 野生株, 3 重破壊株および 5 重破壊株を用いて液体振盪培養試験を行ったところ, 5 重破壊株は野生株に比べ小さな菌糸の塊を形成したが, 3 重破壊株との差は見られなかった。このことから, 麹菌における菌糸分散性に *agtA*, *amyG* はほとんど影響しないと考えられた。現在, モデルタンパク質の高発現系を構築し 5 重破壊株の物質生産性について解析を進めている。

1) Yoshimi A., et al., PLoS ONE 8(1):e54893 (2013), 2) He X., et al., Mol. Microbiol., 91(3):579-595 (2014)

Growth characteristics and protein production of *Aspergillus oryzae* quintuple disruptants of the α -1,3-glucan-related genes under liquid culture conditions.

Ken Miyazawa¹, Akira Yoshimi², Silai Zhang¹, Motoaki Sano³, Katsuya Gomi¹, Keietsu Abe^{1,2} (¹ Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., ² NICHe, Tohoku Univ., ³ Kanazawa Inst. Tech.)

P-35

RNA-seq データを活用した糸状菌ゲノムアノテーションの高精度化解析

山岸秀規, 上村泰央 (株式会社ジナリスオミックス)

次世代シーケンサーの普及に伴って非モデル生物ゲノムの解析も盛んに行われるようになり、新規に配列決定したゲノムに対するアノテーションのニーズが高まってきている。特に RNA-seq データを活用したゲノムアノテーション手法は、近縁種のゲノム情報が利用できない生物種の遺伝子を精度良く予測できる手法として研究が進んでいる。代表的な手法として有名な Augustus は、複数のエビデンスデータをヒントとして利用できる *Ab initio* 遺伝子予測プログラムであり、その予測精度の高さが、さまざまな生物種において実証されてきている。しかし、Augustus を始めとした多くのアノテーションプログラムは、主にヒトのような高等生物ゲノムを対象に開発されているため、イントロン長が短く、遺伝子間で UTR 領域のオーバーラップの頻度が少ない糸状菌ゲノムに対しては、複数の遺伝子を一つの遺伝子として予測してしまうような誤りを起こしやすいことがわかっている。

我々は複数のアルゴリズム/エビデンスデータを組み合わせることによってゲノムアノテーションの精度を向上させる最新の手法に着目し、特に RNA-seq データを活用した糸状菌ゲノムアノテーションの高精度化解析についてさまざまな手法の比較検討を行ったので、その結果について報告する。

High accuracy methods for fungal genome annotation using RNA-seq

Hidenori Yamagishi, Yasuo Uemura

(Genaris Omics, Inc.)

P-36

酵母誘導発現系によるマイコウイルス由来抗菌性タンパク質の生育阻害評価の試み

月本竣司, 木村優里, 一之瀬俊, 福原敏行, 森山裕充 (農工大・院農・生物制御)

我々は、パン酵母異種発現系を利用することにより、植物病原糸状菌に生育阻害をもたらすマイコウイルス由来するタンパク質から新規な抗菌性タンパク質を探索し評価してきた。イネいもち病菌に生育不良をもたらす、マイコウイルス MoCV1-A (*Magnaporthe oryzae chrysovirus 1 strain A*) がコードする ORF4 (812 aa) を、パン酵母細胞内で恒常高発現ベクター (*TDH3pro*, 2 μ ori) で発現させると、コントロールベクターと比較した際に、濁度 (OD₆₀₀) と生菌細胞数に差が生じ、生育阻害効果が確認された。イネいもち病菌の別株から見つかった MoCV1-B は、MoCV1-A と近縁種であり、2 種のウイルス間の ORF4 の同一性は 89% を示す。MoCV1-B 感染株は、アルビノ化、分生子形成抑制などより激しい生育不良を示すことから、MoCV1-B ORF4 (811 aa) はパン酵母に対して高い生育阻害効果を持つことが予想された。しかし、MoCV1-B ORF4 を恒常発現させて、濁度と生菌細胞数を測定したところ、顕著な差が見られなかった。そこで、ガラクトース誘導高発現ベクター (*GALIpro*, 2 μ ori) 下で MoCV1-B ORF4 を酵母細胞内で誘導発現させて、MoCV1-B ORF4 の生育阻害効果を調査した。その結果、MoCV1-B ORF4 発現細胞では、コントロールベクターと比較して、濁度に差は見られなかったが、生菌細胞数は 5 分の 1 となり、恒常発現プロモーター下の発現では、顕れなかった生育阻害効果を見出すことが出来た。今後、恒常発現プロモーターでは差が生じなかった MoCV1-A の他の ORF や、MoCV1-A 近縁種ウイルスの各 ORF についても調査していく。

Evaluation of Antifungal activity in Proteins encoded by Mycoviruses using Yeast inducible promoter expression system

Shunji Tsukimoto, Yuri Kimura, Shun Ichinose, Toshiyuki Fukuhara, Hiromitsu Moriyama (Div. of Bioregulation and

Biointeraction, Tokyo Univ. of Agriculture and Technology)

P-37

麹菌 *Aspergillus oryzae* の金属プロテアーゼ *insulysin* の機能解析

鈴木遥香, 吉永良平, 竹内道雄, 山形洋平 (東京農工大・応生化)

【背景・目的】

Aspergillus oryzae は EST 解析及び全ゲノム解析によりヒト *insulysin* の ortholog を 3 つ有していることが推定された。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* における ortholog, Ste23 は α -prohormone の成熟化に関与し、ヒト *insulysin* と類似した酵素化学的性質を有する事が報告されている。一方、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* における ortholog, Iph1 をコードする *iph1* 遺伝子の欠損は野生株より高い ER ストレス耐性を誘導する事が報告されている。しかし *A. oryzae* の 3 つの ortholog 酵素の機能についてこれまで報告はない。本研究ではこれらの酵素をコードする遺伝子 *insA*, *insB*, *insC* の各遺伝子欠損株を作製し、欠損株の表現型を比較する事で各酵素の生体内での機能を明らかにすることを目的としている。

【方法・結果】

A. oryzae RIB40 $\Delta pyrG \Delta ligD$ 株をホストとし、*pyrG* 遺伝子を選択マーカーとして *insA*, *insB*, *insC* 各遺伝子欠損株を作製した。作製が完了した $\Delta insB$ 株及び $\Delta insC$ 株について野生株との表現型の比較を行った。その結果、Czapek-Dox 寒天培地上では $\Delta insC$ 株の分生子量が野生株の約半分に減少した。ER stressor としてツニカマイシンを添加した Czapek-Dox 寒天培地上では、野生株のコロニー直径が顕著に減少したのに対し、 $\Delta insB$ 株及び $\Delta insC$ 株ではそのコロニー直径の減少に回復が見られた。さらに、 $\Delta insB$ 株では分生子量が増加し、 $\Delta insC$ 株では Czapek-Dox 培地の時に野生株に対して半分に減少した分生子量が回復した。

以上の事から、*A. oryzae* の *InsB* 及び *InsC* は *S. pombe* *Iph1* と同様に ER ストレスに関与する可能性が示唆された。

Analysis on Physiological functions of insulysins in *Aspergillus oryzae*.

Haruka Suzuki, Ryohei Yoshinaga, Michio Takeuchi, Youhei Yamagata

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

P-38

麹菌における核の自食機構ヌクレオファジーの解析

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)。核全体を分解することは、*A. oryzae* が細胞内に複数の核を持つからこそ可能である。オートファゴソーム膜が囲い込む形での核全体の分解は、いままでのところ *A. oryzae* で報告されているのみであり、その生理学的意義や機構などには未解明な部分が多い。本研究では、*A. oryzae* におけるヌクレオファジーの解析を目的として、ヌクレオファジーに関連する遺伝子を探索した。

【方法・結果】 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手法である Cleavage assay を核質に局在するヒストン H2B-EGFP を用いて行った。その結果、核質がオートファジー依存的に液胞に取り込まれるのを検出することができた。この手法を用いて、オートファゴソーム形成に必須でありヌクレオファジーに関与する *AoAtg8* との相互作用が yeast two-hybrid 法によって予想される 5 種類の遺伝子の破壊株においてヌクレオファジーの活性が変化するかを調べている。また、選択的オートファジーに関わる遺伝子 *Aoatg11*, *Aoatg26* の破壊株においても同様にヌクレオファジー活性を解析中である。

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

Takahiro MITANI, Takashi KIKUMA, Katsuhiko KITAMOTO

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

P-39

Aspergillus fumigatus の推定ガラクトフラノース転移酵素遺伝子群の機能解析

¹李 秋実, ¹片渕 由佳子,¹浴野 圭輔,²竹川 薫,²後藤 正利,²岡 拓二 (¹崇城大院・工,²九大院・農)

【目的】 チャワントケ亜門に属する糸状菌の細胞壁を構成する糖鎖やタンパク質糖鎖中にはガラクトフラノース (Gal_f) が含まれている。我々は、これまでに肺アスペルギルス症の病原菌である *Aspergillus fumigatus* の AfGfsA が O-グリカンの末端 Gal_f 残基を合成する糖転移酵素であることを明らかにしてきた。一方、*A. fumigatus* のゲノム上には *AfgfsA* のホモログが7つ存在しており、それぞれ *AfgfsB*-*AfgfsH* と名付けた。*AfgfsA*-*AfgfsH* についてアミノ酸配列情報を基に進化系統樹を作成したところ、進化土屋 貴寛に2つのグループに大別できることが明らかになった。そこで、*AfgfsA* を含むグループを GT31-A、他方を GT31-B と名付けた。GT31-B に属する5つの遺伝子は、AfGfsA とは異なる結合様式や基質特異性を持つ Gal_f 転移酵素である可能性が高いと考えられる。本研究では、*A. fumigatus* の GT31-B に属する遺伝子の機能解析を目的とした。

【方法および結果】 *A. fumigatus* の GT31-B に属する5つの糖転移酵素遺伝子 (*AfgfsD*-*AfgfsH*) 全てについて遺伝子破壊株を取得した。取得した遺伝子破壊株は MM 培地、37°C の条件下で親株と同様のコロニー形態を示した。そこで、様々な薬剤を培地に添加し、培養温度を変化させたところ、60 µg/mL のカルコフルオロホワイト(CFW)を含む培地で42°Cにて培養した際に、 Δ *AfgfsD* および Δ *AfgfsE* 株が感受性を示すことが明らかになった。このことから、*AfgfsD* および *AfgfsE* 遺伝子が何らかの細胞壁糖鎖合成に関与している可能性が示唆された。CFW に感受性を示した *AfgfsD* と *AfgfsE* はアミノ酸レベル上で50.9%相同性を持つため、機能重複の可能性があると考えられた。そこで、*AfgfsD* および *AfgfsE* 遺伝子2重破壊株を作製した。作製した二重破壊株は、CFW に対して高い感受性を示した。現在、*AfgfsD* および *AfgfsE* 遺伝子機能を明らかにするため、大腸菌による AfGfsD 及び AfGfsE の発現系を構築し、解析を進めている。

Functional analysis of the putative galactofuranosyltransferase genes in *Aspergillus fumigatus*

¹Qiushi Li, ¹Yukako Katafuchi, ¹Keisuke Ekino,²Kaoru Takegawa,²Masatoshi Goto,¹Takuji Oka

(¹Grad. Sch. Eng., Sojo Univ.,²Fac. Agric., Kyushu Univ.)

P-40

Aspergillus nidulans におけるプロテインキナーゼ C の失活によるカルシウム応答シグナル伝達経路活性化機構の解析

山本雄己, 片山琢也, 堀内裕之 (東大院・農生科・応生工)

Aspergillus nidulans のプロテインキナーゼ C 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。これまでに当研究グループでは *pkcA* 温度感受性株を用いた PkcA 失活条件下における網羅的転写解析を行い、細胞内 Ca²⁺濃度の恒常性維持に関わる遺伝子 (CZD 遺伝子) 群の多くの mRNA が増加することを明らかにした。さらに、Ca²⁺に応答するシグナル伝達経路の転写因子である CrzA が PkcA の失活に伴い細胞質から核へ移行すること、この活性化には cell wall integrity 経路において PkcA の下流で機能する MAP キナーゼである MpkA が関与することを示した(1)。

Saccharomyces cerevisiae において、CrzA のオルソログである Crz1 の核移行は、そのリン酸化レベルで制御されていることが知られている。今回 CrzA のリン酸化レベルについて検討したところ、PkcA 失活条件下では CrzA の脱リン酸化が促進されることが明らかになった。さらに、浸透圧安定化剤の存在下では PkcA の失活条件下でも CrzA の核移行が起こらないことも明らかになった。これらのことから、PkcA 失活条件下では細胞壁または細胞膜にストレスがかかり、CrzA の脱リン酸化が促進されて核移行が起こり、CZD 遺伝子群の発現が上昇していることが示唆された。現在、PkcA 失活条件下での細胞内 Ca²⁺濃度の変化について検討中である。

(1) 片山ら, 第14回糸状菌分子生物学カンファレンス要旨集 p.55 (2014)

Activation of Ca²⁺ signaling pathway by *pkcA*-inactivation in *Aspergillus nidulans*

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

P-41

細胞壁多糖 α -1,3-グルカンが低減した麹菌をスクリーニングする方法の開発

吉見啓¹, 平間美沙², 坪田康信², 川上和義³, 阿部敬悦^{1,4} (東北大・未来研,²(株)一ノ蔵,³東北大院医,⁴東北大院農・生物産業創成)

我々は、モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* において、細胞壁多糖 α -1,3-グルカン (AG) 欠損株を作成し、細胞壁 AG が菌糸細胞間の接着に関与していることを明らかにしてきた。また、AG 欠損株のコンゴレッド (CR) 感受性が、細胞表層に露出した β -グルカン類 (BG) への CR の吸着に起因することを見出している (BG への CR の選択的吸着)。一般的に、菌類の BG には動物細胞に対する免疫賦活活性が備わっていることが知られている。このことから、発酵食品の製造に利用される麹菌において、細胞壁 AG が低減し BG が露出した菌株が作出できれば、免疫刺激性の強い麹菌開発へと繋がるのではないかと考えた。そこで本研究では、麹菌の AG 欠損株にも認められる CR 感受性を利用して、変異源処理した細胞集団から AG 低減株を選抜する方法 (CR 濃縮法) を開発することを目的とした。まず、麹菌の野生株、AG 欠損株を用いて CR 処理時の菌体の生育量を計測し、生育の鈍い AG 欠損株をフィルター濾過できることを明らかにした (CR 濃縮法の確立)。次に、実際に変異源処理した麹菌野生株に対して CR 濃縮法を適用し、複数の AG 低減候補株の分離に成功した。これらの AG 低減候補株について CR 感受性を評価したところ、野生株よりも高い CR 感受性を示すことが明らかになった。さらに、細胞壁 AG を定量分析したところ、野生株と比較して候補株の細胞壁では約 3 割 AG が低減していることが明らかになった。現在、これらの AG 低減株を用いてマウス免疫細胞に対する免疫刺激性を評価しており、その結果についても議論したい。

Screening method for isolation of the cell wall α -1,3-glucan-deficient mutants in *Aspergillus oryzae*.

Akira Yoshimi¹, Misa Hiramata², Yasunobu Tsubota², Kazuyoshi Kawakami³, Keietsu Abe^{1,4}

(¹NICHE, Tohoku Univ., ²Ichinokura Co., Ltd., ³Tohoku Univ. Sch. of Med., ⁴Grad. Sch. Agric. Sci. Tohoku Univ.)

P-42

麹菌 *A. oryzae* おけるオートファジー関連タンパク質 AoAtg26 の局在および機能解析

菊間隆志, 有岡学, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)

【目的】 麹菌 *Aspergillus oryzae* におけるオートファジー関連タンパク質 AoAtg26 はステロールグルコシルトランスフェラーゼドメインを有し、非選択的オートファジー、マイトファジー、ペキソファジーにおけるオートファゴソーム形成に関与する。メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* PpAtg26 はメタノール誘導性ペキソファジーに関与する一方、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* における Atg26 欠損株は表現型を示さないことから、Atg26 の機能は生物種間で多様であることが予想される。本研究は、AoAtg26 のオートファジーにおけるさらなる機能を解明し、オートファゴソーム形成機構に関する知見を得ることを目的とした。

【方法・結果】 *Aoatg26* 破壊株は気中菌糸および分生子形成が顕著に阻害される。これは *A. oryzae* におけるオートファジー欠損株に特徴的な表現型である。*Aoatg26* 破壊株に対して、AoAtg26 全長 (AoAtg26FL) および C 末端側の触媒ドメインを欠損した AoAtg26 (AoAtg26 Δ C) を発現させ相補実験を行った。その結果 AoAtg26FL 発現株は気中菌糸および分生子形成が野生株と同程度に回復した。一方、AoAtg26 Δ C 発現株では表現型の回復は認められなかった。このことから、AoAtg26 のグルコシルトランスフェラーゼ活性が機能に必要であることが示唆された。また、イネいもち病菌 *Magnaporthe oryzae* MoAtg8 に対する抗体を用いたウエスタン解析を行った結果、*Aoatg26* 破壊株では AoAtg8 のホスファチジルエタノールアミン (PE) 結合型 (AoAtg8-PE) と予想されるバンドが顕著に検出された。現在、EGFP-AoAtg26F および EGFP-AoAtg26 Δ C を *Aoatg26* 破壊株に発現させ、局在解析および機能相補性の検討を行っている。

Localization and functional analysis of autophagy-related protein AoAtg26 in *Aspergillus oryzae*

Takashi Kikuma, Manabu Arioka, Katsuhiko Kitamoto

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

P-43

Aspergillus nidulans の分生子形成に関与する糖転移酵素様機能未知膜タンパク質の解析

川満 洋平¹, 石井 千尋¹, 浴野 圭輔¹, 竹川 薫², 後藤 正利², 岡 拓二² (¹崇城大院・工,²九大院・農)

【目的】糸状菌 *Aspergillus nidulans* のゲノム上には 92 個の推定糖転移酵素遺伝子が存在している。我々は、この推定糖転移酵素遺伝子の破壊株を作製し、機能解析を進めてきた。これら遺伝子破壊株の中に茶褐色のコロニー表現型を示す株を見出した。そこで、その責任遺伝子を *rcfA* と名付け、遺伝子破壊株の表現型について検討した。

【方法、結果】 *rcfA* は 405 アミノ酸からなるタンパク質をコードしており、膜タンパク質予測プログラム (SOSUI) により 3 回膜貫通タンパク質であることが予想された。*AnRcfA* は、推定 N-結合型糖鎖付加部位および糖ヌクレオチドとの結合に必要な DXD モチーフを有していた。また、推定触媒領域はヒトの GnT-IVb と 25% の相同性を有していた。 $\Delta rcfA$ 株の分生子形成数を親株と比較したところ、36% にまで減少しており、 $\Delta rcfA$ 株由来の分生子は親株に比べ出芽速度が約 1 時間遅延していた。*RcfA* のアミノ酸情報をもとに BLAST 検索を行い 36%、30% の相同性を有した遺伝子を、それぞれ *rcfB*、*rcfC* と名付け、その遺伝子破壊株を取得したが、表現型に顕著な差は見られなかった。薬剤感受性試験を行ったところ、 $\Delta rcfA$ 株はキチンに結合し生育に影響を与えるカルコフルオロホワイト (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) に対して感受性を示した。以上のことから *RcfA* が正常な細胞壁形成に重要な役割を果たしていることが示唆された。現在、様々な *RcfA* の 1 アミノ酸置換変異体を作製し、*RcfA* の機能に重要なアミノ酸残基の特定を試みている。

Functional analysis of the putative galactofuranosyltransferase genes in *Aspergillus fumigatus*

¹Yohei Kawamitsu, ¹Chihiro Ishii, ¹Keisuke Ekino, ²Kaoru Takegawa, ²Masatoshi Goto, ¹Takuji Oka

(¹Grad. Sch. Eng., Sojo Univ., ²Fac. Agric., Kyushu Univ.)

