

The 16th Conference on

Fungal Genetics

and

Molecular Biology

第 16 回糸状菌分子生物学コンファレンス

2016 年 11 月 17 - 18 日

京都大学宇治おうばくプラザ

糸状菌分子生物学研究会

<http://www.biosci.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
シンポジウム講演要旨	16
一般講演要旨	31
ポスター発表講演要旨	41
発表者索引	92
糸状菌分子生物学研究会会則	95
糸状菌分子生物学研究会運営委員名簿	96
糸状菌遺伝子研究会賛助会員	97

第 16 回糸状菌分子生物学コンファレンス

日時：2016年11月17日(木)-18日(金)

会場：京都大学宇治おうばくプラザ

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17日(木)

11時 - 受付

12:00 - 12:05 開会の辞 (きはだホール)

12:05 - 14:05 口頭発表 (O1-O10) (きはだホール)

14:05 - 14:20 休憩

14:20 - 16:20 口頭発表 (O11-O20) (きはだホール)

16:20 - 17:50 ポスター発表 (奇数番号)

17:50 - 18:10 総会 (きはだホール)

18:30 - 20:30 懇親会 (生協食堂)

11月18日(金)

9:30 - 受付

10:00 - 11:30 ポスター発表 (偶数番号)

11:30 - 12:45 昼食

12:45 - 14:15 シンポジウム (S1-S3) (きはだホール)

14:15 - 14:30 休憩

14:30 - 15:40 シンポジウム (S4, S5) (きはだホール)

15:40 - 16:00 表彰式 (きはだホール)

16:00 - 16:05 閉会の辞 (きはだホール)

発表演題および講演時間

シンポジウム 11月18日(金) 12:45 - 15:40

「和食に生きる糸状菌」

12:45-13:15 〔座長：秦 洋二（月桂冠（株））〕

S-1 「麹菌研究としょうゆ醸造への応用」

キッコーマン（株）
伊藤 孝太郎

13:15-13:45 〔座長：秦 洋二（月桂冠（株））〕

S-2 「麹その古くて新しいもの（清酒用種麹の開発の一例）」

秋田今野商店（株）
今野 宏

13:45-14:15 〔座長：田中 千尋（京都大学）〕

S-3 「糸状菌の発酵調味料への活用」

味の素（株）
外内 尚人

14:15-14:30 休 憩

14:30-15:00 〔座長：田中 千尋（京都大学）〕

S-4 「キノコ類微生物の子実体形成機構の解明を目指した
ゲノムデータベースの構築」

近畿大学
白坂 憲章

15:00-15:40 〔座長：櫻谷 英治（徳島大学）〕

S-5 「和食の美味しさ」

龍谷大学
伏木 亨

一般講演 (O-1~O-10) 11月17日(木) 12:05 - 14:05

[座長: 萩原 大祐 (O-1,2), 谷 修治 (O-3,4), 吉見 啓 (O-5,6), 入枝 泰樹 (O-7,8), 深田 史美 (O-9,10)]

12:05 O-1 代謝改変およびフラックス強化した黄麹菌でのデンプンからの乳酸生産

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

12:17 O-2 *Aspergillus nidulans* における β -D-Galactofuranosidase の機能解析

豊田早紀¹, 八色奈央¹, 松永恵美子¹, 樋口裕次郎¹, 後藤正利², 竹川薫¹
(¹九大院・生資環, ²佐賀大・農)

12:29 O-3 Cyclopenin 類を変換する糸状菌由来酵素シクロペナーゼの発見と機能解析

岸本真治, 石川格靖, 山田陽香, 平山裕一郎, 恒松雄太, 渡辺賢二 (静岡県大・薬)

12:41 O-4 白色腐朽菌ヒラタケにおける *wtr1* 遺伝子変異がリグニン分解システムに与える影響

小寺里奈¹, 中沢威人¹, 西村裕志², 渡辺隆司², 坂本正弘¹, 本田与一¹
(¹京大・院農, ²京大・生存研)

12:53 O-5 麹菌転写因子 *XlnR* の誘導物質依存的リン酸化の生理学的意義

浅井恒滋, 塩谷友佐, 杉本賢吾, 金丸京子, 木村真, 小林哲夫 (名大院・生命農学)

13:05 O-6 *Aspergillus aculeatus* セルラーゼ誘導発現機構への *sepM* の関与

津村亮輔, 谷修治, 炭谷順一, 川口剛司 (阪府大院・生環科)

13:17 O-7 ウリ類炭疽病菌における細胞周期制御因子 *CoTem1* の推定相互作用因子 *CoPpt1* は病原性に関与する

梶河直起, 深田史美, 久保康之 (京府大院・生環)

13:29 O-8 トウモロコシごま葉枯病菌の物理的疎水面認識および付着器形成を制御する *Opy2* の解析

吉田紘樹¹, 後藤駿介¹, 田中千尋², 入江俊一¹, 鈴木一実¹, 泉津弘佑¹
(¹滋賀県大・環境, ²京大院・農)

13:41 O-9 疫病菌 *Phytophthora infestans* シスト発芽阻害物質 *b-rubromycin* の作用解析

西尾尚堯, 谷修治, 甲斐建次, 東條元昭, 炭谷順一, 川口剛司 (阪府大院・生環科)

13:53 O-10 ナス科植物の産生するファイトアレキシンの植物病原性糸状菌による代謝の解析

黒柳輝彦, 小鹿一, 佐藤育男, 千葉壮太郎, 川北一人, 竹本大吾 (名大院生農)

一般講演 (O-11~O-20) 11月17日(木) 14:20 – 16:20

[座長: 樋口 裕次郎 (O-11~13), 岡 拓二 (O-14, 15), 玉野 孝一(O-16, 17), 若井 暁(O-18~20)]

- 14:20 O-11 担子菌キノコの順遺伝学研究から示唆されてきた, リグニン生分解と子実体形成の関連性
中沢威人¹, 村口元², 本田与一¹ (¹京大・院農, ²秋田県大・資源生物)
- 14:32 O-12 イネいもち病菌におけるクロラムフェニコールの新規作用点
野坂亮仁, 遠藤正伍, 田中信清, 成川恵, 中島将博, 紙透伸治*, 田口速男, 菅原二三男,
鎌倉高志 (東理大院理工・応生, *麻布大獣医学・基礎教)
- 14:44 O-13 糸状菌 PKC に特異的な新規阻害剤 Z-705 の作用機構解析
菅原亜寿美¹, 庄司郁央¹, 中山真由美^{1,2}, 吉見啓², 藤岡智則³, 河合清³, 片山琢也⁴,
堀内裕之⁴, 梅山秀明⁵, 阿部敬悦^{1,2}
(¹東北大院農・生物産業創成, ²東北大・未来研, ³クミアイ化学工業, ⁴東大院農,
⁵中央大理工)
- 14:56 O-14 *Aspergillus nidulans* のミトコンドリア機能調節と菌体内分布
金丸京子, 稲葉真由子, 木村眞, 小林哲夫 (名大院生命農)
- 15:08 O-15 麹菌カーボンカタボライト抑制制御因子 CreA の分解と機能維持に関与するカルボキシ末端領域の同定
田中瑞己, 新谷尚弘, 五味勝也 (東北大院農・生物産業創成)
- 15:20 O-16 製麹時における光照射の影響
村上直之, 小高敦史, 佐原弘師, 松村憲吾, 秦洋二 (月桂冠・総研)
- 15:32 O-17 表面の分子修飾による糸状菌の応答制御と表面認識機構に関する解析
西村麻里江¹, 中野美紀², 三宅晃司² (農研機構・生物機能利用¹・産総研・製造技術²)
- 15:44 O-18 糸状菌特有の転写因子 HapX の cysteine-rich 領域の機能解析
村田俊輔, 小森誠也, 志水元亨, 加藤雅士 (名城大・農)
- 15:56 O-19 黒麹菌における主要転写因子破壊株ライブラリーの作製
西堀奈穂子¹, 水谷治¹, 林梨咲¹, 有馬寿英², 山田修¹
(¹酒総研 ² 県立広島大・生環)
- 16:08 O-20 担子菌類の子実体発生機構解明を目指したゲノム編集技術の確立
千葉洋史¹, 鈴木博子¹, 菅野茂夫³, 下北英輔⁴, 刑部裕里子², 刑部敬史²
(¹徳島大院・生命テクノ, ²徳島大・生物資源産業, ³京都大・理, ⁴徳島県農技セ)

ポスター発表 11月17日(木) 16:20 – 17:50 (奇数番号)

11月18日(金) 10:00 – 11:30 (偶数番号)

P-1 油糧糸状菌におけるリシノール酸生産株の分子育種

阪本鷹行¹, 富永康子¹, 井出紗奈江¹, 奥田知生², 安藤晃規², 岸野重信², 和泉自泰³, 馬場健史³, 島 純⁴, 櫻谷英治¹, 小川 順² (¹徳大・生物資源, ²京大院・農, ³九大・生体防御, ⁴龍谷大・農)

P-2 海生糸状菌 *Aspergillus* sp. MF275 由来 himeic acid の生合成研究

橋元誠¹, 勝木理子², 加藤光², 照井亜美¹, 塚本佐知子², 藤井勲¹
(¹岩手医科大・薬, ²熊本大院・薬)

P-3 黒麹菌における主要転写因子破壊株ライブラリーの作製

西堀奈穂子¹, 水谷治¹, 林梨咲¹, 有馬寿英², 山田修¹
(¹酒総研 ²県立広島大・生環)

P-4 *Aspergillus nidulans* におけるハイドロフォビン-クチナーゼ間相互作用

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-5 麹菌 *A. oryzae* 実用株におけるゲノム編集技術の改良による高効率変異導入法の確立

片山琢也¹, 藤井渉², 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-6 黄麹菌由来のハイドロフォービン HypA を用いた重金属イオン回収システムの構築

栗原璃子, 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 麹菌のハイドロフォービン HypC は水分量が高い条件で発現する

廣木寛之, 石倉幹大, 早川英佑華, 山川結, 中島春紫 (明治大院・農・農化)

P-8 シイタケにおける TILLING 法の効率化

坂本裕一, 佐藤志穂 (岩手生工研)

P-9 白麹菌 *Aspergillus kawachii* における推定クエン酸輸送体 CtpA と YhmA 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鹿大・農, ²滋賀県大, ³佐賀大・農)

P-10 白麹菌 *Aspergillus kawachii* における *pex16* ホモログの機能解析

木本大地¹, 門岡千尋¹, 奥津果優¹, 吉崎由美子¹, 高峯和則¹, 後藤正利², 玉置尚徳¹, 二神泰基¹
(¹鹿大・農, ²佐賀大・農)

P-11 麹菌 hydrophobin RolA との間の相互作用における CutL1 側の新奇相互作用部位

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-12 製麹時における光照射の影響

村上直之, 小高敦史, 佐原弘師, 松村憲吾, 秦洋二 (月桂冠・総研)

P-13 NADPH 産生に着目したペントースリン酸経路強化による麹菌の遊離脂肪酸生産性増大

玉野孝一, 三浦愛 (産総研・生物プロセス)

P-14 糸状菌特有の転写因子 HapX の cysteine-rich 領域の機能解析

村田俊輔, 小森誠也, 志水元亨, 加藤雅士 (名城大・農)

P-15 Cas9 タンパク質を用いた麹菌のゲノム編集技術の開発

嶋本孝平^{1,2}, 齊藤亮太¹, 和田 悠作³, 織田 健¹, 奥田 将生^{1,2}, 岩下和裕¹

(¹酒総研, ²広島大院・生圏, ³ファスマック)

P-16 担子菌類の子実体発生機構解明を目指したゲノム編集技術の確立

千葉洋史¹, 鈴木博子¹, 菅野茂夫³, 下北英輔⁴, 刑部裕里子², 刑部敬史²

(¹徳島大院・生命テクノ, ²徳島大・生物資源産業, ³京都大・理, ⁴徳島県農技セ)

P-17 表面の分子修飾による糸状菌の接着制御と表面認識機構に関する解析

西村麻里江¹, 中野美紀², 三宅晃司² (農研機構・生物機能利用¹・産総研・製造技術²)

P-18 麹菌におけるゲノムを切らずに書き換える新規ゲノム編集ツールの確立

荒添貴之¹, 西田敬二¹, 田畑麻由良¹, 若井暁¹, 荻野千明², 秦洋二³, 近藤昭彦¹

(¹神戸大院・科学イノベ, ²神戸大院・工, ³月桂冠・総研)

P-19 マルチセルラーゼ発現黄麹菌の培養条件によるセルラーゼ生産性の違い

片山周平¹, 若井暁², 浅井菜々実², 荻野千秋³, 堤浩子⁴, 秦洋二⁴, 近藤昭彦²

(¹神戸大・工, ²神戸大院・イノベ, ³神戸大院・工, ⁴月桂冠・総研)

P-20 黄麹菌 *Aspergillus oryzae* による機能性オリゴ糖の生産

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¹

(¹神戸大院・イノベ, ²神戸大院・工, ³月桂冠・総研)

P-21 リシノール酸高生産株の作製とその脂質解析

富永康子¹, 濱野百花¹, 阪本鷹行¹, 井出紗奈江¹, 菊川寛史³, 安藤晃規², 岸野重信², 和泉自泰⁴, 馬場健史⁴, 島 純⁵, 小川 順², 櫻谷英治¹

(¹徳大・生物資源, ²京大院・農, ³岐阜大・工, ⁴九大・生体防御, ⁵龍谷大・農)

- P-22 黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* の *pyrG* マーカー遺伝子を用いた多重遺伝子操作可能なホストの開発**
渡嘉敷直査, 外山博英 (琉球大・農学研究科)
- P-23 アクチンの重合・エキソサイトーシス・Ca²⁺流入の振幅による菌糸の先端生長機構**
竹下典男^{1,2}, Minoas Evangelinos², Reinhard Fischer²
(¹筑波大学・生命環境系, ²Dept of Microbiol, Karlsruhe Institute of Technology)
- P-24 担子菌キノコの順遺伝学研究から示唆されてきた, リグニン生分解と子実体形成の関連性**
中沢威人¹, 村口元², 本田与一¹ (¹京大・院農, ²秋田県大・資源生物)
- P-25 黄麹菌 *Aspergillus oryzae* におけるエンドサイトーシス関連因子 AipA の機能解析**
柿本健一, 竹川薫, 樋口裕次郎 (九大院・生資環・生命機能)
- P-26 Dissection of acyl-CoA binding protein secretion in *Aspergillus oryzae***
Kwon Hee Su¹, Kouhei Kawaguchi², Takashi Kikuma², Katsuhiko Kitamoto², Kaoru Takegawa¹, Yujiro Higuchi¹ (¹ Dept. of Biosci. Biotechnol., Kyushu Univ., Dept. of Biotechnol., Univ of Tokyo)
- P-27 麹菌マルトーストランスporterMalP 分解におけるアレクチン様タンパク質 CreD の PXY モチーフの関与**
多田日菜子, 田中瑞己, 平本哲也, 新谷尚弘, 五味勝也 (東北大院・農・生物産業創成)
- P-28 麹菌 *A. oryzae* の菌核形成に関与する新規転写因子の解析**
藤井陽平¹, 中村英淳¹, 片山琢也¹, 小川真弘², 小山泰二², 北本勝ひこ¹, 丸山潤一¹
(¹東大院・農生科・応生工, ²野田産研)
- P-29 *Aspergillus nidulans* における低酸素誘導性脱ユビキチン化酵素の細胞機能**
岡添孝章, 阿部央行, 榎尾俊介, 高谷直樹 (筑波大・生命環境)
- P-30 麹菌カーボンカタボライト抑制制御因子 CreA の分解と機能維持に関与するカルボキシ末端領域の同定**
田中瑞己, 新谷尚弘, 五味勝也 (東北大院農・生物産業創成)
- P-31 麹菌 *A. oryzae* の分化における LacA 様メチルトランスフェラーゼの機能解析**
川田純毅, 丸山潤一 (東大院・農生科・応生工)
- P-32 *Aspergillus nidulans* における α -1,3-グルカン合成酵素 AgsA, AgsB の機能の比較解析**
宮澤拳¹, 吉見啓², 阿部敬悦^{1,2} (¹東北大院・農・生物産業創成, ²東北大・未来研)

- P-33 *Aspergillus nidulans* のリン酸基中間因子 YpdA 発現抑制に伴う細胞骨格の機能不全**
 吉見啓¹, 萩原大祐², 小野都³, 福間泰之³, 古川健太郎⁴, 緑川裕良³, 中山真由美^{1,3}, 原田昌彦⁵,
 阿部敬悦^{1,3} (¹東北大・未来研, ²千葉大・真菌センター, ³東北大院農・生物産業創成,
⁴新潟大院・医歯学, ⁵東北大院農・応生科)
- P-34 発芽管破裂法 (GTBM) による *Fusarium oxysporum* の細胞学的核型解析**
 鮎川侑¹, 小松健², 多賀正節³, 有江力² (¹農工大院連農, ²農工大院農, ³岡大院自然)
- P-35 *Aspergillus fumigatus* の推定 β1,6-ガラクトフラノース転移酵素遺伝子の機能解析**
¹李秋実,²田中大,¹浴野圭輔,³竹川薫,⁴後藤正利,²柴田信之,¹太田一良,¹岡拓二
 (¹崇城大院・工,²東北医薬大・薬,³九大院・農,⁴佐賀大・農)
- P-36 ウシグソヒトヨタケにおける抗酸化物質エルゴチオネイン (EGT) の研究**
 大谷冴果, 佐藤祐紀, 尾崎紀昭, 村口元 (秋田県立大・生物資源)
- P-37 ウシグソヒトヨタケの栄養菌糸におけるセプチン動態の観察**
 松渕美月, 菅生麻友, 本間ちはる, 村口元 (秋田県立大学・生物資源)
- P-38 糸状菌 PKC に特異的な新規阻害剤 Z-705 の作用機構解析**
 菅原亜寿美¹, 庄司郁央¹, 中山真由美^{1,2}, 吉見啓², 藤岡智則³, 河合清³, 片山琢也⁴, 堀内裕之⁴,
 梅山秀明⁵, 阿部敬悦^{1,2}
 (¹東北大院農・生物産業創成, ²東北大・未来研, ³クミアイ化学工業, ⁴東大院農, ⁵中央大理工)
- P-39 黄麹菌 *Aspergillus oryzae* における初期エンドソーム動態に関する解析**
 都甲祐介, 竹川薫, 樋口裕次郎 (九大院・生資環)
- P-40 麹菌株間の光応答様式の違いについて**
 鈴木聡, プシュパ S ムルティ, 服部領太, 楠本憲一 (農研機構・食品部門, CSIR-CFTRI, India)
- P-41 イネいもち病菌におけるクロラムフェニコールの新規作用点**
 野坂亮仁, 遠藤正伍, 田中信清, 成川恵, 中島将博, 紙透伸治*, 田口速男, 菅原二三男, 鎌倉高志
 (東理大院理工・応生, *麻布大獣医学・基礎教)
- P-42 *Aspergillus fumigatus* のガラクトフラノース転移酵素(AfGfsA)の酵素的諸性質の解析**
¹川満洋平,¹李秋実,²田中大,¹浴野圭輔,³竹川薫,⁴後藤正利,²柴田信之,¹太田一良,¹岡拓二
 (¹崇城大院・工,²東北医薬大・薬,³九大院・農,⁴佐賀大・農)
- P-43 *Aspergillus nidulans* における AP2 コンプレックスの機能解析**
 金京運, 高城景子, 堀内裕之 (東大院・農生科・応生工)

- P-44** 麹菌 *Aspergillus oryzae* 金属プロテアーゼ AdmB の基質・相互作用タンパク質の探索
小林拓嗣, 大岩達郎, 前田浩, 竹内道雄, 山形洋平 (東農工大院・応生科)
- P-45** *Aspergillus nidulans* のミトコンドリア機能調節と菌体内分布
金丸京子, 稲葉真由子, 木村眞, 小林哲夫 (名大院生命農)
- P-46** 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)
- P-47** Functional analysis of an Argonaute-like protein FoQDE in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*
Seong-Mi Jo^{1,2}, Sung-Hwan Yun³, Ken Komatsu², Tsutomu Arie²
 (¹United Graduate School of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology,
²Laboratory of Plant Pathology, Graduate School of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and
 Technology · ³Soonchunhyang University)
- P-48** 担子菌 *Coprinopsis cinerea* における生育とオートファジーの関係
小川直紀, 大野聡一郎, 濱岡修平, 麻田恭彦, 渡邊彰 (香川大・農)
- P-49** *Aspergillus nidulans* における β -D-Galactofuranosidase の機能解析
豊田早紀¹, 八色奈央¹, 松永恵美子¹, 樋口裕次郎¹, 後藤正利², 竹川薫¹
 (¹九大院・生資環, ²佐賀大・農)
- P-50** 白色腐朽菌ヒラタケにおける *Posnf5* および *Poubc2* の変異がリグニン分解酵素生産および有性形態形成に与える影響の解析
堀井雅人, 中沢威人, 小寺里奈, 坂本正弘, 本田与一 (京大・院農)
- P-51** 麹菌における DCA 類縁体のコンビナトリアル生合成
斉藤 開, 三橋 隆章, Chang Li, 松田 侑大, 淡川 孝義, 阿部 郁朗 (東大院・薬)
- P-52** 白色腐朽菌ヒラタケにおける *wtr1* 遺伝子変異がリグニン分解システムに与える影響
小寺里奈¹, 中沢威人¹, 西村裕志², 渡辺隆司², 坂本正弘¹, 本田与一¹
 (¹京大・院農, ²京大・生存研)
- P-53** Cyclopenin 類を変換する糸状菌由来酵素シクロペナーゼの発見と機能解析
岸本真治, 石川格靖, 山田陽香, 平山裕一郎, 恒松雄太, 渡辺賢二 (静岡県大・薬)
- P-54** *Tricholoma matsutake* NBRC30605 株の De novo 解析およびグルコアミラーゼ遺伝子の特定
大沼広宜, 福田泰久, 亀井健吾, 白坂憲章 (近畿大・農応生化)

P-55 麹菌 *Aspergillus oryzae* 由来 6-O- α -L-rhamnosyl- β -D-glucosidase(AoRut)の諸性質

石川真衣, 塩野義人, 小関卓也 (山形大・農)

P-56 Nivalenol 系トリコテセン検出のためのアセチル化法の構築

島村拓実¹, 杉江雄太¹, 小川雅義¹, 田中彰², 木村真³, 安藤直子^{1,2}

(¹東洋大学院 理工学, ²東洋大学院工学 ³名大院生命農学)

P-57 動物細胞におけるトリコテセン側鎖修飾酵素 TRI101 の発現と耐性獲得の検証

田中希望¹, 佐藤弘基¹, 田中彰², 前田一行³, 木村真³, 安藤直子^{1,2}

(東洋大院理工学¹ 東洋大院工学² 名大院生命農学³)

P-58 トリコテセンC-4位アセチル化酵素TRI7の安定性の検証と発現解析

杉江雄太¹, 島村拓実¹, 小川雅義¹, 田中彰², 木村真³, 安藤直子^{1,2}

(¹東洋大院理工学, ²東洋大院工学, ³名大院生命農学)

P-59 非天然型新規 A 型トリコテセンの生産方法と毒性評価

佐藤弘基¹, 足立健太郎², 田中彰³, 前田一行⁴, 相川俊一⁵, 吉田泰彦^{1, 2, 3, 5}, 木村真⁴, 安藤直子^{1, 2, 3, 5}

(¹東洋大院理工学, ²東洋大理工学, ³東洋大院工学, ⁴名大院生命農学, ⁵東洋大工技研)

P-60 麹菌における gamma-glutamylcysteine synthetase オルソログのグルタチオン合成に対する影響

服部領太, 多田功生, 森田(松下)真由美, 鈴木聡, 楠本憲一 (農研機構・食品研究部門)

P-61 麹菌のホモ 6 量体を形成する D-乳酸脱水素酵素 (D-LDH) のアロステリック特性

渡部昭, 佐藤陽子, 五味勝也 (東北大院農・生物産業創成)

P-62 種々の樹木成分で生育させた白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* の細胞外プロテオーム解析

糝谷紗季¹, 鈴木梨央¹, 酒井杏匠¹, 高須賀太一², 堀千明², 志水元亨¹, 加藤雅士¹

(¹名城大・農, ²北大・農)

P-63 新規 d-type トリコテセンの生産条件の検討と構造解析

松井宏介¹, 新海航輝², 相川俊一³, 吉田泰彦^{1,2}, 木村真⁴, 安藤直子^{1,2}

(東洋大院理工学¹, 東洋大理工学², 東洋大工技研³, 名大院生命農学⁴)

P-64 黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* の酸性プロテアーゼ遺伝子破壊株および高発現株の解析

瀬戸口翔^{1,3}, 水谷治², 高橋徹², 山田修², 二神泰基¹, 玉置尚徳¹, 岩井謙一³, 高瀬良和³

(¹鹿大院・連農, ²酒総研, ³霧島酒造)

- P-65** 糸状菌におけるエチレン応答性人工シグナル伝達系の創製と応用
中山真由美^{1,2}, 古川健太郎³, 吉見啓¹, 阿部敬悦^{1,2}
(¹東北大・未来研, ²東北大・院農・生物産業創成, ³新潟大)
- P-66** 糸状菌 *Trichoderma reesei* における新規 pH 依存的セルラーゼ生産制御因子の解析
平沢大樹, 志田洋介, 小笠原渉 (長岡技科大・生物)
- P-67** *Trichoderma reesei* における推定トランセプターCRT1 の C 末端テール領域の解析
吉澤和将, 谷口大樹, 古川隆紀, 志田洋介, 小笠原渉 (長岡技科大・生物)
- P-68** *Pleurotus salmoneostramineus* L. Vass NBRC31859 株の Whole genome shotgun 配列決定
福田泰久, 大沼広宜, 白坂憲章 (近畿大・農応生化)
- P-69** 麹菌におけるカーボンカタボライト抑制に関わる脱ユビキチン化酵素 CreB の細胞内局在と安定性
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-70** 麹菌のエノラーゼ遺伝子 *enoA* の選択的転写開始に由来する 5' 非翻訳領域が遺伝子発現制御に及ぼす影響
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-71** 誘導物質依存的リン酸化による麹菌転写因子 XlnR の活性制御
浅井恒滋, 塩谷友佐, 杉本賢吾, 金丸京子, 木村真, 小林哲夫 (名大院・生命農学)
- P-72** 黄麹菌 *Aspergillus oryzae* *pepstatin insensitive protease* のプロモーター領域の解析
関桃子, 竹内真理衣, 岡本綾子, 阿保春花, 前田浩, 竹内道雄, 山形洋平 (農工大院・応生化)
- P-73** *Aspergillus oryzae* *pepO* 遺伝子の *cis*-element の探索
久下貴紀, 山崎周平, 前田浩, 竹内道雄, 山形洋平 (農工大院・農)
- P-74** *Aspergillus aculeatus* セルラーゼ誘導発現機構への *sepM* の関与
津村亮輔, 谷修治, 炭谷順一, 川口剛司 (阪府大院・生環科)
- P-75** *Aspergillus fumigatus* とその近縁種における二次代謝遺伝子の比較ゲノム解析
萩原大祐, 高橋弘喜, 矢口貴志, 楠屋陽子, 渡邊哲, 亀井克彦 (千葉大・真菌センター)
- P-76** フサリセチン A の特徴的な環構造形成を担う環化酵素の同定
加藤直樹¹, 衣笠清美¹, Jae-Hyuk JANG², 高橋俊二¹, Jong Seog AHN², 長田裕之¹
(¹理研・CSRS, ²KRIBB)

P-77 麹菌 *Aspergillus oryzae* 由来二次代謝産物の生合成

恒松雄太, 渡辺賢二 (静岡県大・薬)

P-78 代謝改変およびフラックス強化した黄麹菌でのデンプンからの乳酸生産

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

P-79 *Fusarium* 属真菌由来メロテルペノイド化合物アスコクロリン新規類縁体の単離および生合成機構の解明

王冬梅^{1,2}, 全智揚¹, 淡川孝義¹, 阿部郁朗¹ (¹東大院・薬,²中国中山大学・薬)

P-80 トウモロコシごま葉枯病菌のある種 PKS 遺伝子は *Pol2* 突然変異依存的に発現する

陳帯娉, 北出雄生, 宮下正弘, 宮川恒, 田中千尋 (京都大・院・農)

P-81 炭疽病菌が誘導するシロイヌナズナ色素体の新規応答

入枝泰樹¹, 高野義孝², 塩見大輔¹ (¹立教大・理,²京大・院・農)

P-82 RabGAP Bub2は炭疽病菌およびいもち病菌の付着器分化過程における細胞周期および隔壁形成を制御する

深田史美¹・西内巧²・久保康之¹ (¹京府大院・生環,²金沢大・学際センター)

P-83 *Aspergillus fumigatus* におけるストレス応答遺伝子の解析

酒井香奈江¹, 楠屋陽子¹, 高橋弘喜^{1,2}, 五ノ井透¹
(千葉大・真菌セ¹, 千葉大・分子キラリティー研究セ²)

P-84 ウリ類炭疽病菌における細胞周期制御因子 *CoTem1* の推定相互作用因子 *CoPpt1* は病原性に関与する

梶河直起, 深田史美, 久保康之 (京府大院・生環)

P-85 ウリ類炭疽病菌のメタロプロテアーゼ *CoMep1* の感染時における適切な分泌は、完全な病原性に必要である

中前彩加¹, 原田賢^{1,5}, 鳴坂真理², 鳴坂義弘², 高野義孝³, Pamela Gan⁴, 白須賢⁴, 久保康之¹
(¹京府大院・生環,²岡山生科研,³京大院・農,⁴理研,⁵(現)龍谷大・農)

P-86 アブラナ科炭疽病菌のストレス応答制御因子 *ChWHI2* は病原性に必須であり、宿主のカロース形成や ROS 産生に関与する

長田暢洋¹, 原田賢^{1,2}, 西内巧³, 久保康之¹
(¹京府大・生環,²(現)龍谷大・農,³金沢大・学際セ)

P-87 外生菌根菌ホンシメジにおけるランダム挿入突然変異法の確立

広瀬優樹¹, 松永有佳理¹, 田中千尋², 入江俊一¹, 鈴木一実¹, 泉津弘佑¹ (¹滋賀県大・環境, ²京大院・農)

P-88 トウモロコシごま葉枯病菌における全 10 種のホメオボックス遺伝子の機能解析

姑射誠佳, 渡邊彩奈, 横山綾, 入江俊一, 鈴木一実, 泉津弘佑 (滋賀県大・院・環境)

P-89 トウモロコシごま葉枯病菌の物理的疎水面認識および付着器形成を制御する *Opy2* の解析

吉田紘樹¹, 後藤駿介¹, 田中千尋², 入江俊一¹, 鈴木一実¹, 泉津弘佑¹
(¹滋賀県大・環境, ²京大院・農)

P-90 トウモロコシごま葉枯病菌の付着器侵入に関連するテトラスパニン遺伝子 *Pls1* の機能解析

奥谷美季¹, 田中千尋², 入江俊一¹, 鈴木一実¹, 泉津弘佑¹ (¹滋賀県大・環境科学, ²京大院・農)

P-91 ウリ類炭疽病菌の NDR キナーゼ *CoCbk1* は宿主由来のクチンモノマーにより活性化され植物シグナル応答遺伝子群の発現制御に関与する

小玉紗代¹, 西内巧², 久保康之¹ (¹京府大院生環, ²金沢大・学際センター)

P-92 *Aspergillus fumigatus* の銅代謝転写因子 *Afmac1* の機能解析

楠屋陽子¹, 萩原大祐¹, 酒井香奈江¹, 矢口貴志¹, 五ノ井透¹, 高橋弘喜^{1,2}
(¹千葉大・真菌センター, ²千葉大・分子キラリティー研究センター)

P-93 全ゲノム解析による抗真菌性化合物 Tolnifanide 耐性遺伝子の同定

重吉沙衣¹, 入江俊一¹, 鈴木一実¹, 宮川恒², 田中千尋², 泉津弘佑¹
(¹滋賀県大・環境, ²京大院・農)

P-94 病原真菌 *Aspergillus fumigatus* を弱毒化するマイコウイルス各遺伝子の発現量と機能解析

宍戸絵里香¹, 高橋梓², 酒井香奈江², 萩原大祐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-95 疫病菌 *Phytophthora infestans* シスト発芽阻害物質 β -rubromycin の作用解析

西尾尚堯, 谷修治, 甲斐建次, 東條元昭, 炭谷順一, 川口剛司 (阪府大院・生環科)

P-96 トウモロコシごま葉枯病菌の高浸透圧応答シグナル伝達における *Skn7* の機能解析

山田淳司¹, 吉田裕史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-97 抗真菌性化合物 Tolnifanide の選択毒性には *GGTase-I* の *Cys*²²¹ が関与する

松原佳耶¹, 吉田裕史¹, 泉津弘佑², 宮川恒¹, 田中千尋¹ (¹京大院・農, ²滋賀県大・環境科学)

- P-98** イネ科植物共生菌 *Epichloë/Neotyphodium* 属エンドファイトの産生する抗菌性物質の探索
三浦里佳¹, 橋川拓史¹, 磯部仁美¹, Enkhee Purev¹, 小鹿 一¹, 増中 章², 菅原幸哉²,
佐藤育男¹, 千葉壮太郎¹, 川北一人¹, 田中愛子¹, 竹本大吾¹ (¹名大院生農・²農研機構)
- P-99** ナス科植物の産生するファイトアレキシンの植物病原性糸状菌による代謝の解析
黒柳輝彦, 小鹿一, 佐藤育男, 千葉壮太郎, 川北一人, 竹本大吾 (名大院生農)
- P-100** 擬似有性生殖様の現象を介して作出した *epichloae* エンドファイト菌株の諸性質の解析
磯部仁美¹, 増中章², 菅原幸哉², 多賀正節³, 佐藤育男¹, 千葉壮太郎¹, 川北一人¹, 田中愛子¹,
竹本大吾¹ (¹名大院生農・²農研機構・³岡山大院自然科学)
- P-101** 牧草共生糸状菌 *Epichloë festucae* の Ras 活性化因子 Cdc25 の共生確立における役割
神谷昇汰, 岡村文音, 榎野友香, 佐藤育男, 千葉壮太郎, 川北一人, 田中愛子, 竹本大吾
(名大院生農)

Symposium

糸状菌分子生物学コンファレンス シンポジウム 「和食に生きる糸状菌」

S-1

麴菌研究としょうゆ醸造への応用

伊藤考太郎

(キッコーマン株式会社 研究開発本部)

【はじめに】

しょうゆは、大豆と小麦と食塩を原料に 3 種の微生物によって作られる日本伝統の発酵調味料である。昔から良質なしょうゆをつくる上で重要な技術要素を表した「一麴、二擻、三火入れ」という言葉がある。これは、製麴（麴づくり）の良否が製品しょうゆの品質に及ぼす影響が大きく、原料処理を含めた製麴工程が最も重要であることを意味する。製麴は、原料に麴菌を生育させて、様々な酵素を生産させることが主な目的である。しょうゆ醸造では、不溶性の原料タンパク質やでんぷん質が、麴菌の酵素によりアミノ酸やブドウ糖へと分解され可溶化する。それら分解物が直接的な味に関わるだけでなく、さらにしょうゆ乳酸菌やしょうゆ酵母によって有機酸や芳香成分へと代謝され、しょうゆの味や香りが作られる。それ故に、麴菌がしょうゆの基礎をつくるといっても過言ではない。各種アミノ酸やペプチドはしょうゆの味(うま味やコクなど)に関わるため¹⁾、しょうゆ中に含まれるアミノ酸やペプチド、それらを生成させる麴菌の酵素に関する研究は古くから行われている。私たちは、先人達が明らかにしている過去の知見を参考にしながら、日々、研究・商品開発に取り組んでいる。本シンポジウムでは、(1) 麴菌のゲノム情報を活用したしょうゆのうま味成分の生成に寄与する麴菌の酵素に関する基礎的な研究と、(2) しょうゆ中に含まれるペプチドの過去の研究をヒントにしたアンジオテンシン I 変換酵素阻害ペプチド高含有しょうゆの開発を紹介したい。

(1) しょうゆ醸造に寄与する麴菌グルタミナーゼ遺伝子の同定²⁻⁴⁾

しょうゆのうま味の主体であるグルタミン酸は、①原料タンパク質中に含まれるグルタミン酸がタンパク質分解酵素による分解過程で直接溶出してくる経路と、②原料タンパク質の分解で溶出するグルタミンがグルタミン酸へと変換される経路から生成する。しょうゆのグルタミン酸含量を高めるには、②の経路が重要である。グルタミナーゼはグルタミンをグルタミン酸に変換する酵素であり、しょうゆ醸造では麴菌由来のグルタミナーゼが関わる。しょうゆ麴菌 *Aspergillus sojae* のゲノム配列中には、10 個のグルタミナーゼ遺伝子が存在することがゲノム解析から明らかになった。そのうち、しょうゆ醸造で機能する遺伝子を明らかにするため、全グルタミナーゼ遺伝子破壊株を含め、複数の遺伝子を多重に破壊した株を作製し、小仕込み試験を行った。*gahA*, *gahB*, *ggtA*, *gls* の 4 遺伝子を多重に破壊すると、全グルタミナーゼ遺伝子破壊株と同様にグルタミン酸含量が親株と比較して著しく低下し、これら 4 遺伝子がしょうゆ醸造でのグルタミン酸生成に寄与していることが明らかとなった。4 遺伝子の組み合わせを詳細に検討した結果、2 重遺伝子破壊株 ($\Delta gahA$ - $\Delta gahB$)ではグルタミン酸含量が低下したが、*gahA* または *gahB* 遺伝子が残る 3 重遺伝子破壊株($\Delta gahB$ - $\Delta ggtA$ - Δgls , $\Delta gahA$ - $\Delta ggtA$ - Δgls)ではグルタミン酸含量が低下しなかった。このことから Gah タイプは他のタイプのグルタミナーゼ反応を補うことができるが、Gah タイプの反応は他のタイプでは補えないことが考えられた。そこで、これらの酵素を精製

し、基質特異性を調べた結果、GahA タンパク質およびGahB タンパク質は、ペプチドにも作用するグルタミナーゼであることが明らかとなった。しょうゆ醸造では、このペプチドへの反応が重要と考えられ、よりうま味を増強するためには、ペプチドグルタミナーゼ活性の高い麹菌を育種することが有効であると考えられる。

(2) 醸造技術の革新によるアンジオテンシン I 変換酵素阻害ペプチド高含有しょうゆの開発

しょうゆは、伝統的調味料であるがゆえに他の業界に比べて需要創出型の新商品の開発が少なく、日本におけるしょうゆの出荷量は、1970年代をピークに減少を続けている。しょうゆは、食材においしさを付与する素晴らしい機能を有する一方、しょうゆに含まれる塩分が血圧を上昇させるイメージを持たれる場合がある。1990年代以降、アンジオテンシン I 変換酵素 (ACE) 阻害作用を有する食品由来のペプチドが血圧降下作用を発揮することが報告され⁵⁾、これを活用した機能性食品が販売されていた。一方、しょうゆにもペプチドが含まれることが1970年代に報告されていたが⁶⁾、その含有量やACE阻害活性については明らかにされていなかった。そこで、諸味中のペプチダーゼ活性を低下させることによってACE阻害ペプチドが遊離アミノ酸に分解されることを抑制し、ACE阻害ペプチドが豊富に含まれるしょうゆ様調味料を開発した^{7,8)}。これを減塩しょうゆに配合したACE阻害ペプチド高含有しょうゆを用いて、血圧が高めのヒトを被験者として連続摂取試験を実施したところ、対照 (通常の減塩醤油) 群と比較して収縮期血圧が有意に低下した⁹⁾。これらの知見を基に特定保健用食品 (トクホ) の表示許可申請を行い、2013年にしょうゆ類で初の血圧が気になる方向けのトクホ表示許可を取得し、商品を発売した。

しょうゆには、塩分摂取だけでなく、原料である大豆や小麦の食物アレルギーに対する要望など様々な声がお客様から寄せられている。私たちは、地球上のより多くの人があわせない記憶を積み重ね、ゆたかな人生をおくれるようお手伝いをしていきたい、という想いを込めて、コーポレート・スローガンに「おいしい記憶をつくりたい。」を掲げている。今後も過去の知見と最新の研究とを融合し、お客様の声に応えていき、おいしい記憶づくりに貢献していきたい。

引用文献

- 1: 川野友美：生活の科学シリーズ (財)科学技術教育協会, **24**, 6-14 (1990)
- 2: Ito, K., Matsushima, K., Koyama, Y.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **78**, 5182-5188 (2012)
- 3: Ito, K., Hanya, Y., Koyama, Y.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **97**, 8581-90 (2013).
- 4: Ito, K., Koyama, Y., Hanya, Y.: *Biosci. Biotechnol. Biocheml.*, **77**, 1832-40 (2013)
- 5: 松井利郎：バイオサイエンスとインダストリー, **60**, 665-670 (2002)
- 6: Oka, S. and Nagata, K.: *Agric. Biol. Chem.*, **38**, 1185-1194 (1974)
- 7: Nakahara, T., Sano, A., Yamaguchi, H., Sugimoto, K., Chikata, H., Kinoshita, E., Uchida, R.: *J. Agric. Food Chem.*, **58**, 821-827 (2010). Erratum in : *J. Agric. Food Chem.*, **58**, 5858 (2010)
- 8: Nakahara, T., Yamaguchi, H., Uchida, R.: *J. Biosci. Bioeng.*, **113**, 355-359 (2012)
- 9: 内田理一郎, 仲原丈晴, 花田洋一, 福原育夫, 竹原 功, 矢野夕幾：薬理と治療, **36**, 837-850 (2008). 訂正, 薬理と治療, **39**, 1063 (2011)

Study on enzymes of koji molds, and its application to soy sauce brewing

- Identification of glutaminases that involved in glutamate production during soy sauce fermentation, Development of the angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide-enriched soy sauce -

Kotaro Ito

(Research & Development Division, Kikkoman Corp.)