P-44

Aspergillus nidulans におけるホスファチジルセリンデカルボキシラーゼ遺伝子の機能解析

吉川阿佳里¹, 高城景子², 福田良一², 堀内裕之² (¹東京大・農・生化工, ²東大院・農生科・応生工)

糸状菌の菌糸生長、形態形成において重要な役割を果たす因子の一つとしてプロテインキナーゼ C (PKC) が同定されている。PKC は細胞極性の維持、分生子形成に関与していることが明らかになっているが、その上流、下流で働いている因子については未解明な状態である。

糸状菌 *Aspergillus nidulans* において PKC をコードする遺伝子 *pkcA* の失活条件、活性化型 PkcA の高発現条件下で行った網羅的転写解析の結果、mRNA 量が変化した遺伝子のなかに、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* においてホスファチジルセリンデカルボキシラーゼ (PSD) をコードする *PSD2* オルソログが含まれていた。PSD はホスファチジルセリンの脱炭酸によりホスファチジルエタノールアミン (PtdEtn) を合成する酵素であり、原核生物から真核生物まで広く保存されている。また近年、*S. cerevisiae* において、膜リン脂質が細胞極性の形成、維持機構に関わることが示唆されており、膜リン脂質が PKC による細胞極性の制御に関わっている可能性が考えられる。

今回、*A. nidulans* において *S. cerevisiae* の *Psd2p* に配列相同性を示すタンパク質をコードする遺伝子を探索し、配列類似性の高かった 3 つの遺伝子 *AN3188*, *AN7989*, *AN11161* について、それぞれ単独破壊した株を作製した。 $\Delta AN7989$, $\Delta AN11161$ 株においては顕著な生育悪化や形態異常はみられなかった。一方、 $\Delta AN3188$ 株において生育の悪化がみられ、特に、最少培地での 25°C における培養では著しい生育の悪化が確認された。しかし、PtdEtn を添加した培地においては、生育に部分的な回復がみられた。現在、 $\Delta AN3188$ 株についてさらに詳細な解析を行っている。

Functional analyses of phosphatidylserine decarboxylase-encoding genes in *Aspergillus nidulans*.

Akari Kikkawa¹, Keiko Takagi², Ryoichi Fukuda², Hiroyuki Horiuchi²

(¹Fac. of Agr., ²Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo)

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

片瀬由佳子¹, 泉実², 浴野圭輔¹, 竹川薫³, 後藤正利³, 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、ゴルジ体に局在する膜タンパク質であり、UDP-Gal_fを糖供与体として O-グリカン修飾タンパク質の 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ている。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 および GfsC が存在しているがその酵素機能は不明である。本報告では、Gfs タンパク質に関して得られた新たな知見について報告する。GfsB および GfsC に関して、大腸菌発現系を用いて組換え体を作製し、Gal_f 転移活性を検出したところ GfsB および GfsC は GfsA と同一の酵素活性を有していることが明らかになった。また、 $\Delta gfsA$ 破壊株において *gfsB* および *gfsC* を高発現させたところ、*gfsA* 破壊による生育異常を回復することはできなかった。以上のことから、GfsB および GfsC は GfsA と細胞内における役割が異なっていることが示唆された。一方、RNA-Seq 解析により *gfsA* 遺伝子破壊株における遺伝子発現プロファイルを解析したところ、機能不明なグルコシダーゼ遺伝子などの転写量の増加が確認された。現在、作製した22種類のGfsAのアミノ酸置換変異体を $\Delta gfsA$ 破壊株において発現させ、機能相補性を観察することで酵素機能上重要なアミノ酸残基を決定することを試みている。

Functional analysis of galactofuranose transferases in *Aspergillus nidulans*

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

P-46 (O-15)

糸状菌 *Aspergillus nidulans* 由来の新規 poly (ADP-ribose) glycohydrolase の発見とその生理学的役割

宮地雄大¹, 平野滯¹, 山本竜也¹, 高谷直樹², 志水元亨¹, 加藤雅士¹ (¹名城大・農, ²筑波大・生命環境)

ポリ (ADP-リボース) (PAR) 化は真核生物に特異的な可逆的翻訳後修飾である。この反応には、PAR を合成する poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) と分解する poly (ADP-ribose) glycohydrolase (PARG) が関与することが知られている。PARP は、酵母を除く全ての真核生物に保存され、DNA 修復、転写調節、細胞死、中心体の分裂制御に関与していると考えられている。*Aspergillus nidulans* のゲノム中にも *parp* の ortholog が1つ存在するが、酵母及び *A. nidulans* を含む糸状菌のゲノムの中には、既知の *parg* の ortholog は見出されていない。本研究では、糸状菌の *parg* 遺伝子を特定し、その生理学的役割を明らかにすることを目的とする。

A. nidulans のゲノム中から *parg* 候補遺伝子を7種選抜し、リコンビナントタンパク質を異種発現させ、精製した。これらの PARG 活性を測定したところ、1種のみ Mg^{2+} 依存的に PAR を分解した。PAR の分解産物を LC-MS/MS にて解析したところ、ADP-リボースが検出されたことから、このタンパク質を fungal PARG (fPARG) と命名した。

次に、 $\Delta fparg$ 株を作製し、3種のDNA損傷剤に対する影響を検討した。その結果、野性株に比べて、 $\Delta fparg$ 株はDNA損傷剤に対して感受性を示した。さらに、PARの分解を経時的に追跡したところ、 $\Delta fparg$ 株ではPARの分解が抑制されていた。以上のことから、糸状菌ではfPARGがPARGとして機能していることが示唆された。

Novel poly (ADP-ribose) glycohydrolase in *Aspergillus nidulans*.

Yuta Miyachi¹, Mio Hirano¹, Tatuya Yamamoto¹, Naoki Takaya², Motoyuki Shimizu¹, Masashi Kato¹

(¹ Faculty of Agriculture, Univ. of Meijo ² Univ. of Tukuba)

P-47

麹菌 *Aspergillus oryzae* AdmA, AdmB の局在解析

小林拓嗣, 前田浩, 竹内道雄, 山形洋平 (東農工大院・応生科)

【背景および目的】 AdmA, AdmB は, 麹菌 *Aspergillus oryzae* の ADAM (A Disintegrin And Metalloproteinase) である。哺乳類 ADAM は, 細胞膜上でのタンパク質分解によるユニークなメカニズムでシグナル伝達に関与することが知られている。我々は, これまでに $\Delta admB$ と $\Delta admA\Delta admB$ の細胞壁構造が変化していることを表現型観察や細胞壁構成多糖の定量, RNA-Seq 解析により明らかにした。RNA-Seq 解析の結果, 欠損株では, 一部のキナーゼ遺伝子や転写制御に関わる遺伝子の発現が変動しており, 麹菌 ADAM がシグナル伝達に関与することが示唆された。麹菌 ADAM の生体内での基質を同定することを目標に, 候補となるタンパク質を絞るために, AdmA と AdmB 自身の局在解析を行うことにした。

【方法および結果】 C 末端に EGFP を融合した AdmA-EGFP, AdmB-EGFP を *glaA142* もしくは自身のプロモーター下で発現させるためのプラスミドを構築し, *A. oryzae* niaD300 を形質転換した。得られた株を液体培養し, 蛍光顕微鏡で観察した結果, *glaA142* プロモーター下で AdmB-EGFP は主に液胞で蛍光が観察され, 菌糸先端部でこれより弱い蛍光が観察された。次に, 培養した菌体からタンパク質を抽出し, SDS-PAGE に供し, 抗 GFP 抗体を用いたウェスタンブロット解析を行った。その結果, AdmB-EGFP を発現する株では GFP 単体の大きさ付近と AdmB-EGFP 全長に相当する大きさのバンドが検出された。このことから高発現した AdmB-EGFP の多くは分解され, EGFP 部分が液胞に蓄積し, 菌糸先端部に見られた弱い蛍光が AdmB-EGFP 全長のものであると推察された。

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 on localization of AdmA and AdmB in *Aspergillus oryzae*

Takuji Kobayashi, Hiroshi Maeda, Michio Takeuchi, Youhei Yamagata

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

P-48

糸状菌二成分性情報伝達経路に対する新規阻害剤の出芽酵母を用いた評価系の構築

田畑風華¹, 中山真由美¹, 吉見啓², 藤岡智則³, 阿部敬悦^{1,2}

(¹ 東北大学院農・生物産業創成, ² 東北大・未来研, ³ クミアイ化学工業)

浸透圧ストレス応答シグナル伝達経路は糸状菌にとって生命の維持に重要なシステムであり, 抗真菌剤標的として注目されている。本経路は, センサータンパク質であるヒスチジンキナーゼ, リン酸基転移仲介因子 (HPt), レスポンスレギュレーター (RR) から成る二成分性情報伝達経路と下流の MAP キナーゼ経路から構成されている。これら経路の構成タンパク質のうち HPt は必須因子として中枢的役割を担っていると考えられており, モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* においては HPt (AnYpdA) の欠損は致死であることが知られている。近年, 植物病原菌であるイネいもち病菌の HPt (MgYpd1) を標的とした阻害剤のスクリーニングが行われ, MgYpd1 の阻害化合物候補として KT 化合物が選抜された。本化合物は HPt あるいは RR に作用することが示唆されているが, 詳細な作用機構は不明である。そこで本研究では, KT 化合物の作用機作の解明を最終目標として, KT 化合物の糸状菌 HPt および RR に対する阻害活性の簡易評価系の構築を試みた。将来, 糸状菌由来 HPt と RR の変異体を用いて KT 化合物の阻害部位を特定するために, 糸状菌に比べ取扱いが容易な出芽酵母を用いた評価系を構築した。すなわち, 出芽酵母に糸状菌由来の *Mgydp1* および *AnypdA* 遺伝子を導入発現した後に, 酵母 *YPD1* 遺伝子を破壊した糸状菌 HPt 発現酵母株を構築した。現在, これら糸状菌 HPt 発現酵母株の浸透圧ストレスに対する応答性および KT 化合物に対する感受性を評価しており, KT 化合物の糸状菌 HPt への阻害作用を解析している。

Analysis of the novel inhibitor “KT” of fungal two-component signaling system by using yeast cells expressing fungal HPt.

Fuka Tabata¹, Mayumi Nakayama², Akira Yoshimi², Tomonori Fujioka³, Keietsu Abe^{1,2}

(¹Grad. Sch. Agric. Sci., ²NICHe, Tohoku Univ., ³Kumiai Chemical Industry Co., Ltd.)

P-49 (O-1)

メロテルペノイド terretonin 生合成に関与する新規異性化酵素 Trt14 の構造機能解析

岩瀬大輝, 松田侑大, 森貴裕, 阿部郁朗 (東大院・薬)

メロテルペノイドはポリケタイドとテルペノイドからなる特異なハイブリッド型化合物である。前回、糸状菌 *Aspergillus terreus* の生産するメロテルペノイド terretonin について、その生合成機構の全容解明に成功したことを報告した。また、terretonin 生合成に関与する酵素 Trt14 については相同性検索の結果、機能既知タンパク質とほとんど配列相同性を示さなかったため、L- [methyl-¹³C] methionine を用いた同位体標識実験を行った。その結果、メチルエステル基の形成は Trt14 依存的な分子内メトキシ基転位反応によって生じることが示唆された¹⁾。そこで、新規の異性化反応を担う酵素として Trt14 の構造機能解析に着手した。

Trt14 全長を His₆ タグ融合組み換えタンパク質として大腸菌にて発現し、ニッケルアフィニティークロマトグラフィーおよびゲル濾過クロマトグラフィーにより精製、蒸気拡散法により結晶化を行ったところ、再現性良く単結晶を取得することに成功したため、現在は X 線による結晶構造解析を行っている。また、Trt14 のホモログ間で高度に保存されている複数の酸性および塩基性アミノ酸残基について変異を導入し、Trt14 の基質認識や反応機構のより詳細な解析を進めている。

また、異種糸状菌 *A. oryzae* NSAR1 株を宿主とし、terretonin 生合成遺伝子を andrastin A や austinol といった別種のメロテルペノイド生合成遺伝子と共発現させることによって Trt14 の推定基質類縁体となる非天然型新規化合物の取得に成功した。精製した Trt14 を用いてこの類縁体を酵素変換したところ複数の変換産物が得られたため、これらについても詳細を併せて報告したい。

1) Matsuda, Y., Iwabuchi, T., Wakimoto, T., Awakawa, T., Abe, I. *J. Am. Chem. Soc.*, **137**, 3393-3401 (2015)

Structural and functional studies on Trt14, a unique isomerase involving in the biosynthesis of terretonin

Taiki Iwabuchi, Yudai Matsuda, Takahiro Mori, Ikuro Abe

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

P-50

Aspergillus oryzae 酸性プロテアーゼ欠損株の菌体外プロテアーゼの解析

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 30~40% 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、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。また、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。 $\Delta pepO \Delta aorA$ 二重欠損株を作製し、培養上清についてカゼイン分解活性を測定した結果、カゼイン分解活性が残存していた。さらに、RIB40 に比べ、 $\Delta pepO \Delta aorA$ の二重欠損株では CPase, AorsinB の活性の上昇が見られた。現在は、各遺伝子欠損株について酸性条件下で作用すると考えられるプロテアーゼ遺伝子の転写について検討中である。

Analysis of extracellular proteases in *Aspergillus oryzae* acidic proteases deletion strains

Ayako Ueno, Hiroshi Maeda, Yohei Yamagata, Michio Takeuchi

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

P-51

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, 森貴裕, 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構成単位とする化合物群はテルペノイドと呼ばれる。この中でも 5 つのイソプレン単位に由来するものは、特にセスタテルペン類と呼ばれ、天然において報告例の少ない比較的稀な化合物群として知られている。また、セスタテルペン類に関しては、生合成に関する研究例も少ない。そこで本研究では、このセスタテルペンについて、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。

前年の本会では、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が報告されていることから、糸状菌 *Emericella varicolor* に着目し、本菌のゲノム情報から、既知セスタテルペン合成酵素と高い相同性を示す酵素遺伝子を検索することで、セスタテルペン類の一種である *stellatic acid* の生合成に必要なセスタテルペン合成酵素ならびにシトクロム P450 をコードする 2 種類の酵素遺伝子を見出し、*stellatic acid* の生合成分子基盤を明らかにするに至った。

今回は糸状菌 *Emericella varicolor* のゲノム情報から、別のセスタテルペン合成酵素を新たに同定し、更にこの酵素産物が新規の四環性炭素骨格を持つセスタテルペンであることが明らかとなった為、これを報告する。また、現在、精製酵素を用い、より詳細な酵素の機能解析を行っており、セスタテルペン合成酵素が触媒する環化反応のメカニズムに関しての知見が得られた為、これらの結果についても報告する。

The search for sesterterpene synthases from *Emericella varicolor*

Takaaki Mitsuhashi, Yudai Matsuda, Takahiro Mori, Takayoshi Awakawa, Ikuro Abe

(Graduate School of Pharmaceutical, Univ. of Tokyo)

P-52

麹菌 *Aspergillus oryzae* の酸性ホスファターゼ遺伝子に関する研究

安田 (吉野) 庄子, 小野奈津子, 長谷川 摂, 間野博信 (あいち産科技総セ・食工技セ)

【目的】 麹菌 *A. oryzae* のゲノム情報上には、産業的に重要な *A. niger* 由来フィターゼ (PhyA) と相同性のある 8 個の推定酸性ホスファターゼ (Aph) 遺伝子 (*aphA* ~ *aphH* 遺伝子) が見出されている。我々はこれまでに、味噌用麹菌 *A. oryzae* KBN630 株において *aphA* ~ *aphH* 遺伝子の単遺伝子破壊を行い、*aphA* 遺伝子および *aphC* 遺伝子が豆麹培養中の酸性ホスファターゼ活性に寄与することを明らかにし、AphA および AphC の高生産、精製および酵素学的性質の解析を行った。本研究では、残り 6 個の未解明 *aph* 遺伝子の機能解明を目的として、*A. oryzae* におけるこれらの遺伝子の高発現を試みた。

【方法・結果】 未解明ホスファターゼ遺伝子 (*aphB*, *aphD*, *aphE*, *aphF*, *aphG*, *aphH*) を、*A. oryzae* において最も強いプロモーターの一つである *taaG2* 遺伝子プロモーターの制御下で発現させるための高発現ベクターを構築した。*A. oryzae* PDE1 株 (*alp* 遺伝子および *pyrG* 遺伝子の二重破壊株) を宿主として形質転換し、形質転換株各 100 株を Aph 活性測定によりスクリーニング後、培養液を SDS-PAGE 解析した。その結果、*aphG* 遺伝子高発現ベクター導入株複数の培養液中に AphG と推定される太いタンパク質バンドが認められた。この培養液を AphG 粗酵素液として基質特異性を解析した結果、グリセロリン酸を始めとする各種リン酸化合物に対して分解活性を示したが、フィチン酸には作用しなかった。一方、*aphB*, *D*, *E*, *F*, *H* 遺伝子高発現ベクター導入株中には、Aph を大量に分泌生産する株は得られなかった。

Studies on Acid Phosphatase Genes from *Koji* Mold, *Aspergillus oryzae*

Shoko YOSHINO-YASUDA, Natsuko ONO, Osamu HASEGAWA, Hironobu Mano (Food Res. Center, Aichi-Inst)

P-53 (O-2)

マツタケ (*Tricholoma matsutake*) 培養菌糸由来糖質分解酵素遺伝子群の発現解析

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い。当研究室において、マツタケは α -アミラーゼや極めて強い β -グルコシダーゼ活性を示すことを明らかにしてきたが、グルコアミラーゼやエンド型セルラーゼ等の活性については殆ど検出されていない。そのため、他の腐生性のきのこと同様の栽培法では人工栽培が困難であるとされている。マツタケの人工栽培化においては、マツタケがどのような糖質分解系を発現しているかを解析し、生育に有効な糖質を探索することは重要である。そこで本研究では、糖質分解酵素遺伝子誘導性を明らかにすることを目的とし、リアルタイム PCR による発現解析を行った。*T.matsutake* NBRC30605 株を各種糖質 1%, Yeast Extract 0.5% の液体培地に接種後 30 日間静置培養した各培養菌糸体より mRNA を抽出し、逆転写により合成した cDNA を鋳型として、リアルタイム PCR により発現量を定量した。アラビノガラクトサン、グルコマンナンなどのヘミセルロースを唯一の炭素源とした培地で生育させたところ、グルコアミラーゼ遺伝子の発現量がグルコース培養と比較して増加した。このことから、ヘミセルロースの添加によりデンプンの加水分解活性が高くなることが示唆された。現在、他の糖質による誘導性についても検討を進めている。

Expression analysis of polysaccharide hydrolyzing enzyme genes from *Tricholoma matsutake*.

Hiroki Onuma¹, Yasuhisa Fukuta¹, Mizuho Kusuda², Takao Terashita¹, Norifumi Shirasaka¹

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

P-54

Lentinula edodes (シイタケ) 培養菌体内プロテアーゼ遺伝子群の発現解析

福田泰久, 寺下隆夫, 白坂憲章 (近畿大・農応生)

近畿大学農学部・寺下らは、酸性プロテアーゼの特異的阻害剤である S-PI (Streptomyces-Pepsin Inhibitor) をきのこ培養基に添加すると子実体の形成を促進し、金属プロテアーゼの阻害剤である Talopeptin を培養基に添加すると子実体の形成阻害を示す現象を、いくつかの食用きのこ (シイタケ、ブナシメジ、エノキタケなど) で発見し、きのこの子実体形成にはプロテアーゼ群が深く関与していることを報告した。シイタケのプロテアーゼ群は、酸性プロテアーゼと金属プロテアーゼがそれぞれ菌体外、培養菌糸体内、子実体内より精製され、その酵素化学的諸性質が解明されているが、1 次構造は未解明である。本研究では、FeorestGEN シイタケゲノムデータベースより、プロテアーゼ様遺伝子群 16 種 (Eqolisin 様遺伝子 4 種, Pepsin 様遺伝子 7 種, Metallo protease 様遺伝子 5 種) を抽出し、それぞれの遺伝子発現量を栄養生長菌糸期と子実体原基形成期で相対定量した。子実体原基形成期では、AUGUSTUS01_g7597.t1, g10028.t1, g867.t1, g2267.t1 遺伝子の発現量が相対的に制御されていた。本研究は、JSPS 科研費 26870730 の助成を受けたものである。

Expression analysis of protease genes from *Lentinula edodes*

Yasuhisa Fukuta, Takao Terashita, Norifumi Shirasaka

(Grad-Sch. Agri., Kindai Univ.)

P-55

糸状菌 *Trichoderma reesei* における BGLII の生理学的役割

中村彩奈¹, 高橋真智子¹, 松沢智彦², 志田洋介¹, 矢追克郎², 小笠原渉¹ (¹長岡技科大・生物, ²産総研)

セルラーゼ高生産糸状菌である *Trichoderma reesei* において, セルラーゼ遺伝子群の発現は誘導的であり, 誘導物質の存在下で観察される。セルラーゼの誘導物質は *T. reesei* の β -グルコシダーゼ (BGL) の糖転移活性によってセロビオースから生じると考えられているが, その詳細は不明である。セルラーゼ高生産変異株である PC-3-7 株は, セロビオースによるセルラーゼ生産能が高められた株であり, *T. reesei* のセルラーゼ誘導メカニズムを解析するうえで重要な株である。比較ゲノム解析の結果から, PC-3-7 株は細胞内 BGL である BGLII に変異が生じていることが明らかとなった。この変異を回復させたところセロビオースによるセルラーゼ生産性が低下したことから, BGLII の変異が PC-3-7 株のセルラーゼ高生産能に関与していると考えられた。そこで本研究では, *T. reesei* のセルラーゼ発現誘導における BGLII の機能を明らかにするため, PC-3-7 株の BGLII の変異が糖転移活性にどのような影響を与えているのかを明らかにし, セルラーゼの誘導に関する新たな知見を得ることを目的としている。

Escherichia coli を宿主として用い, PC-3-7 株における BGLII の変異箇所を 20 種のアミノ酸にそれぞれ置換した BGLII を発現, 精製し, HPLC および TLC を用いて糖転移産物の解析を行った。その結果, 野生型 BGLII の糖転移活性によって, ラミナリビオースやセロトリオースに加え, 四糖および五糖が生成されていることを明らかにした。現在, A, L, I, S, T, C のアミノ酸置換 BGLII の発現に成功しており, それら変異体についても同様の解析を進めている。

The physiological role of BGLII in *Trichoderma reesei*

Ayana Nakamura¹, Machiko Takahashi¹, Yosuke Shida¹, Tomohiko Matsuzawa², Katsuro Yaoui², Wataru Ogasawara¹

(¹Nagaoka Univ. of Tech., ²AIST)

P-56

糸状菌 *Aspergillus nidulans* が分泌する新規 GH 134 family に属する β -1,4-マンナーゼ Man134A およびそのホモログの解析

酒井 杏匠¹, 望月 麻衣¹, 山田 みゆき¹, 金子 優平¹, 石原 紗彩耶¹, 新沢 祐大¹, 嶺澤 美帆¹, 木本 紗蘭¹, 神藤 定生¹, 志水 元亨¹, 小林 哲夫², 加藤 雅士¹ (¹名城大・農, ²名大院・生命農)

【目的】 我々は、 β -マンナンを唯一の炭素源として糸状菌 *Aspergillus nidulans* を生育させた際に細胞外に分泌される、既知の β -1,4-マンナーゼが属する glycoside hydrolase family 5 (GH5) および GH26 とは異なるファミリーに属する新規 β -1,4-マンナーゼ (Man134A) を見出した。さらに、*A. nidulans* のゲノムには Man134A と 50% 以上の相同性を有する遺伝子が他に 3 種類存在していた。本研究では、Man134A ならびに 3 種類のホモログの生理学的な役割を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】 *man134A* の遺伝子破壊株 (Δ *man134A* 株) を作製し、種々の多糖を唯一の炭素源として生育させたところ、 β -マンナンを炭素源とした場合、野生株 (WT 株) に比べて Δ *man134A* 株の生育が顕著に低下することが明らかとなり、Man134A は β -マンナンの分解に関与することが示唆された。さらに、Man134A と Man5C のリコンビナントタンパク質を調製し、 β -マンナンおよびマンノオリゴ糖に対する基質特異性を調べたところ、生成する分解産物など酵素学的性質が異なっていた。また、Man5C の至適 pH が 4.0 であるのに対して Man134A は 6.0 であった。pH4.0 と 6.5 において Man134A と Man5C の相乗効果を検討したところ、pH6.5 において高い相乗効果を示した。以上の結果より、Man134A は特に中性付近における β -マンナンの分解に関与することが示された。現在、3 種類のホモログについても同様に解析を進めている。

Functional analysis of a novel β -1,4-mannanase Man134A and its homologs belonging to the new GH134 family

Kiyota SAKAI¹, Mai MOCHIZUKI¹, Miyuki YAMADA¹, Yuhei KANEKO¹, Saaya ISHIHARA¹, Shinzawa Yuta¹, Minezawa Miho¹, Kimoto Saran¹, Sadanari JINDOU², Tetsuo KOBAYASHI³, Motoyuki SHIMIZU¹, Masashi KATO¹ (^{1,2} Meijo Univ., ³ Nagoya Univ.)

P-57

新たな NRPS-PKS 融合酵素によるかび毒テヌアゾン酸の生合成

尹忠銖, 本山高幸, 長田裕之 (理研 CSRS・ケミカルバイオロジー)

【目的】 かび毒の一種であるテヌアゾン酸は 1957 年に植物病原性糸状菌である *Alternaria tenuis* の培養液から初めて報告されて以来、イネいもち病菌 *Magnaporthe oryzae* など他の植物病原性糸状菌からもその生産が報告されてきたが、その生合成遺伝子は現在まで不明であった。今回、*M. oryzae* より初めてテヌアゾン酸生合成遺伝子の特定に成功し、テヌアゾン酸の生合成機構を明らかにしたので報告する。

【方法と結果】 *M. oryzae* 北 1 株を用いた二次代謝活性化実験から、p38 MAP キナーゼ OSM1 の遺伝子破壊及び DMSO 添加によりテヌアゾン酸の生産が誘導されることを見出した。この二つのテヌアゾン酸生産誘導条件を用いたマイクロアレイ解析から、共通して発現誘導される二次代謝遺伝子 *MGG_07803* を見出した。*MGG_07803* の破壊株がテヌアゾン酸を生産しないことと強制発現株がテヌアゾン酸を大量生産することから、*MGG_07803* がテヌアゾン酸生合成遺伝子(*TASI*; Tenuazonic acid synthetase 1)であることが明らかとなった。*TASI* は糸状菌では初めて報告される NRPS-PKS タイプの酵素をコードし、PKS 部分は KS ドメインのみで構成されていた。*S. cerevisiae* を用いて調製した *TASI* 蛋白質を用いて、*TASI* が isoleucine と acetoacetyl-CoA からテヌアゾン酸を生合成すること及び酵素活性には KS ドメインが必須であることを明らかにした。この KS ドメインは系統的解析から type I PKS の KS の新しいグループに分類され、type I PKS の KS では報告のない環化反応を触媒していることを明らかにした。

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及び SIP (戦略的イノベーション創造プログラム)「次世代農林水産業創造技術」による支援を受けた。

Biosynthesis of the mycotoxin tenuazonic acid by a novel fungal NRPS-PKS hybrid enzyme

Choong-Soo Yun, Takayuki Motoyama, Hiroyuki Osada

(Chem. Biol., RIKEN CSRS)

P-58

担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* 由来新規 PQQ 依存性酸化還元酵素遺伝子の発現応答解析

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* から新規 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 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 CcSDH 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、系統解析において CcSDH とは異なる分岐に位置する担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* 由来 PQQ 酵素様遺伝子の発現応答を解析し、本酵素の機能に関する情報を得ることを目的とした。

グルコースまたはセルロースを単一の炭素源とし、窒素源の濃度を 0.4 mM, 4 mM, 40 mM とした計 6 系統の培地で *P. chrysosporium* を 3 日間振とう培養し、得られた菌体から一本鎖 cDNA を合成した。この cDNA を鋳型にして RT-PCR を行い、アガロースゲル電気泳動に供した。その結果、本遺伝子は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、窒素濃度が 40 mM の時に発現量が増加した。このことから、本遺伝子は窒素濃度によって発現が制御され、高窒素条件下において発現量が増加することが明らかになった。現在、本タンパク質の機能解析を含め、さらに詳細に解析を行っている。

Expression analysis of a novel 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-59

Aspergillus nidulans における β -D-ガラクトフラノシダーゼの諸性質の解析

豊田早紀, 八色奈央, 松永恵美子, 樋口裕次郎, 後藤正利, 竹川薫 (九州大・農学部)

Aspergillus 属などの糸状菌には、細胞壁構成成分として五員環構造のガラクトフラノース(Galf)が存在する。糖鎖中の Galf のグリコシド結合を加水分解する β -D-ガラクトフラノシダーゼ(Galf-ase)は、Galf 含有糖鎖の代謝に重要な酵素である。我々は *A. nidulans* における Galf-ase を検索するため、Galf と構造が類似しているアラビノフラノースに着目し、 α -L-アラビノフラノシダーゼ(Araf-ase)が Galf-ase 活性を有しているか解析を行った。その結果、*A. nidulans* に複数存在する Araf-ase は Galf-ase 活性を有しているが、Galf-ase 活性は微弱であることがわかった。そこで土壌から Galf-ase を生産する放線菌を単離することで、Galf 特異的な新規酵素を見出し、遺伝子の同定に成功した。この Galf-ase 遺伝子を用いて *A. nidulans* 中の Galf-ase 遺伝子の相同性検索を行い、2 つの相同性遺伝子を見出すことができた。本研究では、これらの 2 つの遺伝子が Galf 特異的な Galf-ase 活性を有しているか解析を行った。まず、この *A. nidulans* 由来の 2 つの遺伝子(AN2395, AN3200)を cDNA から増幅し、大腸菌内で発現させて精製を行った。酵素活性測定は、酵素を人工基質である pNP-Galf と pNP-Araf と反応させて、遊離した pNP を吸光度により測定した。AN2395, AN3200 タンパクを用いて酵素活性測定を行った結果、AN2395 は His-Tag 精製後のサンプルから Araf-ase 活性と Galf-ase 活性の両活性を示すことがわかった。これに対して AN3200 は Araf-ase 活性を示さず、Galf-ase 活性のみを示したことから AN3200 タンパクが *A. nidulans* における Galf 特異的な Galf-ase であることが明らかになった。

Characterization of β -D-Galactofuranosidases in *Aspergillus nidulans*

Saki Toyota, Nao Yairo, Emiko Matsunaga, Yujiro Higuchi, Masatoshi Goto, Kaoru Takegawa

(Dept. of Biosci. & Biotechnol., Fac. of Agric., Kyushu Univ.)

P-60

大腸菌で高発現させた麹菌由来 D-乳酸脱水素酵素 (D-LDH) の酵素学的諸性質

渡部 昭, 佐藤陽子, 五味勝也 (東北大院農・生物産業創成)

【目的】 乳酸を原料とした生分解性プラスチックの一つであるポリ乳酸(PLA)は、成型性が高く、生分解性プラスチックの中で唯一透明であるという特性を持っているが、高価であることが普及の障害となっており、PLA の原料である乳酸を安価に生産する製造方法の確立が求められている。そこで我々は効率的な乳酸生産を目指し、麹菌ゲノム解析情報を利用して *Aspergillus oryzae* から乳酸脱水素酵素(LDH)遺伝子を探索し大腸菌で高発現させ、その基本的な酵素学的諸性質を報告した(1)。今回は、さらに詳細に本酵素の諸性質を調べたので報告する。

【結果】 麹菌ゲノム解析情報を利用し、シアノバクテリア *Nostoc* D-LDH 配列とアミノ酸レベルで 51%の相同性のある遺伝子配列を *A. oryzae* のゲノムから見出し、大腸菌 BL21(DE3)株で pET システムを用いて発現させた。発現タンパク質を大腸菌の菌体内から粗酵素として回収し、Ni カラムに供して精製した。精製標品は、SDS-PAGE で 41 kDa 付近に単一バンドとして検出された。本講演では、本精製標品を用いて新たに解析した本酵素の Native な分子量、基質特異性等について報告する。

(1) 渡部ほか、2007 年度日本農芸化学会大会講演要旨集、p179

Overexpression of D-lactate dehydrogenase (D-LDH) gene found from *Aspergillus oryzae* genome in *Escherichia coli* and its enzymatic characterization

Akira Watanabe, Yoko Satoh, Katsuya Gomi

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

P-61

トランスクリプトーム解析による糸状菌 *Aspergillus fumigatus* の環境ストレス応答能の基盤整備

高橋弘喜, 楠屋陽子, 高橋 (中口) 梓, 早川真理子, 五ノ井透 (千葉大・真菌センター)

地球環境中に生息する微生物は、苛酷な環境ストレスに適応し生存している。環境ストレスに応答して体内の多くの遺伝子発現を厳密に制御することは、生存戦略として非常に重要である。酵母を含むモデル生物では、ゲノム科学的手法によって様々なストレス条件下での遺伝子発現応答が体系化され、遺伝子発現プロファイルの相同性 (共発現) 情報を含む膨大なデータが多くの研究の基盤情報として重要な役割を果たしている。アスペルギルス属真菌は、発酵やヒトを含む宿主への感染過程で晒される多様な環境ストレスに応答し、適応している。しかしながら、糸状菌の環境ストレス応答能は、同じ真菌である酵母のホモログ遺伝子のみでは説明できず、未解明な部分が多い。そこで我々は、糸状菌 *Aspergillus fumigatus* の菌糸を対象に、遺伝子発現応答の体系化を目指して、様々な条件下での RNA-Seq 解析を進めてきた。その結果、熱ストレスに応答する遺伝子として、機能未知の転写因子を含む 592 個の遺伝子を見出した。酵母遺伝子との相同性解析から、247 個の遺伝子には、酵母のホモログ遺伝子が存在しないことが明らかとなった。このことから、糸状菌は熱ストレスを受けると、真菌に共通の遺伝子と独自に獲得した遺伝子の発現を組み合わせ、環境ストレスに適応していることが示唆された。本発表では、様々な環境ストレス条件下でのトランスクリプトームデータの統合解析結果並びに、環境ストレス応答に関わる遺伝子の網羅的探索結果について報告し、遺伝子発現応答の体系化に向けた取り組みを紹介したい。

Transcriptome analysis in the responses to multi environmental changes in *Aspergillus fumigatus*

Hiroki Takahashi, Yoko Kusuya, Azusa Takahashi-Nakaguchi, Mariko Hayakawa, Tohru Gono

(MMRC, Chiba Univ)

P-62

休眠孢子および発芽孢子のトランスクリプトーム解析から示唆された休眠-発芽における AtfA の機能

萩原大祐, 楠屋陽子, 高橋弘喜, 川本進, 亀井克彦, 五ノ井透 (千葉大・真菌センター)

Aspergillus 属菌の無性孢子は、環境ストレス (高温, UV, 乾燥など) に対して一般的に高耐性である。その要因として、トレハロースなど適合溶質を孢子内に蓄積することが知られているが、その他の耐性機構はほとんど明らかにされていない。本研究では、休眠孢子のストレス耐性能および孢子発芽の分子機構に関する新しい知見の取得を目指し、三種の *Aspergillus* 属菌 (*A. fumigatus*, *A. niger*, *A. oryzae*) を対象に、RNA-seq による比較トランスクリプトーム解析を行った。菌糸, 休眠孢子, 発芽孢子 (1h) における発現値の比較から、休眠孢子特異的 (Af: 687 個; An: 694 個; Ao: 812 個) または発芽孢子特異的 (Af: 766 個; An: 1241 個; Ao: 749 個) な発現遺伝子を各菌において選抜した。次に、*Aspergillus* 属に共通した現象を見出すため、対象とした三種の菌で保存されたオーソログ遺伝子に着目した。BLAST 解析により 6172 個のオーソログ遺伝子セットが見つかり、そのうち 91 個が孢子特異的, 391 個が発芽孢子特異的な発現を全ての菌種で示していた。孢子特異的遺伝子セットには孢子ストレス能の制御に関連する AtfA 転写因子の制御下遺伝子が多数含まれていた。興味深いことに、*A. fumigatus* の *atfA* 遺伝子破壊株の休眠孢子では複数の発芽特異的遺伝子の発現上昇が観察され、AtfA がストレス耐性能の制御のみならず、発芽の抑制にも機能することが示唆された。実際に *atfA* 破壊株の休眠孢子では、発芽時に見られる sterol rich domain の形成や代謝活性が確認されており、発芽可能な環境でなくとも発芽プロセスが進行していると考えられた。今後更なるデータを取得し、*Aspergillus* 属菌孢子の休眠/発芽切り替えにおける AtfA の機能について検証していきたい。

Comparative transcriptome analysis in resting conidia and germinated conidia of three *Aspergillus* species

Daisuke Hagiwara, Yoko Kusuya, Hiroki Takahashi, Susumu Kawamoto, Katsuhiko Kamei, Tohru Gono

(MMRC, Chiba Univ.)

P-63 (O-7)

ウシグソヒトヨタケの傘形成に関与する Cag1 と相互作用するタンパク質の探索

増田亮, 村口元 (秋田県立大・生物資源)

担子菌ウシグソヒトヨタケの子実体形成過程において、子実体原基の傘部分が成長せずに子実体原基の状態で止まってしまう突然変異体 *cap-growthless1* を見出した。この突然変異体の子実体原基では、石突上部で傘部分が膨らみはしているものの、子実層が分化していないように思われた。相補活性に基づき、原因遺伝子 *cag1* 遺伝子を特定したところ、*cag1* 遺伝子は出芽酵母の Tup1 と相同なタンパク質をコードしていることが分かった。ウシグソヒトヨタケのゲノムには、もう1つの Tup1 相同遺伝子があり、*Cc.tupA* と命名した。出芽酵母やショウジョウバエの Tup1 タンパク質は、直接 DNA には結合せずに、DNA 結合タンパク質に結合することで、転写抑制を行っていると思われている。そこで Cag1 タンパク質と結合するタンパク質を探索するため、野生型の子実体を形成する #326 株の傘組織から、Total RNA を抽出して cDNA を合成した。Cag1 タンパク質をベイトにして、Yeast two hybrid 法を用いて、約 484000 の cDNA クローンをスクリーニングしたところ、3つのクローンで相互作用が確認できた。Cag1 Interacting Protein という意味で CIP2、CIP3、CIP13 と命名した3つのタンパク質は、それぞれ CC1G_15287、CC1G_11698、CC1G_12764 由来のタンパク質断片であった。PSORTII によって細胞内局在性を予測すると、いずれのタンパク質も核内に存在する可能性が高いことが分かった。現在、これらのタンパク質と Cag1 タンパク質の相互作用部位を特定しようとしているところである。

A screen to identify proteins interacting with Cag1 involved in cap growth of *Coprinopsis cinerea*.