ご略歴

1998年 東京理科大学 基礎工学部 生物工学科卒

2000年 東京大学大学院 農学生命科学研究科 応用生命工学専攻 修士課程修了

同年 キッコーマン株式会社に入社（研究本部に配属）

2010年 公益財団法人 野田産業科学研究所に出向

2014年 キッコーマン株式会社 研究開発本部

糸状菌分子生物学コンファレンス シンポジウム 「和食に生きる糸状菌」

S-2

麴その古くて新しいもの（清酒用種麴の開発の一例）

今野 宏

(株式会社 秋田今野商店)

1. 醸造に用いられる麴菌

「和食」がユネスコの無形文化遺産として登録されたが、「和食」の味わいをつくり出すには酒、味噌、醤油、味醂、鰹節のような素材が欠かせない。実はそれらは麴なくしてはあり得ず、麴は縁の下の力持ちとして日本の食文化を支えているといっても過言ではない。

麴菌は、1000年以上にわたる醸造の歴史の変遷を経て完成された我が国の食文化の原点に位置する微生物であり、桜が国花、雉が国鳥であるならば麴菌はまさに国を代表する微生物「国菌」と呼ぶにふさわしいものである。

種麴の製造は一種の秘伝であったが、初期の種麴は出来の良い麴の一部を種麴として利用する友（共）種法であったため極めて不安定であった。しかし、室町時代に木灰を蒸米に添加することにより麴菌分生子の耐久性を高める画期的な技術が開発され現在の種麴の基礎が築かれた^{1,2)}。

木灰利用の理論は、現代の微生物学的見地から考えると実に巧妙な方法である。

ほとんどの雑菌は木灰のアルカリ性に対して抵抗力がなく死滅してしまうのに、逆に麴菌は木灰に含まれるカリウムを利用して多量の分生胞子を着生させる。これは、雑菌や麴菌、木灰の性質を非常に良く見抜いての方法であり、雑菌は淘汰され、純粋な種麴が得られる。さらに種麴業者の命である種麴原菌の保存においても木灰は活躍する³⁾。木灰を加えて作った種麴は木灰を加えないで作った分生胞子に比較して耐久性が増大され、種麴を悪い環境に保存した場合でも分生胞子の発芽率が低下しない。今から500年も前に、未だ微生物の存在すら知られていない頃に、世界中のどの民族にも先駆けて、このような「純粋分離法」「純粋培養法」「長期保存法」を木灰を使って行っていた日本人の知恵には感服させられる。

2. 吟味をつくる清酒用種麴の開発

アミノ酸度と清酒の官能的品質の間に負の相関が見られるため、アミノ酸が多過ぎることは清酒にとって好ましくないと考えられている。また、グルタミン酸、アスパラギン酸及びアルギニンが清酒の呈味に好ましくない影響を及ぼすことが報告されている⁴⁾。岩野らは主に米蛋白質の主要な成分であるグルテリンを麴菌の蛋白質分解酵素で分解し、生成されるアミノ酸のひとつであるアルギニンが清酒の喉ごしや後味に大きく関与していることを明らかにしている⁴⁾。弊社では米グルテリンの分解活性の少ない麴菌を探索し「清酒のアルギニン含量を低減化させ呈味性を向上させる新規麴菌の開発⁵⁾」に成功した。ここでは一連の研究の一端を紹介する。

清酒造りは、原料米の品質、麴菌株、製麴方法、酵母菌株、醗温度管理などの造り手の選択により極めて幅広い酒質の製品を造ることができる。特に清酒の味に関与する呈味性アミノ酸の出発点は原料米のタンパク質組成の違いにあり麴菌が生きるためこれを分解する酵素を生産することに起因する。

米の主要なタンパク質はグルテリンであり、これが麴のタンパク質分解酵素で分解されてアミノ酸となる。グルテリンの中のアルギニン比率は5~7%であるにもかかわらず既存の種麴菌で造った麴を用いて蒸米を消化した液中のアルギニン含有割合が17%にも増加する。アルギニンは醗において酵母増殖の窒素源として利用されて減少するが、既存の種麴菌を用いて製麴した麴を使用した場合は蒸米タンパク質からのアルギニン生成量が酵母の資化量を大きく上回り清酒に移行する⁶⁾。このため清酒のアルギニン含有量は普通酒ではアラニンについて2番目に多い。アルギニンの呈味性を官能試験によって調べたところ純米酒中の存在量で官能的に識別できること、苦味を呈して後味（喉ごし）に大きく関係していることが判明した⁴⁾。高級酒である吟醸酒や純米吟醸酒ではアルギニンは少ないことから清酒中のアルギニン含有量の低減は品質向上に有効と考えられる。清酒にアルギニンが多い理由は既存の種麴菌のエンドプロテアーゼに原因があると考えられる。エンドプロテアーゼはタンパク質のペプチド鎖の特定の位置を切断する。たとえば膵臓が分泌するトリプシンは生成するペプチドのC末端はリジンとアルギニンである。キモトリプシンはチロシン、フェニルアラニン、トリプトファンである。既存の種麴菌はトリプシンタイプのエンドプロテアーゼを生産し、アルギニンをC末端に持つペプチドが多量に生成するためカルボキシペプチダーゼによってアルギニンが容易に生成するためと推論される。

以上の知見から清酒のアルギニン含有量を減らし清酒の呈味の向上を図るためには既存の種麴菌とは生産するエンドプロテアーゼのタイプが異なる新規な麴菌を開発する目的でスクリーニングを行った。

米タンパク質の分解には数多くのタンパク質分解酵素が関わっていることから醸造の現場でのアミノ酸生成量を反映するためにはこれら多くのタンパク質分解酵素の総合活性を求める必要があると判断し、米グルテリンを基質とする活性測定法を開発した⁷⁾。米グルテリンを基質とした総合ペプチダーゼ活性は米グルテリンを酵素分解してアミノ酸とする数多くのエンドプロテアーゼとエキソペプチダーゼの総合された活性であり、麴酵素による蒸米消化液中のアミノ酸生成量と極めて高い相関を有することを突き止めた⁸⁾。そこで醸造適性の優れた麴菌25菌株を用いてシャーレ法により製麴し、それらの25麴の酵素活性を調べ、グルコアミラーゼ活性が必要量あり総合ペプチダーゼ活性が低い麴菌株5菌株を候補株として選抜した。この選抜した麴菌5菌株を用いて通常の方法で製麴し、その麴を用いて試験醸造を行い、製成酒のアミノ酸組成を分析したところ、苦味アミノ酸であるアルギニン生成量が既存の種麴菌の10分の1であるAOK-12株、AOK-18株を見出した。さらに官能試験の結果、アルギニンが10倍多い対照酒にくらべて優れていることを見出し、この菌株を「吟味」という商品名で市販されるに至った⁵⁾。吟醸造りを呈味性アミノ酸、アルギニン、グルタミン酸、アラニン、アスパラギン酸の生成制御という観点から見ても山田錦を使う理由、高精白をする理由、突き破精麴を造る理由、低温発酵する理由の一面を見ることが出来る。呈味性アミノ酸の制御という視点から原料米の品種ごとに最適な麴菌や酵母を選択し使用すれば山田錦でなくとも、高精白しなくとも、高品質の清酒を造れる可能性を示唆するものである。

清酒は嗜好品なので品質を最も重視する必要があるが、安価な一般米でそれほど米を磨かなくとも高品質のお酒を造れることになれば、自ら製造コストの低減につながるようになる。

3. 温故知新

カビの機能を最大限に発揮させているのが「麴づくり」のような穀物粒固体培養法では

ないだろうか。最近私たちは、この日本特有の製麹手法（穀物粒固体培養）で培養された麹菌の仲間が、抗ウイルス物質⁹⁾や新規抗真菌物質^{10,11)}をたくさん作ってくれる事実を目の当たりにして驚きを隠せないでいる。このように、多くの機能性物質は「麹づくり」だからこそ効率的に生産されているということを忘れてはならない。麹とは様々な穀物粒に多くの酵素群、生理活性物質を生産する菌株を、特有の穀物粒固体培養法という他に類を見ないテクノロジーにより、極めて効率的に生産する培養法に他ならない。

固体培養で特異的に発現する遺伝子が幾つか単離されている。おもしろいことにそれらは、固体培養の中でも特に水分活性を下げたり、培養温度を上げるなどの限定された条件でないと発現しない遺伝子である。そしてその限定された条件というのが「麹づくり」そのものなのである。おそらくこのような遺伝子はストレスによって誘導される遺伝子であるから、通常の状態では発現する必要がなく、ある種の緊急事態において何らかの役割を担っている遺伝子であろう。このように、本来は緊急事態にしか対応しない麹菌の機能を見だし、「麹づくり」に応用した先人の偉大さに今さらながら敬服するばかりである。

この麹づくりの手法をもってすれば、醸造物への生理活性機能の賦与のみならず、健康食品や製菓業界においても多くのユニークな生理活性物質を探し出せるに違いない。今後、日本の醸造から生まれた独自の製麹技術は、醸造以外の分野でも、世界的にもてはやされることは容易に想像できる。忘れてくれるな、日本人とは知恵ものである。「優れた発酵食品を持つ民は、進んだ文化の持ち主である」とは坂口謹一郎先生の言葉である。まさに言えたりと感ずる今日この頃である。

引用文献

- 1: 村井三郎, 化学と生物, **6**, 31-36 (1968).
- 2: 寺島良安, 和漢三才図会, 巻 105 (1712).
- 3: 真鍋勝, 温古知新, **24**, 33-43 (1987).
- 4: 岩野君夫, 高橋和弘, 伊藤俊彦, 中沢伸重: 醸協, **99**, 659 (2004)
- 5: 公立大学法人秋田県立大学, 株式会社秋田今野商店, 特開第 4851481 号
- 6: 伊藤俊彦, 渡辺沙織, 渡辺誠衛, 中沢伸重, 岩野君夫: 醸協, **101**, 879 (2006)
- 7: 高橋仁, 伊藤俊彦, 中沢伸重, 岩野君夫: 醸協, **103**, 638 (2008)
- 8: 伊藤俊彦, 熊谷久夫, 高橋仁, 佐藤勉, 中沢伸重, 岩野君夫: 醸協, **104**, 617 (2009)
- 9: Y.Kanai, D. Ishiyama, H.Senda, W. Iwatani, H. Takahashi, H. Konno, S.Tokumasu, S.Kanazawa, *J.Antibiot*, **53**, 863-872 (2000).
- 10: D.Ishiyama, T.Satou, H.Senda, T. Fujimaki, R.Honda, S.Kanazawa, *J.Antibiot*, **53**, 728-732 (2000).
- 11: T. Satou, D.Ishiyama, R.Honda, H.Senda, H.Konno, S.Tokumasu, S.Kanazawa, *J.Antibiot*, **53**, 597-602 (2000).

Visiting old, learn new from koji

~ The development of koji starter for Sake brewing ~

Hiroshi konno

(Akita konno Co., Let.)

ご略歴

1956年 秋田県生まれ

1980年 東京農業大学農芸化学科卒業後、国税庁醸造試験所研修員を経て 1983年 デルフト工科大学微生物研究所（オランダ）留学

1986年 帰国

同年 (株)秋田今野商店専務取締役

1993年 生研機構の出資による(株)真菌類機能開発研究所取締役研究部長兼任

2003年 (株)秋田今野商店代表取締役社長

2007年 博士（農芸化学・東京農業大学）

2016年 秋田大学大学院理工学研究科非常勤講師兼任

----- MEMO -----

糸状菌分子生物学コンファレンス シンポジウム 「和食に生きる糸状菌」

S-3

糸状菌の発酵調味料への活用

外内 尚人

(味の素(株) バイオ・ファイン研究所)

1. はじめに

糸状菌(カビ)は食物に付着してそれを栄養源として増殖するが、その多くは食品中を脱水し、また、アミラーゼ・プロテアーゼ・リパーゼといった分解酵素を分泌して食物の成分を変化させる。すなわち、カビの機能により、保存性の向上やうま味や風味の創出といった調味料の製造につながる。本講演では、和食を中心として食品・調味料へのカビ利用を概説するとともに、弊社が販売する発酵調味料の呈味特性についても紹介する。

2. 和食の食文化

日本はアジアの多くの国と同様にコメを主食とする食文化圏であるが、最も特徴的なことは古くから肉食が禁止されたことと考えられる。その結果和食においては、野菜や魚を素材として、だしや調味料で「うま味を添加する」ことが重要となった。奈良時代の貴族の宴会では、四種器と呼ばれる調味料の皿が置かれ、食品素材をそれに浸して食した。調味料は塩、酢、酒、醬(ひしお)であり¹⁾、醬の代わりに鰹や豆の煮汁である煎汁(いろり)も用いられた。日本は東アジアの穀醬文化圏であり²⁾、主に大豆や小麦を原料とした調味料が用いられてきた。麴を用いた味噌や醤油をはじめとして、これらを原料にしてカビを利用した発酵調味料が発達したのである。

だしについては、素材の代表格は昆布とかつお節である。昆布は収穫したものを単に干して熟成させたものであるが、一方かつお節は、鰹を煮熟・燻蒸しそののちにカビ付けを行うことにより、水分の除去と脂肪の分解をおこなって高い保存性と独特の風味が現れる。つまり、かつお節も糸状菌を利用した調味料といえることができる。

3. 海外の食品における糸状菌利用の例

日本以外の例でも、中国や沖縄の紅麴・中国の火腿、インドネシアのテンペ・オンジョムなどカビを用いた食品・調味料が多く挙げられる。特に火腿は、豚肉にカビを付けることによりタンパク分解と脱水をしたものであり、それを削って出汁を取る調味料であるので豚肉版のかつお節といえることができる。欧州のチーズにおいても、熟成過程で様々なカビをはやすことにより、それぞれ固有の風味を形成している。なお、チーズをつくる際の凝乳酵素は仔牛の胃に存在するキモシンであるが、その代替となる酵素を探索した際に探索・発見されたのは糸状菌の酵素であった³⁾。

4. うま味の調味料の製造法

昆布のうまみ成分がグルタミン酸であることは、日本の科学者である池田菊苗によって発見され、うま味調味料が発明された。当時の製造法は小麦や大豆を原料として塩酸加水分解によりタンパクを分解してグルタミン酸を取り出す分解抽出法であった。現在ではグルタミン酸は発酵法で生産されている⁴⁾が、一方でタンパクの加水分解物も引き続き調味

料として用いられている。動物由来および植物由来の分解物はそれぞれ HAP, HVP と呼ばれているが、主な機能はアミノ酸・糖などによる味の添加である。

5. 糸状菌を用いた発酵調味料

弊社では、カビを用いて酵素分解した発酵調味料『コウジ・アジ®』, 『コウジ・ベース®』を2000年から発売している⁵⁾。原材料として小麦や大豆を用いているが、糸状菌の酵素を用いて分解することにより通常の加水分解物と異なり、アミノ酸に加え呈味性のペプチドを生じる。そのため、うま味を含むことに加えて中味・後味と呼ばれる呈味を付与し、素材の風味を活かすことができる。

文献

- 1: 外内尚人, 2012, 酢の機能と科学, 酢酸菌研究会編, 朝倉書店, 30-37
- 2: 石毛直道, 1999, 魚醤とうま味の文化圏, 日本うま味調味料協会
- 3: 外内尚人, 2008, 月間フードケミカル, 24: 54-58
- 4: Tonouchi, N. et al., 1986, Nuc. Acids Res. 14: 7557-7568
- 5: 宮村直宏, 2001, ニューフードインダストリー, 43: 57-62

Utilization of fungi for the production of fermented seasonings

Naoto Tonouchi

(Bio-Fine Research Institute, Ajinomoto Co. Inc.)

ご略歴

- 1986年 東京大学大学院農学系研究科修士課程 終了
- 1986年 味の素(株) 入社 中央研究所 研究員
- 1992年 農学博士(東京大学)
- 2010年 味の素(株) バイオ・ファイン研究所 主席研究員
兼任等
- 1992年-1998年 (株) バイオポリマー・リサーチ 出向
- 1992年-1994年 東京大学農学部農芸化学科 受託研究員
- 2002年-2006年 (社) 農林水産先端技術産業振興センター 出向
- 2007年- 酢酸菌研究会幹事
- 2014年- 琉球大学, 日本大学 非常勤講師
- 2016年- 奈良先端科学技術大学院大学 非常勤講師

糸状菌分子生物学コンファレンス シンポジウム 「和食に生きる糸状菌」

S-4

和食に生きる糸状菌

白坂 憲章

(近畿大学 農学部 応用生命化学科)

キノコは世界中で食材として利用されているが、その生態は解明されていない部分が多い。一般にキノコといっても日本を含む東アジアではシイタケ (*Lentinula edodes*) が主要な食用きのこであり、日本においては古くから食材として用いられてきた。一方、東アジア以外ではツクリタケ (通称マッシュルーム; *Agaricus bisporus*) が主要な食用キノコであり、その生産量はシイタケを大きく上回っている。そのため、食用キノコに関する研究といえば世界的にはツクリタケに関するものが多くを占めるが、中国や日本ではシイタケに関する研究が盛んであるとともに、エノキタケやブナシメジといった栽培キノコに関する研究も少なからず行われている。一方で、キノコの大きな特徴である木材腐朽能力に焦点を当てた研究も世界的に進められており、モデル生物である *Phanerochaete chrysosporium* の生産する木材腐朽に関する酵素の報告は多数見受けられる。しかし、前述の食用キノコに関する研究は栽培や育種などの報告が多く、生化学的な研究報告は多くはない。我々はこれまで現象としては確認されているものの、その際に起こる生化学的な変化の詳細についてはほとんど理解されていないキノコの子実体形成にかかわる因子の解明を目指していくつかの酵素活性が変動することを確認してきたが、これらの酵素遺伝子のクローニングや発現解析などを行うステップになると、研究対象となるキノコの遺伝子配列やアノテーションの情報が公開されていないという状況や、キノコ類微生物では利用できる異種遺伝子発現系が少ないという状況に直面し、研究が進まないことがほとんどであった。

本シンポジウムでは、キノコ類微生物の子実体形成機能の解明を主とした目的としたゲノムデータベースを構築することを目指し、ドラフトゲノム配列情報、アノテーション情報などのデータベースを整備するための事業に取り組んでいる現状について紹介する。

1. キノコの子実体形成機構の解明

キノコ栽培にあたって最も重要なことは、子実体、すなわち“キノコ”を作ることである。培養した菌糸の状態からキノコを作らせるための方法として、低温刺激、光刺激など経験的に知られているものも多く、これらは実際の栽培現場でも利用されている。しかし、こういった【現象】が起きる際にどういった変化がキノコの中で起こり、進んでいくかについては現在も明らかになってはいない。我々の研究室では、酸性プロテアーゼ阻害剤によりヒラタケ (*Pleurotus ostreatus*) の子実体形成促進が、また金属プロテアーゼ阻害剤により子実体形成抑制が起こる現象を明らかにし、プロテアーゼ活性をコントロールすることでキノコの子実体形成をコントロールできることを報告した¹⁾。また、ブナシメジ (*Hypsizygus marmoreus*) では子実体形成時に特定のプロテアーゼの活性が上昇することも報告しており、この現象が菌糸蔓延後の低温処理によりもたらされることも明らかにしている²⁾。そこで、こういった現象がどのように制御されているかを検討するために、これまでにいくつかのプロテアーゼを精製し、解析を試みてきた。しかし、酵素タンパクを単

離しても LC-MS や MALDI-TOF MS などの解析手法を用いるためのデータベースがほとんどの食用キノコで存在せず、解析はおろかクローニングにも多大な時間を要する状態であった。そこで、我々は新たにこれまで利用できる全ゲノムの情報が存在しなかった、ブナシメジをはじめとする食用キノコのドラフトシーケンス決定を行なうことにした。また、現在利用できる状況にある公的なデータベース上の情報についても、実際に実験に用いる菌株のゲノム情報を新たに取得し、RNA-seq のデータとも合わせて食用キノコを中心としたゲノムデータベースの構築を進めている。

2. マツタケの人工栽培に向けて

本事業の目的の大きな部分は子実体形成機構の解明であるが、キノコが子実体を作るための機序が解明できれば、マツタケやトリュフなどのように人工栽培の条件が確立されていない有用食用キノコの栽培が可能になるかもしれない。これまでのキノコの栽培は、とにかく栽培できるキノコを栽培してきたという状況で、経験とノウハウに基づいた栽培といえ、ツクリタケのような堆肥を用いた栽培と、シイタケなどのように木材もしくは木片を用いる方法に大きく2分される。これらのキノコは自然界における発生状況を模した栽培条件で栽培できるものであるが、マツタケなどのように生きた植物（多くは樹木）と菌根と呼ばれる相利共生体を形成して生育するとされるものは一部のキノコを除き、従来の栽培法では子実体まで分化させることは困難であるとされている。

マツタケの栽培検討の歴史は1970年代にまで遡り、その当時は組織培養による菌株の樹立と基礎的な純粋培養条件の検討がほとんどであったが、この当時のデータがマツタケの基本データとして現在も利用されている³⁾。我々の研究室でも1990年代末よりマツタケの栄養摂取の仕組みを明らかにするためにマツタケが分泌する糖質分解酵素についての研究を進め、マツタケがデンプンやセルロースなどの多糖から、生育に必要なグルコースを生産する能力が低いことを明らかにしてきた⁴⁾。しかし、マツタケの糖質分解にかかわるこれらの酵素については、アミノ酸配列情報の取得が困難などの理由で、これまでコードする遺伝子の特定にまで至っていなかった。一方、*Tricholoma matsutake* の全ゲノム情報が最近 JointGenomeInstitute と Forestgen で公開され、酵素タンパク質のクローニングだけでなく様々な遺伝子の発現解析などが可能となってきた。しかし、2つのデータベース間でタンパクをコードする領域が異なっていたり、そもそも解析に用いた菌株の由来が明らかではなく、RNA-seq などの発現解析をする際に問題が生じる可能性も考えられた。我々は上記2菌株のゲノム情報に加えて新たに8菌株の *T. matsutake* についてドラフトゲノム情報を決定し、データベース化を進めている。そのうち NBRC30605 株についてはすでに DDBJ 等への登録も終わっており、これらのゲノム配列情報を利用して糖質分解系酵素の発現を解析し、菌体生育時の糖質を変えることにより糖質分解酵素の遺伝子の発現が変化することを確認することができた。現在、培養条件の異なる菌糸体を用いた発現解析を進めている。

1980年代は、それまで栽培や生態という部分のみが注目されていたキノコ研究の場に、生理学的な手法が導入され、キノコが生化学研究の場に登場した時期であろう。しかし、その後キノコは微生物でありながらも培養がしにくいといった特徴からか、研究対象とする研究者が増えず、現在もキノコを研究材料とする研究者は少ない。一方、世の中の研究手法はゲノムデータベースが利用できることを前提としているものも多く、キノコで LC-MS などを用いてプロテオーム解析をしようと思っても、解析できない生データだけが

たまっていくといった状況になりかねない。実際のところ麹菌のように全ゲノム情報が明らかになっているものであっても、何時・どのように遺伝子とタンパク質の発現が制御されているかを明らかにするのは簡単ではないのであるから、情報がほとんどないキノコで同じような手法で研究を進めていくのは非常に困難であることは容易に想像できる。しかし、子実体形成機構のみならず、少なくともこれまでに蓄積されたデータを裏付けできるような解析が可能になるようなデータベースの整備については少しずつでも進めていかなければいけないと感じている。

なお、本報告の内容の一部は、冒頭にも述べたが、「私立大学戦略的基盤形成支援事業」の支援を受けて行った研究の成果である。

引用文献

- 1: 寺下隆夫・小田耕平・河野又四・村尾澤夫：酸性プロテアーゼ阻害剤：S-PI による人工シメジ（ヒラタケ）の増産，醗酵工学会誌 59, 55-57, 1981
- 2: 寺下隆夫・盧 成金・吉川賢太郎・獅山慈孝：ブナシメジの栄養生長環境と生長時の加水分解酵素活性，きのこの科学 2, 15-20, 1995
- 3: Kawai, M and Ogawa, M: Studies on the artificial reproduction of *Tricholoma matsutake* (S. Ito et Imai) Sing. IV. Studies on a seed culture and a trial for the cultivation on solid media, Trans Mycol Soc Japan, 17, 499-505, 1976
- 4: Kusuda, M, Ueda, M, Miyatake, K and Terashita, T: Characterization of the carbohydrase productions of an ectomycorrhizal fungus, *Tricholoma matsutake.*, Mycoscience 49, 291-297, 2008

Construction of genome database of mushroom for understanding fruiting body formation mechanisms in mushroom

Norifumi Shiraaka

(Dep. of Applied Biological Chemistry, Fac. of Agriculture, Kindai Univ.)

ご略歴

- 1991年 京都大学農学部農芸化学科 卒業
1993年 京都大学農学研究科修士課程 修了
1995年 近畿大学農学部食品栄養学科 助手
1999年 京都大学博士（農学）
2001年 近畿大学農学部食品栄養学科 講師
2007年 近畿大学農学部食品栄養学科 助教授
2009年 改組により 近畿大学農学部応用生命化学科 准教授
2014年 近畿大学農学部応用生命化学科 教授 現在に至る
兼任等
2007年～2008年 オレゴン州立大学薬学部客員研究員

糸状菌分子生物学コンファレンス シンポジウム 「和食に生きる糸状菌」

S-5

和食の美味しさ

伏木 亨
(龍谷大学 農学部)

万葉の時代から、日本には宮廷や貴族を中心とした独自の食文化が生まれていた。穀類、蔬菜、種実、魚介や鳥獣肉類に加え、発酵を利用した国内外由来の多様な調味料も使われており、発酵は今日もさらに発展し続けている。自然の恵みを活かした現代日本料理の精神の原型がここにあることがわかる。日本料理は、このような自然との調和を基に、室町時代に開花した伝統的なだしのおいしさを加え、今日、世界をリードする料理に発展してきた。自然の素材を活かす精神と、独自のだしを中心とした現代日本食への流れについて、味覚・嗅覚・だしなどの観点から、海外の食の味わいとも比較しながらお話ししたい。

だしは世界中にある

料理の味わいの中心はだしにある。世界中のどのだしも、そのおいしさは、味覚としてのうま味と口腔から鼻に抜ける風味との2つの部分から構成されている複合的な感覚である。風味の主役は嗅覚であるが、風味が味覚を次元の違う高度な味わいにまで高めることでだしが成立しており、味覚と嗅覚の関係は切り離せない部分がある。

うま味の中心は核酸・アミノ酸などに由来する。だしの風味は、うま味を抽出する際に同時に移行してくる素材由来の香気成分が中心である。だしの材料は地方や国によって異なる。したがって、だしの味覚は比較的単純であるが、風味は多様である。

匂いの記憶は長期間にわたって変形しない。数十年前の匂いの記憶さえも鮮明である。匂いの受容体は人間でも約400種類もあり、応答パターンは無限にある。食物の微妙な違いを峻別できるのは風味すなわち嗅覚しかない。文化として継承するためには風味(匂い)の記憶が重要である。

うま味はグローバルだが風味の嗜好はローカルである

うま味は生得的に好まれる味に含まれると考えられ (Beauchamp 1998, Bellisle 1999)、甘味や油脂のようにグローバルに受け入れられるものである。反対に、嗅覚を動員する風味に対する嗜好は後天的なものであり、食文化と密接に関係している。だしの匂いはきわめてローカルであるといえる。

マウスなどの実験動物は油脂や甘味に対する好みがあれば、風味に違和感があってもそれを柔軟に受け入れる行動を見せる。しかし、人間の場合は風味の受諾のハードルは高い。食物の嚥下に先立って風味や見た目から得られる情報が人間の好き嫌いの判断に決定的な影響を与えるからである。

人間では食文化に合わない風味は受け入れられにくい。だしは地域のローカルな食材からうま味を抽出するものであるから、うま味が受諾されても風味が拒否されることが多い。だしを好きになることは、その地方のだし食材の匂いを許せるようになることである。それ故に食経験に組み込まれることがもっとも確実な継承の方法である。

離乳期における鰹だしの呈示実験

子供のころに与えただしが、成長後の嗜好にどの様に影響するかについて、私たちの研究グループは実験動物を用いて研究している（川崎ら 2003）。

マウスを3つのグループに分けた。鰹だしを親の代から離乳完了まで与え続け、その後子供にはだしの香りを抜いた餌を大人になるまで与えたグループ。さらに、対照群として、親の代から子供が成長するまでまったく鰹だしの風味の餌を与えなかったグループ。3つ目は、親の代から子供の離乳完了までは鰹だしを経験させず、離乳が完了してからしばらくの間鰹だしの風味の餌を与えたグループ。成長してからはどのグループも鰹だしの香りの餌を与えなかった。

親の餌から子どもの離乳完了まで通して鰹だしを好んで摂取した。離乳完了後に鰹だしを与えたグループも鰹だしの溶液をある程度好んだが、先のグループほどではなかった。一度も鰹だしを経験していないグループは、鰹だしに対する嗜好性が高くなかった。

離乳前から鰹だしを経験したグループと、離乳が完全に完了してから与えられたグループはともに鰹だしを好んだが嗜好性の強さには大きな違いがあった。離乳前後の経験が強く影響を与えていることを示唆するものである。

Palatability of Japanese Cuisine

Tohru Fushiki

Ryukoku Univ. Fac. of Agriculture

ご略歴

1953年舞鶴市生まれ。滋賀県に育つ。

1975年京都大学農学部卒業

1994年より京都大学農学研究科教授

2015年より龍谷大学農学部教授。食の嗜好性研究センター長併任。

おいしさとは何かをテーマに学際的な研究を展開している。

2014年紫綬褒章受章。

専門分野の論文の他に、『味覚と嗜好のサイエンス』など著書。

----- MEMO -----

Oral Session

O-1 (P-78)

代謝改変およびフラックス強化した黄麹菌でのデンプンからの乳酸生産

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

本研究の目的は、黄麹菌 *Aspergillus oryzae* を用いたデンプンからの L-乳酸の高効率生産である。乳酸は、従来の石油由来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である。これまでに栄養要求性黄麹菌 *A. oryzae* NSPID1 株に牛(*Bos taurus*)由来の lactate dehydrogenase (LDH) 遺伝子を導入した L-乳酸生産株で、100 g/L のデンプンから約 30 g/L の L-乳酸生産に成功している。この際、乳酸生産の基質であるピルビン酸がエタノールなどの副産物の生産に使われていると考えられた。そこで本研究では、L-乳酸生産の競合経路の破壊や非活性の高い LDH 発現によるフラックスの強化で乳酸生産能の向上を目指した。

L-乳酸生産株では、副産物としてエタノールや有機酸の生産が確認された。そこで、エタノール生産および有機酸生産を減らす目的で、エタノール生合成経路上のピルビン酸デカルボキシラーゼ(PDC)およびピルビン酸をオキサロ酢酸に変換するピルビン酸カルボキシラーゼ(PYC)を両方破壊した株(PDC/PYC 破壊株)を構築した。この株は、エタノール生産と乾燥菌体重量が低減し、乳酸生産量が約 40 g/L に改善された。これと並行して、乳酸生産へのフラックスを強化するために牛由来 LDH よりも比活性の高い乳酸菌(*Lactococcus lactis*)由来 LDH を導入した株を構築した。この株では、乳酸生産量が約 44 g/L に改善された。今後、更なる乳酸生産能の向上を目指し、PDC/PYC 破壊株に乳酸菌由来の LDH を導入した株での乳酸生産能を評価する予定である。

Metabolic engineering and flux enhancement of L-lactate producing *Aspergillus oryzae*.

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

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

O-2 (P-49)

Aspergillus nidulans における β -D-Galactofuranosidase の機能解析

豊田早紀¹, 八色奈央¹, 松永恵美子¹, 樋口裕次郎¹, 後藤正利², 竹川薫¹ (¹九大院・生資環,²佐賀大・農)

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 Galactofuranose(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 含有糖鎖の代謝機構に重要な酵素である。これまで、*A. niger* などの菌株の培養液中から Galf-ase の精製および特性解析に関する報告はあるが、遺伝子の同定までには至ってなかった。我々は Galf-ase 遺伝子の同定を行うために、Galf と構造が類似したアラビノフラノース(Araf)に着目し、既知の 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が、その活性は微弱であった。そこで、土壌より 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発見した。相同性検索の結果、*A. nidulans* の中に放線菌の Galf-ase と相同性の高い 2 つの遺伝子 AN2395 と AN3200 が存在することがわかった。本研究ではこれら 2 つの Galf-ase の機能解析を行った。まず、*A. nidulans* 由来の 2 つの Galf-ase 候補遺伝子を cDNA から増幅し、大腸菌内で発現させ、精製および酵素活性測定を行った。その結果、両遺伝子産物とも、Galf-ase 活性のみを示し、Galf 特異的な Galf-ase であることがわかった。さらに、両 Galf-ase 遺伝子の諸性質について調べた。また、AN3200 遺伝子破壊株を作製し、培養液および菌体内の Galf-ase 活性を測定した。その結果、AN3200 破壊株において菌体内で野生株と比較して、Galf-ase 活性が低下していることがわかった。以上の結果から、*A. nidulans* において AN3200 は細胞内でガラクトフラノース含有糖鎖の代謝に関与していることが示唆された。

Functional analysis of two β -D-Galactofuranosidases in *Aspergillus nidulans*

Saki Toyota¹, Nao Yairo¹, Emiko Matsunaga¹, Yujiro Higuchi¹, Masatoshi Goto², Kaoru Takegawa¹

(¹Dept. of Biosci. & Biotechnol., Fac. of Agric., Kyushu Univ., ²Fac. of Agric., Saga Univ)

O-3 (P-53)

Cyclophenin 類を変換する糸状菌由来酵素シクロペナーゼの発見と機能解析

岸本真治, 石川格靖, 山田陽香, 平山裕一郎, 恒松雄太, 渡辺賢二 (静岡県大・薬)

Cyclophenin 類および viridicatin 類は様々な *Aspergillus* 属および *Penicillium* 属の糸状菌で産生が確認されている化合物群である。1967年, Luckner らは *Penicillium viridicatum* の菌体抽出液が cyclophenin 類を viridicatin 類へと変換することを見出し, この変換を担う酵素としてシクロペナーゼの存在を提唱した。しかしその後, 分子生物学的な研究が進まずシクロペナーゼの正体は長い間謎に包まれていた。そこで我々はシクロペナーゼの正体を明らかにするため, viridicatin 類が生合成中間体であると予想された aspoquinolone 類および penigequinolone 類の生合成研究を開始した。

まず, aspoquinolone 類の構造を元にして生合成に必要な遺伝子を推定し, 生産菌である *Aspergillus nidulans* のゲノム中からそれらを全て含む遺伝子クラスターとして *asq* クラスターを見出した。一方, penigequinolone 類の生産菌である *Penicillium* 属糸状菌 FKI-2140 株のドラフトゲノムを解読後, *asq* クラスターと同一性のある遺伝子クラスターを探索した結果, *png* クラスターを見出した。化合物産生量の多い FKI-2140 株の菌体破砕液から酵素活性を指標にシクロペナーゼを精製し, 得られた情報を元に *png* クラスター中での候補遺伝子を絞り込んだ。候補遺伝子を異種宿主発現させて酵素活性を測定したところ, penigequinolone 類の生合成に関与していると予想されなかったヘモシアニン様タンパク質 PngL がシクロペナーゼ活性を有していることが分かった。さらに, *asq* クラスター中にコードされていて PngL と同一性のある酵素 AsqI にもシクロペナーゼ活性を確認することができた。現在, シクロペナーゼの触媒機構について研究を進めている。

Cyclophenases, atypical enzymes converting cyclophenins to viridicatin in fungi

Shinji Kishimoto, Noriyasu Ishikawa, Haruka Yamada, Yuichiro Hirayama, Yuta Tsunematsu, Kenji Watanabe

(Dept. Pharm. Sci., Univ. Shizuoka)

O-4 (P-52)

白色腐朽菌ヒラタケにおける *wtr1* 遺伝子変異がリグニン分解システムに与える影響

小寺里奈¹, 中沢威人¹, 西村裕志², 渡辺隆司², 坂本正弘¹, 本田与一¹ (¹京大・院農, ²京大・生存研)

担子菌類に属する白色腐朽菌は, 木質中の主要構成成分の一つである不定形芳香族高分子リグニンを単独で生分解(無機化)できる唯一の生物である。これを可能にしている主要因子の正体は, リグニン分解酵素と呼ばれる, 白色腐朽菌のみが生産する一連の酸化酵素であるとされている。当研究室で用いている白色腐朽菌ヒラタケ (*Pleurotus ostreatus*) は, リグニン分解酵素の一部である, マンガンペルオキシダーゼ (MnP) および多機能型ペルオキシダーゼ (VP) などを生産する。しかし, 以前の木材腐朽菌の生化学および細胞生物学研究からは, リグニン分解酵素以外にも, リグニン生分解に重要な因子の存在が示唆されている。このような未知の因子を同定する目的で, リグニン生分解能力と相関を示す色素脱色能力に不全をきたすヒラタケの突然変異体を分離し, 原因変異遺伝子を特定した(中沢ら, 第14回本研究会)。変異体 UVJ2-1 の原因変異遺伝子は, Zn-finger を有する担子菌に特異的な転写因子をコードする遺伝子 (*wtr1* と命名) であることが判明した。当該変異体では, DNA 結合領域と転写活性化領域は保持したまま, C 末の一部が欠損する形で変異している (*wtr1-1* 変異)。本研究において, UVJ2-1 および *wtr1* 完全破壊株 2 株 (J2-1d#1, J2-1d#2) を GP 液体培地上で培養したところ, 通常ヒラタケの野生株が示す MnP/VP 活性が消失した一方, 酵素遺伝子 (*mnp3*, *vp1*) の転写発現は野生株と変わらなかった。これらの結果からは, *wtr1* 変異による遺伝子発現変動が, 正常な MnP/VP の活性発現を転写以外の段階で妨げていることが示唆された。また, ブナ木粉上で培養した場合, UVJ2-1 は野生株と同等のリグニン生分解能力を示した一方, *wtr1* 完全破壊株ではリグニン生分解能力が減少していた。以上を踏まえて, 野生株と J2-1d#2 の間での比較 RNA-seq 解析を行った。現在は, Wtr1 によって制御される MnP/VP 活性発現およびリグニン生分解に重要な因子の同定を行っている。

Effects of mutations in *wtr1* on the ligninolytic system in the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*

Rina Kodera¹, Takehito Nakazawa¹, Hiroshi Nishimura², Takashi Watanabe², Masahiro Sakamoto¹, Yoichi Honda¹

(¹Grad. School of Agr., Kyoto Univ., ²RISH, Kyoto Univ.)