Ryo Masuda, Hajime Muraguchi

(Dept. of Biotechnology, Akita Prefectural Univ.)

P-64

黄麹菌セリントイプカルボキシペプチダーゼ遺伝子のイントロン残存の配列依存性

石田健, 竹内道雄, 山形洋平 (東京農工大院・応生科)

我々は、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ること、*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、イントロン1とイントロン2の位置を入れ替えると本来の位置とは異なる残存割合を示すことを明らかにした¹⁾。これらのイントロン残存が *ocpG* 遺伝子の塩基配列に依存するのかが解明するため、別の遺伝子に *ocpG* イントロンを挿入し、*ocpG* イントロン残存のイントロン配列への依存度を検討した。また、別の遺伝子のイントロンを *ocpG* 遺伝子に挿入し、*ocpG* イントロン残存のエキソン配列への依存度を検討した。

イントロン残存解析のコントロールとして、イントロン残存を起こさないと考えられるアスパルティックプロテアーゼ遺伝子 *pepO* を選択した。*pepO* 遺伝子欠損株をホストとして、*pepO* 遺伝子のイントロン1を *ocpG* イントロン1もしくは *ocpG* イントロン2に置換した遺伝子をもつ株を作製した。これらの株を Czapek-Dox 液体培地で24時間培養し、*pepO* 遺伝子中の *ocpG* イントロンの残存割合を確認した。その結果、*ocpG* イントロン1、*ocpG* イントロン2は *pepO* 遺伝子内においても高い割合で残存を起こすことが明らかとなった。次に、*ocpG* 遺伝子欠損株をホストとして、*ocpG* 遺伝子のイントロン1を *pepO* イントロン1に置換した遺伝子をもつ株を作製した。この株を Czapek-Dox 液体培地で24時間培養し、*ocpG* 遺伝子中の *pepO* イントロン1の残存割合を確認した。その結果、*pepO* イントロン1は *ocpG* 遺伝子内において残存を起こさないことが明らかとなった。以上の結果から、*ocpG* 遺伝子においてイントロン残存を指示するシグナルは、エキソン中ではなくイントロン中に存在することが示唆された。

1) Ishida K, et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2014;78:1328-1336.

The sequence dependence of the intron retention in mRNA from *A. oryzae* serine-type carboxypeptidase gene

Ken Ishida, Michio Takeuchi, Youhei Yamagata (Dept. of Applied Biological Science, Tokyo Univ. of Agriculture and Technology)

P-65

麹菌のアミラーゼ生産におけるカーボンカタボライト抑制は窒素源の違いの影響を受ける

小川真弘, 小山泰二 (公益財団法人野田産業科学研究所)

【背景】 麹菌を始めとする糸状菌において酵素類を生産させるときに、グルコースのような資化されやすい炭素源が存在すると、カーボンカタボライト抑制 (CCR) が発生し、酵素生産が強く抑制される。工業的に使用される株では、CCR が解除されている株が求められる。そのため我々は、麹菌 *A. oryzae* を用いて、本菌の CCR の分子機構に関する解析を行っている。本菌のアミラーゼ生産は、グルコース存在下で、CreA 依存的 CCR が強くかかることが既に報告されている。しかし我々は、最少培地である Czapek-Dox 培地の炭素源を可溶性デンプンに置換し、その培地にグルコースを添加しても、*A. oryzae* のアミラーゼ生産ほとんど低下しないという現象を見出した。そのようなことが起こる原因として、培地の炭素源以外の成分、中でも窒素源の違いが本菌の CCR に影響を及ぼすのではないかと予想し検討を行った。

【方法および結果】 2%可溶性デンプンを含み、窒素源を硝酸塩またはアンモニウム塩とした最少寒天培地に、終濃度 100 mM のグルコースを添加したものと非添加のものを作製した。これに、*A. oryzae* $\Delta ku70$ 株 (コントロール株) および $\Delta creA$, $\Delta ku70$ 株を植菌し、アミラーゼ生産のハロアッセイを実施した。その結果、硝酸塩を窒素源とした培地では、コントロール株における CCR は微弱であったが、アンモニウム塩を窒素源とした培地では、CCR が強く生じることを見出した。また $\Delta creA$, $\Delta ku70$ 株では、アンモニウム塩を窒素源とした際にも、CCR が大幅に緩和されていた。以上の結果から、麹菌のアミラーゼ生産における CreA 依存的な CCR は、窒素源の種類の違いにより影響を受けることが明らかとなった。

Carbon catabolite repression for amylase production in *Aspergillus oryzae* is affected by the deference of nitrogen sources

Masahiro Ogawa, Yasuji Koyama

(Noda Institute for Scientific Research)

P-66

Aspergillus terreus における pH 依存的イタコン酸生産制御機構の研究

安藤祥生, 尾花克哉 (中部大院・応生) 金政 真 (中部大・環境生科)

イタコン酸は不飽和基を有する二価の水溶性有機酸であり、合成樹脂や接着剤、インキ等、工業製品の原料や添加剤として幅広く利用されている。工業生産においては生育速度の観点からもっぱら *A. terreus* が使用されてきた。本菌においてイタコン酸生産性向上のための研究は数多く行われてきたが、イタコン酸の生合成経路は近年まで未解明であった。我々は本菌のシス・アコニット酸デカルボキシラーゼ (CAD) をコードする *CADI* 遺伝子を同定し、CAD がクエン酸回路代謝物であるシス・アコニット酸を基質としてイタコン酸を生成することから、イタコン酸生産の鍵酵素であることを明らかとした。一方、本菌は pH2~3 のみで旺盛にイタコン酸を生産し、pH4 を超えると生産性は大幅に減少するが、この原因は未解明である。本研究は、本菌のイタコン酸生産性が pH 依存的に変化する機構を分子レベルで理解することを目指して行った。

前培養した本菌を、イタコン酸生産に適した pH2~3 と、ほとんどイタコン酸を生産しない pH5 の条件にシフトして培養し、*CADI* 遺伝子転写量と CAD 活性を測定した。その結果、pH2~3 では pH5 と比較して *CADI* 遺伝子転写量と CAD 活性が共に高い傾向が見られた。このことから、本菌のイタコン酸生産の pH 依存的な変化には、*CADI* 遺伝子の転写量の変化が関係していると考えられた。

Regulation of pH responsive itaconic acid production in *Aspergillus terreus*

Yoshiki Ando¹, Katsuya Obana¹, Shin Kanamasa²

(¹Grad. Sch. Biosci. Biotech. Chubu Univ., ²Dept. Envi. Biol. Chubu Univ.)

P-67

麹菌のヒドロフォービン HypD は固体培養時に発現する

石倉 幹大, 藤井 祐希, 土屋 貴寛, 稲葉 拓哉, 中島 春紫 (明治大・農)

ヒドロフォービンは、糸状菌や担子菌の細胞表層に局在する低分子量タンパク質で、特徴的な配置の 8 つの Cys 残基を有する。これまでに麹菌 *Aspergillus oryzae* から 4 つのヒドロフォービン (HypA-D) を見出し出している。HypD は全長 207 アミノ酸で、C 末端に 63 個の荷電アミノ酸を含む 93 アミノ酸の非常に親水的な領域を有している。この C 末端領域はデータベース上に相同タンパク質の報告がなく、既存のヒドロフォービンと異なる性質および機能を持つことが予想される。そこで本研究では、HypD の性質と機能について解析を行った。

in vitro での HypD のタンパク質としての性質を解析するため、麹菌の HypD 高生産株を作製した。培養上清を陰イオン交換カラムおよび疎水性相互作用カラムに供することで、精製 HypD を得た。精製 HypD を用いて疎水性/親水性基材の表面被覆試験を行ったところ、基材表面の濡れ性の変化が観察され、ヒドロフォービン特有の吸着性と表層修飾の性質が認められた。

in vivo での HypD の機能解析のため、 β -グルクロニダーゼ (GUS) を用いた *hypD* 遺伝子の発現解析を行った。その結果、*hypD* 遺伝子は小麦ふすまや蒸し米を用いた固体培養時に高発現し、特に培地の水分含量が少ない時に発現量が増大することが明らかになった。さらに、平板培地においても高浸透圧条件下で発現量の増加が認められた。また、*hypD* 遺伝子欠失株の表現型を観察した結果、高浸透圧条件下での分生子形成量の増加が認められたことから、乾燥環境における分生子形成に HypD が関与していることが示唆された。

Characterization of a hydrophobin HypD from *Aspergillus oryzae*

Kandai Ishikura, Yuki Fujii, Takahiro Tsuchiya, Takuya Inaba, Harushi Nakajima

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

P-68

麹菌におけるカーボンカタボライト抑制制御因子 CreA の細胞内局在と安定性

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。我々はこれまでに、麹菌の CreA がカーボンカタボライト抑制非誘導条件下では不安定であり、グルコースやマンノースなどのカーボンカタボライト抑制を誘導する炭素源存在下で安定化することを明らかにしてきた (田中ら, 第 14 回糸状菌分子生物学コンファレンス)。近年, 他の糸状菌において CreA がセルラーゼ遺伝子発現誘導条件下で核内から細胞質に移行することが報告されている。本研究では CreA の局在と安定性の関係について調べるため, GFP 融合 CreA を用いて細胞内局在解析を行った。

N 末端に GFP を融合した CreA を *creA* 自身のプロモーター制御下で発現させた。フルクトースを炭素源とした培地で培養して蛍光顕微鏡で観察した結果, 核内において強い蛍光が観察された。この菌糸をグルコースやマンノースを炭素源とした培地に移した場合には, 同様に強い蛍光が核内において観察された。一方, マルトースやキシロースを炭素源とした培地に移した場合は, 強い蛍光が観察されず, 細胞質において弱い蛍光が観察された。CreA のアミノ酸配列中に nuclear export signal (NES) として機能する可能性のある配列が存在したため, この推定 NES に変異を導入した CreA の局在を調べた。その結果, マルトースやキシロースを炭素源とした培地に移した場合も, 強い蛍光が核内に観察された。NES に変異を導入した CreA の安定性を調べた結果, マルトース存在下での安定性が野生型の CreA よりも高くなっていた。以上の結果から, CreA はカーボンカタボライト抑制非誘導条件下では核内から細胞質に移行し, 細胞質において分解されることが示唆された。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。

Involvement of subcellular localization in the stability of glucose repression regulator CreA in *A. oryzae*.

Mizuki Tanaka, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi

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

P-69

イネいもち病菌の相同組換え修復機構における Srs2 DNA ヘリカーゼの役割

小川哲央¹・荒添貴之²・佐久間哲史³・山本卓³・桑田茂¹・草野好司¹・大里修一¹ (¹ 明治大院農・² 神戸大院工・³ 広島大院理)

イネいもち病菌の病原性変異機構の研究から DNA 二本鎖切断 (DSBs) と相同組換え (HR) 修復における制御機構の解析を進めている。今回、相同組換え経路の制御に関する主要因子の探索を目的として、Srs2 DNA ヘリカーゼに着目した。出芽酵母の Srs2 DNA ヘリカーゼ遺伝子のホモログを単離して、欠損変異株を用いた機能解析を行った。 $\Delta srs2$ 変異株の表現型は野生株と比較して、付着器形成時における発芽管の異常伸長や付着器の形成不全が一部で観察された。次に、メラニン生合成経路に関わる *Scytalone dehydratase* (SDH) 遺伝子を標的とした遺伝子ターゲティングを実施し、菌叢の白色化を指標とした *srs2* 欠損による HR 修復への影響を調査した。その結果、野生株および $\Delta srs2$ 変異株の両菌株において 100% のターゲティング効率を示したが、 $\Delta srs2$ 変異株では破壊株の取得数が減少する傾向が見られた。現在、より詳細な HR 修復への影響を調査するために、相同組換え検出マーカー系を用いた解析を進めている。

The role of Srs2 DNA helicase in homologous recombination repair mechanism of *Pyricularia oryzae*

Tetsuo Ogawa¹, Takayuki Arazoe², Tetsushi Sakuma³, Takashi Yamamoto³, Shigeru Kuwata¹, Kohji Kusano¹, Shuichi Ohsato¹

(¹Grad. Sch, Agric., Meiji Univ., ²Grad. Sch, Eng., Kobe Univ., ³Grad. Sch, Sci., Hiroshima Univ.)

P-70

Transcriptional regulation mechanism of Trichodermapepsin in *Trichoderma reesei*

Nayani D. Daranagama, Hiroki Aita, Hiroki Hirasawa, Koki Shioya, Haruna Sato, Yoshiyuki Suzuki, Yosuke Shida, Wataru Ogasawara (Dept. of Bioeng., Nagaoka Univ. of Tech.)

Fungal proteases play critical role in metabolism, nutrition and morphogenesis. Filamentous fungus *Trichoderma reesei* which is a most potent cellulase producer and used in many industrial applications, produces the aspartic protease called Trichodermapepsin (TrAsP). TrAsP is involved in proteolytic degradation of cellulases in culture medium. Generally, Production of extracellular proteases is regulated at transcription level and protein level. Previously, we presented that TrAsP was induced by monosaccharides, especially galactose and not expressed in cellulase inducers such as cellulose and sophorose. This disclosed that carbon based regulating mechanism existed in TrAsP production. However, regulation system of proteases *T. reesei* was not studied in detail and a relationship between cellulase and protease production mechanism is still unknown. Due to paucity of knowledge of TrAsP, objective of this study is ascertaining TrAsP producing mechanism.

The promoter region of TrAsP of *T. reesei* QM9414 has putative binding sequence of XYRI, ACEI, CREI, AREA and PACC, that are regulating cellulase production. Specially, XYRI is an essential transcription factor and AREA regulates nitrogen metabolism. Interestingly, results of promoter deletion GUS reporter analysis suggest that XYRI and AREA act as a repressor and an activator in respectively for TrAsP production. For further confirmation, deletion strains of these transcription factors in QM9414 were cultivated in cellulose, glucose and galactose and measured protease activity of culture supernatants separately. Both in glucose and galactose medium, protease activity of QM $\Delta xyr1$ significantly increased, but QM $\Delta areA$ didn't show protease activity. It reveals that TrAsP production is not only depended on carbon source, but also nitrogen source in the medium and cellulase regulating transcription factors differently involve in protease production. This insight of regulation mechanism of TrAsP shows a novel avenue for cellulase production mechanism in filamentous fungi.

P-71 (O-6)

Binding features of ManR and ManS involved in cellulase and mannanase regulation in

Aspergillus nidulans

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

In *A. nidulans*, ManR regulates the expression of cellulolytic genes together with McmA by being recruited to CeRE (Cellulose Responsive Element). Regulation of mannanase production is under control of both ManR and its paralog ManS. Cellobiose induces some mannanase genes (*manB*, *manC*, *mndB*) in a ManR dependent manner, while galactomannan induces a different set of mannanase genes (*manC*, *manE*, *manF*), for which ManS is responsible. In this report, we identified the sequence in CeRE recognized by ManR and showed the relationship between ManR and ManS in binding to some manannase genes.

Mutation analysis by EMSA on CGG/CCG that is within and close to CeRE on the promoter of endoglucanase gene, *eglA* and *eglB*, showed that CCG triplet in CeRE serves as C1rB recognition sequence. ManS could bind to the same 3 sites (CGGN₈CCG) as ManR does on the promoter of *mndB*. However the 2nd binding site which showed the weakest binding affinity by ManR turned out to be bound most strongly by ManS among the three binding sites. In addition, promoter activity assay showed reporter gene with the 2nd binding site was induced in galactomannan, concerning that it is inactive in CMC. These findings indicates that ManR and ManS may possess opposite effect in regulating *mndB* under different inducers. In the case of binding to *manB*, *manE* and *manF*, both ManR and ManS can recognize CGGN₉CC/GG, while most interestingly is, when they were added together to the reaction, ManR-ManS heterodimer was formed. This result aroused our interest in investigating the roles of ManR and ManS in regulation of mannanase genes. Further study will focus on the clarification of inductive mechanism mediated by ManR and ManS, and the necessity of heterodimer formation.

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-72

麹菌 *Aspergillus oryzae* のリン酸獲得系遺伝子の転写因子 PhoR の機能解析

多田 功生, 大口 ひかる, 鈴木 聡, 楠本 憲一 (農研機構 食総研)

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の転写因子 Pho4p は、リン酸の獲得に関与するホスファターゼ、リン酸トランスporter等の遺伝子発現を制御することが明らかとなっている。我々は、それと同様の機能を持つとされる *Aspergillus nidulans* の PalcA のオルソログである麹菌 *Aspergillus oryzae* の PhoR が、環境中のリン酸量に応じて分泌型ホスファターゼ活性を制御していることを明らかにし、報告している。

今回我々は、新たに RIB40 由来の *AligDApyrG* 株を用いて *phoR* 破壊株を作成し、その解析を行った。*phoR* 破壊株は、低リン酸(0.1mM)培地において生育が著しく悪く、分生子形成もほとんど見られなかった。細胞抽出液中のホスファターゼ活性、ホスホジエステラーゼ活性も著しく減少していた。高リン酸(11mM)培地においては、コントロール株と比較して生育に大きな変化は見られなかったが、細胞内のリン酸量が大きく減少していた。また、麹菌ゲノム情報より見出した 11 個のリン酸トランスporter様遺伝子について qRT-PCR による発現解析を行ったところ、6 個の遺伝子の発現量が低リン酸培地で培養した *phoR* 破壊株にて減少していることが明らかとなった。そのうち 2 遺伝子は高リン酸条件でも発現量が減少していた。さらに、*phoR* 破壊株は米麹培養において、培養時間 24 時間ではコントロール株と菌体量に差が見られなかったが、40 時間では菌体量が減少していた。また、GFP-PhoR 融合タンパク質が、低リン酸環境で核に局在することを確認した。

Functional analysis of the transcription factor involved in phosphate acquisition in *Aspergillus oryzae*

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

P-73 (O-5)

麹菌における炭素源依存的な選択的転写開始機構を有する解糖系遺伝子の同定

井上 大志, 田路 洋紀, 高間 充, 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 *Aspergillus oryzae* のゲノムデータと EST データの比較から、解糖系遺伝子であるエノラーゼ遺伝子 *enoA* とグリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素遺伝子 *gpdA* において 2 つの転写開始点が見出された。その後の解析により、これら 2 つの遺伝子は解糖系または糖新生で代謝される炭素源に応じて異なる転写開始が行われ、特に *enoA* においては炭素源の種類に応じて 2 つの転写開始点が厳密に使い分けられることが明らかとなった。さらに興味深いことに、上流から転写される際の 5' UTR では、下流からの転写開始点を含んだ配列がイントロンとしてスプライシングされる。構成的に発現すると考えられていた可逆反応を制御する 2 つの解糖系遺伝子においてこのような現象は初めての発見であり、その生理学的意義や分子機構の解明は学術上重要な課題であると考えられる。本研究では 5' RACE と qRT-PCR 解析により、*enoA* と *gpdA* 以外の解糖系遺伝子においても同様の現象がみられるかどうかを検討した。その結果、解糖系と糖新生の両経路において重要だと考えられる可逆反応を制御する 3 遺伝子と不可逆反応を制御する 1 遺伝子において、複数の転写開始点と 5' UTR 内のイントロンの存在が確認され、炭素源に応じて異なる転写開始が起こることが新たに明らかとなった。またその中でも特にアルドラーゼ遺伝子 *fbpA* には、*enoA* と同様に炭素源に応じた厳密な転写開始点の使い分けが見られた。一方で糖新生の制御に重要とされる転写因子 *AcuK*、*AcuM* は *enoA* の上流からの転写に関与することを既に報告しているが (2015 農芸化学会)、興味深いことに *fbpA* やその他の複数の転写開始点を有する遺伝子の ORF 上流にも、*AcuK*、*AcuM* の結合モチーフが存在した。現在はこれらの遺伝子と *AcuK*、*AcuM* の関連について解析を進めている。

Identification of glycolytic genes transcribed alternatively depending on carbon sources in *Aspergillus oryzae*

Taishi Inoue, Hiroki Toji, Mitsuru Takama, Mizuki Tanaka, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi

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

P-74

麹菌転写因子 XlnR の誘導物質依存的リン酸化の生理的意義

浅井 恒滋, 杉本 賢吾, 石川 周平, 金丸 京子, 木村 真, 小林 哲夫 (名大院・生命農)

XlnR はキシラン分解やキシロース代謝に関わる遺伝子群の転写活性化因子である。本因子は常に核に存在すると考えられており、誘導物質であるキシロースに応答してリン酸化される。また、このリン酸化は可逆的であり、キシロースの除去により脱リン酸化される。これらから、リン酸化が XlnR の転写活性化能の制御に関わると考えられるが、その実験的証拠は得られていなかった。本研究では、XlnR の 6 カ所の推定リン化部位をアラニンおよびグルタミン酸に置換し、その影響の解析によりリン酸化の生理的意義の解明を試みた。

各アミノ酸置換体を発現する麹菌のキシラナーゼ生産性を野生株と比較したところ、S556A 変異体発現株において著しい生産性の低下が認められた。そこで XlnR により制御されるキシラナーゼである *xynG2* の発現を Northern blotting により解析したところ、顕著に mRNA 量が低下していた。さらに、XlnR 抗体を用いた Western blotting により S556A 変異体のリン酸化レベルを野生型と比較したところ、野生型ではキシロース誘導時においてリン酸化レベルの異なる 2 本の isoform が生じるのに対し、変異体では移動度の低い isoform が消失していた。以上から、S556 のリン酸化が XlnR 活性を制御することが示唆された。しかし、*xynG2* の誘導は低レベルながら依然として見られることから、ほかのリン酸化部位も活性制御に関わっている可能性がある。現在、キシラナーゼ生産への影響が顕著ではなかった他の推定リン酸化部位変異体についても解析を行っており、その結果も併せ考察する予定である。

本研究は、農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業の一貫として行われたものである。

Physiological role of inducer-triggered phosphorylation of XlnR in *Aspergillus oryzae*.

Koji Asai, Kengo Sugimoto, Shuhei Ishikawa, Kyoko Kanamaru, Makoto Kimura, and Tetsuo Kobayashi

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

P-75

麹菌における菌体内 α -グルコシダーゼ MalT のアミラーゼ誘導生産への関与

渡辺崇健, 市川昂典, 長谷川-城祥子, 田中瑞己, 渡部昭, 新谷尚弘, 五味勝也 (東北大院・農・生物産業創成)

麹菌のアミラーゼ遺伝子の発現は転写因子 AmyR が制御しているが, AmyR の活性化基質については明らかになっていない。一方で, 麹菌のアミラーゼ生産にはマルトースの菌体内への取り込み及び資化が重要な過程であると考えられており, マルトーストランスポーターMalP, 菌体内 α -グルコシダーゼ MalT, これらを制御する転写因子 MalR からなるマルトース資化遺伝子クラスター (MAL cluster) がマルトース資化において主要な役割を果たしている。本研究では, 特に MalT のアミラーゼ誘導生産への関与について解析を行った。malT 破壊株では, デンプン及びマルトース寒天培地において著しい生育の悪化が観察され, マルトース液体培地にて培養すると, α -アミラーゼ誘導生産の顕著な低下, α -アミラーゼ遺伝子発現の大幅な遅延が観察された。一方, マルトースとイソマルトースによる遺伝子発現プロファイルを調べたところ, イソマルトースの方が速やかにアミラーゼ遺伝子発現を誘導し, malT はマルトース培養時のみ発現が誘導された。またイソマルトース培養では野生株と malT 破壊株においてアミラーゼ遺伝子発現に差は認められなかった。以上より AmyR は, 菌体内に取り込まれたマルトースが MalT の糖転移反応を受け, 変換されたイソマルトースによって活性化される可能性が示唆された。現在 MalT の糖転移活性の有無を調べ, 仮説の検証を行っている。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。

Involvement of an intracellular α -glucosidase, MalT, in inducible production of amylolytic enzymes in *Aspergillus oryzae*

Takayasu Watanabe, Takanori Ichikawa, Sachiko Hasegawa-Shiro, Mizuki Tanaka, Akira Watanabe, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi (Div. Biosci. Biotechnol. Future Bioind., Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ.)

P-76

Aspergillus oryzae csrA 遺伝子の natural antisense RNA は sense RNA と結合し, 発芽を制御する

辻井雅, 竹内道雄, 山形洋平 (東京農工大院・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, 分生子中では csrA (conidia specific reductase) 遺伝子領域と重なる領域から転写された antisense RNA (as-csrA) 由来の EST が最も多く, 解析された 528 の EST のうち 43 を占めていた。我々は定量 PCR により, as-csrA が分生子特異的であることを明らかにした。一方, csrA 遺伝子から転写された sense RNA (SN RNA) は菌糸では検出できず, 分生子と分生子着生直前の菌体に最も多量に存在していた。また, 膨潤した分生子からも僅かに検出された。さらに, csrA 欠損株 (Δ csrA 株) では, 分生子形成能が低下することも明らかにした (1)。今回は, CsrA, as-csrA の機能を明らかとすることを目的とした。

【方法と結果】 分生子から抽出した total RNA を S1 nuclease で処理し, RT-PCR のテンプレートに用いた。その結果, アクチン mRNA からは増幅が見られず, csrA 遺伝子由来 mRNA からは増幅が見られた。一方, as-csrA のプロモーター領域欠損株 (Δ as-csrA) を作製し, Δ csrA 株とともに分生子のストレス耐性, 発芽率を調べた。その結果, Δ csrA, Δ as-csrA 両株とも熱ストレス耐性, 酸ストレス耐性が低下していた。更に, Δ as-csrA 株では発芽率が低下していることが明らかとなった。これらのことから CsrA と as-csrA はいずれも分生子形成に関与し, as-csrA は SN RNA と相補的に結合することで csrA 遺伝子由来の mRNA の安定性, あるいはそこからの翻訳を制御している可能性が示唆された。

(1) M Tsujii et al, *Biosci Biotech Biochem*, in press. doi: 10.1080/09168451.2015.1101333.

Natural antisense RNA of csrA binds to sense RNA and regulate germination in *Aspergillus oryzae*

Masaru Tsujii, Michio Takeuchi, Youhei Yamagata

(Department of Applied Biological Science, Tokyo University of Agriculture and Technology)

P-77

Fusarium graminearum における *Tri6* 5' 上流領域の機能解析

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 は二次代謝によりマイコトキシンであるトリコテセン類を産生する。本菌のトリコテセン生合成遺伝子クラスターにおいて、転写因子 *Tri6* および P450 モノオキシゲナーゼをコードする *Tri4* はクラスター中央部で互いに逆向きに隣接し、およそ 1.1 kb の領域で隔たれた配置をとっている。本領域内には GATA 配列など様々なシス配列が見出され、*Tri4* 開始コドンからおよそ 370 bp 上流には TRI6 結合サイトが存在する。これは *Tri4* の転写活性に関与すると考えられているが、本サイトが *Tri6* の転写活性に及ぼす影響はこれまで調べられてこなかった。我々はこれまでにトリコテセン生合成の制御機構を解析する過程で *Tri6* の正の自己制御を示唆する結果を得てきており、本研究では *Tri4-Tri6* 間の領域が双方向性プロモーターとしての機能を持つ可能性に焦点をあて、解析を行った。

まずマーカー遺伝子の痕跡を残さずゲノム上 *Tri4* の上流に存在する TRI6 結合サイトに点変異のみを導入したセルフクローニング株を作製し、トリコテセン生産が消失することを確認した。次に、本株に対しクラスター外から *Tri4* を過剰供給した株を作製したところ、トリコテセン生産性は回復したが、その生産量は野生型と比べてわずかであった。この結果は *Tri4* 上流に位置する TRI6 結合サイトが *Tri4* の転写活性化だけでなく *Tri6* の転写にも関与することを示唆するものである。現在、作製した株におけるトリコテセンクラスター内遺伝子の転写状況を解析している。

本研究の一部は農食事業の支援を受け行われた。

Functional analysis of *Tri6* 5' upstream region in *Fusarium graminearum*.

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

(Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya Univ.)

P-78

抗摂食性物質 citreohybridonol 合成を担うシトクロム P450 の発見

全智揚, 松田侑大, 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る。我々は、糸状菌メロテルペノイドの生合成に興味を持ち、andrastin A, terretonin, anditomin を始めとするメロテルペノイド化合物の生合成研究を展開してきた。我々は新たに andrastin A の生合成遺伝子クラスター (*adr* クラスター) と類似した遺伝子クラスターを *Emericella varicolor* のゲノム中に見出しており、本クラスター特異的に含まれる 3 つの遺伝子を andrastin A 生産能を有する *Aspergillus oryzae* 形質転換体に導入することで、新規代謝物が得られることを報告している¹。

今回、この新たに得られた化合物の単離構造決定を試みたところ、本化合物が抗摂食作用を有する citreohybridonol であることが判明した。加えて、citreohybridonol の生合成中間体と考えられる新規化合物の単離構造決定にも成功した。一方で、上述の 3 つの遺伝子のより詳細な機能解析を行ったところ、citreohybridonol の生合成に寄与するのはシトクロム P450 をコードする 1 つの遺伝子のみであることも明らかとなった。現在、citreohybridonol に至る生合成経路の確立ならびに、本 P450 に由来する未知の生合成前駆体の構造決定を進めており、その結果についても合わせて報告したい。

1. 全ら, 第 14 回糸状菌分子生物学コンファレンス要旨集, 2014, P-84

Discovery of a cytochrome P450 responsible for the synthesis of an antifeeding compound citreohybridonol

Zhiyang Quan, Yudai Matsuda, Ikuro Abe

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

P-79

An unusual chimeric terpene synthase from *Emericella varicolor*: Diterpene synthase or sesterterpene synthase?

Bin Qin, Takahiro Mori, Yudai Matsuda, Masahiro Okada, Takaaki Mitsuhashi, Zhiyang Quan, Ikuro Abe (The University of Tokyo · Graduate School of Pharmaceutical Sciences)

Diterpene synthases are the primary enzymes responsible for catalyzing the formation of diterpenes (C₂₀) from the substrates GGPP (Geranylgeranyl pyrophosphate), while sesterterpene synthases are responsible for the forming of sesterterpenes (C₂₅) from GFPP (Geranylarnesyl pyrophosphate). In this research, by genome mining of *E. varicolor*, we found a chimeric terpene synthase consisting of cyclase domain and prenyltransferase domain. The metabolite of this chimeric terpene synthase was identified as a diterpene compound by using *in vivo* system (*Aspergillus oryzae*). Surprisingly, besides the diterpene compound, this terpene synthase could produce a sesterterpene compound *in vitro* by using DMAPP (Dimethylallyl pyrophosphate) and IPP (Isopentenyl pyrophosphate) as substrates. To investigate the structure of the sesterterpene compound, a new chimeric terpene synthase was constructed by swapping the PT domain of this terpene synthase with a GFPP synthase from *E. varicolor*, and as a result, the chimeric enzyme could produce both diterpene and sesterterpene compounds *in vivo*. These findings indicate that this terpene synthase is an unusual terpene synthase, which displays the ability to catalyze the forming of both diterpene and sesterterpene compounds. The absolute configurations of the two metabolites were also determined in this research.

An unusual chimeric terpene synthase: Production of diterpene and sesterterpene at the same time

Bin Qin, Takahiro Mori, Yudai Matsuda, Masahiro Okada, Takaaki Mitsuhashi, Zhiyang Quan, Ikuro Abe (Grad. Sch. Pharm. Sci. · Univ. of Tokyo)

P-80 (O-3)

昆虫病原性糸状菌 *Lecanicillium* sp. が生産するポリケタイド合成酵素 (PKS) と非リボソームペプチド合成酵素 (NRPS) 由来新規ハイブリッド化合物の同定

中村美有希, Minh Viet Nguyen, 石堂圭一, 木下浩, 仁平卓也 (阪大・生物工学国際交流セ)

糸状菌において PKS と NRPS は生理活性物質の主骨格を合成する主要な酵素である。当研究室で *Lecanicillium* sp. MAFF635047 のゲノム解析を行った際、PKS 遺伝子と NRPS 遺伝子が隣接して存在し、さらに、その周辺の遺伝子配座が他菌株でも保存されていたことから、この PKS, NRPS 遺伝子を含む領域は一つの化合物の合成に関与していると予想した。糸状菌において PKS と NRPS によって合成されるハイブリッド化合物の報告例は少ないため、本研究ではこれらの産物の単離・同定を目指した。

Lecanicillium sp. MAFF635047 の親株と PKS 遺伝子破壊株, NRPS 遺伝子破壊株を同条件で培養し、その培養抽出液について HPLC で解析を行った。その結果、親株のプロファイルでは検出されるが破壊株のプロファイルでは検出されない化合物を発見した。この化合物を精製後、MS 解析, NMR 解析によって構造決定した。その結果、fusaristatin の新規類縁体であることが明らかとなった。

Identification of a novel hybrid compound synthesized by PKS and NRPS from *Lecanicillium* sp. MAFF635047

Miyuki Nakamura, Minh Viet Nguyen, Keiichi Ishido, Hiroshi Kinoshita, Takuya Nihira (ICBiotech, Osaka Univ.)

P-81

シクロピアゾン酸生合成における *cpaM* の機能解析

菊池友希¹, 小山哲史², 飯尾晋一郎², 篠原靖智³, 久保田高明^{4,5}, 小林淳一⁴, 小山泰二³, 徳岡昌文², 進藤齊², 穂坂賢² (¹東農大院・農, ²東農大・応生科, ³野田産研, ⁴北大院・薬, ⁵昭和薬大)

シクロピアゾン酸(CPA)は *Aspergillus oryzae* 一部菌株やその近縁種が生産する二次代謝物である。生合成遺伝子クラスターの解析から, *A. oryzae* は CPA 合成に関わる *cpaA*, *cpaD*, *cpaO* に加えて, CPA の修飾に関わる *cpaH* と *cpaM* を保持することが見出されている¹⁾。*cpaH* は, 遺伝子破壊株の解析から CPA 誘導体である 2-oxoCPA の合成に関わることが示されたが, *cpaM* は, 遺伝子破壊による影響がなく, 機能は明らかになっていない¹⁾。推定アミノ酸配列から *CpaM* はメチル基転移酵素と推定されているが, *A. oryzae* は 2-oxoCPA のメチル化誘導体である speradine A を生産しない。そこで本研究では, *cpaM* は speradine A の合成に関与するが, *A. oryzae* においては機能していないと予想し, *cpaM* の機能解析を行った。

speradine A 生産株である *A. tamarii* NBRC 4099 について, *cpaM* ホモログの推定 ORF とその周辺領域を解読した。取得した *cpaM* ホモログを *A. oryzae* で発現させたところ, 親株が生産する 2-oxoCPA に加えて speradine A を生産した。また, *A. tamarii* との比較から *cpaM* ORF 内に 4 塩基の欠失が見出されたため, 4 塩基を復帰させた *cpaM* を作製し *A. oryzae* で発現させたところ, speradine A を生産した。以上より, *cpaM* は speradine A の合成に関わることが明らかとなり, また, *A. oryzae* の *cpaM* は 4 塩基の欠失により機能していないことが示唆された。

1) Kato, N. *et al.*, *ChemBioChem* 12, 1376–1382 (2011)

Functional analysis of the *cpaM* in cyclopiazonic acid biosynthesis

Tomoki Kikuchi¹, Akifumi Koyama², Shin-ichiro Iio², Yasutomo Shinohara³, Takaaki Kubota^{4,5}, Jun-ichi Kobayashi⁴, Yasuji Koyama³, Masafumi Tokuoka², Hitoshi Shindo², Masaru Hosaka² (¹Grad. Sch. Agric., Tokyo Univ. Agric., ²Fac. Appl. Biosci., Tokyo Univ. Agric., ³Noda Inst. Sci. Res., ⁴Grad. Sch. Pharm., Hokkaido Univ., ⁵Showa Pharm. Univ.)

P-82

白麹菌 *Aspergillus kawachii* におけるクエン酸合成関連遺伝子の機能解析

門岡千尋¹, 泉津弘佑², 奥津果優¹, 吉崎由美子¹, 高峯和則¹, 後藤正利³, 玉置尚徳¹, 二神泰基¹ (¹鹿児島大・農, ²滋賀県大・環境科学, ³九州大・農)

白麹菌 *Aspergillus kawachii* は大量のクエン酸を菌体外に分泌する性質をもつ。本研究ではクエン酸合成酵素遺伝子 *citA* の上流と下流に位置する遺伝子が糸状菌において高く保存されていることに着目し, クエン酸生産機構との関連を明らかにすることを目的とした。これらの遺伝子は, 出芽酵母の RNA 結合タンパク質をコードする *nrd1*, およびミトコンドリアのクエン酸とオキソグルタル酸の交換輸送体をコードする *yhm2* と相同性を示すことから, *nrdA* および *yhmA* とした。

まず, *citA*, および *yhmA* 遺伝子の破壊株を構築した。*citA* および *yhmA* 破壊株は, グルコースを炭素源とする培地において野生株と比較して顕著に生育がわるくなった。一方, 酢酸, あるいはグリセロールを炭素源とする培地では, 野生株と各破壊株の生育は同様であった。凍結乾燥菌体重量あたりの菌体外の有機酸量を測定した結果, *citA* 破壊株は野生株と比べてクエン酸, コハク酸, リンゴ酸が減少し, ピルビン酸が上昇した。また, *yhmA* 破壊株は, 野生株と比べてクエン酸, オキソグルタル酸, コハク酸, およびリンゴ酸が減少した。よって, *yhmA* は *citA* と同様に有機酸生産に関わることが示唆された。一方, *nrdA* はヘテロカリオン破壊株のみ取得されたことから, 必須遺伝子である可能性が示唆された。

Characterization of genes associated with citrate synthesis in *Aspergillus kawachii*

Chihiro Kadooka¹, Kosuke Izumitsu², Kayu Okutsu¹, Yumiko Yoshizaki¹, Kazunori Takamine¹, Masatoshi Goto³, Hisanori Tamaki¹, Taiki Futagami¹
(¹Kagoshima Univ., ²Univ. of Shiga Pref., ³Kyushu Univ.)