O-5 (P-71)

誘導物質依存的リン酸化による麴菌転写因子 XlnR の活性制御

浅井恒滋, 塩谷友佐, 杉本賢吾, 金丸京子, 木村真, 小林哲夫 (名大院・生命農学)

XlnR は *Aspergillus niger* で最初に発見された転写因子であり, D-キシロースに応答して, キシラン分解酵素, セルロース分解酵素, ペントース代謝系酵素をコードする遺伝子群の転写を特異的に活性化する。我々は *A. oryzae* での解析により, XlnR はリン酸化タンパク質として存在し D-キシロースに応答して付加的なリン酸化を受けること, この付加的なリン酸化は可逆的であり, D-キシロース除去により非誘導時のリン酸化レベルに復帰することなどを明らかにしてきた。以上から, 可逆的リン酸化が XlnR 活性を制御するという作業仮説をたて, その証明のために前回の本コンファレンスでは, XlnR の推定リン酸化部位 6 カ所のアミノ酸置換がキシラナーゼ生産と遺伝子発現に与える影響を解析し, S556A で生産能・遺伝子発現が顕著に, S562A でわずかに低下するが消失には至らないことを示した。

本研究では, S556A 置換が XlnR の安定性や核移行に与える影響を解析するとともに, S556A/S562A および S556E/S562E 二重置換体を作製し, これらのキシラナーゼ生産・遺伝子発現誘導能, ならびに XlnR のリン酸化レベルを解析した。

S556A 置換体の安定性, 核移行ともに野生型と同等であった。これは核内での XlnR の DNA 結合や構造変化, 未知の因子との相互作用などにリン酸化が関与していることを示唆する。S556A 置換体では完全なキシラナーゼ誘導能の欠損には至らなかったため, S556A/S562A および S556E/S562E 二重置換体について解析した結果, キシラナーゼ生産と *xynF1*, *xynG2* の発現が完全に消失した。また, S556A/S562A は解析中であるが S556E/S562E では D-キシロース依存的リン酸化も完全に消失した。これらはリン酸化が XlnR の活性化に必要であるという作業仮説を支持している。二重置換体の安定性や核移行, DNA 結合について解析し, あわせて報告する予定である。

Regulation of XlnR activity by inducer-dependent phosphorylation in *Aspergillus oryzae*.

Koji Asai, Yusuke Shioya, Kengo Sugimoto, Kyoko Kanamaru, Makoto Kimura, and Tetsuo Kobayashi (Grad. Sch. Bioagric. Sci., Nagoya Univ.)

O-6 (P-74)

Aspergillus aculeatus セルラーゼ誘導発現機構への *sepM* の関与

津村亮輔, 谷修治, 炭谷順一, 川口剛司 (阪府大院・生環科)

【目的】 *Aspergillus aculeatus* においてセルラーゼ遺伝子の発現は, 構成的に生産されるセルラーゼによる基質からのインデューサーの遊離を起点として誘導されると考えられるが, この分子機構は不明な点が多い。本研究では, セルラーゼ生産調節に関わる新規制御因子の同定とその機能解析を目的とした。【方法・結果】 主要セルラーゼ FIII-avicelase (*cbhl*) 遺伝子のプロモーター制御下で orotidine-5'-monophosphate decarboxylase 及び β -glucuronidase の遺伝子をレポーターとして同時に発現する宿主を用いて新規因子を探索した。アグロバクテリウム形質転換法 (AMT) により宿主を形質転換し, 構築した約 10,000 株の変異株ライブラリから, 5-fluoroorotic acid 耐性を獲得及び GUS 活性・セルロース資化能が低下した株を選択し, 一次候補株とした。一次候補株から, T-DNA が 1 コピーで挿入されていた菌株について qRT-PCR 解析を行い, *cbhl* 転写量が宿主に比べ減少していた株を最終候補株とした。最終候補株について, inverse PCR により T-DNA 周辺配列を増幅し, シークエンス解析により T-DNA 挿入位置を特定した。T-DNA が *Schizosaccharomyces pombe cdc14* の ortholog である *sepM* 遺伝子の近位に挿入されていたことから, *cbhl* 発現量の減少が *sepM* の機能低下に寄与していると考え, 相同組み換え法を用いて *sepM* 単一破壊株を作製した。その結果, *sepM* 単一破壊株において *cbhl* 発現量がコントロール株に比べ三分の一に低下していた。さらなる解析の結果, キシランやキシロースを誘導基質とした時には, キシラナーゼ遺伝子の発現量に有意な変化はなく, *sepM* の機構への関与は, セロビオースや Avicel などのセルロース性基質に特異的な現象である事を見出した。

The involvement of the *sepM* on the induction of the cellulase genes in *Aspergillus aculeatus*

Ryosuke Tsumura, Shuji Tani, Jun-ichi Sumitani, Takashi Kawaguchi

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

O-7 (P-84)

ウリ類炭疽病菌における細胞周期制御因子 CoTem1 の推定相互作用因子 CoPpt1 は病原性に関与する

梶河直起, 深田史美, 久保康之 (京府大院・生環)

これまでにウリ類炭疽病菌における GTPase CoTem1 が, GAP 複合体 CoBub2/CoBfa1 の制御下で細胞周期の制御と病原性に関与することを報告してきた。今回, CoTem1 を中心としたシグナルカスケードの解明を目的とした酵母ツーハイブリッド法によって CoTem1 の相互作用因子として CoPPT1 を同定した。CoPPT1 は phosphatidylglycerol phosphatidylinositol transfer protein をコードすると推定された。また CoPpt1 は CoTem1 における推定相互作用部位を変異させた CoTem1^{T146A} との相互作用を失うことを確認した。次に, CoPPT1 の機能を解析するため遺伝子破壊株を取得した。Δ*coppt1* 株は宿主植物体上においては野生株と同様の正常な付着器を形成したが, 侵入菌糸の形成が認められず, 宿主植物に対する病原性の顕著な低下を示した。一方, Δ*coppt1* 株のセルロース膜上での付着器および侵入菌糸形成については野生株と顕著な差は認められず, 胞子発芽から侵入菌糸形成に至る形態形成能は正常であった。さらに蛍光タンパク質 mCherry と CoPpt1 の融合タンパク質 CoPpt1-mCherry を用いて細胞内局在観察を行ったところ, CoPpt1 は栄養菌糸, および未発芽胞子において液胞に存在することが明らかになった。一方, CoPPT1 の遺伝子破壊株, 過剰発現株において培養 6 時間までの付着器分化や核挙動に顕著な異常は認められなかった。

CoPpt1, a candidate interactor with cell cycle regulatory factor CoTem1, is involved in the pathogenicity of *Colletotrichum orbiculare*.

Naoki Kajikawa, Fumi Fukada, Yasuyuki Kubo

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

O-8 (P-89)

トウモロコシごま葉枯病菌の物理的疎水面認識および付着器形成を制御する Opy2 の解析

吉田紘樹¹, 後藤駿介¹, 田中千尋², 入江俊一¹, 鈴木一実¹, 泉津弘佑¹ (¹滋賀県大・環境, ²京大院・農)

多くの植物病原糸状菌は付着器と呼ばれる特殊な細胞を介して宿主植物に侵入する。これらの菌類は宿主葉の表面を, ①物理的疎水面の認識, ②宿主由来成分の認識, という 2 つの機構によって認識し, 付着器を形成するものと考えられている。

当研究室では, トウモロコシごま葉枯病菌 (*Bipolaris maydis*) において Opy2 がこの物理的疎水面の認識に重要な役割をもっていることを明らかにした。野生株は宿主であるトウモロコシ葉上だけでなく, プラスチック表面などの物理疎水面上でも付着器を形成することができる。一方で Opy2 破壊株はプラスチック表面では付着器の形成能力を欠損するが, 宿主葉上では正常に付着器を形成する。

本研究では, Opy2 破壊株の付着器形成を誘導する物質を探索し, 表面認識のメカニズムを調査した。Opy2 破壊株はトウモロコシだけではなく様々な植物葉上で付着器を形成したことから, 付着器形成の誘導物質は植物一般に含まれると考えられた。さらに Opy2 破壊株の宿主葉上での挙動を観察したところ, 葉の細胞間層上で特に多くの付着器を形成していた。そこで, 植物の細胞間層の主成分であるペクチンを添加したところ, Opy2 破壊株のプラスチック表面における付着器形成が回復した。一方で, 他の植物病原菌類で付着器形成を誘導することが報告されているクチンモノマーやビーワックス, トリアコンタノールを添加しても Opy2 破壊株は付着器を形成しなかった。このことから, トウモロコシごま葉枯病菌における付着器形成は物理的疎水面および植物由来成分ペクチンにより誘導されることが示唆された。

Functional analysis of Opy2 in *Bipolaris maydis*

Hiroki Yoshida¹, Syunsuke Goto¹, Chihiro Tanaka², Toshikazu Irie¹, Kazumi Suzuki¹, Kosuke Izumitsu¹

(¹Grad. School of Env. Sci., Univ. of Shiga prefecture, ²Sch. of Agriculture, Kyoto Univ.)

O-9 (P-95)

疫病菌 *Phytophthora infestans* シスト発芽阻害物質 β -rubromycin の作用解析

西尾尚堯, 谷修治, 甲斐建次, 東條元昭, 炭谷順一, 川口剛司 (阪府大院・生環科)

【目的】卵菌 *Phytophthora infestans* はナス科植物に感染し疫病を引き起こす植物病原菌である。*P. infestans* の遊走子嚢は 15°C 以下の水中で遊走子を放出する。遊走子は宿主へと走化的に泳いで行き、植物表層でシスト形成後、発芽し付着器を形成することで効率よく植物内へ侵入する。本研究ではシスト発芽機構の解明を目的としてシスト発芽阻害物質を放線菌二次代謝産物から同定し、その作用解析を行った。また同定した化合物が他の卵菌に対しても分化阻害活性を示すか調べるため *Pythium aphanidermatum* を被験菌として用いた。

【方法及び結果】土壌より単離した放線菌の培養液に等量のアセトンを加えて調製したサンプルを *P. infestans* 遊走子嚢懸濁液に添加し、10°C で 18 時間静置後の遊走子嚢の形態を観察した。505 サンプル中、2 サンプルがシスト発芽を阻害した。発芽阻害率の高かった no. 750 株の培養液 76.4 L を酢酸エチル抽出後、各種クロマトグラフィーにより発芽阻害物質 2.9 mg を取得した。精製標品の $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, MSI-MS スペクトル解析により精製物質を β -rubromycin と同定した。 β -rubromycin 標品を用いシスト発芽阻害活性を調べたところ、 IC_{50} は 37 nM であった。また 2 μM の β -rubromycin で処理した遊走子嚢をトマトの葉に接種したところ、感染を阻害した。次に β -rubromycin による *P. aphanidermatum* 卵胞子分化への影響を調べた。*P. aphanidermatum* の卵胞子を 25°C に静置し、24 時間後の形態を観察した。 β -rubromycin は卵胞子の発芽を阻害し、 IC_{50} は 60 nM であった。2 μM の β -rubromycin で処理した *P. aphanidermatum* の卵胞子をハクサイに接種し 35°C で静置した後、経時的に観察したところ同様に植物感染を阻害した。今回の結果から β -rubromycin は低濃度で 2 種類の卵菌の異なる植物感染を阻害する事が明らかとなった。

The analysis of β -rubromycin on sporangium and oospore development in oomycetes.

Nishio Naotaka, Shuji Tani, Kenji Kai, Motoaki Tojo, Jun-ichi Sumitani, Takashi Kawaguchi

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

O-10 (P-99)

ナス科植物の産生するファイトアレキシンの植物病原性糸状菌による代謝の解析

黒柳輝彦, 小鹿一, 佐藤育男, 千葉壮太郎, 川北一人, 竹本大吾 (名大院生農)

植物は病原性糸状菌の攻撃に対して抗菌物質であるファイトアレキシンを産生することで、抵抗性を発揮している。ナス科植物の主なファイトアレキシシンとして、ベンサミアナなど *Nicotiana* 属植物やピーマンなどの *Capsicum* 属が産生するカプシジオールやジャガイモやトマトなど *Solanum* 属植物が産生するリシチンなどのセスキテルペノイドが挙げられる。本研究では、カプシジオール存在下で病原糸状菌および卵菌 16 種を培養し、カプシジオール耐性および代謝能を解析した。その結果、供試した 16 種の植物病原菌のうち 8 種がカプシジオール耐性を示し、それらのうち少なくとも 6 種がカプシジオールを他の物質に代謝する能力を持っていることが確認された。一方、供試した 4 種の卵菌 *Phytophthora infestans*, *P. nicotianae*, *P. capsici* および *P. cryptogea* はカプシジオール感受性であり、代謝能を示さなかった。宿主範囲の広い病原菌であることが知られる *Botrytis cinerea* および *Stemphylium lycopersici* はカプシジオールをそれぞれ異なる物質に代謝し、共にベンサミアナに病原性を示した。さらに両病原菌はリシチン代謝能を持ち、ジャガイモに対しても病原性を示した。以上の結果から、病原菌と植物の組み合わせにより、植物の産生するファイトアレキシンを代謝する能力が、病原糸状菌の植物への感染に重要な役割を担う可能性が示された。

Detoxification of Solanaceae phytoalexins by plant pathogenic fungi

Teruhiko Kuroyanagi, Makoto Ojika, Ikuo Sato, Sotaro Chiba, Kazuhito Kawakita and Daigo Takemoto

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

O-11 (P-24)

担子菌キノコの順遺伝学研究から示唆されてきた、リグニン生分解と子実体形成の関連性

中沢成人¹, 村口元², 本田与一¹ (¹京大・院農, ²秋田県大・資源生物)

担子菌キノコには、他の微生物にはない生態的特徴が2点ある。1つ目は、顕微鏡サイズの菌糸細胞が、肉眼ではっきりと認識できる巨大な有性生殖器官・子実体（キノコ）を形成する点。2つ目は、森林圏の分解者として、複雑難解な木質成分に対する生分解（木材腐朽）能力をもつ点である。特に木材の主要成分のひとつ“リグニン”を単独で生分解（無機化）できる生物は、地球上で“白色腐朽菌”と呼ばれる担子菌の一部のみである。そのような担子菌に特徴的な2点に関して、今までは別々に研究が行われてきた。本発表では、非木材腐朽菌ヒトヨタケ (*Coprinopsis cinerea*) および白色腐朽菌ヒラタケ (*Pleurotus ostreatus*) を用いた別々の順遺伝学研究から、リグニン生分解と子実体形成に同時に影響を与える機構の存在が示唆されてきたことを報告する。以前の発表（中沢ら、第14回当研究会）の後、リグニン分解能力と相関する色素脱色能力を失ったヒラタケ突然変異体の原因変異遺伝子の特定に成功した。その中の2つの遺伝子 (*Popex1* および *Pochd1*) が、実際にブナ木粉中のリグニン生分解に重要であることが判明した。それらの遺伝子変異（および破壊）は、同時に子実体発生開始不全も引き起こした。一方、ヒトヨタケにおけるキノコ形態形成の順遺伝学研究からは、*Pochd1* に相当する *Cc.chd1* の変異が、子実体の傘形成を不全化させることが明らかとなった。さらに *Popex1* に相当する、ヒトヨタケの *Cc.pex1* 遺伝子破壊株を作成したところ、ヒラタケと同様に子実体発生開始不全になった。しかし、上記以外の表現型については、ヒラタケとヒトヨタケで異なる部分も見つかった。以上の結果および2種のキノコの生理生態的な違い（木材腐朽性の有無・子実体形成過程の相違を含む）を踏まえて、「子実体形成とリグニン生分解に同時に影響する機構」について仮説を論じる。

Insights into correlation between white rot and sexual development from forward genetics in agaricomycetes

Takehito Nakazawa¹, Hajime Muraguchi², Yoichi Honda¹

(¹Kyoto Univ., ²Akita Prefectural Univ.)

O-12 (P-41)

イネいもち病菌におけるクロラムフェニコールの新規作用点

野坂亮仁, 遠藤正伍, 田中信清, 成川恵, 中島将博, 紙透伸治*, 田口速男, 菅原二三男, 鎌倉高志 (東理大院理工・応生, *麻布大獣医学・基礎教)

イネいもち病菌 (*Pyricularia oryzae*) の付着器形成は真核生物において最も単純な細胞分化のひとつである。この付着器形成を細胞分化に関わる因子を阻害する薬剤に反応する実験系とみなし、本菌の付着器形成を指標とした既存薬剤の新規作用点の探索を行った。その結果、原核生物においてタンパク質合成を阻害する抗生物質であるクロラムフェニコール (以下 Cm) が付着器形成を極めて特異的に阻害した。本菌は真核生物であることから、Cm の真核生物における新規標的因子が *P. oryzae* に存在することが示唆された。この標的因子を解析することで細胞分化機構の解明や抗真菌剤の開発に繋がる。

新規標的因子の探索方法には T7 フェージディスプレイを採用し標的因子を探索したところ、PoDullard が候補に挙がった。国産野性株 P2 株の PoDullard 過剰発現株では野性株にみられる Cm に対する感受性が低下した。また大腸菌を宿主としたタンパク質発現系で GST タグを付加した PoDullard の融合タンパク質を発現・取得し、Cm に対する結合解析を行った結果 PoDullard に Cm への結合能がみられた。このことから *P. oryzae* における Cm の新規作用点として PoDullard が Cm と相互作用していることが考えられた。現在は欠損変異株の作出を試みており、取得でき次第 Cm への感受性を確認する。

今後 PoDullard の *P. oryzae* における機能解析ならびに Cm への作用の解析が進むことで、*P. oryzae* の付着器形成プロセスの理解や新規付着器形成阻害剤の開発に繋がることが期待される。

A novel target of chloramphenicol in *Pyricularia oryzae*

Akihito Nozaka, Shogo Endo, Nobukiyo Tanaka, Megumi Narukawa, Shinji Kamisuki*, Masahiro Nakajima, Hayao

Taguchi, Fumio Sugawara, Takashi Kamakura (App. Bio. Sci., Tokyo Univ. of Sci., *Dept. Vet. Med., Azabu Univ.)

O-13(P-38)

糸状菌 PKC に特異的な新規阻害剤 Z-705 の作用機構解析

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

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

我々は、MgPkc1 阻害剤を探索するため、立体構造モデリングによる *in silico* スクリーニングおよび寒天平板培地上での生育阻害試験を行い、約 80 万化合物の中から Z-705 を選抜した。本化合物はイネ葉上では顕著な病害防除効果は認められず、化合物改変による活性向上が課題となっている。そこで本研究では、酵母内での Z-705 活性評価系を構築し、PKC 阻害機構を解析することを目的とした。本評価系では、酵母 Pkc1 のキナーゼドメインのみを糸状菌由来のものに置換した酵母-糸状菌キメラ PKC 発現株を用い、Z-705 による生育阻害効果を解析した。その結果、Z-705 存在下において酵母-糸状菌キメラ PKC 発現株は野生株や酵母 PKC 発現株と比較して生育の遅延が認められた。また、Z-705 による CWIS 経路への影響を評価するため、PKC 下流因子 *MLP1* の転写量を定量 PCR により解析した。その結果、6.25 µg/mL の Z-705 存在下では、酵母-糸状菌キメラ PKC 発現株でのみ *MLP1* の転写量が減少した。このことは、Z-705 が糸状菌 PKC に特異的な阻害剤であることを示唆している。現在、PKC 下流の MAP kinase Mpk1p のリン酸化解析を行い、タンパク質レベルでの Z-705 の PKC 阻害作用を評価している。

Novel antifungal drug Z-705 specifically inhibits protein kinase C of filamentous fungi

Asumi Sugahara¹, Fumio Shoji¹, Mayumi Nakayama^{1,2}, Akira Yoshimi², Tomonori Fujioka³, Kiyoshi Kawai³, Takuya Katayama⁴, Hiroyuki Horiuchi⁴, Hideaki Umeyama⁵, Keietsu Abe^{1,2} (¹Grad. Sch. Agric. Sci. & ²NICHE. Tohoku Univ., ³Kumiai Chemical Industry Co. Ltd., ⁴Grad. Sch. Agric. Sci. Tokyo Univ., ⁵Facul. Sci. Engin. Chuo Univ.)

O-14 (P-45)

Aspergillus nidulans のミトコンドリア機能調節と菌体内分布

金丸京子, 稲葉真由子, 木村眞, 小林哲夫 (名大院生命農)

液体培養で栄養増殖する *Aspergillus nidulans* の菌体を寒天培地に移すと、栄養源の枯渇や乾燥、空気に晒されるなどの生育環境の変化がシグナルとなり、菌糸の一部から分生子柄が分化し、その先端に分生子が形成される。これまでにわれわれは、膜電位を発生したミトコンドリアが分生子柄の先端 (分生子頭) に局在すること、His-Asp リン酸リレー情報伝達機構のヒスチジンキナーゼ HysA がミトコンドリアの膜電位調節と菌体内の分布に関与することを報告した。HysA と GFP の融合タンパク質を利用して菌体内局在部位を観察したところ、HysA はまさに分生子頭のミトコンドリアに局在することも確認した。本研究では、HysA の局在性をタンパク質レベルで検証するために、*hysA* 遺伝子を *alcA* プロモーターの制御下においた株を構築した。液体培養後の菌体からプロトプラストを調製し細胞分画を行ったところ、ミトコンドリア画分に HysA タンパク質を検出した。ヒスチジンキナーゼ間で保存されている自己リン酸化部位 (His 残基) とリン酸基受容部位 (Asp 残基) を他のアミノ酸に置換した変異タンパク質 (HysAHQ, HysADN) もミトコンドリア画分に検出したことから、両アミノ酸残基は HysA の局在性に関与しないことが明らかになった。分画したサンプルを、還元剤を含まない SDS-PAGE で解析したところ、HysA タンパク質は多量体化する性質をもつことを見いだした。現在、この性質を利用して、HysA とともにミトコンドリア機能調節に関わる他のタンパク質因子の同定を行っている。

Control of mitochondrial function and distribution in *Aspergillus nidulans*

Kyoko Kanamaru, Mayuko Inaba, Makoto Kimura, Tetsuo Kobayashi

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

O-15 (P-30)

麹菌カーボンカタボライト抑制制御因子 CreA の分解と機能維持に関与するカルボキシ末端領域の同定

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 (CCR) 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 CCR 非誘導条件下で核内から細胞質に移行し、速やかに分解されることを明らかにしてきた。本発表では、CreA の分解に関わる領域について解析した結果を報告する。

カルボキシ末端にタグを融合した CreA の安定性を調べた結果、アミノ末端にタグを融合した CreA と比較して半減期が長くなったことから、CreA のカルボキシ末端領域に分解に重要な領域が存在する可能性が考えられた。そこで、カルボキシ末端を欠失させた CreA 変異体を *creA* 破壊株で発現させて安定性を調べた。その結果、末端の 40 アミノ酸を欠失させることで CCR の誘導・非誘導条件にかかわらず半減期が著しく長くなったのに対し、末端の 20 アミノ酸を欠失した変異体では半減期の大きな変化は観察されなかった。これらのカルボキシ末端欠失 CreA の機能相補性を調べた結果、*creA* 破壊によって抑制される寒天培地上での生育は、いずれの変異 CreA を導入しても野生株と同等に回復した。一方で、末端の 40 アミノ酸を欠失させた CreA 導入株では、アミラーゼ遺伝子発現のグルコース添加時の抑制が完全には回復しなかった。以上の結果から、カルボキシ末端から 40-20 アミノ酸の領域が CreA の分解と CCR 特異的な機能維持において重要であることが示された。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。

Identification of carboxy-terminal region of glucose repressor CreA involved in its degradation and functional maintenance in *Aspergillus oryzae*.

Mizuki Tanaka, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi

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

O-16 (P-12)

製麹時における光照射の影響

村上直之, 小高敦史, 佐原弘師, 松村憲吾, 秦洋二 (月桂冠・総研)

【背景・目的】糸状菌に光を照射することで分生子形成の促進することや、二次代謝産物の生産抑制されることなどが報告されている。一方、清酒醸造等で産業利用されている麹菌 *Aspergillus oryzae* でも光応答に関する研究が行われており、光を照射することで分生子形成が抑制されることが報告されている。しかし、これらの報告は限られた株を用いた培養による検討が中心であり、産業利用を目指した実用的な検討はあまり行われていない。そこで、本研究では実用麹菌株を用い、通常暗条件で行う製麹を、光を照射しながら行いその影響について検討を行ったので報告する。

【方法と結果】光源には青色 LED (450 nm : 以後青色光) と赤色 LED (660 nm : 以後赤色光) を使用し、シャーレを使った小スケール製麹を実施した。乾燥蒸米を 15 g 使用し、麹菌の分生子懸濁液 (約 1.5×10^4 cells/mL) 7.5 ml を混ぜ合わせて植菌した。麹菌は RIB40 と当社保有実用株 (OSI 1047) を使用した。製麹は恒温恒湿機で温度 35°C、湿度 70~95%で行い、植菌 24 時間後から光照射 (光量子数 $40 \pm 5 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) を開始した。赤色光を照射した場合と暗条件とでは差が見られなかった。一方、青色光を照射した場合は、暗条件と比べ酵素活性に若干の変化が見られ、Dfcy 濃度が 75%に低下していた。実用株である OSI 1047 を使ってさらに光による影響を検討したところ、光を照射する時間、および光量子数と Dfcy 濃度の間に負の相関が見られた。現在、これらの麹米の代謝物や遺伝子発現解析を実施している。

Effect of exposure to light on enzymatic activity and metabolism in *koji* making

Naoyuki Murakami, Atsushi Kotaka, Hiroshi Sahara, Kengo Matsumura, Yoji Hata

(Res. Inst., Gekkeikan Sake Co., Ltd.)

O-17 (P-17)

表面の分子修飾による糸状菌の接着制御と表面認識機構に関する解析

西村麻里江¹, 中野美紀², 三宅晃司² (農研機構・生物機能利用¹・産総研・製造技術²)

いもち病菌 (*Magnaporthe oryzae*) などの植物病原性糸状菌では孢子が植物やカバーガラス等の表面で発芽すると表面に接着し感染器官が誘導される。この感染器官誘導には菌による表面の濡れ性(親水性/疎水性)や硬さの認識が関わっていると考えられてきた。そこで自己組織化法により種々の官能基で修飾した金基板表面を用いて詳細に解析したところ *M. oryzae* においては表面の濡れ性は感染器官形成には無関係であり、表面の水酸基がヘテロ 3 量体 G タンパク質の 1 つを介して認識されることにより接着が阻害されることを示唆する結果を得た。さらに *Aspergillus oryzae*, *Cladosporium cladosporoides*, *Alternaria alternata* に対して表面の化学的特性が発芽孢子に及ぼす影響について解析した。水酸基修飾により *A. oryzae* でのみ接着阻害が観察された。しかしオリゴエチレングリコールを含む分子で修飾した基板表面では *M. oryzae* を含む全ての菌において接着性の阻害もしくは著しい低下が見られた。この分子で修飾された基板表面に対して *M. oryzae* の接着阻害も見られたが、これにはヘテロ 3 量体 G タンパク質は関与していなかった。以上の結果から糸状菌の接着には少なくとも 2 つの機構が関与していることが推測された。本結果は抗菌剤を利用しない糸状菌汚染制御の可能性を示すと考えている。

(Control of fungal adhesion by chemical modification of substrate surfaces)

Marie Nishimura, Miki Nakano, Koji Miyake

(NARO, AIST)

O-18 (P-14)

糸状菌特有の転写因子 HapX の cysteine-rich 領域の機能解析

村田俊輔, 小森誠也, 志水元亨, 加藤雅士 (名城大・農)

【背景と目的】 HapX は、我々の研究グループが初めて見出した CCAAT-box 結合因子 (HapB/C/E 複合体) と相互作用する真菌類に特有の転写因子である。HapX は鉄欠乏時に鉄を含むタンパク質の転写を抑制することから、鉄の恒常性維持において中心的な役割を果たしている。HapX には C-末端側ドメインにオルソログ間で保存されたシステイン残基が連続する 4 つの Cysteine-rich motif (CrmA-D) が存在するが、その機能は不明である。そこで本研究では、糸状菌 *Aspergillus nidulans* の HapX の C-末端側ドメインの機能を解析した。

【結果および考察】 4 つのモチーフを含む C-末端側を欠失させた HapX (HapX^{Δ200}) を *Aspergillus nidulans* の *ΔhapX* 株に再導入したところ、*ΔhapX* 株と同様に鉄制限下で生育が抑制された。そこで HapX の CrmA, B, C, D それぞれ欠失変異を導入した 4 種の変異型 HapX (HapX^{ΔCrmA}, HapX^{ΔCrmB}, HapX^{ΔCrmC}, HapX^{ΔCrmD}) を *ΔhapX* 株に再導入した。その結果、HapX^{ΔCrmB} を導入した株で *ΔhapX* 株と同様に生育が抑制されたことから、CrmB が鉄制限下での HapX の機能に重要であることが示唆された。また野生型および変異型 HapX のリコンビナントタンパク質を調製し、紫外可視吸収スペクトルを測定した。野生型のリコンビナント HapX (HapX^{WT}) では波長 420 nm 付近にピークが検出されたことから、HapX^{WT} は鉄硫黄クラスターを保持していることが示唆された。変異型 HapX の HapX^{ΔCrmB} では 420 nm の吸収強度が HapX^{WT} に比べて 30% まで低下したことから、鉄硫黄クラスター含有量が低下していた。これらのことから、HapX の C-末端側の Cysteine-rich motif は、鉄硫黄クラスターの保持に関与しており、鉄硫黄クラスターは鉄制限下における HapX の機能に重要な役割を果たすことが示唆された。

Functional analysis of C-terminal cysteine-rich region of HapX in iron-homeostasis

Shunsuke Murata, Seiya Komori, Motoyuki Shimizu, Masashi Kato (Meijo Univ.)

O-19 (P-3)

黒麹菌における主要転写因子破壊株ライブラリーの作製

西堀奈穂子¹, 水谷治¹, 林梨咲¹, 有馬寿英², 山田修¹ (1 酒総研 2 県立広島大・生環)

黒麹菌は沖縄の泡盛や九州地方での焼酎造りに使用されている有用糸状菌であり、製麹中に大量のクエン酸を産生することでもろみを酸性にし、暖地での醸造に適しているとされている。また、*Aspergillus oryzae*, *A. sojae* とともに、我が国を代表とする微生物として日本醸造協会より『国菌』に認定されている。黒麹菌は乾により *Aspergillus luchuensis* としてはじめに報告されたが、その後も *A. awamori* など複数の株が報告され、さらには *A. niger* の異名同種とされるなどの分類学上の混乱が見られた。近年、山田らによって、黒麹菌は *A. niger* とは別の種であり、その学名は *A. luchuensis* とするのが妥当との報告 (Yamada et al., *JBB*. **112**, 233, 2011) がなされ、Hong らによる研究からも黒麹菌は *A. luchuensis* とするよう提案されている (Hong et al., *PLOS ONE* **8**, e63769, 2013)。2016 年、黒麹菌ゲノム解読が報告され、約 13000 個の open reading frames (ORFs) が存在することが判明した (Yamada et al., *DNA Res.* In press)。また、他の生物種との比較から、機能が推定可能な主要転写因子遺伝子が 100 個程度同定された。本研究では、黄麹菌と比べて遅れている黒麹菌研究のプラットフォームの一つとして、これらの主要な転写因子の破壊株ライブラリーを作製し機能解析を行うとともに、公開することを目的としている。破壊カセットは、ハイグロマイシン耐性遺伝子マーカーへ目的遺伝子の上流および下流の約 1 kb を付加することにより作製し、黒麹菌 *ligD* 遺伝子破壊株へアグロバクテリウム法 (Takahashi et al., *JBB*. **112**, 529, 2011) にて導入・選択することとした。現在、破壊株を順次作製しているところである。

Construction of transcription factor gene deletion library in *Aspergillus luchuensis*

Nahoko Nishibori¹, Osamu Mizutani¹, Risa Hayashi¹, Toshi-Hide Arima², and Osamu Yamada¹ (1 NRIB, 2 Environ Sci, Pref. Univ. Hiroshima)

O-20 (P-16)

担子菌類の子実体発生機構解明を目指したゲノム編集技術の確立

千葉洋史¹, 鈴木博子¹, 菅野茂夫³, 下北英輔⁴, 刑部裕里子², 刑部敬史²

(¹徳島大院・生命テクノ, ²徳島大・生物資源産業, ³京都大・理, ⁴徳島県農技セ)

従来、担子菌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高等動物に比べて進んでいない。また、動植物などではすでに Cas9 タンパク質-gRNA 直接導入によるゲノム編集が可能であるが、担子菌ではタンパク-RNA 導入系が十分に確立されておらずその利用が難しい。これまでに我々は、モデル担子菌 *Coprinopsis cinerea* において形質転換に必要な技術として、凍結保存プロトプラストを使用した高効率形質転換法を確立してきた。この方法を活用し、高発現プロモーターを取得した。本研究では、これらプロモーターを利用したキノコにおけるゲノム編集法の確立に取り組んだ。

C. cinerea GFP 発現株において、CRISPR/Cas9 システムによる GFP 遺伝子破壊を指標とし、gRNA と Cas9 を発現するためのベクター条件を検討した。コドンやプロモーターを最適化し、Pded1Cas9 では得られた任意の 19 系統を解析したうち 2 系統において GFP 上の標的配列の変異導入が確認された。さらに改良を行い、とくに Cas9 の核移行シグナルの配列と数を改善し、より高効率で変異導入可能なベクターシステムを構築した。現在、子実体形成関連遺伝子を標的とした内在性遺伝子の破壊を行っており、これらの遺伝子破壊についても報告する予定である。また、現在育種への応用も目指し Cas9 タンパク質直接導入によるゲノム編集の検討も行っており、こちらも併せて報告したい。

Development of genome editing in mushroom for elucidating the mechanism of fruiting-body formation

Hirofumi Chiba¹, Hiroko Suzuki¹, Sigeo S Sugano³, Eisuke Shimokita⁴, Yuriko Osakabe², Keishi Osakabe² (¹Life Tech., Tokushima Univ., ²Bioscience & Bioindustry, Tokushima Univ., ³PREST, Kyoto Univ., ⁴Tokushima Prefectural Agri.)

Poster Session

P-1

油糧糸状菌におけるリシノール酸生産株の分子育種

阪本鷹行¹, 富永康子¹, 井出紗奈江¹, 奥田知生², 安藤晃規², 岸野重信², 和泉自泰³, 馬場健史³, 島 純⁴, 櫻谷英治¹, 小川順²

(¹徳大・生物資源, ²京大院・農, ³九大・生体防御, ⁴龍谷大・農)

リシノール酸 (RA) は 12 位に水酸基を 1 つ有する C18 の水酸化脂肪酸であり, 近年ではナイロン 6,10 ポリマーの原料として需要が高まっている。RA はトウゴマの種子, および麦角菌においてその生産が知られており, それら由来の脂肪酸水酸化酵素 (FAH) 遺伝子を導入した組換え酵母による発酵生産研究が進められている。本研究では, 脂質生産性が極めて優れている油糧糸状菌 *Mortierella alpina* の変異株に FAH 遺伝子を導入することで, リシノール酸生産株の分子育種を試みた。

M. alpina Δ12 不飽和化酵素 (DS) 活性欠損株にトウゴマ由来の FAH を導入した変異株では, RA 生産は確認されなかった。一方, 麦角菌由来の FAH を導入した変異株においては, 総脂肪酸あたり 5% の RA が検出された。また, RA 生産株で 30% のリノール酸が検出されたことから, *M. alpina* において FAH は水酸化活性だけでなく, 高い Δ12 不飽和化活性を有することが示唆された。

Molecular breeding of oleaginous fungus for production of ricinoleic acid

Takaiku Sakamoto¹, Yasuko Tominaga¹, Sanae Ide¹, Tomoyo Okuda², Akinori Ando², Shigenobu Kishino², Yoshihiro Izumi³, Takeshi Bamba³, Jun Shima⁴, Eiji Sakuradani¹, Jun Ogawa²

(¹Fac. Biosci. Bioindus., Tokushima Univ. ²Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., ³Medical Institute Bioregulation, Kyushu Univ. ⁴Fac. Agric., Ryukoku Univ.)