P-83 (O-4)

麴菌 *astellolide* 生合成遺伝子クラスターの同定

篠原靖智¹, 川谷誠², 二村友史², 長田裕之², 小山泰二¹ (¹野田産研、²理研・CSRS)

ゲノム解析の結果、麴菌は多くの二次代謝関連遺伝子を有していることが明らかとなったが、生産物が明らかになっている二次代謝産物遺伝子クラスターは非常に少ない。近年、クロマチンリモデリングが二次代謝関連遺伝子の発現に関与していることが明らかとなってきた。そこで、我々は、麴菌の転写制御関連遺伝子破壊株ライブラリーを用い、麴菌が生産する二次代謝産物および、その生合成遺伝子の同定を試みた。

ライブラリー株を二次代謝産物のプロファイルの変化でスクリーニングした結果、ヒストン3リジン4のメチル化に寄与する遺伝子 *cclA* の麴菌ホモログを破壊した株 ($\Delta cclA$) において、いくつかの代謝物の産生が増加することを見出した。また、産生量の変化が顕著であった2つの代謝物を単離し構造解析を行い、14-deacetyl *astellolide* A (14-DAA) および B (14-DAB) であることを明らかとした。各化合物の生物活性を調べたところ、14-DAB にがん細胞生育阻害活性が見出された。いずれの化合物も過去に麴菌から単離の報告はあるものの生合成遺伝子に関する知見は全くないことから、*astellolide* 生合成遺伝子クラスターの同定を試みた。マイクロアレイ解析を用い、 $\Delta cclA$ 株で発現量が増加している二次代謝関連遺伝子の探索を行ったところ、NRPS をコードすると予測されている遺伝子 *astA* の発現が $\Delta cclA$ 株で顕著に増加していた。そこで、この遺伝子を $\Delta cclA$ バックグラウンドで破壊し、得られた破壊株 ($\Delta cclA \Delta astA$) の代謝物の LC-MS 解析を行った。その結果、 $\Delta cclA \Delta astA$ 株では、14-DAA および 14-DAB に相当するピークが消失していたことから、*astA* が *astellolide* の生合成に関与していることが明らかとなった。

Identification of *astellolide* biosynthetic gene cluster in *Aspergillus oryzae*.

Yasutomo Shinohara¹, Makoto Kawatani², Yushi Futamura², Hiroyuki Osada², Yasuji Koyama¹

(¹Noda Ins. Sci. Res., ²RIKEN CSRS)

P-84

昆虫制御活性物質オカラミンの生合成遺伝子クラスターの同定

加藤直樹¹, 古谷章悟², 衣笠清美¹, 高橋俊二¹, 松田一彦², 長田裕之¹ (¹理研 CSRS・ケミカルバイオロジー、²近畿大・農)

オカラミンは *Penicillium simplicissimum* AK-40 株より単離されたプレニル化インドールアルカロイド化合物である。これまでに、本化合物の選択的な殺虫活性に関わる分子標的が、無脊椎動物にのみ存在する抑制性グルタミン酸受容体であることを明らかにしている。さらなる生物活性評価のためには生産性向上が必須であるため、生合成研究に着手した。今回は、オカラミン生合成遺伝子クラスターの同定と、その機能解析の結果について報告する。

まず、候補となる遺伝子を探索するため、オカラミン生産菌 *P. simplicissimum* AK-40 株のドラフトゲノム解読を行い、2ndFind により二次代謝関連遺伝子を予測した。オカラミンの生合成には、その化学構造から非リボソームペプチド合成酵素 (NRPS) に加え、プレニル基転移酵素やメチル基転移酵素、複数のオキシゲナーゼの関与が予想された。ゲノム中に複数見出された NRPS 遺伝子のうち、それら修飾酵素遺伝子が近傍に存在するものはひとつのみであり、その遺伝子 (*oka*) クラスターを候補に解析を進めた。次いで、遺伝子欠失実験を行い、*oka* 遺伝子クラスターの生合成への関与について検討した。標的 *oka* 遺伝子の全長を薬剤耐性遺伝子と置換することで欠失株を作製し、その代謝物生産を LC/MS により解析した。その結果、作製した4種類のオキシゲナーゼ遺伝子欠失株のそれぞれにおいて、その生合成における役割に見合う代謝物生産パターンの変化が認められ、*oka* クラスターがオカラミン生合成を担っていることが明らかとなった。

Identification of the okaramine biosynthetic gene cluster

Naoki Kato¹, Shogo Furutani², Kiyomi Kinugasa, Shunji Takahashi¹, Kazuhiko Matsuda², Hiroyuki Osada¹

(¹Chem. Biol., RIKEN CSRS, ²Dept. of Agri., Kinki Univ.)

P-85

Sirtuin 活性の制御による糸状菌の休眠二次代謝系遺伝子の活性化

茂本亮輔, 伊藤英里子, 張本修平, 松本貴良, 榎尾俊介, 高谷直樹 (筑波大院・生命環境)

糸状菌 *Aspergillus nidulans* では, NAD⁺依存型ヒストン脱アセチル化酵素である sirtuin (SirA)によってステリグマトシスチンなどの二次代謝産物の生産がエピジェネティック抑制される。本研究では, まず, 本菌の *sirA* および 4 つの sirtuin オルソログ (*sirB*, *sirC*, *sirD*, *sirE*) の遺伝子破壊株を作製したところ, いずれの株においても, 野生株と比較してヒストン H4K16 のアセチル化レベルが上昇していた。これらと野生株では, 生産される二次代謝産物のパターンが異なっていたことから, 5 つの sirtuin アイソザイムがそれぞれ二次代謝系遺伝子の発現を抑制することが示された。これらの活性を阻害する薬剤を用いて, 糸状菌の二次代謝系の強制発現を行うことを試みた。1107 種の糸状菌培養液中から SirA 活性を阻害するものを選抜し 31 種の培養液を得た。このうち, 7 種の SirA 阻害化合物を精製し構造を決定した。その結果, *A. nidulans* の培養液中に SirA の活性を阻害する化合物が含まれることを発見し, これらは本菌等が生産することが知られる diorcinol, cordyol C, violaceol I および violaceol II であった。また, 0.5 mM diorcinol を添加した培地を用いて *A. nidulans*, *A. terreus*, *Ustilago maydis*, *Fusarium oxysporum* を培養したところ, diorcinol を添加しない培養と比較して, いずれの菌株も培養液抽出物中に多数の未同定化合物を生産することが明らかとなった。これらの結果は, diorcinol が多種の糸状菌において通常は発現抑制されている二次代謝産物の生産を人工的に誘引する薬剤として利用できる可能性を示し, 新たな医薬開発のための技術として貢献すると期待される。

Sirtuins regulate fungal secondary metabolisms

Ryosuke Shigemoto, Eriko Ito, Shuhei Harimoto, Takara Matsumoto, Shunnsuke Masuo and Naoki Takaya

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

P-86 (O-8)

大規模数理モデリングによる菌根菌感染関連遺伝子の同定と感染予測法の確立

石井一夫¹, 古崎利紀¹, 中川知巳² (東京農工大・農学府農学部¹、基生研²)

菌根菌は, 菌根を作って植物と共生する菌類で, 土壌中の糸状菌が植物の根の表面または内部に着生したものを菌根と言う。我々は菌根菌感染の見られるフタバネゼニゴケを材料に菌根菌感染植物と非感染植物をトランスクリプトーム解析で比較することにより菌根菌共生のメカニズムを解析してきた(宮本ら, 第54回日本植物生理学会, 2012年)。今回これらのデータを基に, 判別分析による判別関数を求め, 菌根菌感染の予測数理モデルを作成することを試みた。次世代シーケンサーを用いた RNA-Seq データから感染予測指標遺伝子を, 無作為抽出法(ブートストラップ)により自動抽出し, スパコンを用いた並列分散処理により感度, 特異度, ウィルクスのラムダ統計量を自動計算し最適化を試みた。その結果, 極めて感度及び特異度の高い判別関数が得られ, 菌根菌感染の予測を判別分析で実施することが可能となったので報告する。

Mathematical Modeling for Mycorrhizal Infection using Biological Big Data and Combinatorial Optimization

Kazuo Ishii¹, Toshinori Kozaki¹, Tomomi Nakagawa²

(¹Tokyo Univ. Agricul. Technol., ²Natl. Inst. Basic Biol.)

P-87

プレオスポラ目菌にユニークな β -キシロシダーゼホモログの発現解析

吉田裕史, 住田卓也, 田中千尋 (京都大院・農)

イネ科植物を宿主とする病原菌にとって、イネ科近縁群に特有の一次細胞壁架橋性多糖であるキシランを分解する能力はとりわけ重要な性質だと考えられる。Wegener et al. (1999) はトウモロコシ北方斑点病菌 *Bipolaris zeicola* における主要な分泌型 β -キシロシダーゼとして Xyp1 を分離・同定した。Xyp1 は Glycoside Hydrolase ファミリー43 に分類され、キシラン及びその構成糖に対し特異的な活性を示すことが報告されている。今回、我々は同属のトウモロコシごま葉枯病菌 *B. maydis* のゲノム情報を検索し、Xyp1 との類似性が高い BmXyp1 並びにやや類似性の低い BmXyp2 を見出した。さらに、これら2つに対するホモログを菌類全般に渡って探索し、系統解析を行ったところ、Xyp1・BmXyp1 は同一系統に位置付けられ、そのオルソログは *Bipolaris* 属をはじめとするプレオスポラ目菌にのみ見つかった。一方、BmXyp2 は BmXyp1 のパラログであることが示され、過去に *Aspergillus oryzae* など他の菌類で報告されたホモログは BmXyp2 と同じ系統に分類される結果となった。そこで、BmXyp1 の系統にユニークな発現制御機構が備わっている可能性を探る端緒として、*B. maydis* の BmXYP1 プロモーター配列直下に緑色蛍光たんぱく質の遺伝子を組み込み、蛍光レポーターによる発現解析を行った。その結果、糖源としてキシロース、アラビノース、セルロース、ペクチン、トウモロコシ葉不溶性画分、オートミールの何れかを2% (w/v) 添加した平板培地においては菌叢周縁部の菌糸に明瞭な蛍光が認められた。一方、グルコース、フルクトース、スクロース、セロビオース、可溶性澱粉の何れかを糖源とした場合には微かな蛍光のみ観察された。タマネギ鱗葉剥離表皮に本菌株を接種したところ、附着器を介してタマネギ表皮組織に貫入した侵入菌糸において強い蛍光が見られた。今後、BmXyp2 の発現様式についても解析を行う予定である。

Expression assay of a putative beta-xylosidase homologue whose phyletic group is unique to Pleosporales fungi

Hiroshi Yoshida, Takuya Sumita, Chihiro Tanaka

(Grad. School of Agriculture, Kyoto Univ.)

P-88

キャベツ萎黄病菌は生存に必須でない複数の小型染色体を保持する

鮎川侑¹, 柏毅², 小松健^{3, 4}, 寺岡徹³, 有江力³

(¹農工大院連農・²理研 CSRS・³農工大院農・⁴農工大テニュアトラック機構)

キャベツ萎黄病菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* (*Foc*) の病原性関連遺伝子 *FocSIX4* は約 1.4 Mb の小型染色体に座乗する(柏ら, 2014)。また、エンドウ萎凋病菌 f. sp. *pisi* やトマト萎凋病菌 f. sp. *lycopersici* (*Fol*) でも病原性関連遺伝子が小型染色体に座乗することが報告されている(Coleman et al., 2009, Ma et al., 2010)。さらに *Fol* の小型染色体では、菌株間の水平伝播が報告されており、これらが病原性には必要だが生存に必須でない conditionally dispensable (CD) 染色体であることが示唆されている(Ma et al., 2010)。そこで、*Foc* の小型染色体が生存に必須であるかについて調査を行った。小型染色体にハイグロマイシン B 耐性遺伝子を組込んだ *Foc* (Kashiwa et al., 2013) の小型染色体の喪失を、VanEtten et al. (1998) に従いペノミル (1.56~70.0 μ g/ml) 処理によって促した。その結果、ハイグロマイシン B 感受性株 5 株を得た。これらの株の核型解析を行ったところ、1.4 Mb の小型染色体に加え、2.2 Mb の染色体も観察されない 1 株を得た。この株の DNA を鋳型に、1.4 Mb の小型染色体に座乗する *SIX9* および *ORX1*, 2.2 Mb の小型染色体に座乗する *SIX8* のホモログ遺伝子を PCR で増幅したところ増幅産物が確認されず、この株が 2 本の小型染色体を喪失していることを認めた。この株を暗黒下で 25 °C で 9 日間、PDA 培地で培養したところ、生育が遅れる傾向が認められたが生存には影響なく、1.4 Mb および 2.2 Mb の染色体が *Foc* の生存に必須でないことが示された。

Dispensable small chromosomes in *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*

Yu Ayukawa¹, Takeshi Kashiwa², Ken Komatsu^{3, 4}, Tohru Teraoka³, Tsutomu Arie³

(1 Unit. Grad. Sch. Agric., Tokyo Univ. of Agric. Tech., 2 CSRS, RIKEN, 3 Grad. Sch. Agric., Tokyo Univ. of Agric. Tech., 4 Organization for Promotion of Tenure-track System, Tokyo Univ. of Agric. Tech.)

P-89 (O-9)

イネいもち病菌の非病原性タンパク質 AVR-Pia の構造と機能の解析

藤原志帆¹, 樋口裕也¹, 佐藤佑樹¹, 尾瀬農之², 神谷昌克³, 浅野行蔵¹, 曾根輝雄¹

(¹北大院農,²北大院薬,³北大院先端生命)

イネいもち病はイネの最重要病害であり、その防除に抵抗性品種が使用されている。抵抗性反応は、病原菌の AVR 遺伝子産物を宿主の R 遺伝子産物が認識することによって起こるとされているが、その詳細は未だわかっていない。イネいもち病菌の AVR 遺伝子の 1 つである AVR-Pia はイネの R 遺伝子 Pia に対応しており、その遺伝子産物は、Pia 遺伝子産物の 1 つの RGA5-A の C 末端部分と相互作用することが知られている。

Yeast two hybrid 解析により AVR-Pia は多量体化すると推測された。さらに、2 アミノ酸置換体 (AVR-Pia^{F38AV40A}) が AVR-Pia 同士の相互作用を弱くすることが判明した。また、AVR-Pia^{F38AV40A} は宿主の Pia 遺伝子産物の 1 つの RGA5-A の C 末端部分と野生型と同等の相互作用を示したが、接種試験において AVR-Pia^{F38AV40A} を発現するいもち病菌は、Pia イネへの感染能を示した。

大腸菌にて封入体として発現させ、変性、リフォールディング後、ゲル濾過により精製した AVR-Pia の NMR 法による構造解析を行った。AVR-Pia は、6 つの逆並行 β ストランドからなる β サンドイッチ構造をとっており、既に構造解析がなされているイネいもち病菌の AVR タンパク質 AVR-Pizt や *Pyrenophora tritici-repentis* の宿主特異的毒素 ToxB と構造類似性を示した。

Structure and Function of AVR-Pia Protein of Magnaporthe oryzae

Shiho Fujiwara¹, Yuya Highchi¹, Yuki Satoh¹, Toyoyuki Ose², Masakatsu Kamiya³, Kozo Asano¹, Teruo Sone¹

(¹Grad. Sch. Agriculture, ²Fac. Pharmaceutical Sci., ³Fac. Adv. Life Sci., Hokkaido Univ.)

P-90

Aspergillus fumigatus における銅恒常性維持機構に関与する遺伝子の探索

楠屋陽子, 早川真理子, 五ノ井透, 高橋弘喜 (千葉大・真菌センター)

必須金属である銅は、細菌から人間にわたり様々な生物が生きていくうえで、生育に必要な栄養素であり、細胞内の多岐にわたる酵素・タンパク質が正常に働くために必要不可欠である。一方で、強力な酸化作用を有する銅の過剰な蓄積は、生体にとって有害であり、生体内における濃度は厳密に制御されている。真菌症を引き起こす *Cryptococcus neoformans* では、銅の獲得と排出に関わる遺伝子の制御を転写因子 Cuf1 が行っており、銅の恒常性維持が宿主との相互作用に置いて重要であることが提唱されている。糸状菌 *Aspergillus fumigatus* も真菌症を引き起こす原因菌であるが、細胞内の銅濃度を調整する制御機構に関する知見は乏しい。そこで、*A. fumigatus* における銅獲得と排出の分子メカニズムを明らかにするために、培地中の銅が欠乏および過剰な条件下で *A. fumigatus* を培養し、RNA-seq 法を用いたトランスクリプトームにより、*A. fumigatus* の銅ストレス応答を解析した。銅欠乏時に、メラニン合成に関わる遺伝子や銅の取り込みを行うトランスポーターを含む 170 個の遺伝子が発現上昇しており、銅過剰時にはキチナーゼやグルタミナーゼを含む 104 個の遺伝子の発現が上昇していた。さらに、*A. fumigatus* で銅制御に関与する転写因子の候補遺伝子として、出芽・分裂両酵母と *C. neoformans* の転写因子との相同性解析から 3 つの遺伝子を見いだした。本発表では、それら候補転写因子の機能解析の結果と銅ストレス応答による発現変化の結果を報告したい。

The molecular mechanisms of copper acquisition and detoxification in *Aspergillus fumigatus*

Yoko Kusuya, Mariko Hayakawa, Tohru Gono, Hiroki Takahashi

(MMRC, Chiba Univ)

P-91

トマト萎凋病菌の病原性関連遺伝子の変異の多様性

赤井浩太郎¹, 田村咲子², 小松健¹, 寺岡徹¹, 有江力¹ (¹農工大院・農, ²農工大・農)

トマト萎凋病菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* にはこれまでに3つのレースが報告されている。これら3つのレースは、萎凋病菌が持つ非病原力遺伝子 (AVR 遺伝子) とトマト品種が持つ萎凋病抵抗性遺伝子の組み合わせで決定される。非病原力遺伝子の変異によって、萎凋病菌は抵抗性を回避し、レースが変化する。例えば、萎凋病菌レース1は、3つの非病原力遺伝子を保持し (AVR1 AVR2 AVR3)、これらの AVR 遺伝子をそれぞれ認識する抵抗性遺伝子 (I、I2、I3) のいずれかを保持するトマト品種には感染できない。しかし、AVR1 に変異が生じ、抵抗性遺伝子 I の認識を回避できるようになる (avr1) と、萎凋病レース1抵抗性品種 (Ii2 i3) に感染できるようになり、レース2となる (avr1 AVR2 AVR3)。

これまでに、AVR1 の変異の様式として、AVR1 遺伝子座を喪失したもの (avr1^{null}: Houterman *et al.*, 2008) や、トランスポゾンが ORF に挿入されることによって非病原力遺伝子としての機能を失ったもの (avr1^{th380}: Inami *et al.*, 2012; avr1^{th658}: 佐藤 2013)、ORF 上流にトランスポゾンが挿入されることで AVR1 の発現が抑制されるようになったもの (avr1^{tf-380}: 赤井 2015) が報告されている。一方、レース3が保持する AVR2 の変異の様式としては、これまでに ORF 内部の G121A, T122A, G134A, G137C, C146T の5種類の点変異のみが報告されていたが (Houterman *et al.*, 2009; 稲見 2012)、2014年に千葉県で分離された萎凋病菌 18-1 株は、PCR の結果から AVR2 を保持していない (avr2^{null}) 可能性が示唆された。現在、18-1 株の非病原力遺伝子の詳細な解析を行っている。

以上のようにトマト萎凋病菌は非病原力遺伝子を多様に変異し、その病原性を変化させていることが明らかになった。

The diversity of mutations of avirulence genes of the tomato wilt fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

Kotaro Akai¹, Sakiko Tamura², Ken Komatsu¹, Toru Teraoka¹, Tsutomu Arie¹

(¹Grad. Sch. Agric., Tokyo Univ. of Agric. Tech., ²Fac. Agric. Tokyo Univ. of Agric. Tech.)