P-2

海生糸状菌 *Aspergillus* sp. MF275 由来 himeic acid の生合成研究

橋元誠¹, 勝木理子², 加藤光², 照井亜美¹, 塚本佐知子², 藤井勲¹ (¹岩手医科大・薬, ²熊本大院・薬)

himeic acid A は, 海生糸状菌 *Aspergillus* sp. MF275 からユビキチン活性化酵素阻害活性をもつ化合物として単離された化合物である。4-ピロン骨格に脂肪酸側鎖と分岐鎖アミド構造を有する本化合物は, 構造のわずかな違いが生理活性に影響を及ぼすことが示唆されている。himeic acid A の生成機構解明および選択的生産を目指し, 本研究では, himeic acid A に対する標識化合物の取り込みと生合成遺伝子の同定を試みた。

¹³C 標識酢酸投与実験により得られた himeic acid A の ¹³C NMR 解析により, himeic acid A の脂肪酸側鎖部分には酢酸が取り込まれることを確認した。さらに[1-¹³C]ロイシン投与実験を行ったところ, ロイシンの 1 位が 4-ピロン骨格に取り込まれることを確認した。これらの取り込み様式から, himeic acid の生合成にはポリケタイド合成酵素—非リボソームペプチド合成酵素 (PKS-NRPS) が関与することが示唆された。次に, 生産菌のドラフトゲノムデータを BLAST 検索し, 5 個の PKS-NRPS 遺伝子の存在することを見出した。さらに, アデニル化ドメインの比較により, PKS-NRPS の 1 つが himeic acid A 生合成に関与するものと予想した。そこで, 候補遺伝子の破壊株を作製し, 代謝物を調べたところ, himeic acid 生産能の消失を確認した。このことから, 破壊した PKS-NRPS 遺伝子が himeic acid 生合成に関与することを明らかにした。現在, 周辺にある酸化酵素遺伝子破壊株の作製と himeic acid 生産の関連性を検討中である。

Biosynthetic studies of himeic acid from *Aspergillus* sp. MF275

Makoto Hashimoto, Katsuki Ayako, Hikaru Kato, Ami Terui, Sachiko Tsukamoto, Isao Fujii

(School of Pharmacy, Iwate Med. Univ., Graduate School of Pharmaceut. Sci., Kumamoto Univ.)

P-3 (O-19)

黒麹菌における主要転写因子破壊株ライブラリーの作製

西堀奈穂子¹, 水谷治¹, 林梨咲¹, 有馬寿英², 山田修¹ (1 酒総研 2 県立広島大・生環)

黒麹菌は沖縄の泡盛や九州地方での焼酎造りに使用されている有用糸状菌であり、製麹中に大量のクエン酸を産生することでもろみを酸性にし、暖地での醸造に適しているとされている。また、*Aspergillus oryzae*, *A. sojae* とともに、我が国を代表とする微生物として日本醸造協会より『国菌』に認定されている。黒麹菌は乾により *Aspergillus luchuensis* としてはじめに報告されたが、その後も *A. awamori* など複数の株が報告され、さらには *A. niger* の異名同種とされるなどの分類学上の混乱が見られた。近年、山田らによって、黒麹菌は *A. niger* とは別の種であり、その学名は *A. luchuensis* とするのが妥当との報告 (Yamada et al., *JBB*. **112**, 233, 2011) がなされ、Hong らによる研究からも黒麹菌は *A. luchuensis* とするよう提案されている (Hong et al., *PLOS ONE* **8**, e63769, 2013)。2016 年、黒麹菌ゲノム解読が報告され、約 13000 個の open reading frames (ORFs) が存在することが判明した (Yamada et al., *DNA Res.* In press)。また、他の生物種との比較から、機能が推定可能な主要転写因子遺伝子が 100 個程度同定された。本研究では、黄麹菌と比べて遅れている黒麹菌研究のプラットフォームの一つとして、これらの主要な転写因子の破壊株ライブラリーを作製し機能解析を行うとともに、公開することを目的としている。破壊カセットは、ハイグロマイシン耐性遺伝子マーカーへ目的遺伝子の上流および下流の約 1 kb を付加することにより作製し、黒麹菌 *ligD* 遺伝子破壊株へアグロバクテリウム法 (Takahashi et al., *JBB*. **112**, 529, 2011) にて導入・選択することとした。現在、破壊株を順次作製しているところである。

Construction of transcription factor gene deletion library in *Aspergillus luchuensis*

Nahoko Nishibori¹, Osamu Mizutani¹, Risa Hayashi¹, Toshi-Hide Arima², and Osamu Yamada¹ (1 NRIB, 2 Environ Sci, Pref. Univ. Hiroshima)

P-4

Aspergillus nidulans におけるハイドロフォビン-クチナーゼ間相互作用

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】ハイドロフォビン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あり、糸状菌の気中菌糸表面や分生子表面に局在する。麹菌 *Aspergillus oryzae* のハイドロフォビン RolA は生分解性ポリエステルの PBSA 等の固体表面に吸着し、その後イオンの相互作用によって PBSA 分解酵素であるクチナーゼ CutL1 を固体表面にリクルート・濃縮する。ハイドロフォビンと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り、本報告では、他の *Aspergillus* 属糸状菌にもこのような相互作用が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、RolA-CutL1 間イオンの相互作用に関与するアミノ酸残基は、*Aspergillus* 属の RolA オルソログ及び CutL1 オルソログにおいて良く保存されていることが明らかとなった。そこでモデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* の持つ RolA オルソログ (RodA) 及び CutL1 オルソログ (Cut1, Cut2) を発現・精製し、PBSA 分解促進実験、テフロン微粒子を用いたブルダウンアッセイによる吸着量定量、分子間相互作用解析装置 QCM を用いた親和性の定量的解析を行った。この結果、①RodA 存在下で Cut1, Cut2 による PBSA 分解がともに促進されること、②RodA は Cut1, Cut2 両方と相互作用し、酸性～中性 pH 条件下で相互作用の強さが最大となること、③RodA と Cut1, Cut2 間にイオンの相互作用が働くことを見出した。以上から、*Aspergillus* 属糸状菌において、イオンの相互作用により相互作用する RolA オルソログ-CutL1 オルソログの組み合わせが一般的に存在する可能性が高いことが示唆された。

Interaction between hydrophobin and two cutinase from *Aspergillus nidulans*

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-5

麹菌 *A. oryzae* 実用株におけるゲノム編集技術の改良による高効率変異導入法の確立

片山琢也¹, 藤井渉², 丸山潤一¹ (¹東大院・農生科・応生工,²東大院・農生科・応動)

麹菌 *Aspergillus oryzae* において、野生株 RIB40 に由来する株では非相同末端結合の不活性化により効率的な遺伝子改変が可能となっているが、産業的に用いられる多くの実用株では遺伝子改変技術の基盤が整備されていない。実用株における遺伝子改変を効率的に行うため、我々はこれまでに CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集技術を確立している¹⁾。しかし、プラスミドを導入するために *niaD* 変異株の取得が必要である点、変異株取得効率は 10~20%に留まっている点が問題であった。本研究では、ゲノム編集技術の改良により、*A. oryzae* 実用株における高効率変異導入法の確立を目的とした。

CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集に必要なヌクレアーゼ遺伝子 *cas9* とガイド RNA を発現するプラスミドにおいて、選択マーカーとしてピリチアミン耐性遺伝子 *ptrA*, ならびにプラスミドの自立複製を可能にする *Aspergillus nidulans* 由来の DNA 配列 AMA1 を挿入した。RIB40 株において *wA*, *yA*, *pyrG* の 3 つの遺伝子の変異導入を試みた結果、それぞれの変異株取得効率は 87.5%, 100%, 55.6%であった。さらに、実用株 RIB128, RIB915 において *wA* の変異導入を試みたところ、それぞれの株における変異株取得効率は 94.1%, 58.3%であった。以上の結果から、本研究で確立した方法により *A. oryzae* 実用株においても高効率な変異株取得が可能であることが示された。現在、プラスミドの脱落と再導入による多重変異株の作製を試みている。

1) Katayama *et al.*, 2015, *Biotechnol. Lett.*, **38**, 637-642

Highly efficient mutagenesis by improving the genome editing technique in *A. oryzae* industrial strains

Takuya Katayama¹, Wataru Fujii², Jun-ichi Maruyama¹

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

P-6

黄麹菌由来のハイドロフォービン HypA を用いた重金属イオン回収システムの構築

栗原璃子, 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を有し、吸着した基材表面の「ぬれ性」の変化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、精製が困難なタンパク質である。筆者らは黄麹菌 *Aspergillus oryzae* より、ハイドロフォービンをコードする遺伝子 *hypA* ~*D* を単離しており、分子特異的に局在する HypA が最も生産量が高いことを観察している。

筆者らは HypA の C 末端に重金属吸着ペプチドを融合した機能性 HypA を生産・精製し、各種の基材に吸着させることにより基材に機能性を付与した新規生物素材の開発を目標としている。機能性 HypA を吸着させたポリエステル綿を乾燥してシリンジに詰めて重金属吸着カラムを作製し、Ni²⁺ 水溶液を通すことにより Ni²⁺ の吸着試験を行った。その結果、His8-tag を融合した HypA-His8 を吸着させたポリエステル綿が有意に Ni²⁺ を吸着する事を観察した。

そこで、ポリエステル綿に吸着させる HypA-His8 濃度の最適化を行って重金属吸着効率の向上をめざすとともに評価系の確立を行っている。また、重金属吸着ペプチドについてもコピー数及びリンカーを検討し、Cu²⁺, Co²⁺などを含め重金属吸着能について調査している。

Construction of heavy metal recovery systems using Hydrophobin HypA from *Aspergillus oryzae*

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

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

P-7

麴菌のヒドロフォービン HypC は水分量が高い条件で発現する

廣木寛之, 石倉幹大, 早川芙佑華, 山川結, 中島春紫 (明治大院・農・農化)

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両親媒性の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。ヒドロフォービンは吸着した基材表面の「ぬれ性」の変化をはじめ物理化学的にユニークな性質を有する。一方、吸着性が高く、再解離が困難な重合体を形成しやすい特徴から精製・解析が困難なタンパク質である。

筆者らはこれまでに麴菌 *Aspergillus oryzae* から 4 つのヒドロフォービン (HypA-D) を単離し、HypA(151 アミノ酸)、HypB(146 アミノ酸)については発現条件および局在性などの性質を明らかにしている。一方、HypC は全長 102 アミノ酸と麴菌のヒドロフォービンの中では最も分子量が低いうえに荷電性アミノ酸の含有量が 3% と最も疎水的であり、特異な機能を有していることが予想される。そこで、本研究では HypC の発現特性及び性質についての解析を目的としている。

レポーター遺伝子として β -グルクロニダーゼ (GUS) を用い *hypC* 遺伝子の発現条件について解析を行った。その結果、*hypC* 遺伝子は分生子植菌後 36~48 時間の培養の初期に発現すること、および培地中の水分量が多い時に発現することを観察した。次に緑色蛍光タンパク質を *hypC* プロモーターまたは HypC タンパク質に連結して発現・局在部位の解析を行った結果、*hypC* 遺伝子は分生子・菌糸の両部位で転写されるが、HypC タンパク質は菌糸に局在することを観察した。現在は HypC の生産と精製を試み、タンパク質としての性質の解析を行っている。

Characterization of hydrophobin HypC from *Aspergillus oryzae*

Tomoyuki Hiroki, Kandai Ishikura, Huyuka Hayakawa, Yui Yamakawa, Harushi Nakajima

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

P-8

シイタケにおける TILLING 法の効率化

坂本裕一, 佐藤志穂 (岩手生工研)

食用栽培きのこの新規育種手法を確立するために、シイタケに TILLING (Targeting induced local lesions in genomes)法を適用するための研究を進めている。昨年度の糸状菌分子生物学コンファレンスにおいて、UV 照射したシイタケ変異株集団の中から、レンチナン分解酵素をコードする遺伝子 (*exg2*) に変異が生じた菌株の選抜について報告した。今年度は、TILLING における作業の効率化を目的とした研究を行った。まず始めに、DNA の抽出方法の検討を行った。多検体の DNA を安価にかつ効率的に抽出するために、96 穴プレートを用いて DNA を抽出する方法を検討した。また、特異的に変異を認識して二本鎖 DNA を切断する酵素 (CELI) により切断された DNA フラグメントを検出する手法として、フラグメントアナライザー (Fragment Analyzer™ ADVANCED ANALYTICAL) を用いた検出方法を検討した。

MYPG 寒天培地にセロファンを敷き、シイタケ菌糸を培養した。セロファン上の菌糸を回収した後、-20℃ で冷凍保存した。回収した菌糸は MasterPure™ Yeast DNA Extraction kit (EPICENTRE) により DNA の溶出、タンパク質の沈澱を行った後、ポアサイズ 0.45 μ m の 96 穴マルチスクリーンプレート (Merck Millipore) を用いて遠心分離することで沈澱をのぞき、イソプロパノール沈澱することで DNA を回収することが出来た。上記の DNA を用いて *exg2* 遺伝子を PCR にて増幅し、常法により CELI にて切断を行い、フラグメントアナライザーにて変異バンドの確認を行った。昨年報告した変異株 Mu789 株をポジティブコントロールとして変異の確認を行ったところ、30 バルク程度まで菌株を混合しても変異が検出できることが明らかになった。

Establishment of streamlined method for TILLING in *Lentinula edodes*

Yuichi Sakamoto, Shiho Sato

(IBRC)

P-9

白麹菌 *Aspergillus kawachii* における推定クエン酸輸送体 CtpA と YhmA 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鹿大・農, ²滋賀県大, ³佐賀大・農)

白麹菌 *Aspergillus kawachii* は焼酎製造に用いられる麹菌であり、菌体外に多量のクエン酸を分泌する性質をもつ。このクエン酸生産機構には、高いクエン酸排出能が関与すると考えられている。本研究では、2つの推定ミトコンドリア局在輸送体 CtpA (クエン酸-リンゴ酸シャトル) と YhmA (クエン酸-オキソグルタル酸シャトル) のクエン酸生産機構における役割を明らかにすることを目的として、その機能解析を行った。

まず、白麹菌において、*ctpA* 遺伝子と *yhmA* 遺伝子の破壊株を構築した。*yhmA* 破壊株はグルコースを炭素源とする M 培地で野生株と比較して顕著に生育が遅延した。一方、*ctpA* 破壊株は低温条件において、生育の遅延が確認された。次に、菌体量あたりのクエン酸生産量を測定した結果、*yhmA* 破壊株は野生株の約 40%、*ctpA* 破壊株は約 60%に低下した。GFP 融合タンパク質の局在を観察した結果、CtpA-GFP と YhmA-GFP のいずれもミトコンドリアに局在することが示唆された。さらに、白麹菌の *yhmA* 遺伝子を出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の *yhm2* 破壊株において発現させた結果、表現型を相補した。以上の結果から、CtpA および YhmA は、白麹菌においてミトコンドリアから細胞質へのクエン酸排出に関与することが示唆された。現在、各輸送体の酵素学的諸性質の解析のための活性測定系の構築を行っている。

Characterization of putative mitochondrial citrate carriers in *Aspergillus kawachii*

Chihiro Kadooka¹, Kosuke Izumitsu², Kayu Okutsu³, Yumiko Yoshizaki³, Kazunori Takamine³, Masatoshi Goto⁴,

Hisanori Tamaki³, Taiki Futagami³

(¹Kagoshima Univ., ²Univ. of Shiga Pref., ³Saga Univ.)

P-10

白麹菌 *Aspergillus kawachii* における *pex16* ホモログの機能解析

木本大地¹, 門岡千尋¹, 奥津果優¹, 吉崎由美子¹, 高峯和則¹, 後藤正利², 玉置尚徳¹, 二神泰基¹

(¹鹿大・農, ²佐賀大・農)

焼酎製造に用いられる白麹菌 *Aspergillus kawachii* はクエン酸を高生産する性質をもつ。ペルオキシソームはグリオキシル酸回路や脂肪酸の β 酸化の場として知られており、クエン酸生産との関連性は不明である。本研究では、白麹菌のクエン酸生産におけるペルオキシソームの役割を調べることを目的として、ペルオキシソーム形成に関与する *pex16* 遺伝子の破壊株を取得して、その諸性質を解析した。

まず、*pex16* 破壊株のペルオキシソーム構造を mRFP-SKL により観察した。その結果、ペルオキシソームの数が野生株の 5%に減少したことから、Pex16 はペルオキシソーム形成に関与することが示唆された。また、野生株と *pex16* 破壊株を用いて米麹を作成し、有機酸濃度を測定したところ、クエン酸濃度には顕著な違いは認められなかったが、*pex16* 破壊株においてギ酸が野生株の約 1.4 倍に増大していた。これらの結果より、ペルオキシソームは製麹における白麹菌のクエン酸生産に関与しないことが示唆された。

一方、*pex16* 破壊株は、グルコース、あるいは酢酸を炭素源とする培地においてコロニー形成能が低下し、オレイン酸を炭素源とする培地においてはコロニー形成能が消失した。また、*pex16* 破壊株はカルコフルオロホワイトに対して高感受性となること、さらには高温条件下 (37°C) での分生子形成能が低下することが明らかとなった。以上の結果より、Pex16 はペルオキシソームの形態形成、長鎖脂肪酸の代謝、cell wall integrity、分生子形成等に関与する可能性が示唆された。

Functional analysis of *pex16* homologous gene in the white koji mold, *Aspergillus kawachii*

Daichi Kimoto¹, Chihiro Kadooka¹, Kayu Okutsu¹, Yumiko Yoshizaki¹, Kazunori Takamine¹, Masatoshi Goto², Hisanori

Tamaki¹, Taiki Futagami¹

(¹Kagoshima Univ., ²Saga Univ.)

P-11

麹菌 hydrophobin RolA との間の相互作用における CutL1 側の新奇相互作用部位

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 PBSA (Polybutylene succinate-co-adipate)を唯一の炭素源として麹菌 *Aspergillus oryzae* を培養すると, hydrophobin RolA と 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 分解を促進する。我々の研究において, この分子間相互作用は 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を明らかとした¹⁾。しかし, 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)間の親和性と比較して顕著に低く, これまでに特定された残基以外のイオンの相互作用部位が存在する可能性が示唆された。

CutL1 の立体構造モデルと CutL1 ホモログ間のアミノ酸配列比較から, D30, D34, D73, D117 が新たな相互作用候補残基として選択され, 以前の報告において D73 が相互作用に関与していることが確認された。そこで本報告では, D30 について点変異体(CutL1-D30S)と四重変異体(CutL1-D30S/E31S/D142S/D171)を作製し, RolA 野生型との分子間相互作用解析を行った。その結果, それぞれ CutL1 野生型, CutL1 三重変異体と比較して親和性の低下が見られ, D30 も RolA-CutL1 間のイオンの相互作用に関与している事が示唆された

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

Analysis of amino acid residues of *Aspergillus oryzae* cutinase CutL1 that involve in the interaction between CutL1 and *A. oryzae* hydrophobin RolA

Yuki Terauchi¹, Yoonkyung Kim¹, Takumi Tanaka¹, Toru Takahashi², Keietsu Abe^{1,2} (¹Grad. Sch. Agric. Sci. Tohoku Univ., ²NICHe Tohoku Univ.)

P-12 (O-16)

製麹時における光照射の影響

村上直之, 小高敦史, 佐原弘師, 松村憲吾, 秦洋二 (月桂冠・総研)

【背景・目的】糸状菌に光を照射することで分生子形成の促進することや, 二次代謝産物の生産抑制されることなどが報告されている。一方, 清酒醸造等で産業利用されている麹菌 *Aspergillus oryzae* でも光応答に関する研究が行われており, 光を照射することで分生子形成が抑制されることが報告されている。しかし, これらの報告は限られた株を用いた培養による検討が中心であり, 産業利用を目指した実用的な検討はあまり行われていない。そこで, 本研究では実用麹菌株を用い, 通常暗条件で行う製麹を, 光を照射しながら行いその影響について検討を行ったので報告する。

【方法と結果】光源には青色 LED (450 nm : 以後青色光) と赤色 LED (660 nm : 以後赤色光) を使用し, シャーレを使った小スケール製麹を実施した。乾燥蒸米を 15 g 使用し, 麹菌の分生子懸濁液 (約 1.5×10^4 cells/mL) 7.5 ml を混ぜ合わせて植菌した。麹菌は RIB40 と当社保有実用株 (OSI 1047) を使用した。製麹は恒温恒湿機で温度 35°C, 湿度 70~95%で行い, 植菌 24 時間後から光照射 (光量子数 $40 \pm 5 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) を開始した。赤色光を照射した場合と暗条件とでは差が見られなかった。一方, 青色光を照射した場合は, 暗条件と比べ酵素活性に若干の変化が見られ, Dfcy 濃度が 75%に低下していた。実用株である OSI 1047 を使ってさらに光による影響を検討したところ, 光を照射する時間, および光量子数と Dfcy 濃度の間に負の相関が見られた。現在, これらの麹米の代謝物や遺伝子発現解析を実施している。

Effect of exposure to light on enzymatic activity and metabolism in *koji* making

Naoyuki Murakami, Atsushi Kotaka, Hiroshi Sahara, Kengo Matsumura, Yoji Hata

(Res. Inst., Gekkeikan Sake Co., Ltd.)

P-13

NADPH 産生に着目したペントースリン酸経路強化による麹菌の遊離脂肪酸生産性増大

玉野孝一, 三浦愛 (産総研・生物プロセス)

【背景・目的】 微生物が生産する遊離脂肪酸 (FFA) やその誘導体には、医薬品・バイオ燃料・健康補助食品やその原料等に利用が期待されるものがある。そこで、物質生産能力に優れた麹菌 *Aspergillus oryzae* を用いて、代謝工学的に改変することで、FFA の高生産化を目標に研究を行ってきた。これまでに、アシル CoA 合成酵素遺伝子 *faaA* の破壊により、FFA 生産性が麹菌野生株の 9.2 倍に増大することを見出した¹⁾。そこで今回は、*faaA* 破壊株の FFA 生産性をさらに向上させることを目的とした。そのために、FFA 生合成に必須な NADPH に着目し、これを産生するペントースリン酸経路 (PPP) の強化に取り組んだ。麹菌ゲノム発現解析結果から、麹菌の NADPH 合成量は FFA 生産性を最大にする上で不十分なことが推察されたからである。

【方法・結果】 麹菌の PPP で働く各酵素遺伝子は、麹菌ゲノムスケール代謝モデルに関する論文²⁾、及び出芽酵母で同定された PPP 各酵素遺伝子に対する BLASTP 相同性検索により選出した。選出された各酵素遺伝子について、単独高発現化を *faaA* 破壊株において実施して、PPP 強化を試みた。その結果、PPP のトランスクレーターゼとして選出された AO090023000345 を高発現した *faaA* 破壊株は、FFA 生産性が *faaA* 破壊株の 1.4 倍に増大した。また、菌体収量も *faaA* 破壊株の 1.2 倍に増大した。そのため、単位培養液量当たりの FFA 生産量は、両比率の積算値に当たる 1.7 倍に増大した。さらに、興味深いことに、*faaA* 破壊株は液体培養で菌糸が凝集するのに対し、AO090023000345 高発現 *faaA* 破壊株は菌糸が凝集せずに分散した状態になった。(本研究成果の一部は、「野田産研研究助成」の支援を受けて行われた。)

1) Tamano et al. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99:3103-13 (2015). 2) Vongsangnak et al. *BMC Genomics* 9:245 (2008).

Elevation of free fatty acid productivity by enhancing the pentose phosphate pathway in *Aspergillus oryzae*

Koichi Tamano, Ai Miura

(AIST)

P-14 (O-18)

糸状菌特有の転写因子 HapX の cysteine-rich 領域の機能解析

村田俊輔, 小森誠也, 志水元亨, 加藤雅士 (名城大・農)

【背景と目的】 HapX は、我々の研究グループが初めて見出した CCAAT-box 結合因子 (HapB/C/E 複合体) と相互作用する真菌類に特有の転写因子である。HapX は鉄欠乏時に鉄を含むタンパク質の転写を抑制することから、鉄の恒常性維持において中心的な役割を果たしている。HapX には C-末端側ドメインにオルソログ間で保存されたシステイン残基が連続する 4 つの Cysteine-rich motif (CrmA-D) が存在するが、その機能は不明である。そこで本研究では、糸状菌 *Aspergillus nidulans* の HapX の C-末端側ドメインの機能を解析した。

【結果および考察】 4 つのモチーフを含む C-末端側を欠失させた HapX (HapX^{Δ200}) を *Aspergillus nidulans* の $\Delta hapX$ 株に再導入したところ、 $\Delta hapX$ 株と同様に鉄制限下で生育が抑制された。そこで HapX の CrmA, B, C, D それぞれ欠失変異を導入した 4 種の変異型 HapX (HapX^{ΔCrmA}, HapX^{ΔCrmB}, HapX^{ΔCrmC}, HapX^{ΔCrmD}) を $\Delta hapX$ 株に再導入した。その結果、HapX^{ΔCrmB} を導入した株で $\Delta hapX$ 株と同様に生育が抑制されたことから、CrmB が鉄制限下での HapX の機能に重要であることが示唆された。また野生型および変異型 HapX のリコンビナントタンパク質を調製し、紫外可視吸収スペクトルを測定した。野生型のリコンビナント HapX (HapX^{WT}) では波長 420 nm 付近にピークが検出されたことから、HapX^{WT} は鉄硫黄クラスターを保持していることが示唆された。変異型 HapX の HapX^{ΔCrmB} では 420 nm の吸収強度が HapX^{WT} に比べて 30% まで低下したことから、鉄硫黄クラスター含有量が低下していた。これらのことから、HapX の C-末端側の Cysteine-rich motif は、鉄硫黄クラスターの保持に関与しており、鉄硫黄クラスターは鉄制限下における HapX の機能に重要な役割を果たすことが示唆された。

Functional analysis of C-terminal cysteine-rich region of HapX in iron-homeostasis

Shunsuke Murata, Seiya Komori, Motoyuki Shimizu, Masashi Kato (Meijo Univ.)

P-15

Cas9 タンパク質を用いた麹菌のゲノム編集技術の開発

嶋本孝平^{1,2}, 齊藤亮太¹, 和田悠作³, 織田健¹, 奥田将生^{1,2}, 岩下和裕¹ (1 酒総研, 2 広島大院・生圏, 3 フェスマック)

【目的】 麹菌はその優秀なタンパク質分泌能や安全性から醸造産業などで広く利用されている微生物であり、宿主・ベクター系や相同組換え系の開発により部分的な遺伝子改変も可能になっている。こうした技術や突然変異処理による育種は煩雑である上、オフターゲットな変異が産業株ではしばしば問題となる。そこで近年、標的的部位を迅速かつ簡便に編集できるゲノム編集技術の CRISPR/Cas9 システムが注目されている。このシステムは *Streptococcus* 属のエンドヌクレアーゼ Cas9 を用いたもので、構築した Cas9 プラスミドベクターを導入することで動物や植物に対して利用されている。この場合外来 DNA を入れる必要があり遺伝子組換え体となる。そこで本研究では *in vitro* で Cas9 タンパク質を直接麹菌の細胞内に導入することで標的遺伝子を編集できる技術の開発をした。

【方法・結果】 今回、ウラシル生合成に必要な 5FOA によりポジティブセレクション出来る *pyrG* 遺伝子をターゲットとし、Cas9 タンパク質による麹菌のゲノム編集を行う事とした。標的遺伝子に対しガイド RNA を設計し Cas9 タンパク質とガイド RNA の複合体を形成させ、プロトプラスト-PEG 法により形質転換した。その結果、ウラシル要求性の *pyrG* 変異株を多数得た。得られた変異株の *pyrG* 遺伝子領域をシーケンスしたところ、約半数が標的配列を起点に 1 塩基欠失しており、その他も標的配列を起点に最大 1781 bp までの塩基の欠失が確認された。本研究により、Cas9 タンパク質直接導入によるゲノム編集が可能であることが示された。現在、実用株に対して本法が適用可能か検討を行っている。

Development of genome editing technique with Cas9 in *Aspergillus oryzae*

Kouhei Shimamoto^{1,2}, Ryouta Saitou¹, Yusaku Wada³, Ken Oda¹, Masaki Okuda^{1,2}, Kazuhiro Iwashita^{1,2} (1 NRIB, 2 Univ. of Hiroshima, 3FASMAC.Co., Ltd.)

P-16 (O-20)

担子菌類の子実体発生機構解明を目指したゲノム編集技術の確立

千葉洋史¹, 鈴木博子¹, 菅野茂夫³, 下北英輔⁴, 刑部裕里子², 刑部敬史²

(¹徳島大院・生命テクノ, ²徳島大・生物資源産業, ³京都大・理, ⁴徳島県農技セ)

従来、担子菌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高等動物に比べて進んでいない。また、動物などではすでに Cas9 タンパク質-gRNA 直接導入によるゲノム編集が可能であるが、担子菌ではタンパク-RNA 導入系が十分に確立されておらずその利用が難しい。これまでに我々は、モデル担子菌 *Coprinopsis cinerea* において形質転換に必要な技術として、凍結保存プロトプラストを使用した高効率形質転換法を確立してきた。この方法を活用し、高発現プロモーターを取得した。本研究では、これらプロモーターを利用したキノコにおけるゲノム編集法の確立に取り組んだ。

C. cinerea GFP 発現株において、CRISPR/Cas9 システムによる GFP 遺伝子破壊を指標とし、gRNA と Cas9 を発現するためのベクター条件を検討した。コドンやプロモーターを最適化し、Pded1Cas9 では得られた任意の 19 系統を解析したうち 2 系統において GFP 上の標的配列の変異導入が確認された。さらに改良を行い、とくに Cas9 の核移行シグナルの配列と数を改善し、より高効率で変異導入可能なベクターシステムを構築した。現在、子実体形成関連遺伝子を標的とした内在性遺伝子の破壊を行っており、これらの遺伝子破壊についても報告する予定である。また、現在育種への応用も目指し Cas9 タンパク質直接導入によるゲノム編集の検討も行っており、こちらも併せて報告したい。

Development of genome editing in mushroom for elucidating the mechanism of fruiting-body formation

Hirofumi Chiba¹, Hiroko Suzuki¹, Sigeo S Sugano³, Eisuke Shimokita⁴, Yuriko Osakabe², Keishi Osakabe² (¹Life Tech., Tokushima Univ., ²Bioscience & Bioindustry, Tokushima Univ., ³PREST, Kyoto Univ., ⁴Toku

P-17 (O-17)

表面の分子修飾による糸状菌の接着制御と表面認識機構に関する解析

西村麻里江¹, 中野美紀², 三宅晃司² (農研機構・生物機能利用¹・産総研・製造技術²)

いもち病菌 (*Magnaporthe oryzae*) などの植物病原性糸状菌では孢子が植物やカバーガラス等の表面で発芽すると表面に接着し感染器官が誘導される。この感染器官誘導には菌による表面の濡れ性 (親水性/疎水性) や硬さの認識が関わっていると考えられてきた。そこで自己組織化法により種々の官能基で修飾した金基板表面を用いて詳細に解析したところ *M. oryzae* においては表面の濡れ性は感染器官形成には無関係であり、表面の水酸基がヘテロ 3 量体 G タンパク質の 1 つを介して認識されることにより接着が阻害されることを示唆する結果を得た。さらに *Aspergillus oryzae*, *Cladosporium cladosporoides*, *Alternaria alternata* に対して表面の化学的特性が発芽孢子に及ぼす影響について解析した。水酸基修飾により *A. oryzae* でのみ接着阻害が観察された。しかしオリゴエチレングリコールを含む分子で修飾した基板表面では *M. oryzae* を含む全ての菌において接着性の阻害もしくは著しい低下が見られた。この分子で修飾された基板表面に対して *M. oryzae* の接着阻害も見られたが、これにはヘテロ 3 量体 G タンパク質は関与していなかった。以上の結果から糸状菌の接着には少なくとも 2 つの機構が関与していることが推測された。本結果は抗菌剤を利用しない糸状菌汚染制御の可能性を示すと考えている。

(Control of fungal adhesion by chemical modification of substrate surfaces)

Marie Nishimura, Miki Nakano, Koji Miyake

(NARO, AIST)

P-18

麹菌におけるゲノムを切らずに書き換える新規ゲノム編集ツールの確立

荒添貴之¹, 西田敬二¹, 田畑麻由良¹, 若井暁¹, 荻野千明², 秦洋二³, 近藤昭彦¹ (¹神戸大院・科学イノベ, ²神戸大院・工, ³月桂冠・総研)

DNA の二本鎖切断修復機構を利用して標的配列を改変するゲノム編集技術は、任意の塩基配列を特異的に切断することが可能な人工ヌクレアーゼの開発により大きく進展している。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 DNA を切断できる人工ヌクレアーゼとして、多くの糸状菌においてその有用性が認められてきた。一方でゲノムが不安定な糸状菌においては、DNA 切断により広域 (1000bp~) な欠失やゲノムの再編成がしばしば起こり得ることから (Mizutani et al., 2016), より正確な配列改変には相同鎖を用いた組換えを行う必要がある。我々は、塩基変換反応を利用したゲノムを切らずにピンポイントに変異を導入できる新規ゲノム編集ツール「Target-AID」の開発に成功した (Nishida et al., 2016)。本技術は、ヌクレアーゼ活性を消失させた CRISPR/Cas システムと活性型シチジンデアミナーゼ (AID) を組み合わせることで、標的配列上 3~5 塩基の範囲内に位置するシトシンの脱アミノ化反応を促進し、相同配列を用いずに点変異 (C to T または A to T) を直接導入可能である。本発表では、Target-AID の麹菌への適用と広域欠失を抑制したゲノム改変・点変異導入例について発表する。

Targeted nucleotide editing without cleaving DNA in *Aspergillus oryzae*

Takayuki Arazoe¹, Keiji Nishida¹, Mayura Tabata¹, Satoshi Wakai¹, Chiaki Ogino², Yoji Hata³, Akihiko Kondo¹

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

P-19

マルチセルラーゼ発現黄麹菌の培養条件によるセルラーゼ生産性の違い

片山周平¹, 若井暁², 浅井菜々実², 荻野千秋³, 堤浩子⁴, 秦洋二⁴, 近藤昭彦² (¹神戸大・工, ²神戸大院・イノベ, ³神戸大院・工, ⁴月桂冠・総研)

バイオリファイナーはセルロースバイオマスエネルギー・化成品原料として利用する概念であり、石油資源使用量の低減の観点から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、複数のセルラーゼを同時に分泌生産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、ベクターインテグレーション型形質転換により三種類のセルラーゼを同時に発現させる菌株 (Single copy 株), cotransformation によって遺伝子導入した Multi copy 株, コピー数多形とプロモーター強度を加味した Designed Co-Tra 株を作成している。本研究では、これらの株の遺伝子コピー数とプロモーター/遺伝子の組み合わせの違いから、培養条件を変えた際にセルラーゼ生産性がどのように変化するか検討を行った。

液体培養時のペプトン濃度について最初に検討を行った。次に、基質をグルコース、可溶性デンプン、キシロース、セロビオース、および Avicel とした場合の三種セルラーゼ (CBHI, EG, BGL) の分泌発現バランスの変化を調べた。同様に、液体培養と固相培養での分泌発現バランスの変化を調べた。発表では、セルラーゼ分泌発現バランスを SDS-PAGE により示し、セルラーゼ活性として CBHI の活性について報告する。

Comparative analysis of cellulase production by multi-cellulase expressing *Aspergillus oryzae* strains under different culture conditions

Shuhei Katayama¹, Satoshi Wakai², Nanami Asai², Chiaki Ogino³, Hiroko Tsutsumi⁴, Yoji Hata⁴, Akihiko Kondo²

(¹Eng., Kobe Univ., ²Grad. Sch. Sci. Tech. Innov., Kobe Univ., ³Grad. Sch. Eng., Kobe Univ., ⁴Res. Inst., Gekkeikan)

P-20

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* による機能性オリゴ糖の生産

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¹ (¹神戸大院・イノベ, ²神戸大院・工, ³月桂冠・総研)

機能性オリゴ糖は、整腸作用および血清脂質改善効果、過酸化脂質上昇抑制効果、免疫賦活活性などの種々の生体調節機能が見出されており、近年、生活習慣病等の予防効果があるとして期待されている。機能性オリゴ糖様の働きをすることが示唆されているイソプリメベロースは、キシロースがグルコースに α -1,6 結合した二糖であり、キシログルカンを原料としてイソプリメベロース生産酵素 (IPase) により生産することが可能である。現在、IPase 以外にイソプリメベロースを生産する酵素は知られていない。黄麹菌が IPase 活性を持つことは既に知られており、黄麹菌の持つ β -グルコシダーゼの一つが IPase であることを Matsuzawa らが発見している (*J. Biol. Chem.* 2016)。本研究では、この IPase をコードすると推定される遺伝子の高発現、発現酵素によるイソプリメベロース生産を目指した。

Cotransformation により複数の形質転換体を取得し、培養上清の分泌生産性の高い物を一株選抜した。本株は 3%GPY 培地、30°C で 7 日間培養後、培養上清に約 0.7 g/L のタンパク質を分泌発現した。本酵素の推定アミノ酸配列から算出されるタンパク質質量は約 80 kDa であるが、SDS-PAGE では約 100 kDa の位置にほぼ単一のバンドが観察された。糖鎖除去処理後、SDS-PAGE 上での移動度が 80 kDa を示すことから糖鎖修飾が確認された。糖鎖除去処理を行っていない培養上清を用いてキシログルカン分解試験を行った結果、イソプリメベロースの生産が確認された。現在、培養上清を用いたイソプリメベロースの大量生産を進めている。

Production of functional oligosaccharide by genetically engineered *Aspergillus oryzae*

Satoshi Wakai¹, Nanami Asai¹, Chiaki Ogino², Hiroko Tsutsumi³, Yoji Hata³, Akihiko Kondo¹

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

P-21

リシノール酸高生産株の作製とその脂質解析

富永康子¹, 濱野百花¹, 阪本鷹行¹, 井出紗奈江¹, 菊川寛史³, 安藤晃規², 岸野重信², 和泉自泰⁴, 馬場健史⁴, 島 純⁵, 小川順², 櫻谷英治¹

(¹徳大・生物資源, ²京大院・農, ³岐阜大・工, ⁴九大・生体防御, ⁵龍谷大・農)

リシノール酸 (18:1 ω 9-12OH, RA) は下剤や鎮痛促進剤などの薬効があるほか, ポリマー原料としても需要が高まっており, 植物や酵母において麦角菌由来の脂肪酸水酸化酵素 (CpFAH) などの遺伝子を用いた遺伝子組換えによる生産研究が行われている。CpFAH はオレイン酸 (18:1 ω 9, OA) を基質として RA へ変換することが知られているが, 油糧微生物 *Mortierella alpina* において OA は Δ 6 および Δ 12 不飽和化酵素 (DS) によって ω 9 オクタデカジエン酸 (18:2 ω 9) およびリノール酸 (18:2 ω 6) へと変換される。本研究では *M. alpina* において Δ 6 および Δ 12ds 遺伝子の抑制と *Cpfah* 遺伝子発現を同時に行うことにより, RA 高生産株の作製を試みた。

M. alpina Δ 12ds 遺伝子欠損株に CpFAH 導入および Δ 6ds 遺伝子 RNAi を行った変異株において, RA 生産を確認した。また, 本菌株における構造脂質分析の結果, 菌体内に含まれる RA はトリアシルグリセロールの構成脂肪酸として存在していることが示唆された。

Creation of high ricinoleic acid-producing strains and their lipid analyses

Yasuko Tominaga¹, Momoka Hamano¹, Takaiku Sakamoto¹, Sanae Ide¹, Hiroshi Kikukawa³, Akinori Ando², Shigenobu Kishino², Yoshihiro Izumi⁴, Takeshi Bamba⁴, Jun Shima⁵, Jun Ogawa², Eiji Sakuradani¹

(¹Fac. Biosci. Bioindus., Tokushima Univ. ²Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., ³Fac. Eng., Gifu Univ. ⁴Medical Institute Bioregulation, Kyushu Univ. ⁵Fac. Agric., Ryukoku Univ.)

P-22

黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* の *pyrG* マーカー遺伝子を用いた多重遺伝子操作可能なホストの開発

渡嘉敷直杏, 外山博英 (琉球大・農学研究科)

黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* は主に沖縄の泡盛醸造の現場で伝統的に用いられてきた。醤油や味噌, 清酒の製造で用いられる黄麹菌と共に, 黒麹菌は日本における国菌として認定されている。黒麹菌の分子生物学的研究は黄麹菌と比較してそれほど盛んではないが, 黒麹菌に特異な未知機能や生理学に興味を持たれている。我々は黒麹菌の形質転換を簡便にすべく, これまで困難であったプロトプラスト-PEG 法による形質転換系を構築した。黒麹菌に関する研究をより円滑に進めていくため, 黄麹菌などで先行して用いられている栄養要求性形質転換マーカーの一つである *pyrG* 遺伝子を用いたマーカーリサイクリングシステムによる多重の遺伝子操作を黒麹菌でも利用できるよう試みた。*A. niger*, *A. oryzae* におけるアノテーション情報を参考にして *Aspergillus luchuensis* RIB2604 株における *pyrG* を決定した。遺伝子の上流と下流約 1 kb 分の DNA を PCR で増幅し, それらを連結して *pyrG* 部分を除去した DNA 断片を調製した。この断片を用いて *A. luchuensis* (Δ *ligD* 株) を形質転換した。栄養要求株の確認にはウリジン/ウラシルを含まない培地上でのネガティブセレクションと, 相補する遺伝子の導入によって形質が回復するかを確認した。

Development of multigene manipulable *Aspergillus luchuensis* host by using *pyrG* gene a marker recyclable gene

Jikian Tokashiki, Hirohide Toyama

(Dept. of Biosci. Biotech. Fac. of Agr., Univ. of the Ryukyus)

P-23

アクチンの重合・エキソサイトーシス・Ca²⁺流入の振幅による菌糸の先端生長機構

竹下典男^{1,2}, Minoas Evangelinos², Reinhard Fischer² (¹筑波大学・生命環境系, ²Dept of Microbiol, Karlsruhe Institute of Technology)

菌糸の先端生長のために必要な膜脂質やタンパク質は、菌糸先端への分泌小胞の輸送と先端でのエキソサイトーシスにより、先端の形質膜に供給される。菌糸先端への長距離の膜輸送には微小管が、先端でのエキソサイトーシスにはアクチンケーブルが、中心的な役割を担っている。これまでの研究により、これらの細胞骨格と極性マーカータンパク質が相互依存的に機能することで、極性部位の確立とエキソサイトーシスが段階的に起きることが示されている。実際に、菌糸の伸長速度が一定ではなく、増減の振幅が見られた。菌糸先端のF-アクチンと分泌小胞を、蛍光観察で経時的に測定した。また、Ca²⁺の細胞内濃度を蛍光マーカーであるR-GECOにより可視化し、経時的に測定した。その結果、それぞれが同調した蛍光強度の振幅を示した。このことから、アクチンの重合とエキソサイトーシスがCa²⁺の流入により同調して制御されることで、一連の段階が協調的に進行する先端生長の動的機構が示唆された。

Oscillation of fungal tip growth related with actin polymerization, exocytosis and Ca²⁺ influx.

Norio Takeshita^{1,2}, Minoas Evangelinos², Reinhard Fischer²

(¹Faculty of Life and Environmental Sciences, Univ. Tsukuba, ²Dept of Microbiol, Karlsruhe Institute of Technology)

P-24 (O-11)

担子菌キノコの順遺伝学研究から示唆されてきた、リグニン生分解と子実体形成の関連性

中沢威人¹, 村口元², 本田与一¹ (¹京大・院農, ²秋田県大・資源生物)

担子菌キノコには、他の微生物にはない生態的特徴が2点ある。1つ目は、顕微鏡サイズの菌糸細胞が、肉眼ではっきりと認識できる巨大な有性生殖器官・子実体（キノコ）を形成する点。2つ目は、森林圏の分解者として、複雑難解な木質成分に対する生分解（木材腐朽）能力をもつ点である。特に木材の主要成分のひとつ“リグニン”を単独で生分解（無機化）できる生物は、地球上で“白色腐朽菌”と呼ばれる担子菌の一部のみである。そのような担子菌に特徴的な2点に関して、今までは別々に研究が行われてきた。本発表では、非木材腐朽菌ヒトヨタケ (*Coprinopsis cinerea*) および白色腐朽菌ヒラタケ (*Pleurotus ostreatus*) を用いた別々の順遺伝学研究から、リグニン生分解と子実体形成に同時に影響を与える機構の存在が示唆されてきたことを報告する。以前の発表（中沢ら、第14回当研究会）の後、リグニン分解能力と相関する色素脱色能力を失ったヒラタケ突然変異体の原因変異遺伝子の特定に成功した。その中の2つの遺伝子 (*Popex1* および *Pochd1*) が、実際にブナ木粉中のリグニン生分解に重要であることが判明した。それらの遺伝子変異（および破壊）は、同時に子実体発生開始不全も引き起こした。一方、ヒトヨタケにおけるキノコ形態形成の順遺伝学研究からは、*Pochd1* に相当する *Cc.chd1* の変異が、子実体の傘形成を不全化させることが明らかとなった。さらに *Popex1* に相当する、ヒトヨタケの *Cc.pex1* 遺伝子破壊株を作成したところ、ヒラタケと同様に子実体発生開始不全になった。しかし、上記以外の表現型については、ヒラタケとヒトヨタケで異なる部分も見つかった。以上の結果および2種のキノコの生理生態的な違い（木材腐朽性の有無・子実体形成過程の相違を含む）を踏まえて、「子実体形成とリグニン生分解に同時に影響する機構」について仮説を論じる。

Insights into correlation between white rot and sexual development from forward genetics in agaricomycetes

Takehito Nakazawa¹, Hajime Muraguchi², Yoichi Honda¹

(¹Kyoto Univ., ²Akita Prefectural Univ.)

P-25

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* におけるエンドサイトーシス関連因子 AipA の機能解析

柿本健一, 竹川薫, 樋口裕次郎 (九大院・生資環・生命機能)

エンドサイトーシスは真核生物に広く保存された機構であり、モデル真核微生物である出芽酵母等では詳細な分子機構が明らかになっているものの、黄麹菌 *Aspergillus oryzae* を含む糸状菌では未だ解析が進んでいない。これまでに、黄麹菌におけるエンドサイトーシス関連因子 AoAbp1 と相互作用するタンパク質として、推定 AAA ATPase である AipA を同定しているが、その分子機能に関しては未解明である。そこで我々は、yeast two-hybrid (YTH) 法によって AipA と相互作用する因子の探索を行い、出芽酵母におけるエイソソーム構成因子 Pil1p の黄麹菌オルソログ AoPil1 との相互作用を見出した。出芽酵母では、エイソソームは細胞膜近傍で構造体を形成し、エンドサイトーシスに関与すると考えられているものの、糸状菌ではエイソソームの解析はあまりなされていない。蛍光顕微鏡解析により、AoPil1-EGFP が細胞膜近傍でパッチ状に局在したことから、AipA と AoPil1 が細胞膜近傍で相互作用することが示唆された。両者の機能解析を進めるため、*aipA* と *Aopil1* の単独破壊株と二重破壊株を作製した。各種培養条件下で生育比較を行ったが、顕著な表現型は見られなかった。現在、AipA と AoPil1 の相互作用部位に関して YTH 解析を行っている。さらに、細胞膜に局在する膜タンパク質であるプリントランスポーターAoUapC とアルギニントランスポーターAoCan1 をエンドサイトーシスのマーカーとして用いることで、AipA と AoPil1 がエンドサイトーシスにどのように関与しているのかを解析している。

Functional analysis of AipA involved in endocytosis in *Aspergillus oryzae*

Ken-ichi Kakimoto, Kaoru Takegawa, Yujiro Higuchi

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

P-26

Dissection of acyl-CoA binding protein secretion in *Aspergillus oryzae*

Kwon Hee Su¹, Kouhei Kawaguchi², Takashi Kikuma², Katsuhiko Kitamoto², Kaoru Takegawa¹, Yujiro Higuchi¹

(¹ Dept. of Biosci. Biotechnol., Kyushu Univ., Dept. of Biotechnol., Univ of Tokyo)

Proteins harboring amino-terminal or internal signal peptides are directed to the endoplasmic reticulum (ER), transported to the Golgi and finally secreted to extracellular space through the plasma membrane. However, it has been reported that there are certain secretory proteins which lack signal peptides. These proteins are secreted via a novel pathway, so called unconventional protein secretion (UPS). In the model yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, Acb1p was found to be secreted via the UPS pathway in a nutrient starved condition. The Japanese national filamentous fungus *Aspergillus oryzae* also possesses two homologs of Acb1p, AoAcb1 and AoAcb2, both of which lack signal peptide. Here we analyzed whether these proteins were secreted under starved-conditions in *A. oryzae*.

In order to investigate protein secretion, western blot analyses were performed using strains expressing either AoAcb or enhanced green fluorescent protein (EGFP) tagged with hemagglutinin (HA) epitope, in which EGFP-HA was used as a control of cytoplasmic protein. These strains were cultured in nutrient-rich DPY medium for 10 hours and thereafter shifted to carbon starved minimal medium for another 30minutes. After carbon starvation, AoAcb2-HA, but not AoAcb1-HA, was detected in culture supernatant, whereas EGFP-HA was mainly detected inside cells. This result suggests that AoAcb2 secretion was induced by carbon starvation, where most of cells were not lysed. In *S. cerevisiae*, autophagy machinery is involved in Acb1p UPS. Therefore, we analyzed AoAcb2 secretion in the conditionally expressing strain of an autophagy-related gene *Aoatg1*, in which *Aoatg1* is regulated under the controllable *thiA* promoter. Unexpectedly, AoAcb2-HA was detected in the supernatant from the *Aoatg1*-repressed cells, suggesting that AoAcb2 might not be involved in AoAcb2 secretion. To further dissect molecular mechanisms underlying AoAcb2 secretion, other autophagy- and secretion-related mutants are being under investigation.

P-27

麹菌マルトーストランスポーターMalP 分解におけるアレスチン様タンパク質 CreD の PXY モチーフの関与

多田日菜子, 田中瑞己, 平本哲也, 新谷尚弘, 五味勝也 (東北大院・農・生物産業創成)

麹菌のデンプン分解酵素生産において、誘導基質であるマルトースの細胞内取り込み系が重要である。その取り込みを担っているマルトーストランスポーターMalPは、グルコース存在下で転写抑制を受けるとともに、タンパク質レベルでも細胞膜上からエンドサイトーシス依存的な取り込み・分解を受けることが明らかになっている。我々はこれまでに、アレスチン様タンパク質 CreD が、HECT ユビキチンリガーゼ HulA による MalP のユビキチン化においてアダプターとして介在することを明らかにした。CreD-HulA 間の相互作用は、CreD の PY モチーフ(PPXY, PXY)と HulA の WW ドメインを介して行われると予想される。そこで、PY モチーフに変異を導入した株を作製し、解析を行った。

CreD の PPLY モチーフに変異を導入した株、また三箇所ある PXY モチーフに単独に変異を導入した株において解析を行った。GFP-MalP の局在解析を行ったところ、すべての変異株においてエンドサイトーシスの遅延が観察された。また、プルダウンアッセイによる相互作用解析を行ったところ、PPLY モチーフおよび PXY モチーフの双方が WW ドメインとの相互作用に関与していること、PXY モチーフのうち C 末端側に存在する PDY 配列の寄与が最も大きいことが示された。さらに、これらの株における GFP-MalP のタンパク質レベルでの分解を Western blotting で調べたところ、PDY 配列に変異を導入した株において顕著な分解の遅延が認められた。

Involvement of PXY motifs of arrestin-like protein CreD in endocytic degradation of MalP in *Aspergillus oryzae*

Hinako Tada, Mizuki Tanaka, Tetsuya Hiramoto, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi

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

P-28

麹菌 *A. oryzae* の菌核形成に関与する新規転写因子の解析

藤井陽平¹, 中村英淳¹, 片山琢也¹, 小川真弘², 小山泰二², 北本勝ひこ¹, 丸山潤一¹ (¹東大院・農生科・応生工, ²野田産研)

【目的】 菌核は菌糸が密着・融合した凝集塊であり、*Aspergillus flavus* などではその内部に有性生殖器官を形成することが報告されている。麹菌 *Aspergillus oryzae* では有性世代が見つからないが、有性生殖を誘導する上で、菌核形成能が低下もしくは消失していることが問題となっている。我々はこれまでに *A. oryzae* 菌核形成の制御機構を明らかにするため、野生株 RIB40 に由来する転写因子破壊株ライブラリーから菌核形成能が低下した株をスクリーニングし、菌核形成に関与する転写因子を明らかにした¹⁾。本研究では、中でも菌核形成に重要な役割を果たすと考えられる新規転写因子の機能解析を行った。

【方法・結果】 まず転写因子破壊株ライブラリーから、分生子形成は正常で菌核は全く形成しない株を抽出し、Zn(II)₂Cys₆型転写因子をコードする2つの遺伝子(AO090010000784, AO090009000520)に着目した。これらの遺伝子は *Aspergillus* 属に広く保存されているが、これまでに機能解析の報告はなされていない。これら2つの遺伝子について過剰発現株を作製し、分生子及び菌核形成数を測定した。AO090010000784 過剰発現株は野生型に比べて菌核形成数が減少し、AO090009000520 過剰発現株では増加していた。以上の結果から、2つの転写因子は菌核形成に対して異なる制御を行っている可能性が考えられた。現在、破壊株と高発現株において分化に関連する遺伝子の転写解析を行っている。

1) 中村英淳ら 第15回糸状菌分子生物学コンファレンス要旨集 p.52(2015)

Analysis of novel transcription factor associated with sclerotia formation in *Aspergillus oryzae*

Yohei Fujii¹, Hidetoshi Nakamura¹, Takuya Katayama¹, Masahiro Ogawa², Yasuji Koyama², Katsuhiko Kitamoto¹,

Jun-ich Maruyama¹ (¹Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, ²Noda Inst. Sci. Res.)

P-29

Aspergillus nidulans における低酸素誘導性脱ユビキチン化酵素の細胞機能

岡添孝章, 阿部央行, 梶尾俊介, 高谷直樹 (筑波大・生命環境)

私達は、これまでに、糸状菌 *Aspergillus nidulans* の Trx (チオレドキシン) 様タンパク質の一つである AN6915 が低酸素ストレス環境下で発現誘導されること、タンパク質の脱ユビキチン化活性を持つ PPPDE ドメインとユビキチン選択的 AAA 型シャペロンである AnCdc48 と結合する PUL ドメインおよび酸化還元活性を有する Trx ドメインからなる構造を有することを示した。このようなドメイン構造を持つ Trx 様タンパク質はカビに特徴的であり、その機能は興味深い。

低酸素ストレスに曝した *A. nidulans* の野生株では CMAC または RabS-GFP 融合タンパク質によって観察される液胞が肥大化するのに対して、AN6915 の遺伝子破壊株 (AN6915 Δ) ではこの程度が低くなることを見出した。また、通常の条件下では細胞質に局在化する AN6915-GFP 融合タンパク質は、低酸素ストレスにตอบสนองして液胞へと移行することが明らかとなった。同様の現象は、本菌を窒素飢餓ストレスに曝した時にも観察された。オートファージのマーカータンパク質である AtgH と GFP との融合タンパク質を AN6915 Δ と野生株で発現させ、両ストレス条件下における AtgH の局在を観察した。その結果、いずれのストレス条件下においても AN6915 Δ と野生株は同様のプレオートファゴソーム様の蛍光を示したものの、AN6915 Δ ではその出現頻度が低かった。以上の結果から、AN6915 が低酸素ストレス条件下でのオートファージの発現に関わる事が示された。

Function of *Aspergillus nidulans* deubiquitinase under hypoxic conditions

Takaaki Okazoe, Hiroyuki Abe, Shunsuke Masuo, Naoki Takaya

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

P-30 (O-15)

麴菌カーボンカタボライト抑制制御因子 CreA の分解と機能維持に関与するカルボキシ末端領域の同定

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 (CCR) 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、麴菌の CreA が CCR 非誘導条件下で核内から細胞質に移行し、速やかに分解されることを明らかにしてきた。本発表では、CreA の分解に関わる領域について解析した結果を報告する。

カルボキシ末端にタグを融合した CreA の安定性を調べた結果、アミノ末端にタグを融合した CreA と比較して半減期が長くなったことから、CreA のカルボキシ末端領域に分解に重要な領域が存在する可能性が考えられた。そこで、カルボキシ末端を欠失させた CreA 変異体を *creA* 破壊株で発現させて安定性を調べた。その結果、末端の 40 アミノ酸を欠失させることで CCR の誘導・非誘導条件にかかわらず半減期が著しく長くなったのに対し、末端の 20 アミノ酸を欠失した変異体では半減期の大きな変化は観察されなかった。これらのカルボキシ末端欠失 CreA の機能相補性を調べた結果、*creA* 破壊によって抑制される寒天培地上での生育は、いずれの変異 CreA を導入しても野生株と同等に回復した。一方で、末端の 40 アミノ酸を欠失させた CreA 導入株では、アミラーゼ遺伝子発現のグルコース添加時の抑制が完全には回復しなかった。以上の結果から、カルボキシ末端から 40-20 アミノ酸の領域が CreA の分解と CCR 特異的な機能維持において重要であることが示された。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。

Identification of carboxy-terminal region of glucose repressor CreA involved in its degradation and functional maintenance in *Aspergillus oryzae*.

Mizuki Tanaka, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi

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

P-31

麹菌 *A. oryzae* の分化における LaeA 様メチルトランスフェラーゼの機能解析

川田純毅, 丸山潤一 (東大院・農生科・応生工)

メチルトランスフェラーゼは、低分子化合物の修飾反応のみならず、DNA やタンパク質を基質とすることで遺伝子発現制御などの様々な細胞機能に関与することが明らかになってきている。LaeA は糸状菌特異的に保存されているメチルトランスフェラーゼである。*Aspergillus nidulans* において LaeA は、これに近縁な LaeA 様メチルトランスフェラーゼの一部とともに分化の制御に関与している¹⁾。日本の伝統的な発酵醸造食品の製造に用いられる麹菌 *Aspergillus oryzae* の主な分化の形態は分生子形成であるが、一部の株では菌糸の凝集した構造である菌核を形成することができる。しかし、*A. oryzae* の LaeA 様メチルトランスフェラーゼの機能は未知であることから、本研究ではこれらの分化における機能解析を試みた。

A. oryzae ゲノムデータベースより、LaeA と同様のメチルトランスフェラーゼドメインを有するタンパク質をコードする 56 遺伝子を見出し、分子系統樹を作成した。中でも特に、LaeA と同じ系統に属する 15 個の LaeA 様メチルトランスフェラーゼに注目し、それぞれをコードする遺伝子の破壊株を作製した。*laeA* 遺伝子の破壊株では分生子および菌核の形成が大幅に減少したことから、LaeA は *A. oryzae* の分化において重要な機能を有していることが示された。また、LaeA 様メチルトランスフェラーゼのなかで、遺伝子破壊により分生子形成には大きく影響しないものの、菌核形成が特異的に減少する 2 つの遺伝子を見出した。これらの遺伝子は他の糸状菌においても機能未知であることから、現在、詳細な機能解析を行っている。

1) Palmer *et al.* (2013) **9**: e1003193.

Functional analysis of LaeA-like methyltransferases in development of *Aspergillus oryzae*

Junki Kawada, Jun-ichi Maruyama

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

P-32

Aspergillus nidulans における α -1,3-グルカン合成酵素 AgsA, AgsB の機能の比較解析

宮澤拳¹, 吉見啓², 阿部敬悦^{1,2} (¹東北大院・農・生物産業創成, ²東北大・未来研)

Aspergillus 属菌の細胞壁には、多糖成分 α -1,3-グルカン(AG)が存在する。AG は一部の病原性真菌における感染因子として知られているが、その他の生物学的機能は不明とされてきた。これまでに当研究室において、モデル糸状菌 *A. nidulans* の AG 合成酵素遺伝子 *agsA*, *agsB* の欠損株が造成され、それらの詳細な表現型解析が行われた。その結果、*agsB* を破壊すると細胞壁から AG が欠失することが明らかとなり、栄養生育時の AG 合成には主に AgsB が機能していることが示された。また、野生株が液体培地中で菌糸の塊を形成しながら生育するのに対し、*agsB* 破壊株の菌糸は液体培地中に均一分散した。このことは、AG が菌糸同士の接着因子として機能していることを示している¹⁾。一方、*agsA* も遺伝子構造に不備はなく、何らかの役割を有すると推察されるが、通常の生育条件ではほとんど発現しておらず、その機能については不明なままである。本研究では、AgsA, AgsB が合成する細胞壁成分を解析することにより、細胞壁 AG 合成における両酵素の役割を明らかにすることを目的とした。まず、各 *ags* 遺伝子単独破壊株を親株として、もう一方の *ags* 遺伝子のプロモーター領域を *Ptefl* に置換した *ags* 遺伝子高発現株を取得した。これらの株について遺伝子の発現量を解析したところ、*agsA* 発現株では野生株比 200 倍以上、*agsB* 発現株でも 2 倍程度の発現上昇が観察され、各遺伝子の高発現化を確認できた。また、*agsA* 高発現により *agsB* 破壊株の菌糸分散性が回復したことから、*agsA* も機能を失っていないことが明らかになった。現在、両酵素が合成する AG の化学構造の差異を比較するため、両高発現株の細胞壁成分を解析している。

1) Yoshimi A. *et al.*, *PLoS ONE* 8(1):e54893 (2013)

Comparative analysis of function of α -1,3-glucan syntheses AgsA and AgsB of *Aspergillus nidulans*.

Ken Miyazawa¹, Akira Yoshimi², Keietsu Abe^{1,2} (¹Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., ²NICHe, Tohoku Univ.)

P-33

Aspergillus nidulans のリン酸基中間因子 YpdA 発現抑制に伴う細胞骨格の機能不全

吉見啓¹, 萩原大祐², 小野都³, 福間泰之³, 古川健太郎⁴, 緑川裕良³, 中山真由美^{1,3}, 原田昌彦⁵, 阿部敬悦^{1,3} (¹東北大・未来研, ²千葉大・真菌センター, ³東北大院農・生物産業創成, ⁴新潟大院・医歯学, ⁵東北大院農・応生科)

二成分性シグナル伝達経路は、His-Asp リン酸リレー情報伝達系としても知られ、バクテリアから高等植物に至るまで普遍的に保存された環境応答機構である。我々はこれまでに、モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* の高浸透圧応答機構に着目し、二成分性シグナル伝達経路のリン酸転移中間因子 YpdA の機能解析を進めてきた。その結果、YpdA の発現を抑制すると生育が悪化すること、この生育悪化は下流のレスポンスレギュレーター (RR) SskA および SrrA 両経路の遮断により回復することが明らかになっている。また、YpdA の発現抑制により SskA 経路下流の MAP kinase HogA が持続的に異常活性化状態に陥り、これが生育異常の主因であることも示唆されている。今回、YpdA と両 RR 経路が及ぼす細胞への影響を探究するため、YpdA 抑制下での各経路遮断株における菌糸細胞形態を詳細に観察した。その結果、YpdA 抑制による SskA 経路依存的な隔壁形成異常などが観察され、細胞骨格系の機能不全が疑われた。さらに、RNA シーケンス解析の結果からも、YpdA 抑制により細胞骨格系に異常が起こることが示唆された。現在、アクチン染色観察をはじめとした細胞骨格系の解析を進めており、その結果についても報告したい。

Dysfunction of cytoskeleton by the down-regulation of the *ypdA* gene encoding the histidine-containing phosphotransfer protein in *Aspergillus nidulans*

Akira Yoshimi¹, Daisuke Hagiwara², Miyako Ono³, Yasuyuki Fukuma³, Kentaro Furukawa⁴, Yura Midorikawa³, Mayumi Nakayama^{1,3}, Masahiko Harata³, Keietsu Abe^{1,3} (¹NICHE, Tohoku Univ., ²MMRC, Chiba Univ., ³Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., ⁴Grad. Sch. Med. & Dent. Sci., Niigata Univ.)

P-34

発芽管破裂法 (GTBM) による *Fusarium oxysporum* の細胞学的核型解析

鮎川侑¹, 小松健², 多賀正節³, 有江力² (¹農工大院連農, ²農工大院農, ³岡大院自然)

Fusarium oxysporum には植物に寄生する菌株が知られ、その病原性を決定する遺伝子が病原菌株特有の小型染色体に座乗することがトマト萎凋病菌 (*f. sp. lycopersici*) で報告された (Ma *et al.*, 2010)。ゲノム解析によって、トマト萎凋病菌 4287 株と非病原性 Fo47 株の染色体数が、それぞれ $n = 15$ および 12 であることが報告されたが (Ma *et al.*, 2010; Shahi *et al.*, 2016)、その他の菌株の染色体数は決定されておらず、*F. oxysporum* の染色体数の多様性に関わる知見は乏しい。そこで本研究は、トマト萎凋病菌 KoChi-1 株、キャベツ萎黄病菌 Cong:1-1 株および非病原性 Fo-304 株および 08C-3B 株の細胞学的核型を発芽管破裂法 (GTBM) (Taga *et al.*, 1998) によって解析した。その結果、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) では、それぞれ $n = 12, 14, 13$ および 10 と判断した KoChi-1, Cong:1-1, Fo-304 および 08C-3B の染色体数が、GTBM では、それぞれ $n = 15, 16, 13$ および 12 であることが判明した。PFGE では、染色体のゲル内での不分離等が生じたためと考えられる。他種でも PFGE が染色体数を過小評価する事例が報告されているが、*F. oxysporum* でも同様であり、正確な核型解析には PFGE と GTBM の併用が有効であることが示された。また、GTBM で作製した標本に FISH 法を適用し、全供試菌株の核小体形成部位を特定した。本研究で確立した手法は *F. oxysporum* の病原性に関わる小型染色体を細胞学的に観察する方法になると期待される。

Germ tube burst method (GTBM) for Cytological karyotyping of *Fusarium oxysporum*

Yu Ayukawa¹, Ken Komatsu², Masatoki Taga³, Tsutomu Arie²

(¹Unit. Grad. Sch. Agric., Tokyo Univ. of Agric. Tech., ²Grad. Sch. Agric., Tokyo Univ. of Agric. Tech., ³Grad. Sch. Nat. Sci. & Tech., Okayama Univ.)

P-35

Aspergillus fumigatus の推定 β 1,6-ガラクトフラノース転移酵素遺伝子の機能解析

¹李秋実,²田中大,¹浴野圭輔,³竹川薫,⁴後藤正利,²柴田信之,¹太田一良,¹岡拓二 (¹崇城大院・工,²東北医薬大・薬,³九大院・農,⁴佐賀大・農)

【目的】 チャワソタケ亜門に属する糸状菌の細胞壁を構成する多糖やタンパク質糖鎖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 *A. fumigatus* の AfGfsA がガラクトマンナン (GM) の合成に関わる β 1,5-Gal_f糖転移酵素であることを報告してきた。一方、GM の Gal_f 糖鎖には β 1,6-Gal_f 残基が存在していることが知られているが、その生合成に関わる糖転移酵素は不明である。*A. fumigatus* には AfGfsA とアミノ酸配列の類似性を有する遺伝子が7つ存在する。それらを分子系統解析によりに分類すると2つのグループに大別され、AfGfsA を含むグループを GT31-A、他方のグループを GT31-B とした。我々は、GT31-B に属する5つの遺伝子 (*AfgfsD*-*AfgfsH*) が β 1,6-Gal_f 転移酵素をコードしていると予測し、機能解析を進めた。

【方法・結果】 *A. fumigatus* の各単独遺伝子破壊株、 Δ *AfgfsDE* および Δ *AfgfsDEG* を取得し、カルコフルオロホワイト (CFW) による影響を調べた。その結果、50°C、67 hr、CFW (60 μ g/mL) を添加した MM 培地の培養条件で Δ *AfgfsD*、 Δ *AfgfsE*、 Δ *AfgfsDE* および Δ *AfgfsDEG* が感受性を示した。また、親株および Δ *AfgfsDEG* から GM を精製し、¹H-NMR 解析を行った。その結果、野生株より Δ *AfgfsDEG* 由来 GM 中の Gal_f- β 1,6-Gal_f 結合数が低下していることが確認された。以上のことから、*AfgfsD* および *AfgfsE* がコードしているタンパク質が β 1,6-Gal_f糖転移酵素であることが強く示唆された。

Functional analysis of putative galactofuranosyltransferase genes in *Aspergillus fumigatus*

¹Qiushi Li,²Yutaka Tanaka,¹Keisuke Ekino,³Kaoru Takegawa,³Masatoshi Goto,²Nobuyuki Shibata,¹Kazuyoshi Ohta,¹Takuji Oka

(¹Grad. Sch. Eng., Sojo Univ.,² Dept. Pham., Tmpu.,³ Fac. Agric., Kyushu Univ.,⁴ Fac. Agric., Saga Univ.)

P-36

ウシグソヒトヨタケにおける抗酸化物質エルゴチオネイン (EGT) の研究

大谷冴果, 佐藤祐紀, 尾崎紀昭, 村口元 (秋田県立大・生物資源)

抗酸化物質が老化や疾病を予防するのに有効であると言われている。EGT は分子量 229.3 の硫黄を含む水溶性アミノ酸の一種であり、特定のバクテリア (*Mycobacterium smegmatis*) や菌類によってのみ合成され、強い抗酸化作用を示す。また、高等動物の細胞には、EGT を積極的に取り込む輸送タンパク質があることが近年明らかとなった。しかし、EGT の詳しい生理的意義は未だ解明されていない。

ウシグソヒトヨタケの子実体形成過程において、EGT 合成酵素遺伝子 (*Cc.egt1*: CC1G_02949) の発現は、子実体形成後期の傘で上昇していた。そこで本研究室では、キノコ子実体形成における EGT の生理的意義の解明と EGT 高含量食用キノコ生産に向けた基盤情報を得るために、モデルきのこであるウシグソヒトヨタケを用いて EGT の含量測定と、含量増加のための条件検討を行うことにした。EGT 含量 (組織 100g 湿重量あたりの EGT 量) を測定したところ、栄養菌糸では 5 mg/100g、子実体柄では 7mg/100g、子実体傘では 40~50mg/100g であった。また、EGT 合成酵素遺伝子 *Cc.egt1* の C 末端に緑色蛍光タンパク質である EGFP を融合し、EGT 合成酵素の細胞内局在性を調べた。加えて、EGFP の緑色蛍光が観察された株においては、HPLC を用いて EGT 含量を測定すると共に、子実体形成も観察した。

食用キノコの子実体収穫後に EGT 含量を増加させるための条件を探索すべく、ウシグソヒトヨタケの各生育段階の試料を冷凍及び乾燥してから試料を調製し、HPLC に供して EGT 含量の測定も行っている。

Antioxidant ergothioneine in *Coprinopsis cinerea*

Saeka Otani, Yuuki Sato, Noriaki Ozaki, Hajime Muraguchi

(Dept. of Biotechnology, Akita prefectural Univ.)

P-37

ウシグソヒトヨタケの栄養菌糸におけるセプチン動態の観察

松瀨美月, 菅生麻友, 本間ちはる, 村口元 (秋田県立大学・生物資源)

ウシグソヒトヨタケの柄伸長欠損突然変異の原因遺伝子 *eln8* を特定したところ, *eln8* は出芽酵母の Cdc3 と相同なセプチン(Cc.Cdc3 と命名)をコードしていた。セプチンは GTP 結合タンパク質ファミリーの 1 つであり, 動物と菌類で保存されており, 生物種によって 2~10 数種類のセプチンが存在する。これらのセプチンは互いに重合して「セプチン複合体」を形成し, 多様なタンパク質の足場ないし拡散障壁となり, 微小管系やアクチン系の制御, 小胞の開口分泌など多様な細胞内現象に関与すると考えられている。ウシグソヒトヨタケには少なくとも 5 種類のセプチン Cc.Cdc3, Cc.Cdc10, Cc.Cdc11a, Cc.Cdc11b, Cc.Cdc12 が存在する。本研究では, 栄養菌糸における各セプチンの動態を観察するために, 2 種類のセプチンに緑色蛍光タンパク質 EGFP と赤色蛍光タンパク質 mCherry をそれぞれ融合し, 共発現している二核菌糸株を構築した。カバーグラス上でこの二核菌糸株を 1~2 日程培養し, 2%アガロースクッション上に菌糸の培養面を被せ, 蛍光顕微鏡で観察した。30 秒ごとに EGFP と mCherry の蛍光を交互にタイムラプス撮影して動画を作成した。その結果, Cc.Cdc3 と Cc.Cdc10 については, クランプが突出する部位の根元に両セプチンが集合したのち, 隔壁形成に伴って, 突起の後方に集合していたセプチンが隔壁へと広がっていく様子が観察できた。現在, 他のセプチンの組み合わせについても観察しようとしているところである。

Septin dynamics in vegetative hyphae of *Coprinopsis cinerea*

Mitsuki Matsubuchi, Mayu Sugo, Chiharu Honma, Hajime Muraguchi

(Dept. of Biotechnology, Akita Prefectural Univ.)

P-38 (O-13)

糸状菌 PKC に特異的な新規阻害剤 Z-705 の作用機構解析

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

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

我々は, MgPkc1 阻害剤を探索するため, 立体構造モデリングによる *in silico* スクリーニングおよび寒天平板培地上での生育阻害試験を行い, 約 80 万化合物の中から Z-705 を選抜した。本化合物はイネ葉上では顕著な病害防除効果は認められず, 化合物改変による活性向上が課題となっている。そこで本研究では, 酵母内での Z-705 活性評価系を構築し, PKC 阻害機構を解析することを目的とした。本評価系では, 酵母 Pkc1 のキナーゼドメインのみを糸状菌由来のものに置換した酵母-糸状菌キメラ PKC 発現株を用い, Z-705 による生育阻害効果を解析した。その結果, Z-705 存在下において酵母-糸状菌キメラ PKC 発現株は野生株や酵母 PKC 発現株と比較して生育の遅延が認められた。また, Z-705 による CWIS 経路への影響を評価するため, PKC 下流因子 *MLP1* の転写量を定量 PCR により解析した。その結果, 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の Z-705 存在下では, 酵母-糸状菌キメラ PKC 発現株でのみ *MLP1* の転写量が減少した。このことは, Z-705 が糸状菌 PKC に特異的な阻害剤であることを示唆している。現在, PKC 下流の MAP kinase Mpk1p のリン酸化解析を行い, タンパク質レベルでの Z-705 の PKC 阻害作用を評価している。

Novel antifungal drug Z-705 specifically inhibits protein kinase C of filamentous fungi

Asumi Sugahara¹, Fumio Shoji¹, Mayumi Nakayama^{1,2}, Akira Yoshimi², Tomonori Fujioka³, Kiyoshi Kawai³, Takuya Katayama⁴, Hiroyuki Horiuchi⁴, Hideaki Umeyama⁵, Keietsu Abe^{1,2} (¹Grad. Sch. Agric. Sci. & ²NICHe. Tohoku Univ., ³Kumiai Chemical Industry Co. Ltd., ⁴Grad. Sch. Agric. Sci. Tokyo Univ., ⁵Facul. Sci. Engin. Chuo Univ.)