P-92

キュウリ褐斑病菌のジカルボキシイミドおよびフェニルピロール耐性変異の同定

塚田淑仁, 堀内玲菜, 一石昭彦, 藤村真 (東洋大院・生命科学)

キュウリ褐斑病菌 (*Corynespora cassiicola*) は様々な殺菌剤に対する耐性菌が発生しており、キュウリ栽培に深刻な被害をもたらしている。ジカルボキシイミドおよびフェニルピロールに耐性を示す株が存在することが示唆されているが、その分布や耐性機構については不明である。本研究では、群馬県板倉地区の圃場からイプロジオン耐性株が単離されたことから、その解析を行った。すべての耐性株は、イプロジオンとフルジオキシニルに高度耐性を示した。これらの株は浸透圧感受性を示したが、強い病原性を保持していた。灰色かび病菌等のジカルボキシイミド耐性変異は、OS-1 型ヒスチジンキナーゼ (浸透圧センサー) 遺伝子内に同定されている。そこで、褐斑病菌の感受性株 (9-12 株) と耐性株 (20-1 株) から CcOSI 遺伝子を PCR 増幅し、その配列を比較した。その結果、耐性株由来の CcOSI は、キナーゼドメインより上流に 25bp の挿入 (直前配列の反復) を持っていた。これにより、フレームシフトが起こり、132 番目のアミノ酸が終始コドンになる。このことから、25bp 挿入が耐性変異であると同定した。さらに、この耐性変異を検出する遺伝子診断系を構築して、4 か所の圃場の分離株を解析した。圃場によって耐性株の分布は異なったが、No.20 圃場由来の供試株はすべて耐性変異をもつことが明らかになった。また、耐性株は一部の例外を除き、beta-tubulin 遺伝子に F200Y 変異 (ベノミル・ジエトフェンカルブ両耐性) を持っていた。ジエトフェンカルブとプロシミドンの混合剤が連用されたことによる可能性が考えられる。

Identification dicarboximide- and phenylpyrrole-resistant mutation in *CcosI* gene of *Corynespora cassiicola*

Yoshihito Tsukada, Reina Horiuchi, Akihiko Ichiishi, Makoto Fujimura

(Life Sciences, Toyo Univ.)

P-93

エンバクいもち病菌のコムギ品種 Hope に対する非病原力遺伝子の同定および分子マッピング

小松 香織, 森 亮太, 井上 喜博, Vy Trinh Thi Phuong, 中馬 いづみ, 土佐 幸雄 (神戸大院・農)

イネ科植物いもち病菌 *Pyricularia oryzae* は、宿主属レベルで寄生性の異なる菌群から構成されている。その中のひとつ、エンバクいもち病菌 (エンバク菌) は、エンバクを宿主とし、コムギには感染できない。我々はこれまで、エンバク菌 Br58 とコムギ品種の間の非親和性の解析を行い、これに関与する抵抗性遺伝子 *Rwt3*, *Rwt4* を同定するとともに、各々を認識する非病原力遺伝子 *PWT3*, *PWT4* をクローニングした。しかし、例外的に *Rwt3*, *Rwt4* を持たないコムギ品種 Hope に Br58 を接種したところ、やはり非病原性を示した。そこで、これに関与する非病原力遺伝子の同定を試みた。Br58 x 76Q1 (コムギいもち病菌 Br48 x Br58 の F₁ 菌系) から得た雑種菌系を Hope に接種したところ、非病原性菌系を病原性菌系が分離した。分離比は 1:1 に適合しなかったが、同様の分離比を示す複数の分子マーカーを見出した。そこで、ここで分離した遺伝子は 1 遺伝子であると考え、この非病原力遺伝子を *PWTX* と仮称した。次に、上記雑種 80 菌系を用いて分子マッピングを行ったところ、*PWTX* を 1.3cM で挟み込むことに成功した。ここで見出された連鎖マーカーを用い、上記交雑子孫を 248 菌系に拡大して組換え体のスクリーニングを行った。その結果、9 菌系の組換え体が見出された。これらの組換え体を用いて fine mapping を行った結果、*PWTX* を 0.4cM の遺伝距離にある 2 つの分子マーカーで挟み込むことができた。これらのマーカーを用いて Br58 の BAC library をスクリーニングしたところ、この領域をカバーする 2 つの BAC クローンが得られた。

Identification and molecular mapping of genes involved in the incompatibility of an *Avena* isolate of *Pyricularia oryzae* with wheat cultivar 'Hope'

Kaori Komatsu, Ryota Mori, Yoshihiro Inoue, Vy Trinh Thi Phuong, Izumi Chuma, Yukio Tosa

(Grad. Sch. Agric. Sci, Kobe Univ.)

P-94

Epichloae (*Epichloë/Neotyphodium* 属) エンドファイトの疑似有性生殖様の現象を介した雑種菌の出現と染色体の再編成

磯部仁美¹, 増中章², 菅原幸哉³, 月星隆雄², 田中愛子¹, 竹本大吾¹ (名大院・生命農学, ¹畜草研, ²東北農研)

Epichloae (*Epichloë/Neotyphodium* 属) エンドファイトは、イネ科植物の細胞間隙で生育し共生関係を確立している。その多くは種子を介して次世代植物に感染するため、他菌株と接触する機会が極めて限られている。一方、自然界より分離される Epichloae エンドファイトの多くは、有性生殖能を持たない不完全菌 (*Neotyphodium* 属菌) であり、生理活性物質の生産性やゲノムサイズに著しい多様性が認められる。これまでに、*Neotyphodium* 属菌の多くが *Epichloë* 属菌の種間雑種であることが指摘されており、epichloae エンドファイトの遺伝的多様性の獲得には通常の有性生殖や無性生殖とは異なる機構が関与すると推察された。そこで、同種あるいは異種の Epichloae エンドファイトを対峙培養し、その相互作用を解析したところ、菌株間の菌糸融合、核の細胞間移行、核融合など、疑似有性生殖様の現象が観察された。また、異なる薬剤抵抗性遺伝子を導入した菌株を用いて、同様の過程を介した人工的な雑種菌の作出に成功した。これらの雑種菌の孢子サイズ、保有遺伝子や生育速度などさまざまな性状を調査したところ、同じ親株由来の雑種菌株の間でも性質やゲノムサイズに多様性があることが示唆された。以上の結果により、epichloae エンドファイトでは疑似有性生殖様の現象を介して同種あるいは異種の親菌株の染色体がランダムに継承されるゲノムの再編成がおり、その結果出現した雑種菌では、極めて高い遺伝的多様性が獲得されることが示された。

Characterization of hybrid strains of Epichloae (*Epichloë/Neotyphodium* spp.) endophyte produced via para-sexual reproduction.

Hitomi Isobe¹, Akira Masunaka², Koya Sugawara³, Takao Tsukiboshi², Aiko Tanaka¹, Daigo Takemoto¹

(¹Grad. School Bioagr. Sci., Nagoya Univ., ²NILGS, ³NARO, TARC)

P-95

ウリ類炭疽病菌の 26S プロテアソームサブユニット *RPN10* ホモログは病原性に関与する

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)

タンパク質の選択的な分解機構ユビキチン・プロテアソーム系は、真核生物の細胞機能の調節に重要な役割を果たし、生物間相互作用のさまざまな局面に寄与している。しかし糸状菌類においては同経路に関する知見は未だ少なく、植物病原菌の宿主感染における役割はほとんど明らかにされていない。我々はプロテアソームのユビキチン受容体サブユニット *RPN10* に着目し、解析を進めている。昨年度の本会では、多犯性の殺生寄生菌として知られる灰色かび病菌の出芽酵母 *RPN10* ホモログが、宿主侵入および宿主内伸展に必須であることを報告した。本研究では、半活物寄生性の重要病原菌ウリ類炭疽病菌の *RPN10* ホモログ *CoRPN10* の遺伝子破壊株を作出し、その病原菌生活史における機能解析を行った。*CoRPN10* 破壊株は宿主上でメラニン化した付着器を形成したが、侵入菌糸形成はほとんど認められず、病原性の低下を示した。同破壊株は、有傷接種においては野生株よりも小さな病斑を形成した。しかし、破壊株はヒートショック処理を施した宿主葉においては、野生株と同様の病斑を形成し、侵入菌糸形成率も顕著に回復した。以上の結果から、ウリ類炭疽病菌においてプロテアソームを介した基質分解が宿主侵入と宿主内伸展に必要であることが示唆された。また、破壊株の病原性低下には抵抗性を含む何らかの宿主側因子が関与している可能性が考えられた。

The 26S proteasome subunit *RPN10* homolog in *Colletotrichum orbiculare* is required for pathogenicity to the host plant.

Takuya Sumita¹, Kosuke Izumitsu², Chihiro Tanaka¹

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

P-96

牧草共生菌 *Epichloë festucae* の共生および細胞融合を制御する情報伝達因子の解析

神谷昇汰¹, 岡村文音¹, 尾崎よしの¹, 亀岡慎一¹, 榎野友香¹, Barry Scott², 丸山潤一³, 田中愛子¹, 竹本大吾¹ (¹名大院・生命農学, ²Inst. Fund. Sci., Massey Univ., ³東大院・農生科・応生工)

E. festucae はイネ科牧草の細胞間隙に共生する糸状菌エンドファイトである。これまでに、*E. festucae* の宿主植物への共生的な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 や細胞融合因子 So などを見出しており、これらの遺伝子破壊株は植物との同調的な菌糸生育能を失い、宿主植物の生育を著しく阻害する。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。植物への共生能を欠損する変異株より単離された機能未知の核タンパク質 NsiA (Nuclear protein for Symbiotic Infection) の破壊株においても、培地上での細胞融合能が欠失していた。*nsiA* 破壊株では、*ProA*, *Ham8*, *Pro41* などアカパンカビにおいて細胞融合に必須な遺伝子群の発現が低下しており、NsiA はこれら遺伝子群の発現を介して、細胞融合や共生確立を制御していることが示された。また、Yeast two hybrid 法により、NsiA が出芽酵母などにおいて細胞融合に関与する MAP キナーゼ Mak2 およびその下流の転写制御因子 Ste12 と相互作用することが示された。*E. festucae* の *mak2* 破壊株において菌糸融合能の欠失が認められたが、*ste12* 破壊株では菌糸融合能に異常は認められなかった。一方、*nsiA* 破壊株および *ste12* 破壊株では細胞壁の完全性に異常が認められることから、NsiA は、Mak2 や Ste12 との相互作用を介して細胞融合や細胞壁の完全性を制御することが示唆された。

Functional analysis of signaling factors for symbiotic infection and hyphal cell fusion of *Epichloë festucae*

Shota Kamiya¹, Ayane Okamura¹, Yoshino Ozaki¹, Shinichi Kameoka¹, Yuka Kayano¹, Barry Scott², Jun-ichi Maruyama³, Aiko Tanaka¹ and Daigo Takemoto¹ (¹Grad. School Bioagr. Sci., Nagoya Univ., ²Inst. Fund. Sci., Massey Univ., ³Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo)

P-97

***Colletotrichum orbiculare* species complex に属する炭疽病菌は類似したゲノム構造を有し、宿主範囲を部分的に共有している**

小川真実¹, 田中 薫¹, 上中谷 瞳², 山下 純³, Pamela Gan⁴, 白須 賢⁴, 多賀正節², 久保康之¹ (¹京府大院・生環, ²岡大院・自然, ³岡大資源植物科学研, ⁴理研)

炭疽病菌は約 70 種から構成され、600 種以上の植物に感染して作物生産に深刻な被害をもたらす。我々は核型解析と病原性検定により、*Colletotrichum* 属菌の系統分化と感染性分化について検討を進めている。これまでに、*C. orbiculare* species complex (Cosc) に属する 4 種が類似した特徴的な細胞学的核型(基本染色体数 $n=10$ 及び高度に AT-rich なヘテロクロマチン領域を持つ) を有することを明らかにした。今回、新たに Cosc 内の *C. lindemuthianum*, *C. malvarum*, *C. tebeestii* の核型解析を行い、これらも AT-rich ヘテロクロマチン領域を有し、基本染色体数 $n=10$ であることを明らかにした。これにより、Cosc はゲノム構造が極めて類似した種からなることが示唆された。次いで、CoSC の分離宿主に対する接種試験を行った。その結果、CoSC に属する炭疽病菌は *C. malvarum* の分離宿主ハナアオイ及び *C. tebeestii* の分離宿主ゼニアオイに共通して感染することを見出した。よって、Cosc に属する炭疽病菌が宿主範囲を部分的に共有していることが示された。

***Colletotrichum orbiculare* species complex conserves similar karyotype and partly shares common host.**

Mami Ogawa¹, Kaoru Tanaka¹, Hitomi Kaminakaya², Jun Yamashita³, Pamela Gan⁴, Ken Shirasu⁴, Masatoki Taga², Yasuyuki Kubo¹

(¹ Grad. Sch. of Life & Env. Sci., Kyoto Pref. Univ., ² Grad. Sch. of Nat. Sci. & Tech., Okayama Univ., ³ Inst. of Plant Sci. & Res., ⁴RIKEN)

P-98

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 TOR 経路を介し準活物寄生の制御に関わる

原田 賢¹, 西内 巧², 久保康之¹ (京府大院・生環¹, 金沢大・学際センター²)

昨年度の本会にて、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* が活物寄生から死物寄生の制御に関わることを報告した。今回、マイクロアレイ法により $\Delta cowhi2$ 株と野生株の遺伝子発現を網羅的に比較することで、*CoWhi2* の下流で制御される遺伝子について評価した。まず、 $\Delta cowhi2$ 株は接種 6h 後に宿主免疫応答を顕著に誘導し始めることから、 $\Delta cowhi2$ 株の遺伝子発現の変動が予想される接種 4h 後のマイクロアレイ解析を行った。その結果、 $\Delta cowhi2$ 株のリボゾームタンパク質に関連する遺伝子の発現は野生株と比較し、10Fold 以上の顕著な上方制御を示した。真核生物において、リボゾーム関連遺伝子の発現制御因子として TOR (Target Of Rapamycin) が知られている。そこで、 $\Delta cowhi2$ 株におけるリボゾーム関連遺伝子の発現は TOR の活性化に起因するのか、TOR 活性抑制剤ラパマイシン処理時での $\Delta cowhi2$ 株のリボゾーム関連遺伝子の発現をマイクロアレイにより解析した。その結果、ラパマイシン処理区における $\Delta cowhi2$ 株のリボゾーム関連遺伝子の発現は無処理区と比較し、顕著に低下した。このことから、*CoWHI2* は TOR 経路に関与することが示唆された。次に、TOR は準活物寄生の制御に関与するのか、ラパマイシン処理時における $\Delta cowhi2$ 株の付着器形成下で蓄積する宿主のカロース形成と活物寄生特異的発現蛍光タンパク質を利用した $\Delta cowhi2$ 株の活物寄生の観察を行った。その結果、ラパマイシン処理区の $\Delta cowhi2$ 株は無処理区と比較し、宿主のカロース形成頻度が減少し、活物寄生が復帰した。このことから、ウリ類炭疽病菌における *CoWHI2* は TOR を介し準活物寄生の制御に関与することが示された。

***CoWHI2*, the homolog of stress response regulator *WHI2* of *Saccharomyces cerevisiae*, is involved in regulation of hemibiotrophic infection in *Colletotrichum orbiculare* through TOR pathway.**

Ken Harata¹, Takumi Nishiuchi², Yasuyuki Kubo¹

(¹Life and Environmental Sciences, Kyoto Prefectural Univ., ²Advanced Science Research Centre, Kanazawa Univ.)

P-99

Aspergillus fumigatus の生産するフコース特異的レクチンの機能解析

酒井香奈江, 五ノ井透 (千葉大・真菌セ)

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明らかにするために様々な研究が行われてきた。宿主の免疫系では病原菌の細胞表面多糖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いる一方で、真菌の持つレクチンが感染や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、*A. fumigatus* の fucose に結合特異性を持つレクチン(AFL)について詳しく調べた。これまでに AFL の 6 つの糖鎖結合領域のアミノ酸置換を行うことで、fucose との結合能が大幅に減少する変異体が見つかった。さらに培養細胞を用いた実験により、AFL が細胞の炎症反応を誘導することが分かった。AFL の炎症反応誘導は fucose との結合能にはあまり依存しておらず、細胞の種類によっても炎症反応の様子が異なっていた。現在は、AFL が *A. fumigatus* においてどのような働きをしているのか調べているところである。

Functional analysis of fucose-specific lectin from *Aspergillus fumigatus*.

Kanae Sakai, Tohru Gono

(MMRC, Univ. of Chiba)

P-100

病原真菌 *Aspergillus fumigatus* を弱毒化するマイコウイルスの遺伝子発現解析

穴戸絵里香¹, 高橋梓², 森山裕充³, 五ノ井透² (¹千葉大・医学薬学府, ²千葉大・真菌センター, ³農工大)

病原真菌 *Aspergillus fumigatus* はアスペルギルス症の主な原因菌である。同菌はアレルギーの原因になるほか、呼吸器疾患を引き起こし、重篤化し全身感染に至る場合もある。しかし、医薬用抗真菌薬は極端に少なく、副作用・薬剤耐性菌の出現といった問題も抱えており、新たな薬剤の開発が強く望まれている。我々は、マウスに対する *A. fumigatus* の病原性を抑制する 2 種のマイコウイルス (それぞれ 4 成分の 2 本鎖 RNA と、5 成分の 2 本鎖 RNA をゲノムとする) を見出し、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。本発表では、マイコウイルスの各ゲノムがコードする ORF タンパク質 (以下 ORF) のうち、宿主の病原性抑制を担う遺伝子を特定するため、ウイルスフリー株である *A. fumigatus* (KU 株) にウイルス由来の各 ORF をそれぞれ個別に強制発現させ、宿主の形態・生育速度・ストレス耐性などの表現型を比較した。その結果 4 成分 2 本鎖 RNA マイコウイルスの ORFc と、5 成分の 2 本鎖 RNA マイコウイルスの ORFb、ORFc の強制発現株においては生育不良が生じることが確認された。各 ORF 形質転換株についてはマウスにおける病原性試験も進めている。次に、宿主菌の各生育ステージにおけるマイコウイルス遺伝子の発現量をリアルタイム PCR で比較定量した結果、菌糸形成過程、孢子形成過程における発現量はことなり、菌生育段階における各ウイルス遺伝子の発現量はそれぞれ変化していることが明らかにされた。

本学会ではこれらの解析結果について報告する予定である。

Influence of mycovirus ORF expression in human pathogen *Aspergillus fumigatus*.