P-39

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* における初期エンドソーム動態に関する解析

都甲祐介, 竹川薫, 樋口裕次郎 (九大院・生資環)

我々は国菌・黄麹菌 *Aspergillus oryzae* において、タンパク質の小胞輸送に関係する経路の中でもエンドサイトーシス経路に着目し、特にタンパク質の選別を行う初期エンドソームに関して解析を行っている。初期エンドソームは広く真核生物において恒常的な動態を示し、近年糸状菌においてその動態の生理学的意義が明らかになってきている。そこで本研究では、黄麹菌における初期エンドソーム動態に関する解析を行った。

糸状菌における細胞生物学のモデルである *Aspergillus nidulans* と *Ustilago maydis* において、初期エンドソームとモータータンパク質のリンカーとしてそれぞれ HookA と Hok1 が存在する。そして、それらの遺伝子破壊株では、初期エンドソームの動態が停止することが報告されている。さらに、初期エンドソームの動態の停止がその他のオルガネラの分布異常につながることも報告されている。そこで、黄麹菌における HookA 及び Hok1 のオルソログである *Aohok1* の遺伝子破壊株を取得し、初期エンドソームマーカーの EGFP-AoRab5 を用いて初期エンドソームの動態解析を行った。その結果、野生株において観察される初期エンドソームの恒常的な動態が *Aohok1* 破壊株ではほぼ見られなくなったことを確認した。また、ペルオキシソームマーカーとして EGFP-SKL を用い、ペルオキシソームの細胞内分布の解析を行った。野生株では菌糸内ではほぼ均一に分布するのに対し、*Aohok1* 破壊株では菌糸の先端部に蓄積している傾向が見られた。一方、*Aohok1* 破壊株の生育比較を行ったところ、野生株に比べて生育が低下し、特に富栄養培地においてコロニー形態の顕著な異常が見られた。現在、他のオルガネラの細胞内分布を確認するとともに、さらなる表現型解析を行っている。

Analysis of early endosome motility in *Aspergillus oryzae*

Yusuke Togo, Kaoru Takegawa, Yujiro Higuchi

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

P-40

麹菌株間の光応答様式の違いについて

鈴木聡, プシュパ S ムルティ, 服部領太, 楠本憲一 (農研機構・食品部門, CSIR-CFTRI, India)

モデル糸状菌を用いた糸状菌光応答研究においては分生子形成は光によって誘導されるとされている。すなわち、暗黒の土壤中で生活する腐生性糸状菌が地表に出たときに光を地表のシグナルとして検知し、光に応答して分生子を形成し風や動物によって伝播することにより、生息域を広げる戦略をとるものと考えられている。一方で植物病原菌においては、光と分生子形成の関わりは複雑であり、明所で分生子を形成するもの、暗所で形成するもの、明暗関わらず形成するもの等様々である。我が国の伝統醸造産業に欠かせない麹菌においては、東京大学のグループの RIB40 株を用いた研究により、他の *Aspergillus* 属菌とは逆に、暗所でより多くの分生子を形成する事が明らかとなっている。このような麹菌光応答が、家畜化の過程で起きた変化によるものか、あるいは祖先となる野生型株が植物と共存していた事を示す痕跡なのか、またその生態学的意味は興味が尽きない。本研究では、いくつかの系統の異なる麹菌株を用いて分生子形成に関わる光応答を観察した。その結果、麹菌数株については、これまで報告のあった光応答とは異なる様式の応答を示した。このことから、*Aspergillus oryzae* の光応答は、菌株により異なる制御を受けている可能性が考察される。

Variation of light response among several strains of *Aspergillus oryzae*

Saroshi Suzuki, Pushpa S Murthy, Ryota Hattori, Ken-Ichi Kusumoto

(NARO-NFRI, CSIR-CFTRI, India)

P-41 (O-12)

イネいもち病菌におけるクロラムフェニコールの新規作用点

野坂亮仁, 遠藤正伍, 田中信清, 成川恵, 中島将博, 紙透伸治*, 田口速男, 菅原二三男, 鎌倉高志 (東理大院理工・応生, *麻布大獣医学・基礎教)

イネいもち病菌 (*Pyricularia oryzae*) の付着器形成は真核生物において最も単純な細胞分化のひとつである。この付着器形成を細胞分化に関わる因子を阻害する薬剤に反応する実験系とみなし、本菌の付着器形成を指標とした既存薬剤の新規作用点の探索を行った。その結果、原核生物においてタンパク質合成を阻害する抗生物質であるクロラムフェニコール (以下 Cm) が付着器形成を極めて特異的に阻害した。本菌は真核生物であることから、Cm の真核生物における新規標的因子が *P. oryzae* に存在することが示唆された。この標的因子を解析することで細胞分化機構の解明や抗真菌剤の開発に繋がる。

新規標的因子の探索方法には T7 フェージディスプレイを採用し標的因子を探索したところ、PoDullard が候補に挙げられた。国産野性株 P2 株の PoDullard 過剰発現株では野性株にみられる Cm に対する感受性が低下した。また大腸菌を宿主としたタンパク質発現系で GST タグを付加した PoDullard の融合タンパク質を発現・取得し、Cm に対する結合解析を行った結果 PoDullard に Cm への結合能がみられた。このことから *P. oryzae* における Cm の新規作用点として PoDullard が Cm と相互作用していることが考えられた。現在は欠損変異株の作出を試みており、取得でき次第 Cm への感受性を確認する。

今後 PoDullard の *P. oryzae* における機能解析ならびに Cm への作用の解析が進むことで、*P. oryzae* の付着器形成プロセスの理解や新規付着器形成阻害剤の開発に繋がることが期待される。

A novel target of chloramphenicol in *Pyricularia oryzae*

Akihito Nozaka, Shogo Endo, Nobukiyo Tanaka, Megumi Narukawa, Shinji Kamisuki*, Masahiro Nakajima, Hayao Taguchi, Fumio Sugawara, Takashi Kamakura (App. Bio. Sci., Tokyo Univ. of Sci., *Dept. Vet. Med., Azabu Univ.)

P-42

Aspergillus fumigatus のガラクトフラノース転移酵素(AfGfsA)の酵素的諸性質の解析

¹川満洋平, ¹李秋実, ²田中大, ¹浴野圭輔, ³竹川薫, ⁴後藤正利, ²柴田信之, ¹太田一良, ¹岡拓二 (¹崇城大院・工, ²東北医薬大・薬, ³九大院・農, ⁴佐賀大・農)

【目的】我々は、AfGfsA が *Aspergillus fumigatus* の O-グリカンに含まれるガラクトフラノース(Gal)糖鎖の生合成に関わる Gal₇ 転移酵素であることを報告してきた。本研究では、これまでに明らかでなかった AfGfsA の酵素的な諸性質、Gal₇ の転移様式およびガラクトマンナン (GM) 生合成への関与について解析を行った。

【方法・結果】大腸菌による発現系を用いて組換え酵素 AfGfsA を発現および精製した。精製した AfGfsA を用い、酵素の至適反応条件を検討した。反応には、受容基質として pNP- β -Gal₇, 糖供与体として UDP-Gal₇ を用いた。その結果、AfGfsA は至適反応温度 20- 30°C, 至適反応 pH 6.0- 7.5 を示した。また、AfGfsA は 2 価金属イオン要求性の酵素であり、Mn²⁺ > Ca²⁺ > Mg²⁺ > Co²⁺ の順に高い活性値を示した。次に、AfGfsA が転移する Gal₇ 残基の結合様式を決定した。酵素反応産物を 500 μ g 程度精製し、¹H-NMR 解析に供した結果、Gal₇- β 1,5-Gal₇結合の存在を示す 5.226 ppm のケミカルシフトが検出された。このことより、AfGfsA は β 1,5-Gal₇ 転移酵素であることが明らかになった。次に、WT 株および *AfgfsA* 破壊株からガラクトマンナン (GM) を抽出し、¹H-NMR 解析、¹³C-NMR 解析およびメチル化分析を行った。その結果、*AfgfsA* 破壊株由来 GM 中の Gal₇- β 1,5-Gal₇結合数が減少していることが明らかになった。以上のことより、AfGfsA は GM の生合成に関わる β 1,5-Gal₇転移酵素であることが明らかになった。

Analyses of enzymatic properties of galactofuranose transferase (AfGfsA) in *Aspergillus fumigatus*

¹Yohei Kawamitsu, ¹Qiushi Li, ²Yutaka Tanaka, ¹Keisuke Ekino, ³Kaoru Takegawa, ³Masatoshi Goto, ²Nobuyuki Shibata, ¹Kazuyoshi Ohta, ¹Takuji Oka

(¹Grad. Sch. Eng., Sojo Univ., ²Dept. Pharm., TMPU., ³Fac. Agric., Kyushu Univ., ⁴Fac. Agric., Saga Univ.)

P-43

Aspergillus nidulans における AP2 コンプレックスの機能解析

金京運, 高城景子, 堀内裕之 (東大院・農生科・応生工)

AP2 コンプレックスは哺乳動物, 出芽酵母においてクラスリン依存性エンドサイトーシスに関与することが知られており, α , $\beta 2$, $\mu 2$, $\sigma 2$ から成るヘテロテトラマーで構成される。糸状菌ではエンドサイトーシスが菌糸の先端生長において重要な役割を果たすことが示されているが, 糸状菌での AP2 コンプレックスの機能は未解明である。また, 最近 *Saccharomyces cerevisiae* においてプロテインキナーゼ C である Pkc1 が AP2 コンプレックスの $\mu 2$ サブユニットである Apm4 と相互作用し, クラスリン依存性エンドサイトーシスに関与していることを示唆する報告がなされている。そこで今回 *Aspergillus nidulans* における AP2 コンプレックスの機能解析を目的として, その構成因子中の $\mu 2$, $\sigma 2$ サブユニットをコードする遺伝子のオルソログと考えられる AN7741, AN0722 についてそれぞれ破壊株を作製し解析した。 Δ AN7741, Δ AN0722 株は両株共に野生型株と比べ三分の一程度にコロニー直径が小さくなっており, また分生子形成効率も三分の一程度までに低下していた。更に, 光学顕微鏡を用いた観察の結果, 両破壊株において菌糸の多分岐が観察され, 菌糸先端においては溶菌も見られた。以上のことから, AN7741, AN0722 は菌糸生長における先端生長, 極性の維持並びに分生子形成に関与することが示唆された。また, 両破壊株はほぼ同様の表現型を示したことから, *A. nidulans* においてもこれら 2 つの遺伝子産物がコンプレックスを作って機能していることが示唆された。現在, AP2 コンプレックスの細胞内での局在について解析を行うため, $\beta 2$ サブユニットをコードすると考えられる遺伝子に mCherry を連結した株を作製し検討を行うとともに AN7741 の発現を制御できる株を作製し, エンドサイトーシスへの関与について検討を行っている。

Functional analysis of the AP2 complex in *Aspergillus nidulans*

Jingyun Jin, Keiko Takagi, and Hiroyuki Horiuchi (Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo)

P-44

麹菌 *Aspergillus oryzae* 金属プロテアーゼ AdmB の基質・相互作用タンパク質の探索

小林拓嗣, 大岩達郎, 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】 ADAM は, disintegrin domain と metalloprotease domain を持つ一群の膜タンパク質である。麹菌にもこのタンパク質をコードする遺伝子が 2 つあり, それぞれを *admA*, *admB* と名付けた。哺乳類 ADAM は, 細胞膜上に存在し, 特定の膜タンパク質を切断, 遊離することでシグナル伝達に関与することが知られている。これまでに我々は, *admA*, *admB* 遺伝子欠損により細胞壁の構成が変化し, DNA ダメージ応答に関わる一部のキナーゼ遺伝子の転写レベルが変化することを示した。さらに, 高発現させた AdmB-EGFP の一部が細胞膜上に局在することを示した。これらの結果から, 麹菌においても AdmB が哺乳類と同様に, 細胞膜上でシグナル伝達に関与している可能性が示唆された。そこで, 麹菌 ADAM の機能を詳細に解析するために, AdmB の基質もしくは相互作用するタンパク質を同定することとした。

【方法および結果】 基質・相互作用タンパク質の探索のために, 自身のプロモーター下で AdmB-EGFP を発現する株の解析を行ったところ, 培養後期に AdmB-EGFP の発現が増加することが示され, AdmB の発現が栄養源の枯渇により誘導される可能性が示唆された。最小培地で培養後に, 栄養飢餓培地もしくは新しい最小培地に移し, 発現解析を行った。その結果, AdmB は炭素源飢餓条件で発現量が増加することが明らかになった。この炭素源飢餓条件で Δ *admA* Δ *admB* 株とコントロール株の細胞外タンパク質の変化を調べた。その結果, Δ *admA* Δ *admB* 株では炭素源飢餓応答が早まるようなバンドパターン変化が認められ, 麹菌 ADAM が栄養源の感知やオートファジー等による飢餓応答に関与することが示唆された。現在, AdmB の詳細な機能を明らかにするために, 抗 AdmB 抗体を用いた共免疫沈降により AdmB の基質・相互作用タンパク質の探索を試みている。

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

Search for substrate and interacting proteins of a metalloprotease, AdmB, in *Aspergillus oryzae*

Takuji Kobayashi, Tatsuro Oiwa, Hiroshi Maeda, Michio Takeuchi, Youhei Yamagata

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

P-45 (O-14)

Aspergillus nidulans のミトコンドリア機能調節と菌体内分布

金丸京子, 稲葉真由子, 木村眞, 小林哲夫 (名大院生命農)

液体培養で栄養増殖する *Aspergillus nidulans* の菌体を寒天培地に移すと、栄養源の枯渇や乾燥、空気に晒されるなどの生育環境の変化がシグナルとなり、菌糸の一部から分生子柄が分化し、その先端に分生子が形成される。これまでにわれわれは、膜電位を発生したミトコンドリアが分生子柄の先端（分生子頭）に局在すること、His-Asp リン酸リレー情報伝達機構のヒスチジンキナーゼ HysA がミトコンドリアの膜電位調節と菌体内の分布に関与することを報告した。HysA と GFP の融合タンパク質を利用して菌体内局在部位を観察したところ、HysA はまさに分生子頭のみトコンドリアに局在することも確認した。本研究では、HysA の局在性をタンパク質レベルで検証するために、*hysA* 遺伝子を *alcA* プロモーターの制御下においた株を構築した。液体培養後の菌体からプロトプラストを調製し細胞分画を行ったところ、ミトコンドリア画分に HysA タンパク質を検出した。ヒスチジンキナーゼ間で保存されている自己リン酸化部位 (His 残基) とリン酸基受容部位 (Asp 残基) を他のアミノ酸に置換した変異タンパク質 (HysAHQ, HysADN) もミトコンドリア画分に検出したことから、両アミノ酸残基は HysA の局在性に関与しないことが明らかになった。分画したサンプルを、還元剤を含まない SDS-PAGE で解析したところ、HysA タンパク質は多量体化する性質をもつことを見いだした。現在、この性質を利用して、HysA とともにミトコンドリア機能調節に関わる他のタンパク質因子の同定を行っている。

Control of mitochondrial function and distribution in *Aspergillus nidulans*

Kyoko Kanamaru, Mayuko Inaba, Makoto Kimura, Tetsuo Kobayashi

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

P-46

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】Insulysin は哺乳類やショウジョウバエで報告されている金属プロテアーゼで、インスリンやグルカゴンの分解に関与しているとされている。また近年ではアミロイドβペプチドの分解にも関与していると報告されており、その機能が着目されている。我々は *Aspergillus oryzae* の酵素中にヒト insulysin の ortholog を 3 つ見出した。しかしこれまでその詳細な機能は解明されておらず、基質となり得るペプチドも麹菌内では発見されていない。そこで insulysin 遺伝子 *insA*, *insB*, *insC* の欠損株を作製し、各種薬剤による表現型の変化を観察したところ、ツニカマイシンを添加した Czapek-Dox 寒天培地上で $\Delta insB$ 株及び $\Delta insC$ 株の生育が野生株より促進される事が明らかとなった。そこでツニカマイシンによって ER ストレスが引き起こされたと考え、InsA, InsB, InsC の ER ストレス応答への関連を解析している。

【方法・結果】作製した $\Delta insB$ 株, $\Delta insC$ 株と野生株について、ツニカマイシンを添加した Czapek-Dox 液体培地で培養を行ったところ、寒天培地での場合と異なり $\Delta insC$ 株は野生株, $\Delta insB$ 株より生育が良くなる事が明らかとなった。一方、ER ストレス刺激の有無による *insA*, *insB*, *insC*, 及び UPR 関連遺伝子の転写量解析を行った結果、野生株では ER ストレス刺激によって *insA* の転写量が約 2 倍に増加した。これに対し、 $\Delta insB$, $\Delta insC$ 株では ER ストレス刺激による *insA* の転写量増加は見られなかった。このことから InsA が ER ストレス耐性に関与しており、ER ストレスによる *insA* の転写促進は InsB や InsC によって制御されている可能性が示唆された。

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 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-47

Functional analysis of an Argonaute-like protein FoQDE in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

Seong-Mi Jo^{1,2}, Sung-Hwan Yun³, Ken Komatsu², Tsutomu Arie² (¹United Graduate School of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, ²Laboratory of Plant Pathology, Graduate School of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, ³Soonchunhyang University)

Fusarium oxysporum is a filamentous ascomycete fungus including important plant pathogenic strains. *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol*) is one of the form of plant pathogenic *F. oxysporum* which causes wilt disease of tomato. Previous studies reported that in Eukaryotes Argonaute proteins work on developmental stage and meiotic silencing. QDE (quelling-defective)-2 of *Neurospora crassa* belongs to the eukaryotic Argonaute proteins, containing three common domains, PAZ, MID and PIWI. QDE-2 interacts with the target mRNA, stabilizes and recognizes nucleotides, and takes an essential role in the siRNA and miRNA pathway in *N. crassa*.

Here we focus on proteins in *Fol* homologous with the *N. crassa* QDE-2 to analyze if they are involved in vegetative growth, asexuality, and pathogenicity in *Fol*. Search for the conserved domains in the *Fol* whole genome database annotated 4 QDE-like genes, *FoQDE-2*, *FoQDE-2-2*, *FoQDE-2-3*, and *FoQDE-2-4*. To investigate the function of the QDE-like genes, we generated gene-disrupted mutants of each gene of *Fol* 4287. One of the mutants, $\Delta FoQDE-2$, increased aerial hyphal growth compared with the wild-type strain, indicating that *FoQDE-2* plays a role in vegetative growth stage. Also we're now checking the phenotypic changes in other transgenic mutants.

P-48

担子菌 *Coprinopsis cinerea* における生育とオートファジーの関係

小川直紀, 大野聡一郎, 濱岡修平, 麻田恭彦, 渡邊彰 (香川大・農)

【目的】担子菌 (担子菌キノコ) は, 生育環境が安定した条件下では菌糸状態で生長するが栄養飢餓, 温度, 光などの外的環境要因が付与されると, 菌糸生長から子実体形成へと, その生育様式を劇的に転換させる特徴的な生活環を有する。一方, オートファジーは, オートファゴソームと呼ばれる二重膜構造体を介したバルクな細胞内分解機構であり, 栄養飢餓に応答するだけでなく, 各種真核生物における解析から, 分化, 発生, そして細胞死など様々な生命現象に関与することが報告されてきている。そこで本研究では, 栄養状態に応答する担子菌 *Coprinopsis cinerea* の生育とオートファジーについて解析を行った。

【方法および結果】*C. cinerea* の栄養源と生育の関係について調べた結果, 高窒素源濃度条件下ならびに高糖源濃度下では比較的旺盛な菌糸生育が観察されるのに対し, 培地中の窒素源または糖源が制限された条件下においては子実体形成が促されるという現象が観察された。また, 緑色蛍光タンパク質とオートファジー誘導時に液胞に運ばれるオートファゴソーム構成タンパク質 Atg8 (*Cc. Atg8*) の融合タンパク質を, *Cc. atg8* プロモーター下で発現するようなオートファジー可視化ベクターを構築し, 同ベクターを導入した導入株を用いた解析の結果, 窒素源飢餓条件下だけでなく糖源飢餓条件下においても, 液胞中への緑色蛍光の蓄積が観察された。以上のことは, *C. cinerea* の生育に影響を及ぼす栄養状態が同菌のオートファジーの誘導にも関係することを示唆するものである。現在, 上述の関係についてさらに解析を進めている。

Relationship between growth and autophagy in basidiomycete *Coprinopsis cinerea*

Naoki Ogawa, Soichiro Ono, Shuhei Hamaoka, Yasuhiko Asada, Akira Watanabe (Fac. of Agr., Kagawa Univ.)

P-49 (O-2)

Aspergillus nidulans における β -D-Galactofuranosidase の機能解析

豊田早紀¹, 八色奈央¹, 松永恵美子¹, 樋口裕次郎¹, 後藤正利², 竹川薫¹ (¹九大院・生資環,²佐賀大・農)

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 Galactofuranose(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 含有糖鎖の代謝機構に重要な酵素である。これまで、*A. niger* などの菌株の培養液中から Galf-ase の精製および特性解析に関する報告はあるが、遺伝子の同定までには至ってなかった。我々は Galf-ase 遺伝子の同定を行うために、Galf と構造が類似したアラビノフラノース(Araf)に着目し、既知の 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が、その活性は微弱であった。そこで、土壌より 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発見した。相同性検索の結果、*A. nidulans* の中に放線菌の Galf-ase と相同性の高い 2 つの遺伝子 AN2395 と AN3200 が存在することがわかった。本研究ではこれら 2 つの Galf-ase の機能解析を行った。まず、*A. nidulans* 由来の 2 つの Galf-ase 候補遺伝子を cDNA から増幅し、大腸菌内で発現させ、精製および酵素活性測定を行った。その結果、両遺伝子産物とも、Galf-ase 活性のみを示し、Galf 特異的な Galf-ase であることがわかった。さらに、両 Galf-ase 遺伝子の諸性質について調べた。また、AN3200 遺伝子破壊株を作製し、培養液および菌体内の Galf-ase 活性を測定した。その結果、AN3200 破壊株において菌体内で野生株と比較して、Galf-ase 活性が低下していることがわかった。以上の結果から、*A. nidulans* において AN3200 は細胞内でガラクトフラノース含有糖鎖の代謝に関与していることが示唆された。

Functional analysis of two β -D-Galactofuranosidases in *Aspergillus nidulans*

Saki Toyota¹, Nao Yairo¹, Emiko Matsunaga¹, Yujiro Higuchi¹, Masatoshi Goto², Kaoru Takegawa¹

(¹Dept. of Biosci. & Biotechnol., Fac. of Agric., Kyushu Univ., ²Fac. of Agric., Saga Univ)

P-50

白色腐朽菌ヒラタケにおける *Posnf5* および *Poubc2* の変異がリグニン分解酵素生産および有性形態形成に与える影響の解析

堀井雅人, 中沢威人, 小寺里奈, 坂本正弘, 本田与一 (京大・院農)

白色腐朽菌は高分子リグニンの生分解が可能な唯一の生物である。白色腐朽菌ヒラタケ (*Pleurotus ostreatus*) においてリグニン生分解と有性形態形成の制御経路に共通性があるという仮説を検証するため、本研究ではウシグソヒトヨタケ (*Coprinopsis cinerea*, 以下ヒトヨタケとする) において有性生殖過程に必須であることが判明している *Cc.ubc2* および *Cc.snf5* のオルソログがヒラタケのリグニン分解酵素生産に与える影響を調査した。ヒトヨタケの場合破壊により二核化不全となることが報告されている *Cc.ubc2* オルソログのヒラタケにおける破壊株を作成した。また、*Posnf5* については、C 末端を欠失した *Posnf5-1* 変異株および機能ドメインを欠失した *Posnf5-2* 変異株を作成した。ヒトヨタケにおける同様な変異はそれぞれ子実体発生開始不全、二核化不全となることが報告されている (Ando et al., 2013)。 Δ *Poubc2* 株は GP 培地および Mn^{2+} 添加 GP 培地を用いた液体培養において、主要なリグニン分解酵素であるマンガンペルオキシダーゼ (MnP) の活性の著しい低下を示した。一方、*Posnf5* 変異株においては液体培養時の MnP 活性に大きな変動がみられた。以上の結果から、ヒトヨタケで有性生殖関連の重要遺伝子として知られる *Cc.ubc2*, *Cc.snf5* のオルソログをヒラタケにおいて欠失させることにより、MnP 生産の制御に異常がおきることが明らかになった。現在、変異株を木粉上で生育させた際のリグニン分解酵素活性およびリグニン分解量の測定、遺伝子発現解析を進めている。また、ヒトヨタケと同様にこれらの変異が有性生殖に影響するのか調査を行う予定である。

The effects of targeted disruption of *Posnf5* and *Poubc2* on lignin-degrading enzyme production and sexual development in the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*

Masato Horii, Takehito Nakazawa, Rina Kodera, Masahiro Sakamoto, Yoichi Honda

(Kyoto Univ.)

P-51

麴菌における DCA 類縁体のコンビナトリアル生合成

齋藤開, 三橋隆章, Chang Li, 松田侑大, 淡川孝義, 阿部郁朗 (東大院・薬)

メロテルペノイドは、部分的にテルペン構造を有する化合物であり、自然界には数多くのメロテルペノイドが存在している。ダウリクロメン酸 (DCA) は、エゾムラサキツツジ (*Rhododendron dauricum*) から単離されたメロテルペノイドであり、強力な抗 HIV 活性を持つことから、医薬品候補化合物として注目を集めている。その一方で、その植物からの収量は十分でなく、安定供給系の構築が求められている。そこで我々は、麴菌 *Aspergillus oryzae* を宿主として用い、糸状菌の生合成酵素と植物の生合成酵素を組み合わせて発現させることにより、DCA およびその類縁体の醗酵生産系を構築することを目的として実験を行った。

まず、黒カビ *Stachybotrys bisbyi* 由来のポリケタイド合成酵素 (PKS) とプレニル転移酵素 (PT) を *A. oryzae* にて発現し、DCA 前駆体と同一の構造を持つ grifolic acid の生産系を構築した¹。そこに、エゾムラサキツツジ由来の環化酵素である DCA synthase を発現することにより、*A. oryzae* 生体内で DCA を生産することに成功した。新規 DCA 類縁体の取得を目指して、この形質転換体に、子囊菌 *Ascochyta viciae* 由来アスコフラノン生合成遺伝子クラスターから得たハロゲナーゼ *ascD* を導入した所、DCA にハロゲンが導入された類縁体を得ることに成功した。現在、その構造決定を行っている。

1) Chang Li, Yudai Matsuda, Hao Gao, Dan Hu, Xin Sheng Yao, Ikuro Abe, *Chembiochem*, 2016, 17, 1-5.

Combinatorial biosynthesis of DCA derivative in *A. oryzae*

Kai Saito, Takaaki Mitsuhashi, Chang Li, Yudai Matsuda, Takayoshi Awakawa, Ikuro Abe

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

P-52 (O-4)

白色腐朽菌ヒラタケにおける *wtr1* 遺伝子変異がリグニン分解システムに与える影響

小寺里奈¹, 中沢威人¹, 西村裕志², 渡辺隆司², 坂本正弘¹, 本田与一¹ (¹京大・院農, ²京大・生存研)

担子菌類に属する白色腐朽菌は、木質中の主要構成成分の一つである不定形芳香族高分子リグニンを単独で生分解 (無機化) できる唯一の生物である。これを可能にしている主要因子の正体は、リグニン分解酵素と呼ばれる、白色腐朽菌のみが生産する一連の酸化酵素であるとされている。当研究室で用いている白色腐朽菌ヒラタケ (*Pleurotus ostreatus*) は、リグニン分解酵素の一部である、マンガンペルオキシダーゼ (MnP) および多機能型ペルオキシダーゼ (VP) などを生産する。しかし、以前の木材腐朽菌の生化学および細胞生物学研究からは、リグニン分解酵素以外にも、リグニン生分解に重要な因子の存在が示唆されている。このような未知の因子を同定する目的で、リグニン生分解能力と相関を示す色素脱色能力に不全をきたすヒラタケの突然変異体を分離し、原因変異遺伝子を特定した (中沢ら, 第 14 回本研究会)。変異体 UVJ2-1 の原因変異遺伝子は、Zn-finger を有する担子菌に特異的な転写因子をコードする遺伝子 (*wtr1* と命名) であることが判明した。当該変異体では、DNA 結合領域と転写活性化領域は保持したまま、C 末の一部が欠損する形で変異している (*wtr1-1* 変異)。本研究において、UVJ2-1 および *wtr1* 完全破壊株 2 株 (J2-1d#1, J2-1d#2) を GP 液体培地上で培養したところ、通常ヒラタケの野生株が示す MnP/VP 活性が消失した一方、酵素遺伝子 (*mnp3*, *vp1*) の転写発現は野生株と変わらなかった。これらの結果からは、*wtr1* 変異による遺伝子発現変動が、正常な MnP/VP の活性発現を転写以外の段階で妨げていることが示唆された。また、ブナ木粉上で培養した場合、UVJ2-1 は野生株と同等のリグニン生分解能力を示した一方、*wtr1* 完全破壊株ではリグニン生分解能力が減少していた。以上を踏まえて、野生株と J2-1d#2 の間での比較 RNA-seq 解析を行った。現在は、Wtr1 によって制御される MnP/VP 活性発現およびリグニン生分解に重要な因子の同定を行っている。

Effects of mutations in *wtr1* on the ligninolytic system in the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*

Rina Kodera¹, Takehito Nakazawa¹, Hiroshi Nishimura², Takashi Watanabe², Masahiro Sakamoto¹, Yoichi Honda¹

(¹Grad. School of Agr., Kyoto Univ., ²RISH, Kyoto Univ.)

P-53 (O-3)

Cyclopenin 類を変換する糸状菌由来酵素シクロペナーゼの発見と機能解析

岸本真治, 石川格靖, 山田陽香, 平山裕一郎, 恒松雄太, 渡辺賢二 (静岡県大・薬)

Cyclopenin 類および viridicatin 類は様々な *Aspergillus* 属および *Penicillium* 属の糸状菌で産生が確認されている化合物群である。1967 年, Luckner らは *Penicillium viridicatum* の菌体抽出液が cyclopenin 類を viridicatin 類へと変換することを見出し, この変換を担う酵素としてシクロペナーゼの存在を提唱した。しかしその後, 分子生物学的な研究が進まずシクロペナーゼの正体は長い間謎に包まれていた。そこで我々はシクロペナーゼの正体を明らかにするため, viridicatin 類が生合成中間体であると予想された aspoquinolone 類および penigequinolone 類の生合成研究を開始した。

まず, aspoquinolone 類の構造を元にして生合成に必要な遺伝子を推定し, 生産菌である *Aspergillus nidulans* のゲノム中からそれらを全て含む遺伝子クラスターとして *asq* クラスターを見出した。一方, penigequinolone 類の生産菌である *Penicillium* 属糸状菌 FKI-2140 株のドラフトゲノムを解読後, *asq* クラスターと同性的のある遺伝子クラスターを探索した結果, *png* クラスターを見出した。化合物産生量の多い FKI-2140 株の菌体破碎液から酵素活性を指標にシクロペナーゼを精製し, 得られた情報を元に *png* クラスター中での候補遺伝子を絞り込んだ。候補遺伝子を異種宿主発現させて酵素活性を測定したところ, penigequinolone 類の生合成に関与していると予想されなかったヘモシアニン様タンパク質 PngL がシクロペナーゼ活性を有していることが分かった。さらに, *asq* クラスター中にコードされていて PngL と同性的のある酵素 AsqI にもシクロペナーゼ活性を確認することができた。現在, シクロペナーゼの触媒機構について研究を進めている。

Cyclopenases, atypical enzymes converting cyclopenins to viridicatin in fungi

Shinji Kishimoto, Noriyasu Ishikawa, Haruka Yamada, Yuichiro Hirayama, Yuta Tsunematsu, Kenji Watanabe

(Dept. Pharm. Sci., Univ. Shizuoka)

P-54

Tricholoma matsutake NBRC30605 株の De novo 解析およびグルコアミラーゼ遺伝子の特定

大沼広宜, 福田泰久, 亀井健吾, 白坂憲章 (近畿大・農応生化)

[目的] 外生菌根菌であるマツタケ(*Tricholoma matsutake*)の人工培地上での糖質分解酵素活性は弱く, 生育に長期間要することからマツタケの人工栽培が困難とされている。他にも要因の一つとして, マツタケのゲノム, またはタンパクのデータベースの情報が少ないことが挙げられる。本発表では, マツタケの人工栽培を目指すための基礎データを得るため, ゲノムデータベースを構築し, これまでに明らかにされている糖質分解酵素系をコードする遺伝子配列を特定することを目的とした。演者らはマツタケ NBRC 30605 の全ゲノム配列を解析し, 前年度糸状菌分子生物学コンファレンスにおいてデンプンおよびヘミセルロース培養によって誘導されるグルコアミラーゼを単一に精製し, 内部アミノ酸配列およびコードするゲノム配列を決定した。[結果] NextSeq500(illumina 社)を用いてマツタケ NBRC 30605 株の全ゲノム情報を取得・解析し, DDBJ に公開した(DDBJ/EMBL/GenBank : accession number ; BDDP00000001-BDDP00088884)。続いて本菌株の培養ろ液よりグルコアミラーゼ(約 63kDa)を単一に精製した。精製したグルコアミラーゼを Endo-H 処理し, SDS-PAGE 後, トリプシンによるゲル内消化で得られたペプチド断片を autoflex speed TOF/TOF-KN2 (Bruker)を用いて内部アミノ酸配列を決定した。それぞれのアミノ酸配列を JGI *T. matsutake* 945 (V3.0) BLAST system ゲノム配列をリファレンスとして検索をしたところ, 本酵素に相当するゲノム配列が見られ, 99.9%一致した。また, 本酵素の酵素化学的諸性質について検討中であり, コンファレンスにて報告する予定である。本研究は文部科学省【私立大学戦略的研究基盤形成支援事業(S1512004)】の助成を受け行われた。

De novo sequence analysis of *Tricholoma matsutake* NBRC30605 and specify of Glucoamylase gene.

Hiroki Onuma, Yasuhisa Fukuta, Kengo Kamei, Norifumi Shirasaka

(Kindai Univ., Fac.of Agri.)

P-55

麹菌 *Aspergillus oryzae* 由来 6-O- α -L-rhamnosyl- β -D-glucosidase(AoRut)の諸性質

石川真衣, 塩野義人, 小関卓也 (山形大・農)

6-O- α -L-rhamnosyl- β -D-glucosidase (ルチノシダーゼ; EC 3.2.1.168) は、ヘスペリジン等のフラボノイド配糖体のアグリコンに結合しているルチノースを加水分解する。フラボノイド配糖体の脱糖鎖によって、柑橘類ジュースの苦味低減や清澄化、香りの向上等の食品機能、あるいはヒトの健康機能などの効果が得られるため、これらの目的でルチノシダーゼの工業的な利用が期待される。ルチノシダーゼはこれまでに植物や糸状菌、バクテリアから発見され、報告されている。糸状菌の中では *Aspergillus niger* 由来のルチノシダーゼが報告されたが、*A.oryzae* ではまだ報告されていない。また、ルチノシダーゼはアミノ酸配列の相同性により CAZy の GH5 に分類され、ごく最近 GH55 に分類されるルチノシダーゼも報告された。今回は GH5 に属するルチノシダーゼの酵素学的諸性質について報告する。本研究では、*A.oryzae* のゲノム配列を基に GH5 のルチノシダーゼと推定される遺伝子 (AO090012000917) をクローン化し、*Pichia pastoris* GS115 を用いて発現させた。リコンビナント酵素は各種クロマトグラフィーにより精製し、特徴付けを行った。

P.pastoris GS115 で発現させた後、ヘスペリジンを基質にジニトロサリチル酸法で酵素活性を測定したところ高い活性が確認された。精製酵素を用いた SDS-PAGE より、70-75 kDa にスミアなバンドが見られたが、エンドグリコシダーゼ H 処理後は 37 kDa 付近に 2 本のバンドを示した。最適 pH は pH4 であり、最適温度は 45°C となった。また、精製酵素はラムノシダーゼ活性を有さなかったため、ルチノースに特異的であると考えられる。詳細な基質特異性は現在検討中である。

Characterization of an 6-O- α -L-rhamnosyl- β -D-glucosidase from *Aspergillus oryzae*

Mai Ishikawa, Yoshihito Shiono, Takuya Koseki

(Dept.of Bioresource Engineering, Yamagata Univ.)

P-56

Nivalenol 系トリコテセン検出のためのアセチル化法の構築

島村拓実¹, 杉江雄太¹, 小川雅義¹, 田中彰², 木村真³, 安藤直子^{1,2}

(¹東洋大学院 理工学, ²東洋大学院工学 ³名大院生命農学)

Fusarium 属菌の生産するカビ毒トリコテセンの防除のためには、免疫アッセイに基づく検出法による迅速なスクリーニングが効果的である。しかし、nivalenol (NIV) を対象とした免疫アッセイキットは実用に耐えうる対 NIV 抗体が存在しないため、未だ実用化に至っていない。そこで我々は NIV 系トリコテセンの中で高い結合性を持つ抗体が存在する 3,4,15-triacetylnivalenol (3,4,15-triANIV) に着目し、トリコテセン生合成酵素である TRI 酵素による NIV から 3,4,15-triANIV への変換を試みた。TRI101 と TRI3 を NIV と反応させたところ、NIV の 66.6% を 3,15-diacetylvalenol (3,15-diANI) に変換することができ、そこに MAFF 111233 株 (NIV ケモタイプ) の Δ Tri8 株の細胞抽出液を添加したところ、NIV の 66.6% を 3,4,15-triANIV に変換することに成功した。この際、TRI8 以外の脱アセチル化酵素により 4,15-diANIV が生じていたため、再度 TRI101 を添加したところ、78.5% まで 3,4,15-triANIV の変換率を向上させることに成功した。しかし C-4 位アセチル化酵素 TRI7 は非常に不安定なため、TRI7 と同様の活性をもつ土壌微生物の探索も同時に行ったところ、434 菌株中 6 菌株が C-4 位アセチル化能を持つことがわかった。中でも最も活性が強かった 3010 株について 16s rRNA の塩基配列から、属種の同定を行ったところ *Pseudomonas Vancouverensis* や *P.mohnii* と高い相同性を示した。3010 株は高い安定性を持っており、TRI7 の代替酵素として使用できることが示唆された。

Acetylation of nivalenol and its derivatives for efficient detection of nivalenol

Takumi Shimamura¹, Yuta Sugie¹, Masayoshi Ogawa¹, Akira Tanaka², Makoto Kimura³, Naoko Takahashi-Ando^{1,2}

Grad. Sch. Sci. Eng. Toyo Univ.¹, Grad. Sch. Eng. Toyo Univ.², Grad. Sch. Bioagr. Sci. Nagoya Univ.³

P-57

動物細胞におけるトリコテセン側鎖修飾酵素 TRI101 の発現と耐性獲得の検証

田中希望¹, 佐藤弘基¹, 田中彰², 前田一行³, 木村真³, 安藤直子^{1,2} (東洋大院理工学¹ 東洋大院工学² 名大院生命農学³)

TRI101 とはトリコテセン生合成酵素の一つで、トリコテセン C-3 位をアセチル化し毒性を下げることが知られている。よって TRI101 はトリコテセン生産菌の自己耐性に係る解毒酵素であると示唆されているが、動物細胞の *Tri101* 遺伝子形質転換体ではトリコテセン耐性の獲得に成功した例がない。これは、細胞内で C-3 位デアセチラーゼが拮抗的に働いてしまっているためだと考えられる。そこで本研究では、*Tri101* 遺伝子を動物細胞に形質転換し、選抜を工夫することで TRI101 の高活性株を得ることを試みた。

リポフェクション法により、マウス乳癌細胞由来 FM3A へ *Tri101* 遺伝子を導入した。その際、デキタメタゾン誘導性プロモーターの下流に *Tri101* 遺伝子を組み込みプラスミドサイジン S(BS)耐性遺伝子 BSD をマーカー遺伝子としたプラスミドを使用した。BS と isotrichodermol(ITDmol)を用いてセレクションを行い、単クローン化をし、得られた細胞株の磨砕物の活性測定を行った。その中で最も高い活性をもつ G3 を使用し、*in vivo* 活性で ITDmol が変換しているか確認したところ、そのアセチル化体である isotrichoermin(ITD)にほぼすべて変換していた。また、WT と G3 に ITDmol を 0, 0.1, 0.2, 0.4, 1.0, 2.0 $\mu\text{g/ml}$ と振って細胞に直接添加した結果、WT は 0.2 $\mu\text{g/ml}$ で完全に死滅したが、G3 は 0.4 $\mu\text{g/ml}$ まで細胞の生存が確認できた。その後、MTT assay で IC_{50} を求めた結果、同様に WT との差が確認できた。以上より、動物細胞でも耐性機構の獲得が示唆された。

Protective effects of TRI101, trichothecene 3-O-acetyltransferase, in animal cells

Nozomu Tanaka¹, Hiroki Sato¹, Akira Tanaka², Kazuyuki Maeda³, Makoto Kimura³, Naoko Takahashi-Ando^{1,2}

(¹Graduate. Sch. Sci. Tech., ²Graduate. Sch. Tech., Toyo Univ., ³Graduate Sch. Bioagric. Sci., Nagoya Univ.)

P-58

トリコテセンC-4位アセチル化酵素TRI7の安定性の検証と発現解析

杉江雄太¹, 島村拓実¹, 小川雅義¹, 田中彰², 木村真³, 安藤直子^{1,2}

(¹東洋大院理工学, ²東洋大院工学, ³名大院生命農学)

トリコテセン系カビ毒の生合成において TRI7 は C-4 位アセチル化酵素と推測されてきたが、異種発現も成功しておらず、いまだ不明な点が多い。C-4 位アセチル化酵素を持たない *Fusarium graminearum* の deoxynivalenol 生産株 JCM 9873 株に *Tri7* 遺伝子を導入すると、C-4 位アセチル化活性が細胞抽出液から検出される。しかし、精製の過程において TRI7 は 25°C でも短時間で活性を失う不安定な酵素であることがわかった。そこで本研究では、これまで最も活性がよく観察できた nivalenol 生産菌 MAFF 111233 株 $\Delta Tri8$ 株を用い、その菌糸磨砕物から TRI7 粗酵素を取得し、安定な保存法について検証を行った。その結果、粗酵素の調製作業の工程を氷上で最短時間で行い、粗酵素に glycerol 50%, 0.1%の BSA を添加し、-30°C、または-80°C で保存することで、劇的に安定性が高まることが示された。また、時系列を追って菌体から検出される粗酵素の活性を調べたところ、5~6 日で活性が最も高くなり、それ以降は低下していくことがわかった。そのため、TRI7 は生合成の比較的早い期間に働くことが示唆された。また、wild type, その $\Delta Tri8$ 株, $\Delta Tri13$ 株を培養し、その粗酵素の C-4 位アセチル化活性を調べたところ、トリコテセン脱アセチル化酵素遺伝子の破壊された $\Delta Tri8$ 株が最も活性が高いのは予想通りであったが、C-4 位水酸化酵素遺伝子の破壊された $\Delta Tri13$ 株は wild type に比べ、はるかに活性が低いことがわかった。よって TRI13 が菌体に存在するかどうかの有無は TRI7 酵素の活性に影響を与えることが示唆された。

Expression and stability of TRI7, trichothecene C-4 acetyltransferase

Yuta Sugie¹, Takumi Shimamura¹, Masayoshi Ogawa¹, Akira Tanaka², Makoto Kimura³, Naoko Takahashi-Ando^{1,2}

(¹Grad. School Sci. Eng., Toyo Univ., ²Grad. School Eng., Toyo Univ., ³Grad. School Bioagr. Sci., Nagoya Univ.)

P-59

非天然型新規 A 型トリコテセンの生産方法と毒性評価

佐藤弘基¹, 足立健太郎², 田中彰³, 前田一行⁴, 相川俊一⁵, 吉田泰彦^{1, 2, 3, 5}, 木村真⁴, 安藤直子^{1, 2, 3, 5}
(¹東洋大院理工学, ²東洋大理工学, ³東洋大院工学, ⁴名大院生命農学, ⁵東洋大工技研)

【概要】トリコテセンとは *Fusarium* 属等の糸状菌が生産するカビ毒であり, その構造から A~D 型に分類される。ヒトが摂取すると中毒症状を引き起こす一方で, 薬剤として期待されているものも存在する。D 型トリコテセンである verrucarins は癌細胞の成長抑制のリード化合物として知られている。そこで, 異種の *Fusarium* 属菌の生合成経路を利用することで, A 型の新規トリコテセンを数種類生産し, 抗癌剤や免疫抑制剤のリード化合物としての可能性を評価した。我々の先行研究では, *Fusarium graminearum* Δ*Tri11* 株を培養し, 生産した 7-hydroxyisotrichodermin (7-HIT) を *F. sporotrichioides* Δ*Tri5* 株に feeding することで, 非天然型の 7-hydroxy T-2 toxin (7-H T-2 toxin) を生産させることに成功した。【操作】本研究では, T-2 toxin の C-4 位脱アセチル化を行う土壌微生物から粗酵素を調製し, 7-H T-2 toxin と反応させ, 7-hydroxy HT-2 toxin (7-H HT-2 toxin) を生産させた。さらに, 7-H T-2 toxin と 7-H HT-2 toxin に C-3 位アセチル化酵素 TRI101 とアセチル CoA を添加することで, 3-acetyl-7-H T-2 toxin (3-A 7-H T-2 toxin) と 3-acetyl-7-H HT-2 toxin (3-A 7-H HT-2 toxin) に変換した。これらの化合物を HPLC で単離し, LC-MS/MS で同定, 確認したのち, 7-H HT-2 toxin については NMR により構造決定を行った。また, HL-60 細胞を用いた MTT assay にて毒性評価, ならびに DNA ladder assay を行った。【結果】生産したトリコテセンと既知のトリコテセンの毒性比較を行ったところ, 毒性は T-2 toxin > 7-H T-2 toxin > 7-H HT-2 toxin > 3-A 7-H T-2 toxin > 3-A 7-H HT-2 toxin > deoxynivalenol > 8-HIT > 7-HIT の順となった。また, DNA ladder assay もほぼ同様の結果となり, 毒性が apoptosis 誘導によるものであることが示唆された。

Production and toxicity evaluation of novel A-type trichothecenes

Hiroki Sato¹, Kentarou Adachi², Akira Tanaka³, Kazuyuki Maeda⁴, Shunichi Aikawa⁵, Yasuhiko Yoshida^{1,2,3,5}, Makoto Kimura⁴, Naoko Takahashi-Ando^{1,2,3,5} (¹Grad. Sch. Sci. Eng., Toyo Univ., ²Dept. Sci. Eng., Toyo Univ., ³Grad. Sch. Eng., Toyo Univ., ⁴Grad. Sch. Bioagr. Sci. Nagoya Univ., ⁵Res. Inst. Indust. Tech. Toyo Univ.)

P-60

麹菌における gamma-glutamylcysteine synthetase オルソログのグルタチオン合成に対する影響

服部領太, 多田功生, 森田(松下)真由美, 鈴木聡, 楠本憲一 (農研機構・食品研究部門)

Aspergillus oryzae は我が国の伝統的発酵食品の製造や医薬・食品用酵素製造において使用される有用糸状菌である。我々は, *A. oryzae* が培養環境中で受ける様々なストレスと, 細胞内物質によるストレス緩和機構の関係を考える上で, グルタチオンに注目している。グルタチオンはチオール基を有するトリペプチドで, あらゆる生物の細胞に普遍的に存在する物質である。その生体内での生理的役割は酸化ストレス, 重金属ストレス等の様々なストレス耐性に関与しており, 細胞内グルタチオン量は菌体の成長に影響を及ぼすと考えられる。これまでに, *A. oryzae* の培養中において, グルタチオンが一過的に増加の後, 減少に転じることを明らかにした。グルタチオンは, グルタミン酸とシステインから gamma-glutamylcysteine を経てグリシンが付加されて合成される。その際, 2 種類の酵素 (gamma-glutamylcysteine synthetases, glutathione synthetases) が合成を担っていると考えられている。本研究では, *A. oryzae* に存在するグルタチオン合成酵素 gamma-glutamylcysteine synthetase 遺伝子のオルソログである *Aogsh1* のグルタチオン合成に対する影響を解明することを目的とした。同遺伝子上流に *thiA* プロモーターをつけた遺伝子発現を制御できる遺伝子改変株を取得した。*Aogsh1* の発現量の変化が *A. oryzae* 細胞内におけるグルタチオン量および生育に及ぼすことを示唆する結果が得られたため, その詳細なデータを取得中である。

Gamma-glutamylcysteine synthetase ortholog in *Aspergillus oryzae* effects glutathione synthesis.

Ryota Hattori, Sawaki Tada, Mayumi Matsushita-Morita, Satoshi Suzuki, Ken-Ichi Kusumoto

(Food Res. Inst., NARO)

P-61

麹菌のホモ 6 量体を形成する D-乳酸脱水素酵素 (D-LDH) のアロステリック特性

渡部昭, 佐藤陽子, 五味勝也 (東北大院農・生物産業創成)

【目的】 乳酸脱水素酵素 (LDH) は, 細菌由来の一部の L-LDH がホモ 4 量体構造を形成し, フルクトース 1,6-ビスリン酸 (FBP) によるアロステリック制御を受けることがこれまで報告されているが, D-LDH では一部の酵素を除いて解析はほとんど行われていない。そこで我々は, 先に報告した麹菌 *Aspergillus oryzae* の D-LDH がホモ 6 量体であると推定された(1)ため, そのアロステリック特性の有無について解析した。

【結果と考察】 本酵素の活性は 1 mM FBP の存在下で約 130%まで賦活化された。また, FBP によるアロステリック制御を受ける *Thermus aquaticus* や *Lactobacillus casei* の L-LDH がクエン酸等によって活性化されることから本酵素についても解析したところ, 1 mM クエン酸の存在下で約 160%まで活性が上昇した。このように, 真菌類由来の D-LDH が細菌のアロステリック制御型 L-LDH のエフェクター因子である FBP やクエン酸のような非基質制御分子によって活性化される例は初めてであり, さらに詳細に解析した結果を報告する。

(1) 渡部ら, 2016 年度日本農芸化学会大会講演要旨集, p. 53

Allosteric function of homo-hexameric D-lactate dehydrogenase from *Aspergillus oryzae*

Akira Watanabe, Yoko Satoh, Katsuya Gomi

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

P-62

種々の樹木成分で生育させた白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* の細胞外プロテオーム解析

糀谷紗季¹, 鈴木梨央¹, 酒井杏匠¹, 高須賀太一², 堀千明², 志水元亨¹, 加藤雅士¹ (¹名城大・農, ²北大・農)

【目的】 環境中の植物バイオマスに含まれる多糖およびリグリンの分解速度および効率が高まれば, バイオ燃料生産やバイオファイナリーなどの産業分野に大きく貢献できる。本研究では強力なセルロース, ヘミセルロース分解能だけでなくリグリン分解能を有しゲノム情報が公開されている白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* を対象に, ヘミセルロースおよび脱脂木粉を唯一の炭素源として培地に添加し生育させた際に生産される細胞外タンパク質をプロテオーム解析により網羅的に解析した。

【方法・結果】 白色腐朽菌 *P. chrysosporium* を所定時間培養後, 菌体をろ別した。得られた培養ろ液から TCA/アセトン沈殿により細胞外タンパク質を回収し, トリプシン処理後に LC-MS/MS にてタンパク質を同定した。脱脂木粉のみを炭素源にして *P. chrysosporium* を培養した場合, Glycoside Hydrolase family (GH) に属する加水分解酵素のほかに, Auxiliary Activities (AA) および Carbohydrate Esterase family (CE) に属する酵素やリパーゼなど 1,165 種のタンパク質が同定された。その中でも 4 つの isozyme が同定された CE1 および 5 つの isozyme が検出された GH10 の発現量が多かった。特に, 同定されたすべてのタンパク質の中で CE1 に属する 3 つの isozyme の発現量が上位 3 つを占めていた。GH5, GH16, AA9 に属する酵素のように 10 種以上の isozyme が検出されたものもあれば, GH1, GH2, GH6, GH11 に属する酵素のように 1 種類のみ同定されたものも存在した。また, 機能が分かっている既知の酵素とアミノ酸配列レベルで全く相同性を有さないシグナル配列を持つ機能未知タンパク質も多数生産されていた。

Secretome analysis of white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* grown on wood-meal.

Saki Kojiya¹, Rio Suzuki¹, Kiyota Sakai¹, Taichi Takasuka², Chiaki Hori², Motoyuki Shimizu¹, Masashi Kato¹
(¹Univ. of Meijo, ²Hokkaido Univ.)

P-63

新規 d-type トリコテセンの生産条件の検討と構造解析

松井宏介¹, 新海航輝², 相川俊一³, 吉田泰彦^{1,2}, 木村真⁴, 安藤直子^{1,2}

(東洋大院理工学¹, 東洋大理工学², 東洋大工技研³, 名大院生命農学⁴)

[目的] *Spicellum roseum* は桃色かび立枯病の原因菌として知られている。この菌体は、赤かび病菌の原因菌である *Fusarium graminearum* が t-type トリコテセンを生産するのとは異なり、トリコジェンの C-3 位が酸素付加を受けずに環化して d-type トリコテセンを生産する。*S. roseum* JCM 8964 株は 8-deoxytrichothecin (8-deTCN)を生産するが、本研究室ではナカライ製酵母エキス(Lot No. M8H5131)を使用した培地でのみ、8-deTCN の類縁体である新奇なトリコテセンを生産することを見出した。本研究では、この新規トリコテセンを 8-deoxytrichothecin-X (8-deTCN-X)と命名し、大量精製し、同定することを目的とした。**[方法]** *S. roseum* JCM8964 株を YS-60 培地で 4 日間振とう培養した。酢酸エチルで抽出を行い、TLC にアプライし、NBP-TEPA 法で呈色し、トリコテセンの生産を確認した。その抽出物から分取クロマトグラフィー-purif Rp-2 で 8-deTCN の単離を行い、さらに C₁₈ カラムをつけた HPLC (195 nm, 254 nm) にアプライした。8-deTCN 以外のピークが検出された場合は、そのピークを HPLC によって分取した。その精製物は 8-deTCN とともに LC-MS と NMR にアプライし、構造推定を試みた。**[結果]** 菌体培養液の酢酸エチル抽出物を TLC にアプライしたところ、8-deTCN と思われるスポットを観測した。その単離精製物を HPLC にアプライしたところ、異なる溶出時間にピークが観察され、前者は後者に比べ、254 nm での吸収が強く、195 nm での吸収は弱かった。これらの物質を LC-MS で解析したところ後者は 8-deTCN であり、前者はモノアイソトピック質量が 8-deTCN よりも 2 少なく、MS/MS パターンから、8-deTCN の A 環の 7, 8 位の部分に二重結合が入ったものと推定された。そこで、この物質を NMR 解析に供し、同定を行った。

Production and structure analysis of the novel d-type trichothecene

Kosuke Matsui¹, Koki Shinkai², Shunichi Aikawa³, Yasuhiko Yosida^{1,2}, Makoto Kimura, Naoko Takahashi-Ando^{1,2}

(¹Grad. Sch. Sci. Eng., Toyo Univ., ²Dept. Sci. Eng., Toyo Univ., ³Res. Inst. Indust. Tech. Toyo Univ., ⁴Grad. Sch.

Bioagr. Sci. Nagoya Univ.)

P-64

黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* の酸性プロテアーゼ遺伝子破壊株および高発現株の解析

瀬戸口翔^{1,3}, 水谷治², 高橋徹², 山田修², 二神泰基¹, 玉置尚徳¹, 岩井謙一³, 高瀬良和³

(¹鹿大院・連農, ²酒総研, ³霧島酒造)

[目的] 黒麹菌 *A. luchuensis* が生産する酸性プロテアーゼは焼酎もろみの酸性条件下でも作用することから焼酎香味への影響も大きいと考えられる。本研究では酸性プロテアーゼが焼酎麹菌の育種指標として有望かを調べるために *A. luchuensis* が持つ酸性プロテアーゼ遺伝子の破壊株および高発現株を作製し、その解析を行った。

[方法・結果] 黄麹菌で報告されているアスパラギン酸プロテアーゼ遺伝子 *pepA* と相同性の高い遺伝子が黒麹菌 *A. luchuensis* RIB2604 のゲノム上からも見出されたことから、本研究では *pepA* をターゲットとした。はじめに、*A. luchuensis* RIB2604 および *A. luchuensis* RIB2604 Δ *ligD* を親株としてアグロバクテリウム法により *pepA* 破壊株および高発現株を作製した。*pepA* 高発現には *glaA142* プロモーターおよび *agdA* ターミネーターを用いた。次に、得られた破壊株および高発現株を用いてカゼインプレートを用いたハロー形成能試験とフラスコ製麹試験を行った。その結果、カゼインプレートではハロー形成能と増殖速度に株間の差が確認され、活性が高い株ほどハロー形成能と増殖能が高くなる傾向であった。フラスコ製麹試験で得られた米麹の酸性プロテアーゼ活性を測定した結果、*pepA* 破壊株は親株の 50%程度まで活性が低下し、*pepA* 高発現株は親株の 24 倍という非常に高い活性を示した。これらの結果より、*pepA* は黒麹菌においても酸性プロテアーゼの生産に大きく関連していることが示唆された。

Characterization of the deletion and overexpression mutants of acid protease gene in *Aspergillus luchuensis*.

Sho Setoguchi^{1,3}, Osamu Mizutani², Toru Takahashi², Osamu Yamada², Taiki Futagami¹, Hisanori Tamaki¹, Kenichi

Iwai³, Yoshikazu Takase³ (¹United. Grad. Sch. Agric. Sci., Kagoshima Univ., ²NRIB, ³Kirishima Shuzou Co.)

P-65

糸状菌におけるエチレン応答性人工シグナル伝達系の創製と応用

中山真由美^{1,2}, 古川健太郎³, 吉見啓¹, 阿部敬悦^{1,2}

(¹東北大・未来研, ²東北大・院農・生物産業創成, ³新潟大)

植物のシロイヌナズナにおいてエチレンセンサーとして機能する AtETR1 はヒスチジンキナーゼ (HK) 活性を持ち, エチレンによって HK 活性が制御されている。これまでに, この植物由来のエチレン結合ドメイン (EBD) と, 出芽酵母唯一の HK である ScSln1p, 糸状菌 *Aspergillus nidulans* の浸透圧ストレスに応答する HK である AnTcsB および主要な HK である AnNikA のヒスチジンキナーゼドメイン (HKD) と融合した HK 分子を設計し, 出芽酵母 Sln1p 温度感受性株において HK の機能相補性およびエチレン応答性を確認している。

本研究では, 出芽酵母で HK 機能相補性およびエチレン応答性を確認できた EBD 融合 HK 分子について, 糸状菌においても発現系を構築し, HK 機能相補性およびエチレン応答性の確認を行うことにより, エチレン応答性の新規シグナル伝達系を創製し応用することを目的とした。

糸状菌での EBD 融合 HK 分子のエチレン応答性を確認するため, 糸状菌 *A. nidulans nika* 破壊株において, 糸状菌 HOG 経路の標的である *Angf1B* 遺伝子のプロモーターに核移行型の *EGFP-LacI-NLS* 遺伝子を連結した蛍光レポーター株を作製し, 各種 EBD 融合 HK 分子を発現させた。これらの EBD 融合 HK 分子導入株では, エチレンに応答して核に EGFP が局在することが確認され, 糸状菌での EBD 融合 HK 分子のエチレン応答性が確認できた。糸状菌においてエチレン応答性の新規シグナル伝達系を構築できたことから, 実際にエチレン制御による転写因子発現システムを構築し, モデル実験としてキシラナーゼ等の酵素生産の応用を試みている。

Development of ethylene-responsive signaling system in filamentous fungi and its application.

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

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

P-66

糸状菌 *Trichoderma reesei* における新規 pH 依存的セルラーゼ生産制御因子の解析

平沢大樹, 志田洋介, 小笠原渉 (長岡技科大・生物)

糸状菌 *Trichoderma reesei* は, セルラーゼ高生産菌として知られている。その有用性から, 突然変異導入により更なる高生産変異株が取得され, 日本においても世界的標準株 QM9414 株を親株として高生産変異株 PC-3-7 株まで複数の変異株が取得されている。これまでに高生産化に寄与する因子の同定を進めてきた。特に, セルラーゼ生産性への環境 pH の影響という観点から, 糸状菌は pH シグナル伝達経路を保持しており, Pal タンパク質群により pH 応答転写調節因子 PacC が活性化され, 様々な遺伝子の発現制御を行っていることが知られている。前々年度大会にて, QM9414 株と PC-3-7 株では, pH シグナル伝達経路遺伝子群に一塩基多型 (SNP) が存在しないにも関わらず, pH 依存的なセルラーゼ生産挙動が異なることを報告した。その結果, QM9414 株では pH が増加するにつれて, セルラーゼ生産性が減少したのに対し, PC-3-7 株ではわずかに増加していた。これは QM9419 株から PC-3-7 株に至る変異株間のアミノ酸置換を伴う 46 個の SNPs の影響であると考えられた。そこで本研究では, この新規 pH 依存的セルラーゼ生産制御因子の同定を試みた。

T. reesei 日本型変異株を種々の pH 条件下で培養を行い, セルラーゼ生産への影響を解析した。その結果, QM9414 株より作出された変異株 N-25 株は高 pH 条件下でのセルラーゼ生産能を獲得していたが, 低 pH 条件下での生産能が劇的に減少していることが明らかとなった。このことから, pH 依存的なセルラーゼ生産を引き起こす原因遺伝子を 9 遺伝子にまで選抜した。これら遺伝子の欠損株を構築し, pH 応答性を評価したところ, 低 pH におけるセルラーゼ生産に重要な役割を持つ因子が明らかとなった。この因子を欠損させると, 低 pH でのセルラーゼ活性は劇的に減少したが, セルラーゼ遺伝子の転写は親株と同程度行われていた。セルラーゼの分泌を確認したところ, 分泌される時間は遅延していたが, 単位時間当たりの分泌量に大きな違いはなかった。以上のことから, 本因子は低 pH 条件下において, セルラーゼの分泌に関与していることが推測された。

Analysis of new pH-dependent cellulase producing regulation factor in filamentous fungi *Trichoderma reesei*.

Hiroki Hirasawa, Yosuke Shida, Wataru Ogasawara (Nagaoka univ. of tech., dept. of bioeng.)

P-67

Trichoderma reesei における推定トランセプターCRT1 の C 末端テール領域の解析

吉澤和将, 谷口大樹, 古川隆紀, 志田洋介, 小笠原渉 (長岡技科大・生物)

セルラーゼ高生産菌 *Trichoderma reesei* はセルロースおよびその誘導体の存在にตอบสนองしてセルラーゼを生産する。しかしながら, *T. reesei* におけるこれら誘導物質の認識機構は明らかになっていない。近年, 糸状菌において誘導物質である糖の取り込みや認識を行うトランセプターと呼ばれる膜タンパク質がセルラーゼの生産に関与することが報告されてきた。*T. reesei* においては, セルラーゼと同調的に高発現し, セルラーゼ生産に必須である推定トランセプターCRT1 が見出されている。CRT1 は 12 回の膜貫通領域を有する典型的な MFS タイプのトランスポーターとされていたが, GFP を用いた局在解析により C 末端の細胞内テール領域が膜貫通領域から遊離していることが示唆され, セルラーゼ生産のシグナル伝達に関与していることが考えられた。本研究では CRT1 のシグナル伝達メカニズムを解明するため, CRT1 の細胞内 C 末端テール領域がセルラーゼ生産に与える影響を解析した。そこで, 異なる長さの C 末端テール領域を有する CRT1 発現株を構築し, セルロース培養を行った。その結果, C 末端テール領域全長欠損株 (残基数 1-466) においてセルラーゼ生産性が欠損し, 他の CRT1 改変株 (残基数 1-472, 1-486, 1-498) ではセルラーゼ生産性を保持していた。この結果から, CRT1 の細胞内 C 末端テール領域の 466 番目から 472 番目の領域がセルラーゼ生産性に関与していることが示唆された。現在, CRT1 の細胞内局在性について知見を得るため, GFP 融合型 CRT1 改変株を構築し, セルラーゼ誘導条件における局在性の解析を行っている。

Functional analysis of intracellular C terminal-tail of putative tranceptor CRT1 in *Trichoderma reesei*

Kazumasa Yoshizawa, Hiroki Taniguchi, Takanori Furukawa, Yosuke Shida, Wataru Ogasawara

(Nagaoka Univ. of Tech)

P-68

Pleurotus salmoneostramineus L. Vass NBRC31859 株の Whole genome shotgun 配列決定

福田泰久, 大沼広宜, 白坂憲章 (近畿大・農応生化)

「きのこ」とは, 肉眼で観察が可能な大型子実体を形成することを特徴とする微生物群の総称であり, 子実体の形態学を基盤とした分類が詳細に行われてきた。しかしながら, 子実体形成機構, 有用酵素の探索, 生理活性物質の探索などの生化学的な研究に関して, 他の糸状菌と比較すると未開拓な部分が多い。その原因の一つとして, 各種きのこ類のゲノムデータベースの不足があげられる。

Pleurotus salmoneostramineus L. Vass (トキイロヒラタケ) は, 鮮やかなピンク色の子実体を形成する担子菌類に分類され, その商品的価値に関わる本色素に関する研究が現在までに行われてきた。本色素は, 分子量約 24.5kDa の色素タンパク質であり, 3H-indol-3-one, ガラクトース糖鎖, 3 種類の金属 (Zn, Fe, Cu) で構成されていることが報告されている。しかしながら, 構成タンパク質の遺伝子配列や 3H-indol-3-one の生合成過程については未だ未解明である。

本演題では, トキイロヒラタケ NBRC31859 株の全ゲノム解析を目標とし, Whole genome shotgun 配列決定について報告する。また, 本解析データを基にしたピンク色素タンパクの遺伝子配列の決定について報告する。

NextSeq500 (Illumina) で得られたリード配列のアセンブリーには CLC Genomics Workbench ver.9.0 (CLC bio) を用い, Contig 数 26,934 本, 総 Contig 長 65,897,893 bp が得られた。MiGAP (migap.org) によるアノテーション付加を行ったところ, CDS 配列 (24,507), tRNA 配列 (338), rRNA (8) それぞれの候補配列が明らかになった。

本研究は, 【私立大学戦略的研究基盤形成支援事業 (S1512004)】 の助成を受け行われた。

First draft genome sequence of Basidiomycetous fungi *Pleurotus salmoneostramineus*

Yasuhisa Fukuta, Hiroki Onuma, Norifumi Shirasaka

(Kindai, Univ. Fac. of Agri.)

P-69

麹菌におけるカーボンカタボライト抑制に関わる脱ユビキチン化酵素 CreB の細胞内局在と安定性

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遺伝子を有するものの、その発現はグルコースによるカーボンカタボライト抑制 (CCR) を受ける。モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* において CCR 制御因子として、脱ユビキチン化酵素 CreB が同定されている。これまでに麹菌において *creB* 遺伝子を破壊した結果、CCR が解除されることを明らかにしたものの、CreB がどのように CCR 制御に関与するかは未だ不明である。そこで本研究では、CreB の細胞内局在及び安定性の解析を通じて、CreB による CCR の制御機構を解明することを目指した。

C 末端に GFP を融合させた CreB を *creB* 自身のプロモーターで発現させ、蛍光顕微鏡を用いてグルコースまたはマルトースを含む培地における CreB の局在を観察した。その結果、CreB は炭素源によらず常に細胞質に局在していることが観察された。次に、C 末端に FLAG タグを融合させた CreB 発現株をグルコースまたはマルトースを含む最小培地で培養し、CreB のタンパク質を解析したところ、興味深いことに CreB はマルトース培地よりもグルコース培地でタンパク質量が減少した。さらに、*A. nidulans* において CreB は WD40 リピードタンパク質の CreC と相互作用していることが報告されているが、麹菌においても *creC* 遺伝子を破壊すると CCR が解除されることが観察された。そこで、CreC 欠損条件下において CreB の局在及びタンパク質量を解析した結果、CreB の局在変化は観察されなかったものの、タンパク質量が著しく減少した。以上の結果から、CreB は細胞質において機能し、CreC によって安定化されることが示唆された。

Subcellular localization and stability of deubiquitinase CreB involved in carbon catabolite repression in *Aspergillus oryzae*

Sakurako Ichinose, Mizuki Tanaka, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi

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

P-70

麹菌のエノラーゼ遺伝子 *enoA* の選択的転写開始に由来する 5' 非翻訳領域が遺伝子発現制御に及ぼす影響

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* における複数の解糖系酵素遺伝子の転写開始点 (TSS) は、炭素源の違いによって変位する (第 15 回糸状菌分子生物学コンファレンス)。特に、エノラーゼ遺伝子 *enoA* とアルドラーゼ遺伝子 *fbaA* は、解糖で代謝される炭素源ではプロモーター下流側の TSS (dTSS)、糖新生で代謝される炭素源ではプロモーター上流側の TSS (uTSS) が選択され、2 ヶ所の TSS が炭素源の違いに応じて厳密に使い分けられる。また、*enoA* と *fbaA* が uTSS を選択した場合の 5' 非翻訳領域 (5' UTR) では、それぞれ 440、227 bp の dTSS を含む長い配列がイントロンとしてスプライシングされる。このような選択的転写開始に由来する 5' UTR の変化は、遺伝子発現に重大な影響を及ぼす可能性が考えられる。本研究ではその影響について検討するため、*enoA* プロモーター (*P_{enoA}*) を対象とした解析を行った。はじめに、uTSS から転写された際の 5' UTR 内イントロンの重要性を評価するため、イントロンを欠失させた *P_{enoA}* (*P_{enoA}Δi*) のレポーターアッセイと、条件特異的 *enoA* 発現株に *P_{enoA}Δi* 制御下で *enoA* を発現させた株の生育評価を行った。その結果、プロモーター活性の低下と生育の悪化が、グルコースと酢酸の両培養条件で認められた。また、uTSS 及び dTSS 由来の 5' UTR の翻訳効率を評価するため、それぞれの 5' UTR を他方の 5' UTR で置換した *P_{enoA}* のレポーターアッセイを行った結果、5' UTR を置換したプロモーター活性が有意に変化した。以上より、*enoA* の TSS 変位に伴う 5' UTR 内イントロンの出現や 5' UTR 配列の変化は、遺伝子発現制御に重要であることが示唆された。

Effect of 5' untranslated regions derived from alternative transcription initiation on regulation of gene expression level of the enolase gene (*enoA*) 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-71 (O-5)

誘導物質依存的リン酸化による麴菌転写因子 XlnR の活性制御

浅井恒滋, 塩谷友佑, 杉本賢吾, 金丸京子, 木村真, 小林哲夫 (名大院・生命農学)

XlnR は *Aspergillus niger* で最初に発見された転写因子であり, D-キシロースに応答して, キシラン分解酵素, セルロース分解酵素, ペントース代謝系酵素をコードする遺伝子群の転写を特異的に活性化する。我々は *A. oryzae* での解析により, XlnR はリン酸化タンパク質として存在し D-キシロースに応答して付加的なリン酸化を受けること, この付加的なリン酸化は可逆的であり, D-キシロース除去により非誘導時のリン酸化レベルに復帰することなどを明らかにしてきた。以上から, 可逆的リン酸化が XlnR 活性を制御するという作業仮説をたて, その証明のために前回の本コンファレンスでは, XlnR の推定リン酸化部位 6 カ所のアミノ酸置換がキシラナーゼ生産と遺伝子発現に与える影響を解析し, S556A で生産能・遺伝子発現が顕著に, S562A でわずかに低下するが消失には至らないことを示した。

本研究では, S556A 置換が XlnR の安定性や核移行に与える影響を解析するとともに, S556A/S562A および S556E/S562E 二重置換体を作製し, これらのキシラナーゼ生産・遺伝子発現誘導能, ならびに XlnR のリン酸化レベルを解析した。

S556A 置換体の安定性, 核移行ともに野生型と同等であった。これは核内での XlnR の DNA 結合や構造変化, 未知の因子との相互作用などにリン酸化が関与していることを示唆する。S556A 置換体では完全なキシラナーゼ誘導能の欠損には至らなかったため, S556A/S562A および S556E/S562E 二重置換体について解析した結果, キシラナーゼ生産と *xynF1*, *xynG2* の発現が完全に消失した。また, S556A/S562A は解析中であるが S556E/S562E では D-キシロース依存的リン酸化も完全に消失した。これらはリン酸化が XlnR の活性化に必要であるという作業仮説を支持している。二重置換体の安定性や核移行, DNA 結合について解析し, あわせて報告する予定である。

Regulation of XlnR activity by inducer-dependent phosphorylation in *Aspergillus oryzae*.

Koji Asai, Yusuke Shioya, Kengo Sugimoto, Kyoko Kanamaru, Makoto Kimura, and Tetsuo Kobayashi (Grad. Sch.

Bioagric. Sci., Nagoya Univ.)

P-72

黄麴菌 *Aspergillus oryzae* pepstatin insensitive protease のプロモーター領域の解析

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

【目的】pepstatin insensitive protease (PIP)は酸性領域で作用するエンドペプチダーゼであるが, アスパルティックプロテアーゼの特異的阻害剤であるペプスタチンによっては阻害を受けず, グルタミン酸を活性中心に持つという特徴がある。我々は, *A. oryzae* RIB40 が PIP の活性中心モチーフを保存するタンパク質をコードする 3 つの遺伝子 *pipA*, *pipB*, *pipC* を保有することを明らかとした。PipA, PipB, PipC はそれぞれ異なる基質特異性を持つこと, PipA, PipB は培地中のタンパク質によって転写が誘導されることを報告した(竹内ら, 2013)が, その生理学的役割や転写制御機構は解明されていない。本研究では *A. oryzae* の PIP において, その遺伝子上流域における転写アクチベーター, あるいはリプレッサーの結合領域をアミラーゼ三重破壊株を用いたレポーターアッセイ法で同定することを目的とした。

【方法・結果】アミラーゼ欠損 *A. oryzae* を宿主に, *pipA*, *pipB*, *pipC* の各上流域とアミラーゼ遺伝子を連結したカセットを挿入し, アミラーゼ発現量を観察するレポーターアッセイを行った。上流域を段階的に欠損させた株間でのアミラーゼ発現量をハロアッセイ及び吸光度測定により測定し, 比較した。その結果, *pipA* の上流-2000 bp から-1000 bp の間を欠損させたプロモーターでは発現量が著しく減少した。一方で, *pipC* のプロモーターは同様の欠損により発現量が著しく増加した。これにより, 欠損させた領域に転写因子結合領域が含まれることが示唆された。上流域の長さを変えた株を新たに作製し, 推定された結合領域について報告する。

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

Analyze of promoter region in *Aspergillus oryzae* pepstatin insensitive protease

Momoko SEKI, Marii TAKEUCHI, Ayako OKAMOTO, Haruka ABO, Hiroshi MAEDA, Michio TAKEUCHI, Yohei YAMAGATA

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

P-73

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

久下貴紀, 山崎周平, 前田浩, 竹内道雄, 山形洋平 (農工大院・農)

A. oryzae RIB40 が有するプロテアーゼ *pepO* の発現量は, 酸性条件下で分泌されるプロテアーゼの中で比較的高く, *pepO* 上流には *cis*-element が存在すると考えられる。我々は *amylase* 三重破壊株を宿主に用い, α -*amylase* を用いたレポーターアッセイ法により *pepO* の ORF 上流 1,200 bp から 1,300 bp に転写活性化因子が結合する塩基配列が存在することを報告した。そこで The JASPAR database より推定された窒素代謝に關与する転写因子結合モチーフを考慮し *pepO* 上流 1,200 bp から 1,300 bp を段階的に欠失させた塩基配列と α -*amylase* 遺伝子を連結したプラスミドを作成し, *amylase* 遺伝子三重破壊株に導入した。獲得した α -*amylase* 発現株について, ヨウ素デンプン反応を利用したハロアッセイを行ったところ, ORF 上流 1,292 bp から 1,300 bp に存在する推定上のモチーフを欠失させてもハロを形成する傾向が見られ, このことから既知の窒素代謝に關する転写因子結合モチーフとは異なる配列が *pepO* の発現に關わっていることが示唆された。

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。

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

Takaki Kuge, Shuhei Yamazaki, Hiroshi Maeda, Michio Takeuchi, Youhei Yamagata

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

P-74 (O-6)

Aspergillus aculeatus セルラーゼ誘導発現機構への *sepM* の関与

津村亮輔, 谷修治, 炭谷順一, 川口剛司 (阪府大院・生環科)

【目的】*Aspergillus aculeatus* においてセルラーゼ遺伝子の発現は, 構成的に生産されるセルラーゼによる基質からのインデューサーの遊離を起点として誘導されると考えられるが, この分子機構は不明な点が多い。本研究では, セルラーゼ生産調節に關わる新規制御因子の同定とその機能解析を目的とした。【方法・結果】主要セルラーゼ FIII-*avicelase* (*cbhI*) 遺伝子のプロモーター制御下で *orotidine-5'*-*monophosphate decarboxylase* 及び β -*glucuronidase* の遺伝子をレポーターとして同時に発現する宿主を用いて新規因子を探索した。アグロバクテリウム形質転換法 (AMT) により宿主を形質転換し, 構築した約 10,000 株の変異株ライブラリから, 5-fluoroorotic acid 耐性を獲得及び GUS 活性・セルロース資化能が低下した株を選択し, 一次候補株とした。一次候補株から, T-DNA が 1 コピーで挿入されていた菌株について qRT-PCR 解析を行い, *cbhI* 転写量が宿主に比べ減少していた株を最終候補株とした。最終候補株について, inverse PCR により T-DNA 周辺配列を増幅し, シークエンス解析により T-DNA 挿入位置を特定した。T-DNA が *Schizosaccharomyces pombe cdc14* の ortholog である *sepM* 遺伝子の挿入されていたことから, *cbhI* 発現量の減少が *sepM* の機能低下に寄与していると考え, 相同組み換え法を用いて *sepM* 単一破壊株を作製した。その結果, *sepM* 単一破壊株において *cbhI* 発現量がコントロール株に比べ三分の一に低下していた。さらなる解析の結果, キシランやキシロースを誘導基質とした時には, キシラナーゼ遺伝子の発現量に有意な変化はなく, *sepM* の機構への関与は, セロビオースや Avicel などのセルロース性基質に特異的な現象である事を見出した。

The involvement of the *sepM* on the induction of the cellulase genes in *Aspergillus aculeatus*

Ryosuke Tsumura, Shuji Tani, Jun-ichi Sumitani, Takashi Kawaguchi

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

P-75

Aspergillus fumigatus とその近縁種における二次代謝遺伝子の比較ゲノム解析

萩原大祐, 高橋弘喜, 矢口貴志, 楠屋陽子, 渡邊哲, 亀井克彦 (千葉大・真菌センター)

糸状菌は多様な二次代謝産物の産生能を有しており, 数十種にのぼる二次代謝遺伝子の存在が各糸状菌ゲノムで確認されている。しかし, 種を越えて保存された遺伝子/化合物は限定的であり, 糸状菌ゲノムにおける二次代謝遺伝子クラスターの普遍性と多様性の全体像は十分に理解されていない。本研究では, ヒト病原性の *Aspergillus fumigatus* と遺伝的に非常に近縁な *A. fischeri*, *A. lentulus*, *A. udagawae*, *A. viridinutans* (いずれも *Aspergillus* section *Fumigati*) を対象として, ゲノム情報から二次代謝遺伝子を体系的に同定する。さらに, これらの遺伝子クラスター構成などを比較し, 進化的な普遍性と多様性獲得の手掛かりを得ることを目的とする。アミノ酸配列の相同性解析から, 上記 5 菌種の, non-ribosomal peptide synthase (NRPS) 遺伝子および polyketide synthase (PKS) 遺伝子を, 各々合わせて 34, 45, 39, 67, 66 個同定した。これらのなかで, アミノ酸配列やモチーフ構造の相同性から 14 個 (8 NRPSs, 6 PKSs) が 5 菌種で共通しており, その産生化合物には病原性に関与するシデロフォア (ferricrocin, fusarinine C) や DHN-melanin, マイコトキシンの gliotoxin や trypacidin が含まれていた。遺伝子クラスター構成の比較や, 培養液に含まれる産物の解析などを進め, これらの近縁種間における二次代謝の進化的多様化様式について考察していく。

Comparative genome analysis for secondary metabolism in *Aspergillus fumigatus* and the related species

Daisuke Hagiwara, Hiroki Takahashi, Takashi Yaguchi, Yoko Kusuya, Akira Watanabe, Katsuhiko Kamei

(MMRC, Chiba Univ.)