Erika Shishido¹, Azusa Takahashi-Nakaguchi², Hiromitsu Moriyama³, Tohru Gono²

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

P-101 (O-10)

トウモロコシごま葉枯病菌の CLA4 と菌糸伸長の関連性

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原菌の一つである。これまでに本菌の2種類のPAK様キナーゼSTE20ならびにCLA4を同定し、*Acla4*が感染行動や有性・無性世代における様々な形態形成において異常を示すことを報告してきた。今回我々は、*Acla4*の形態形成不全の原因の一つと推察される菌糸伸長の異常に注目し解析を進めた。*Acla4*では細胞の膨張が観察され、分枝頻度の増加が認められた。カルコフルオルホワイトとヘキストの二重染色を行ったところ、*Acla4*の核および隔壁の局在は正常であり、核分裂および細胞質分裂において顕著な影響はないことが分かった。また、タイムラプス撮影により、野生株は側方分枝するのに対し、*Acla4*は高頻度で先端分裂することを確認した。FM4-64染色を行ったところ、野生株では常に先端に1個のSpitzenkörperが存在した一方で、*Acla4*では0~2個と流動的であった。よってCLA4は細胞極性決定において重要であることが明らかとなった。さらに、高頻度で変異セクターを形成する*Acla4*の不安定な形質を利用し、20株のセクターを分離したところそのうち1株で側方分枝頻度の回復が認められた。このセクター株はCLA4の欠損を相補する突然変異を有していると推定し、現在解析を進めている。

Relationship between the CLA4 homologue and hyphal growth 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-102

ウリ類炭疽病菌 MOR 経路因子変異株のトランスクリプトーム比較による植物シグナル認識を介した付着器形成メカニズムの解析

小玉紗代¹, 石塚隼也¹, 宮下一糸¹, 西内 巧², 石井孝昭¹, 三芳秀人³, 久保康之¹ (¹京府大院生環, ²金沢大・学際センター, ³京大院農)

本研究ではこれまでに、植物病原糸状菌ウリ類炭疽病菌においてNDR (nuclear Dbf2-related)キナーゼCoCbk1, 足場タンパクCoPag1を構成因子とするMOR (morphogenesis-related NDR kinase network) 経路が宿主植物由来のクチンモノマー認識を介した付着器形成に関与することを報告した。今回、野生株、*copag1* Δ, CoCbk1 恒常活性株を用いたマイクロアレイ解析により *in vitro* および *in planta* における付着器形成時の全遺伝子発現を比較し、植物シグナル認識を介した付着器形成へのMOR経路の関与を評価した。その結果、野生株 *in vitro* と比較し *in planta* で発現変動した遺伝子が多数検出され、ウリ類炭疽病菌は宿主侵入前に認識した植物シグナルに応答する可能性が示唆された。また、野生株 *in vitro* と比較し *in planta* で上方制御された植物シグナル応答遺伝子群には *copag1* Δ で下方制御された遺伝子群が見られ、細胞壁分解酵素、N末端シグナルペプチドを持つタンパクおよび膜輸送体をコードする遺伝子が含まれていた。また、CoCbk1 恒常活性株で下方制御された植物シグナル応答遺伝子群が見られ、CoCbk1 はこれらの負の制御に寄与することが示唆された。以上より、MOR経路下流で植物シグナル応答遺伝子群の発現が制御される可能性が示唆された。

Study on the involvement of plant-derived signals in appressorium development by comparative transcriptome profiling of *Colletotrichum orbiculare* MOR mutants

Sayo Kodama¹, Jyunya Ishizuka¹, Ito Miyashita¹, Takumi Nishiuchi², Takaaki Ishii¹, Hideto Miyoshi³ and Yasuyuki Kubo¹

(¹Grad. Sch. of Life & Env. Sci., Kyoto Pref. Univ., ²ASRC., Kanazawa Univ., ³Grad. Sch. of Agric., Kyoto Univ.)

P-103

麴菌株群の比較ゲノムとアスピロクロリン生産性

齋藤 亮太, 大田 民, 梅尾 美幸, 織田 健, 岩下 和裕 (酒総研・基盤)

【目的】 近年、麴菌が生産するアスピロクロリンの合成遺伝子クラスターが特定された。アスピロクロリンは医真菌のタンパク質の合成を特異的に阻害し、抗生物質として登録されている。これまで麴菌は実験用培地での条件においてアスピロクロリンを生産することが知られていたが、醸造条件下での生産性などの詳細な解析は報告されていない。そこで本研究では、種々の麴菌群のアスピロクロリン生産性を生化学的、分子生物学的に明らかにすることを目的とした。

【方法】 まず麴菌 RIB40 株においてアスピロクロリン生産条件を詳細に検討した。その結果、生産性は培地の条件で異なり、培養後期に増加した。一方、米麴を作成し、2,4,6,8 日目の生産性を検討したが生産は見られなかった。次に、麴菌株群全体の生産性を検討するために、13 系統の代表株について広く解析した。まず、各麴菌のアスピロクロリン合成遺伝子クラスターの有無とゲノム配列比較を行った。その結果、各株が合成クラスターを有しており、シーケンス解析の結果種々の変異点を同定した。クラスター中に系統特異的な変異が見られたことから、アスピロクロリン生産性は異なると考え、その生産性を検討した。その結果、菌株により生産量が異なり、内 2 株については全く生産が見られなかった。また、製麴 2 日目の米麴で検討したところ、全ての株で生産されなかった。以上の解析から、アスピロクロリン構成遺伝子クラスターは麴菌に広く存在し、菌株および生育環境により生産性が異なることが明らかとなった。また、米麴の条件では生産が確認されなかったことから、実際の清酒製造では生産されていないことが推察された。

Comparative analysis of genome sequence and aspirochlorine productivity of *Aspergillus oryzae* strains

Ryota Saito, Tami Ohta, Miyuki Umeo, Ken Oda, Kazuhiro Iwashita

(Natl. Inst. Brew., Fundam. Res. Div.)

P-104

Aspergillus aculeatus セルロース資化能欠損株の表現型解析

片山 椋平, 遊亀 翔太, 谷 修治, 炭谷 順一, 川口 剛司 (阪府大院・生環科)

【目的】 *A. aculeatus* セルラーゼ遺伝子群の発現を制御する新奇制御因子の同定を目的に、セルロースを単一炭素源とした培地で生育が低下した株を T-DNA 挿入変異株ライブラリから探索し、M1 株と Q3 株の 2 株を取得した。この 2 株におけるエンドグルカナーゼ生産量を比較すると共に、Avicel と Xylose それぞれの炭素源に応答したセルラーゼおよびキシラナーゼ遺伝子の発現量を qRT-PCR により定量した。

【結果および考察】 M1 株ではエンドグルカナーゼ生産量が低下し、Xylose に応答したキシラナーゼ Ib 遺伝子 (*xynIb*) の発現誘導率が低下した。Q3 株では Avicel に応答したセロビオヒドロラーゼ I 遺伝子 (*cbhI*) の発現誘導率が低下したものの、エンドグルカナーゼ生産に影響は観察されなかった。*A. aculeatus* 培養上清中のエンドグルカナーゼ活性は FI-CMCase (*cmcI*) の生産量に相関することから、M1 株では *cmcI* および *xynIb* 発現を制御する XlnR を介した経路に関与する因子に欠損が生じており、Q3 株では *cbhI* 発現を制御する ManR を介した経路に関与する因子がそれぞれ欠損していると推測された。現在は両株における欠損遺伝子の同定を進めており、今後同定された遺伝子の機能解析を行うことで *A. aculeatus* のセルラーゼ遺伝子発現制御機構を明らかにする計画である。

Phenotypic analyses of cellulose utilization deficient mutants in *Aspergillus aculeatus*

Ryohei Katayama, Syota Yuki, Shuji Tani, Junichi Sumitani, Takashi Kawaguchi

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

発表者索引

- A*
- Aita, Hiroki 73
- B*
- Bergs, Anna 34, 50
- D*
- Daranagama, Nayani
D..... 73
- Dietrich, Helge M. . 54
- G*
- Gan, Pamela..... 87
- Gao, Hao..... 39
- H*
- Hirasawa, Hiroki.... 73
- I*
- Ishitsuka, Yuji . 34, 50
- L*
- Li, Chang 39
- Li, Nuo 31, 74
- N*
- Nguyen, Minh Viet 30,
78
- Nienhaus, G. Ulrich 34,
50
- O*
- Okada, Masahiro.... 78
- P*
- Phuong, Vy Trinh Thi
..... 85
- Q*
- Qin, Bin 78
- S*
- Sato, Haruna..... 73
- Scott, Barry 86
- Shioya, Koki..... 73
- Suzuki, Yoshiyuki.. 73
- Y*
- Yao, Xin Sheng..... 39
- あ*
- 赤池大輝 43
- 赤井浩太郎..... 84
- 浅井恒滋 75
- 浅井菜々実..... 39, 40
- 浅野行蔵 33, 83
- 阿吹綾香 43
- 阿部郁朗 .29, 39, 63,
64, 77
- 阿部敬悦 .41, 43, 44,
45, 55, 59, 62
- 鮎川侑 82
- 荒添貴之 ..38, 50, 73
- 有江力 38, 50, 82, 84
- 有岡学 42, 51, 52, 59
- 有田稔彦 41
- 淡川孝義 64
- 安藤友貴 34, 51
- 安藤祥生 71
- い*
- 飯尾晋一郎..... 79
- 五十嵐圭日子 67
- 伊澤翔 51
- 石井一夫 32, 81
- 石井孝昭 89
- 石井千尋 60
- 石川周平 75
- 石倉 幹大..... 72
- 石田健 70
- 石田卓也 67
- 石塚隼也 89
- 石堂圭一 30, 78
- 石原紗彩耶..... 66
- 泉津弘佑 .33, 79, 86,
89
- 泉実 61
- 磯部仁美 85
- 一石昭彦 17, 84
- 市川昂典..... 76
- 一條眸 40
- 一瀬桜子 37, 45
- 一之瀬俊 56
- 伊藤英里子 81
- 稲葉 拓哉 72
- 井上大志 31, 75
- 井上喜博 85
- 岩下和裕.. 35, 52, 90
- 岩渕大輝..... 29, 63
- う*
- 上野絢子 63
- 上原健二 41, 43
- 上村泰央..... 56
- 梅尾美幸 90
- 梅澤究 67
- 梅村舞子 46
- え*
- 浴野圭輔.. 58, 60, 61
- 枝克昌 44
- お*
- 大口ひかる 74
- 大里修一 .. 38, 50, 73
- 大田 民..... 90
- 大沼広宜..... 29, 65
- 大橋信太郎 43
- 小笠原涉..... 66, 73
- 岡拓二 58, 60, 61
- 岡久聖実..... 47, 48
- 岡部知弥. 35, 36, 42,
52
- 岡村文音 86
- 小川哲央.. 38, 50, 73
- 小川真弘..... 52, 71
- 小川真実..... 87
- 荻野千秋 39, 40
- 奥津果優 79
- 刑部敬史 .. 47, 48, 49
- 刑部祐里子.... 47, 48,
49
- 尾崎よしの..... 86
- 長田裕之 .. 30, 67, 80
- 尾瀬農之 33, 83
- 小田切正人..... 42
- 織田健..... 90
- 小野奈津子..... 64
- 尾花克哉 71
- か*
- 柿本健一 53
- 柏毅 82
- 加瀬明日香..... 41
- 片渕由佳子..... 58, 61
- 片山琢也 .36, 42, 54,
58
- 片山椋平 90
- 加藤直樹 80
- 加藤雅士 .. 36, 61, 66
- 門岡千尋 79
- 金政真 71
- 金丸京子 .31, 38, 49,
74, 75, 77
- 金子優平 66
- 神坂泰 46
- 上中谷瞳 87
- 神谷昇汰 86
- 神谷昌克 33, 83
- 亀井克彦 69
- 亀岡慎一 86
- 榎野友香 86
- 川上和義 59
- 川口剛司 90
- 川田純毅 42, 54
- 川谷誠..... 30, 80
- 川満洋平 60
- 川本進 69

- 全智揚..... 77, 78
- き
- 菊池友希..... 79
- 菊間隆志..... 57, 59
- 北出雄生..... 33, 89
- 北本勝ひこ ... 35, 36,
42, 51, 52, 54, 55,
57, 59
- 北本真理奈..... 42
- 吉川阿佳里..... 60
- 衣笠清美..... 80
- 木下浩..... 30, 78
- 金允卿..... 43, 45
- 木村和義..... 46
- 木村真31, 38, 49, 74,
75, 77
- 木村優里..... 56
- 木本紗蘭..... 66
- く
- 草野好司..... 73
- 楠田瑞穂..... 29, 65
- 楠本憲一..... 74
- 楠屋陽子..... 69, 83
- 朽方康裕.. 37, 41, 47
- 國武絵美. 31, 38, 49,
74
- 久保田高明..... 79
- 久保康之. 35, 53, 87,
89
- 桑田茂..... 38, 50
- こ
- 小池英明..... 46
- 古崎利紀..... 32, 81
- 小玉紗代..... 89
- 後藤史和..... 44
- 後藤正利. 58, 60, 61,
68, 79
- 五ノ井透.. 69, 83, 88
- 小林淳一..... 79
- 小林拓嗣..... 62
- 小林哲夫. 21, 31, 38,
49, 66, 74, 75, 77
- 駒井紀之..... 51
- 小松香織..... 85
- 小松健..... 82, 84
- 五味勝也. 31, 37, 45,
46, 48, 55, 68, 72,
75, 76
- 小山哲史..... 79
- 小山泰二. 30, 52, 71,
79, 80
- 近藤昭彦..... 39, 40
- 金野尚武..... 44
- 今野友維..... 48
- さ
- 齊藤 亮太..... 90
- 酒井香奈江..... 88
- 酒井杏匠..... 66
- 坂本裕一..... 44
- 佐久間哲史..... 73
- 笹倉直也..... 39
- 佐藤志穂..... 44
- 佐藤佑樹..... 33, 83
- 佐藤陽子..... 68
- 佐野元昭..... 55
- 鮫島正浩..... 26, 67
- し
- 茂本亮輔..... 81
- 宍戸絵里香..... 88
- 志田洋介..... 66, 73
- 篠原靖智.. 30, 79, 80
- 志水元亨.. 36, 61, 66
- 張斯来..... 46, 55
- 白坂憲章..... 29, 65
- 白須賢..... 87
- 新沢祐大..... 66
- 新谷尚弘. 31, 37, 45,
46, 48, 72, 75, 76
- 神藤定生..... 66
- 進藤斉..... 79
- す
- 菅野茂夫.. 47, 48, 49
- 菅原幸哉..... 85
- 菅澤仁..... 40
- 杉本賢吾..... 75
- 鈴木空太..... 48
- 鈴木聡..... 74
- 鈴木遥香..... 57
- 鈴木博子.. 47, 48, 49
- 住田卓也. 33, 82, 86,
89
- 炭谷順一..... 90
- そ
- 曾根輝雄..... 33, 83
- た
- 高城景子..... 60
- 高橋俊二..... 80
- 高橋徹 41, 43, 44, 45
- 高橋 (中口) 梓.. 69,
88
- 高橋弘喜..... 69, 83
- 高橋真智子..... 66
- 多賀正節..... 87
- 高間充..... 31, 75
- 高峯和則..... 79
- 高谷直樹.. 36, 61, 81
- 高柳亜由美..... 51
- 竹内道雄. 57, 62, 63,
70, 76
- 竹川薫53, 58, 60, 61,
68
- 竹下典男..... 34, 50
- 竹本大吾..... 85, 86
- 多田功生..... 74
- 田中愛子..... 85, 86
- 田中薫..... 87
- 田中拓未. 41, 43, 44,
45
- 田中千尋. 33, 82, 86,
89
- 田中瑞己. 31, 37, 45,
46, 48, 72, 75, 76
- 田中勇氣..... 36, 42
- 田邊弘毅..... 41
- 谷修治..... 90
- 田畑風華..... 62
- 玉置尚徳..... 79
- 玉野孝一..... 46
- 田村咲子..... 84
- ち
- 千葉洋史.. 47, 48, 49
- 中馬いづみ..... 85
- つ
- 塚田淑仁..... 84
- 月星隆雄..... 85
- 月本竣司..... 56
- 辻井雅..... 76
- 辻華奈..... 37, 47
- 土屋貴寛..... 72
- 堤浩子..... 39, 40
- 坪田康信..... 59
- て
- 寺内裕貴..... 43, 45
- 寺岡徹..... 24, 82, 84
- 寺下隆夫..... 29, 65
- と
- 田路洋紀..... 31, 75
- 堂前圭佑..... 41
- 徳岡昌文..... 79
- 土佐幸雄..... 85
- 利根川唯..... 37, 47
- 戸谷光平..... 67
- 外山博英..... 54
- 豊田早紀..... 68
- な
- 中川知巳..... 32, 81
- 中沢威人..... 34, 51
- 中島春紫. 37, 41, 43,
47, 72
- 中嶋佑一..... 77
- 中野宏軌..... 41
- 中堀清..... 34, 51
- 中間聖..... 43
- 中村彩奈..... 66

- 中村英淳 . 35, 36, 42, 52
 中村美有希 30, 78
 中山真由美 62
 永山恵美 41
- に
- 西内巧 87, 89
 仁平卓也 30, 78
- は
- 萩原大祐 19, 69
 橋元誠 40
 長谷川撰 64
 長谷川-城祥子 76
 秦武史 34, 51
 秦洋二 39, 40
 早川真理子 69, 83
 原田賢 87
 原田堅伍 55
 張本修平 81
- ひ
- 樋口剛志 41
 樋口裕次郎 53, 68
 樋口裕也 33, 83
 平野滯 36, 61
 平間美沙 59
- ふ
- 深田史美 35, 53
 福田泰久 29, 65
 福田良一 60
- 福原敏行 56
 藤井郁雄 35, 52
 藤井勲 40
 藤井祐希 72
 藤井渉 36, 42
 藤岡智則 62
 藤村真 84
 藤原康太郎 40
 藤原志帆 33, 83
 二神泰基 79
 二村友史 30, 80
 古谷章悟 80
- ほ
- 穂坂賢 79
 堀内裕之 58, 60
 堀内玲菜 84
- ま
- 前田一行 77
 前田浩 62, 63
 榊尾俊介 81
 増田亮 32, 70
 増中章 85
 町田雅之 46
 松沢智彦 66
 松田一彦 80
 松田侑大 . 29, 39, 63, 64, 77, 78
 松永恵美子 68
 松本貴良 81
 間野博信 64
- 丸山潤一 . 35, 36, 42, 52, 54, 55, 86
- み
- 三浦愛 46
 水野雅史 44
 三谷隆宏 57
 三橋隆章 64, 78
 嶺澤美帆 66
 宮澤拳 55
 宮下一糸 89
 宮地雄大 36, 61
 三好健之介 38, 50
 三芳秀人 89
- む
- 村口元 32, 47, 70
- も
- 望月麻衣 66
 本山高幸 67
 森貴裕 29, 63, 64, 78
 守屋繁春 42
 森谷翔太 37, 47
 森山裕充 56, 88
 森亮太 85
- や
- 八色奈央 68
 矢追克郎 66
 安田（吉野）庄子 64
 矢萩大貴 55
 山内隆弘 44
- 山形洋平 . 44, 57, 62, 63, 70, 76
 山岸秀規 56
 山口楓絵 38, 49
 山下純 87
 山田みゆき 66
 大和澄 38, 50
 山本卓 73
 山本竜也 36, 61
 山本雄己 58
- ゆ
- 遊亀翔太 90
 尹忠銖 67
- よ
- 吉崎由美子 79
 吉田裕史 82
 吉田誠 67
 吉永良平 57
 吉見啓 55, 59, 62
- り
- 李秋実 58
- わ
- 若井暁 39, 40
 渡部昭 68, 76
 渡邊泰祐 54
 渡辺崇健 76

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
後藤 正利 九州大学大学院 農学研究院
櫻谷 英治 徳島大学大学院 ソシオテクノサイエンス研究部
佐野 元昭 金沢工業大学 ゲノム生物工学研究所
曾根 輝雄 北海道大学大学院 農学研究院
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

堀内 裕之 東京大学大学院 農学生命科学研究科

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

第15回糸状菌分子生物学コンファレンス要旨集

平成27年10月26日 印刷

平成27年10月26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