P-76

フサリセチン A の特徴的な環構造形成を担う環化酵素の同定

加藤直樹¹, 衣笠清美¹, Jae-Hyuk JANG², 高橋俊二¹, Jong Seog AHN², 長田裕之¹ (¹理研・CSRS, ²KRIBB)

フサリセチン A は, がん細胞の形態形成を阻害する活性を指標にして *Fusarium* sp. FN080326 より単離された代謝物である。そのユニークな五環性の縮合環構造の生合成過程は大きく 2 つに分けられる。生合成中間体であるエキセチン生成の際の立体選択的デカリン環形成と, エキセチンからフサリセチン A への変換である。本研究はそれぞれのプロセスを担う新規環化酵素同定を目的とした。

これまでに生産菌 FN080326 株のドラフトゲノム解読を行い, PKS-NRPS ハイブリッド酵素遺伝子を含む生合成遺伝子 (*fsa*) クラスターを見出し, 遺伝学的解析を行ってきた。PKS-NRPS ハイブリッド酵素遺伝子 *fsa1* に隣接する *fsa2* は, 既知のタンパク質や機能モチーフとは相同性を有さず, そのアミノ酸配列から生合成における役割を類推することは困難であった。*fsa2* 欠失株の代謝物分析により, 本遺伝子が, 立体選択的なデカリン環形成に関与していることを発見した。Stand-alone 型の Diels-Alderase としては糸状菌由来では最初の報告である。これにより, *fsa* クラスターによるエキセチンまでの生合成経路が明らかとなった。

一方, エキセチンからフサリセチン A への変換を担う酵素遺伝子については, ノックアウト実験より, *fsa* クラスター外に存在していることが示唆されている。そこで, 変換酵素遺伝子の絞り込みを行うため, 生産菌 FN080326 株より細胞抽出液を調製し, 変換酵素活性の検出を試みた。細胞抽出液より検出された酵素活性は, NADPH や α -ケトグルタル酸でなく, FAD の添加により増強効果が認められた。このことから, フラビンモノオキシゲナーゼの関与が強く示唆された。

Identification of enzymes responsible for the formation of a unique pentacyclic structure of fusarisetin A

Naoki Kato¹, Kiyomi Kinugasa¹, Jae-Hyuk Jang², Shunji Takahashi¹, Jong Seog Ahn², Hiroyuki Osada¹

(¹RIKEN CSRS, ²KRIBB)

P-77

麹菌 *Aspergillus oryzae* 由来二次代謝産物の生合成

恒松雄太, 渡辺賢二 (静岡県大・薬)

糸状菌二次代謝産物(天然物)は古くから創薬の探索源として重要な役割を担ってきた。しかし現在では多数の製薬企業が醗酵創薬部門を縮小廃止している。新規物質獲得に多大な時間と労力が費やされる、生産性が低いなどがその一因と考えられる。一方、次世代シーケンサーにより、天然物生合成遺伝子クラスター(Biosynthetic Gene Cluster: BGC)情報,すなわち「天然物の設計図」が簡単に得られるようになった。同時に,多くの BGC が休眠型として存在しており,有効利用されていないことが明らかにされた。我々は天然物の設計図をもとに, 遺伝子工学を利用して新規化学構造をもつ天然物を生産させること, 加えてその代謝経路を化学的に解明し, 創薬資源として応用利用することを目指して研究を展開している。

我が国の産業微生物として重要な麹菌 *Aspergillus oryzae* もそのゲノム中に数多くの BGC を含んでいる。これまでにコウジ酸, シクロピアゾン酸類等, 数多くの BGC が明らかにされてきた。ところで, *A. oryzae* RIB40 株は特定の培養条件にてアスピロクロリン類を極微量に生産することが明らかにされている。本化合物は *Aspergillus fumigatus* の生産する病原毒素グリオトキシシンと類似の化学構造を有しているため, その毒性の有無を明らかにすることは非常に重要である。またアスピロクロリン自身だけでなく, その生合成中間体等の構造類縁体の生物活性評価もまた重要であるが, これらの代謝産物はごく僅かに生産されているのみであり, 実際に化合物を獲得して活性評価を行うことがこれまで困難であった。今回, 我々はアスピロクロリン類高生産株を見出すことに成功した。その代謝産物を詳細に解析し, 20 種類以上のアスピロクロリン関連化合物を同定し, そのうち幾つかについては単離することに成功し, 機器分析によりその化学構造を決定した。

Harnessing the biosynthetic pathway in Koji mold, *Aspergillus oryzae*

Yuta Tsunematsu, Kenji Watanabe (Dept. Pharm. Sci., Univ. Shizuoka)

P-78 (O-1)

代謝改変およびフラックス強化した黄麹菌でのデンプンからの乳酸生産

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

本研究の目的は, 黄麹菌 *Aspergillus oryzae* を用いたデンプンからの L-乳酸の高効率生産である。乳酸は, 従来の石油由来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である。これまでに栄養要求性黄麹菌 *A. oryzae* NSPID1 株に牛(*Bos taurus*)由来の lactate dehydrogenase (LDH) 遺伝子を導入した L-乳酸生産株で, 100 g/L のデンプンから約 30 g/L の L-乳酸生産に成功している。この際, 乳酸生産の基質であるピルビン酸がエタノールなどの副産物の生産に使われていると考えられた。そこで本研究では, L-乳酸生産の競合経路の破壊や非活性の高い LDH 発現によるフラックスの強化で乳酸生産能の向上を目指した。

L-乳酸生産株では, 副産物としてエタノールや有機酸の生産が確認された。そこで, エタノール生産および有機酸生産を減らす目的で, エタノール生合成経路上のピルビン酸デカルボキシラーゼ(PDC)およびピルビン酸をオキサロ酢酸に変換するピルビン酸カルボキシラーゼ(PYC)を両方破壊した株(PDC/PYC 破壊株)を構築した。この株は, エタノール生産と乾燥菌体重量が低減し, 乳酸生産量が約 40 g/L に改善された。これと並行して, 乳酸生産へのフラックスを強化するために牛由来 LDH よりも比活性の高い乳酸菌(*Lactococcus lactis*)由来 LDH を導入した株を構築した。この株では, 乳酸生産量が約 44 g/L に改善された。今後, 更なる乳酸生産能の向上を目指し, PDC/PYC 破壊株に乳酸菌由来の LDH を導入した株での乳酸生産能を評価する予定である。

Metabolic engineering and flux enhancement of L-lactate producing *Aspergillus oryzae*.

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

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

P-79

Fusarium 属真菌由来メロテルペノイド化合物アスコクロリン新規類縁体の単離および生合成機構の解明

王冬梅^{1,2}, 全智揚¹, 淡川孝義¹, 阿部郁朗¹ (¹東大院・薬,²中国中山大学・薬)

アスコクロリンは、多様な糸状菌 (*Ascochyta viciae*, *Fusarium* sp., *Cylindrocladium* sp. など) から単離されるメロテルペノイドであり、抗ウイルス活性、血糖低下作用、血清コレステロール低下作用、抗腫瘍活性など多様な生理活性を持ち、医薬品資源としての利用が期待される。また、シクロヘキサン環を含むセスキテルペン、ハロゲン化された芳香環から構成され、特徴的な化学構造を持つため、その生合成酵素反応にも興味を持たれる。そこで、本研究では、アスコクロリン新規類縁体の単離、その生合成酵素の機能解明、を目的として、以下の実験を行った。

アスコクロリン生産菌である *Fusarium* sp. を。各種ハロゲン塩を含む最小培地にそれぞれ培養した。得られた各培養液中の代謝産物を、HPLC-MS 分析を行った所、臭素化された新規アスコクロリン類縁体を単離することに成功した。これら化合物の各種生物活性を評価し、その結果について報告する。また、生合成経路の同定のため、ドラフトシーケンス解析を行い、生産菌ゲノムから、ポリケチド合成酵素、プレニル基転移酵素遺伝子を含むアスコクロリン生合成遺伝子クラスターを見出した。*Aspergillus oryzae* による異種発現系を構築し、各種生合成酵素の同定を行った所、膜結合型テルペン環化酵素 AscF を同定することに成功した。AscF は既知のテルペン環化酵素とは系統樹上異なるクレードに存在する新規性の高い酵素であった。他の生合成酵素についても、現在解析を行っている。

Isolation of novel derivatives of ascochlorin and investigation of their biosyntheses

Dongmei Wang^{1,2}, Zhi-Yang Quan¹, Takayoshi Awakawa¹, Ikuro Abe¹

(¹Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Univ. of Tokyo, ²Sun Yat-sen Univ. China)

P-80

トウモロコシごま葉枯病菌のある種 PKS 遺伝子は *Pol2* 突然変異依存的に発現する

陳帶娣, 北出雄生, 宮下正弘, 宮川恒, 田中千尋 (京都大・院・農)

我々は *Bipolaris maydis* (トウモロコシごま葉枯病菌) のポリオキシシン耐性遺伝子を、全ゲノム解析手法を用いて同定し、これらが hydroxymethylbilane synthase と ferrochelatase をコードすることを見出した。これらの突然変異株では、薬剤耐性だけでなく、赤褐色の菌叢呈色、emodin などアントラキノン類の蓄積、菌叢生育不良などの多面的な表現型変化が認められる。今回、菌叢生育が良好で、赤褐色の菌叢呈色、emodin の蓄積が認められる hydroxymethylbilane synthase 突然変異 (*Pol2*) 株を対象に、本菌の菌叢呈色等の多面的表現型変化の原因を明らかにしようとした。*B. maydis* のゲノムには少なくとも 23 のポリケチド合成酵素 (PKS) 遺伝子が存在している。このうち環状ポリケチドの合成に関与すると考えられる *Pks19*~*Pks23* の 5 種の PKS 遺伝子について野生型株と変異株で発現の有無を調べた。その結果、*Pks19* 並びに *Pks21* が *Pol2* 変異株特異的に発現していることが明らかとなった。*Pks19* は *Aspergillus* 属菌の monodictyphenone (emodin) 合成に関わる PKS と相同性が高く、*Pks21* は *Monascus* 属菌の citrinin (あるいは monascorubrin) 合成に関わる PKS と相同性がある。次に、*Pks19* 並びに *Pks21* の破壊株を作出し、菌叢呈色を調べた。その結果、*Pol2 Alb3 ΔPks19* 株は *Pol2 Alb3* 株に比べやや黄味が少ない鮮赤色を示し、*Pol2 Alb3 ΔPks21* 株は淡黄褐色、*Pol2 Alb3 ΔPks19 ΔPks21* 株は *Alb3* 株とほぼ区別できない白色の呈色であった。以上の結果より、*Pol2* 突然変異株で認められる菌叢呈色の変化は、これら呈色に関与するポリケチド化合物合成系遺伝子が野生型株では発現しておらず、*Pol2* 突然変異依存的に賦活されるために起こっていることが明らかとなった。*Pks19* ならびに *Pks21* の周辺領域は *Bipolaris* 属菌で保存されており、今後、周辺領域に存在する遺伝子の破壊株を作出するとともに、代謝物分析を行う予定である。

Silent PKS genes are activated in *Pol2* (polyoxin resistant) mutant of *Bipolaris maydis*.

DaiDi Chen, Yuki Kitade, Masahiro Miyashita, Hisashi Miyagawa, Chihiro Tanaka

(Graduate School of Agriculture, Kyoto Univ.)

P-81

炭疽病菌が誘導するシロイヌナズナ色素体の新規応答

入枝泰樹¹, 高野義孝², 塩見大輔¹ (¹立教大・理, ²京大・院・農)

炭疽病菌 (*Colletotrichum* 属菌) は植物に壊死斑を形成する植物病原糸状菌である。アブラナ科植物のシロイヌナズナは適応型であるアブラナ科炭疽病菌の感染を許すが、不適応型のクワ炭疽病菌およびウリ類炭疽病菌に対しては強い抵抗性を発揮し、感染することはない。今回、炭疽病菌の接種により、シロイヌナズナ表皮細胞の色素体がダイナミックに応答する新しい現象について報告する。興味深いことに、本現象は不適応型のクワ炭疽病菌を接種したときに特に強く現れた。このとき、色素体は、感染器官 (付着器) を発達させた炭疽病菌が存在する表皮細胞の表層側に特異的に出現していた。別の不適応型菌であるウリ類炭疽病菌は、シロイヌナズナ野生株 (Col-0) に対して色素体応答を誘導しなかったが、シロイヌナズナの侵入抵抗性低下株 (*pen2*) に対しては十分な色素体応答を誘導した。葉緑体 (色素体の一種) の植物免疫への関与を考慮すると、これらの結果は、本現象が不適応型菌に対するシロイヌナズナの免疫応答に関与する可能性を示しており、新しい植物免疫機構として今後の研究が期待される。一方で、色素体応答を誘導する炭疽病菌シグナル、および色素体応答時のシロイヌナズナによる炭疽病菌認識機構を解明するため、植物への物理的侵入に不可欠な貫穿糸を形成できないウリ類炭疽病菌変異株を用いて *pen2* 株の色素体応答を解析した。その結果、本菌の貫穿糸形成不全株は色素体応答を全く誘導しないことが明らかになった。以上より、シロイヌナズナの表皮細胞は、炭疽病菌の貫穿糸を介した侵入行動もしくはそれに付随する行為を認識し、色素体を表層側へと出現させると推定された。

Colletotrichum-induced novel plastid response in *Arabidopsis thaliana*

Hiroki Irieda¹, Yoshitaka Takano² and Daisuke Shiomi¹

(¹Dept. of Life Science, Rikkyo Univ., ²Grad. Sch. of Agric., Kyoto Univ.)

P-82

RabGAP Bub2は炭疽病菌およびいもち病菌の付着器分化過程における細胞周期および隔壁形成を制御する

深田史美¹・西内巧²・久保康之¹ (¹京府大院・生環, ²金沢大・学際センター)

ウリ類炭疽病菌は感染過程において単細胞の孢子から発芽管、付着器、侵入菌糸の形成といった劇的な形態分化を核分裂と同調化して行う。これまでに本菌の付着器分化過程には RabGAP CoBub2 の G1/S 期制御が必要であることを報告してきた。一方、分裂酵母や非病原性糸状菌において Bub2 は隔壁形成開始機構(SIN)を負に制御することから、Bub2 の機能は生物種により多様性があると推察される。今回、Bub2 の細胞周期や隔壁形成における機能を病原性と関連付けて検討した。野生株と *cobub2* 破壊株を用いてマイクロアレイ解析を行った結果、SCF 複合体を含むユビキチン-プロテアソーム系や DNA 複製、DNA 修復といった S 期関連細胞周期関連遺伝子群の大幅な発現変動が認められた。また、転写因子、分泌タンパク質、CAZymes、膜輸送体の推定病原性関連遺伝子群の発現変動が認められた。そこでウリ類炭疽病菌と隔壁形成パターンが異なるアブラナ科炭疽病菌およびイネいもち病菌における *bub2* 破壊株を評価すると、共に野生株と比較して核分裂のタイミングが早まる一方で、それに伴う隔壁形成の頻度が低下し、さらに宿主植物への侵入能力が欠損した。以上より炭疽病菌といもち病菌の付着器分化過程において、Bub2 は細胞周期および隔壁形成を制御し、病原性に関与することが示唆された。現在、染色体タギング法による *bub2* 破壊株の細胞周期の詳細解析、SIN の構成要素の一つである NDR キナーゼ Sid2 の細胞内局在解析による Bub2 の SIN への関与を検討している。

Rab GAP Bub2 regulates cell cycle and septum formation during appressorium formation in *Colletotrichum* and *Magnaporthe*.

Fumi Fukada, Takumi Nishiuchi and Yasuyuki Kubo

(Life and Environmental Sciences, Kyoto Prefectural Univ., ASRC, Kanazawa Univ.)

P-83

Aspergillus fumigatus におけるストレス応答遺伝子の解析

酒井香奈江¹, 楠屋陽子¹, 高橋弘喜^{1,2}, 五ノ井透¹ (千葉大・真菌セ¹, 千葉大・分子キラリティー研究セ²)

日和見感染症であるアスペルギルス症は、近年の臓器移植や AIDS など免疫機能の低下した患者の増加に伴い早急な対応が求められている感染症の一つである。中でも *Aspergillus fumigatus* はアスペルギルス症の主な原因菌であり、いくつかの抗生物質が治療薬として用いられているものの、耐性菌の出現が報告されるなど新規治療薬の開発が求められているのが現状である。感染時に菌は環境中に存在していた時とは異なる様々なストレスを宿主から受けており、これらストレスに応答し適応する能力が感染成立に大きく寄与していると考えられる。そこで本研究では、ストレス条件下に置いたときに応答する遺伝子の機能解析を行うことで感染成立に関与する因子を探索することにした。

熱(37, 48°C), 酸化, 浸透圧の各ストレス条件下へ移行した時の遺伝子発現パターンの変化を RNA-seq により経時的に観察した。初期培養条件下とストレス条件下での RNA 発現量を比較し、4 倍あるいは 4 分の 1 以上の変化があるものを抽出した。今回は、熱を加えた直後に大きく動いた機能未知遺伝子 2 つを選択し、破壊株を作製した。破壊株を 30, 37, 48°C で培養して野生型株と表現型を比較したところ、どちらの遺伝子破壊株においても生育温度の違いによる影響を見出すことができなかった。しかし、浸透圧あるいは細胞壁ストレスに影響を受けることが分かった。現在、これらの遺伝子機能についてさらに調べているところであり、ストレス応答と感染成立への理解を深めることで、*A. fumigatus* 感染防御の一助になることが期待される。

Functional analysis of the stress response genes in *Aspergillus fumigatus*

Kanae Sakai¹, Yoko Kusuya¹, Hiroki Takahashi^{1,2}, Tohru Gono¹

(MMRC, Chiba Univ.¹, MCRC, Chiba Univ.²)

P-84 (O-7)

ウリ類炭疽病菌における細胞周期制御因子 CoTem1 の推定相互作用因子 CoPpt1 は病原性に関与する

梶河直起, 深田史美, 久保康之 (京府大院・生環)

これまでにウリ類炭疽病菌における GTPase CoTem1 が、GAP 複合体 CoBub2/CoBfa1 の制御下で細胞周期の制御と病原性に関与することを報告してきた。今回、CoTem1 を中心としたシグナルカスケードの解明を目的とした酵母ツーハイブリッド法によって CoTem1 の相互作用因子として CoPPT1 を同定した。CoPPT1 は phosphatidylglycerol phosphatidylinositol transfer protein をコードすると推定された。また CoPpt1 は CoTem1 における推定相互作用部位を変異させた CoTem1^{T146A} との相互作用を失うことを確認した。次に、CoPPT1 の機能を解析するため遺伝子破壊株を取得した。Δ*coppt1* 株は宿主植物体上においては野生株と同様の正常な付着器を形成したが、侵入菌糸の形成が認められず、宿主植物に対する病原性の顕著な低下を示した。一方、Δ*coppt1* 株のセルロース膜上での付着器および侵入菌糸形成については野生株と顕著な差は認められず、胞子発芽から侵入菌糸形成に至る形態形成能は正常であった。さらに蛍光タンパク質 mCherry と CoPpt1 の融合タンパク質 CoPpt1-mCherry を用いて細胞内局在観察を行ったところ、CoPpt1 は栄養菌糸、および未発芽胞子において液胞に存在することが明らかになった。一方、CoPPT1 の遺伝子破壊株、過剰発現株において培養 6 時間までの付着器分化や核挙動に顕著な異常は認められなかった。

CoPpt1, a candidate interactor with cell cycle regulatory factor CoTem1, is involved in the pathogenicity of *Colletotrichum orbiculare*.

Naoki Kajikawa, Fumi Fukada, Yasuyuki Kubo

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

P-85

ウリ類炭疽病菌のメタロプロテアーゼ CoMep1 の感染時における適切な分泌は、完全な病原性に必要である

中前彩加¹, 原田賢^{1,5}, 鳴坂真理², 鳴坂義弘², 高野義孝³, Pamela Gan⁴, 白須賢⁴, 久保康之¹ (¹京府大院・生環, ²岡山生科研, ³京大院・農, ⁴理研, ⁵(現)龍谷大・農)

本研究は、ウリ類炭疽病菌の病原性に関与するエフェクターの探索及び機能解析を目的としている。まず 95 種のアブラナ科炭疽病菌エフェクター候補遺伝子の中からベンサミアナタバコにおける一過的発現法やウリ類炭疽病菌における過剰発現法を用いて、メタロプロテアーゼ遺伝子 CH063_03169 のウリ類炭疽病菌におけるホモログ *CoMEP1* を病原性関連遺伝子として同定した。*CoMEP1* 破壊株は病原性の低下や付着器下におけるカロース形成頻度の増加を示し、*CoMEP1* の病原性への関与が示唆された。さらに、リアルタイム PCR によって *CoMEP1* は接種後 3 時間で顕著な発現を示すことが明らかになった。また、シグナルペプチド欠損 *CoMEP1* 発現株では侵入菌糸形成頻度の低下を示し、CoMep1 の分泌が病原性に重要であることが示唆された。加えて mCherry 融合 *CoMEP1* 発現株について蛍光観察を行った結果、CoMep1 が宿主上で胞子や付着器孔から分泌されている可能性が示された。一方で、*CoMEP1* 過剰発現株は病原性の著しい低下を示し、*CoMEP1* の恒常的な過剰発現が宿主の抵抗性を誘導している可能性が示唆された。

Appropriate secretion of *C. orbiculare* metalloprotease CoMep1 during infection is required for full virulence.

Ayaka Nakamae¹, Ken Harata^{1,5}, Mari Narusaka², Yoshihiro Narusaka², Yoshitaka Takano³, Pamela Gan⁴, Ken Shirasu⁴, Yasuyuki Kubo¹

(¹Grad. Sch. of Life & Env. Sci., Kyoto Pref. Univ., ²RIBS Okayama, ³Grad. Sch. of Agri., Kyoto Univ., ⁴RIKEN, ⁵Sch. of Agri., Ryukoku Univ.)

P-86

アブラナ科炭疽病菌のストレス応答制御因子 ChWHI2 は病原性に必須であり、宿主のカロース形成や ROS 産生に関与する

長田暢洋¹, 原田賢^{1,2}, 西内巧³, 久保康之¹ (¹京府大・生環, ²(現)龍谷大・農, ³金沢大・学際セ)

アブラナ科炭疽病菌 *C. higginsianum* は、植物細胞の壊死を伴わず菌糸を伸展する活物寄生から植物細胞を壊死させる死物寄生へ移行する準活物寄生性の感染様式をとる。これまでに、ウリ類炭疽病菌 *C. orbiculare* ではストレス応答制御因子 *CoWHI2* が活物寄生確立に関与し、 Δ *Cowhi2* 株が宿主植物の防御応答を誘導し病原性が低下することを報告している。本研究では、炭疽病菌の感染確立における *WHI2* の機能を解明するため、ゲノム情報を用いた防御応答解析が可能なシロイヌナズナと活物寄生段階から死物寄生段階への移行がより明瞭である *C. higginsianum* を用いて解析を行った。 Δ *Chwhi2* 株のシロイヌナズナへの病原性評価を行ったところ、野生株と比較し病原性、侵入菌糸形成率が低下を示した。 Δ *Chwhi2* 株が宿主植物の防御応答を誘導するかを検討するため、 Δ *Chwhi2* 株接種時におけるシロイヌナズナのカロース形成、ROS 産生の評価を行うと、野生株と比較し Δ *Chwhi2* 株接種時のカロース形成、ROS 産生頻度は上昇することが示された。また、野生株、 Δ *Chwhi2* 株接種 24, 48, 72 時間後におけるシロイヌナズナのマイクロアレイを行い、取得データに基づき Pathway 解析を行ったところ、 Δ *Chwhi2* 株接種において防御応答のシグナル伝達に関与する MAP キナーゼ *AtMPK6* の下流に位置する防御応答関連因子の発現が上方制御されていた。このことから、 Δ *Chwhi2* 株は宿主の防御応答を誘導し、病原性が低下する可能性が示唆された。

***Colletotrichum higginsianum* Stress response regulator ChWHI2 is required for full virulence and involved in host callose deposition and ROS production.**

Nobuhiro Nagata¹, Ken Harata², Takumi Nishiuchi³, Yasuyuki Kubo¹

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

P-87

外生菌根菌ホンシメジにおけるランダム挿入突然変異法の確立

広瀬優樹¹, 松永有佳理¹, 田中千尋², 入江俊一¹, 鈴木一実¹, 泉津弘佑¹ (¹滋賀県大・環境, ²京大院・農)

菌根は植物の根と菌類の共生体である。現在、陸上のほとんどの植物が菌根共生を行うことが知られている。菌根には、グロムス門菌が形成するアーバスキュラー菌根や、マツタケやホンシメジなどの担子菌類が形成する外生菌根などが知られている。いずれの場合にも、植物は光合成により獲得した炭素源を菌類に送り、菌類は土壤中に菌糸を伸ばして獲得した窒素やリンなどを植物に送ることで、相利的な共生関係が成立していると考えられている。しかし、菌根共生に関わる分子メカニズムの解明は、現在までほとんど進んでいない。本研究で、我々は外生菌根菌ホンシメジ (*Lyophyllum shimeji*) のランダム挿入突然変異法の確立を試みた。まず、アグロバクテリウム法を用いて、ホンシメジの一核体、二核体ともに1シャーレ当たり10株以上のハイグロマイシン耐性株を効率よく作出することに成功した。次に、得られた形質転換体の T-DNA 挿入位置に隣接する配列を TAIL-PCR によって増幅し、変異点を同定することに成功した。その結果、Homing endonuclease や ATP-dependent Clp protease などをコードする遺伝子にそれぞれ欠損を持つミュータントを取得できた。また、変異点の同定結果から T-DNA がホンシメジのゲノム DNA 内にランダムに挿入されたことが強く示唆された。また、これまでホンシメジの形質転換に利用されてきた薬剤耐性遺伝子はハイグロマイシン耐性遺伝子のみであったが、我々は新たにナオセオスリシン耐性遺伝子を用いて耐性株を作出することに成功した。その作出効率は、ハイグロマイシン耐性遺伝子と同様であった。

Random insertional mutagenesis in the ectomycorrhizal fungi *Lyophyllum shimeji*

Yuuki Hirose¹, Yukari Matsunaga¹, Chihiro Tanaka¹, Toshikazu Irie¹, Kazumi Suzuki¹, Kosuke Izumitsu¹

(¹Grad. School of Env. Sci., Univ. of Shiga pref., ²Grad. School of Agriculture, Kyoto Univ.)

P-88

トウモロコシごま葉枯病菌における全 10 種の本メオボックス遺伝子の機能解析

姑射誠佳, 渡邊彩奈, 横山綾, 入江俊一, 鈴木一実, 泉津弘佑 (滋賀県大・院・環境)

ホメオボックスは動物・植物・菌類に保存されている転写制御因子である。1980年代、ショウジョウバエにおいて、触角が足に置き換わった変異体などの原因遺伝子としてホメオボックス遺伝子が発見された。その後、昆虫のみならず動物全般において、ホメオボックス遺伝子が体作りの設計図のような役割を果たしていることが次々と報告されてきた。一方で、菌類においてはホメオボックス遺伝子の役割は未解明の部分が多い。今回、我々はトウモロコシごま葉枯病菌 (*Bipolaris maydis*) における全 10 種の本メオボックス遺伝子 (*Hox1*~*Hox9*, *Ste12*) の破壊株を作出し、機能解析を行った。 $\Delta Ste12$ は分生子形成数が著しく減少し、ごくわずかに形成した分生子には共通した特徴的な形態異常が認められた。顕微鏡による解析の結果、分生子形成細胞が正常に分化せず、異常な形態の分生子が形成されていることが示唆された。さらに、感染器官である付着器を形成できず、宿主への病原性を欠損していた。 $\Delta Hox2$ は菌糸のメラニン化に不全が認められた。さらに、付着器形成率が野生株と比較して減少していた。 $\Delta Hox5$ は子嚢殻の形成数が大幅に減少しており、交配初期過程に重要な役割を持つことが示唆された。一方、子嚢胞子の形成に異常は認められなかった。 $\Delta Hox6$ は菌糸生育がやや減少した。 $\Delta Hox7$ は、野生株と同等の数の子嚢殻を形成するものの、子嚢胞子をほとんど形成できなかった。また、子嚢殻の形態にも異常があった。 $\Delta Hox1, 3, 4, 8, 9$ については、野生株と表現型の差異は認められなかった。以上の結果から、付着器、分生子、子嚢殻、子嚢胞子など形態形成の各段階にホメオボックス遺伝子が深く関与していることが明らかとなった。

Functional analysis of 10 homeobox genes in *Bipolaris maydis*.

Seika Koya, Ayana Watanabe, Aya Yokoyama, Toshikazu Irie, Kazumi Suzuki, Kosuke Izumitsu

(Grad. School of Env. Sci., Univ. of Shiga prefecture)

P-89 (O-8)

トウモロコシごま葉枯病菌の物理的疎水面認識および付着器形成を制御する *Opy2* の解析

吉田紘樹¹, 後藤駿介¹, 田中千尋², 入江俊一¹, 鈴木一実¹, 泉津弘佑¹ (¹滋賀県大・環境, ²京大院・農)

多くの植物病原糸状菌は付着器と呼ばれる特殊な細胞を介して宿主植物に侵入する。これらの菌類は宿主葉の表面を, ①物理的疎水面の認識, ②宿主由来成分の認識, という 2 つの機構によって認識し, 付着器を形成するものと考えられている。

当研究室では, トウモロコシごま葉枯病菌 (*Bipolaris maydis*) において *Opy2* がこの物理的疎水面の認識に重要な役割をもっていることを明らかにした。野生株は宿主であるトウモロコシ葉上だけでなく, プラスチック表面などの物理疎水面上でも付着器を形成することができる。一方で *Opy2* 破壊株はプラスチック表面では付着器の形成能力を欠損するが, 宿主葉上では正常に付着器を形成する。

本研究では, *Opy2* 破壊株の付着器形成を誘導する物質を探索し, 表面認識のメカニズムを調査した。*Opy2* 破壊株はトウモロコシだけではなく様々な植物葉上で付着器を形成したことから, 付着器形成の誘導物質は植物一般に含まれると考えられた。さらに *Opy2* 破壊株の宿主葉上での挙動を観察したところ, 葉の細胞間層上で特に多くの付着器を形成していた。そこで, 植物の細胞間層の主成分であるペクチンを添加したところ, *Opy2* 破壊株のプラスチック表面における付着器形成が回復した。一方で, 他の植物病原菌類で付着器形成を誘導することが報告されているクチンモノマーやビーワックス, トリアコンタノールを添加しても *Opy2* 破壊株は付着器を形成しなかった。このことから, トウモロコシごま葉枯病菌における付着器形成は物理的疎水面および植物由来成分ペクチンにより誘導されることが示唆された。

Functional analysis of *Opy2* in *Bipolaris maydis*

Hiroki Yoshida¹, Syunsuke Goto¹, Chihiro Tanaka², Toshikazu Irie¹, Kazumi Suzuki¹, Kosuke Izumitsu¹

(¹Grad. School of Env. Sci., Univ. of Shiga prefecture, ²Sch. of Agriculture, Kyoto Univ.)

P-90

トウモロコシごま葉枯病菌の付着器侵入に関連するテトラスパニン遺伝子 *Pls1* の機能解析

奥谷美季¹, 田中千尋², 入江俊一¹, 鈴木一実¹, 泉津弘佑¹ (¹滋賀県大・環境科学, ²京大院・農)

様々な植物病原菌において, 植物表面で付着器を形成し, そこから植物内部へと侵入菌糸を伸ばす仕組みには共通した部分が多く, 進化的にも保存されていることが強く示唆されている。この付着器侵入に関連する因子の一つとして, 4 回膜貫通型タンパク質テトラスパニンをコードする遺伝子 *Pls1* が知られている。イネいもち病菌や灰色かび病菌では, *Pls1* 遺伝子は付着器からの侵入に不可欠であることが報告されている。しかし, *Pls1* がどのように侵入菌糸形成を制御しているのかはよくわかっていない。

そこで, 本研究ではトウモロコシごま葉枯病菌におけるテトラスパニン遺伝子 *Pls1* の詳細な機能解析を試みた。*Pls1* 遺伝子破壊株は, 正常な付着器を形成するものの侵入能力を欠損しており, 宿主であるトウモロコシへの病原性は認められなかった。一方で, コロニー形成, メラニン化, 胞子形成などには一切影響が認められなかった。このことから, *Pls1* は異なる分類群の植物病原菌において, 付着器侵入という共通した機能を制御していることが強く示唆された。次に, *Pls1*-eGFP 融合遺伝子を用いて *Pls1* の局在を可視化した。その結果, *Pls1* は付着器で特異的に発現し, 細胞内の粒状の構造物に局在することが観察できた。一方で, 細胞膜には局在しないことが明らかとなった。ヒトの細胞においては, テトラスパニンは細胞膜以外に, エンドソームおよびエキソソームに局在することが知られている。現在, *Pls1* がこれらと類似した機能を持っているのかについて詳細な解析を進めている。

Functional analysis of tetraspanin gene *Pls1* in *Bipolaris maydis*.

Fuki Okutani¹, Chihiro Tanaka², Toshikazu Irie¹, Kazumi Suzuki¹, Kosuke Izumitsu¹

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

P-91

ウリ類炭疽病菌の NDR キナーゼ CoCbk1 は宿主由来のクチンモノマーにより活性化され植物シグナル応答遺伝子群の発現制御に関与する

小玉紗代¹, 西内巧², 久保康之¹ (¹京府大院生環, ²金沢大・学際センター)

本研究ではこれまでに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, 出芽酵母 Cbk1 リン酸化特異的抗体を用いたウェスタンブロット解析により, CoPag1 の CoCbk1 リン酸化への関与を評価した。その結果, 野生株と比較して *copag1* Δでは CoCbk1 活性の低下が見られ, CoPag1 は CoCbk1 リン酸化に寄与することが示唆された。また, クチンモノマー *n*-octadecanal 添加培養時の CoCbk1 活性を評価したところ, 野生株では未添加区と比較して *n*-octadecanal 区の CoCbk1 活性は約 20%上昇した。一方, *copag1* Δでは *n*-octadecanal 添加による影響は見られなかった。このことから *n*-octadecanal が MOR 経路を活性化するシグナルとなっている可能性が示唆された。次に, 野生株, *copag1* Δ, CoCbk1-AS (analog-sensitive)株を用いたマイクロアレイ解析を行った。キュウリ子葉上接種時において CoCbk1-AS 株に ATP アナログ 1NA-PP1 を添加し CoCbk1 活性を阻害させた結果, 野生株と比較して *copag1* Δで下方制御された植物シグナル応答遺伝子群の 85%は CoCbk1-AS 株においても下方制御され, これらの *CoPAG1* により発現制御される遺伝子群は *CoCBK1* 制御下にあることが示唆された。現在, MOR 制御下にあると考えられる推定転写因子の形態形成および病原性への寄与を検討している。

NDR kinase CoCbk1 of *Colletotrichum orbiculare* is activated by the cutin monomer released from host cuticle and involved in regulation of the plant-signal-induced genes

Sayo Kodama¹, Takumi Nishiuchi² and Yasuyuki Kubo¹

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

P-92

Aspergillus fumigatus の銅代謝転写因子 *Afmac1* の機能解析

楠屋陽子¹, 萩原大祐¹, 酒井香奈江¹, 矢口貴志¹, 五ノ井透¹, 高橋弘喜^{1,2} (1 千葉大・真菌センター, 2 千葉大・分子キラリティー研究センター)

銅は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, 銅の過剰な蓄積は生体にとって有害であるため, その濃度は厳密に制御されている。真菌症を引き起こす原因菌である糸状菌 *Aspergillus fumigatus* が宿主内で生育するためには, 細胞内の銅濃度を維持する必要がある。今回我々は, 酵母の転写因子との相同性解析から, *A. fumigatus* の銅制御に関与する 3 つの候補転写因子を見いだした。その内の一つである *Afu1g13190* (*Afmac1*) の遺伝子破壊株は, 銅欠乏時に著しい生育の低下を示し, 最小培地においては, 分生子の連鎖が短く, メラニン色素の蓄積が低い胞子が観察された。Δ*Afmac1* 株で, 複数の遺伝子発現を調べたところ, 環境中の銅濃度が低い時に, 細胞外の銅を細胞内に取り込むトランスポーターと細胞外の Cu^{2+} を Cu^{+} に還元する金属還元酵素の遺伝子発現の低下を確認した。銅欠乏環境下での転写因子 *Afmac1* による発現制御の重要性が明らかとなった。また, 最小培地中のΔ*Afmac1* 株では, 分生子形成後期とメラニン色素合成に関与する遺伝子発現の低下が見られ, *Afmac1* が胞子の成熟過程にも関与していることが示唆された。

Functional analysis of copper-sensing transcription factor *Afmac1* in *Aspergillus fumigatus*

Yoko Kusuya¹, Daisuke Hagiwara¹, Kanae Sakai¹, Takashi Yaguchi¹, Tohru Gono¹, Hiroki Takahashi^{1,2}

(MMRC, Chiba Univ., MCRC, Chiba Univ.)

P-93

全ゲノム解析による抗真菌性化合物 Tolnifanide 耐性遺伝子の同定

重吉沙衣¹, 入江俊一¹, 鈴木一実¹, 宮川恒², 田中千尋², 泉津弘佑¹ (¹滋賀県大・環境, ²京大院・農)

次世代ゲノムシーケンサーの登場以降, 菌類の遺伝学は大きく形を変えつつある。農業科学の分野においても, 従来, メンデル遺伝学レベルでの同定が限界であった薬剤耐性遺伝子を, 全ゲノム解析により直接同定することも可能になると期待される。特に, 殺菌剤の真の作用機作の解明につながった過去の事例から見ても, 耐性遺伝子の同定は植物保護に大きく貢献するものと考えられる。本研究では, 未だ作用点を特定できていない抗真菌性化合物 Tolnifanide (TF-991) に注目し, これまでにメンデル遺伝学レベルで同定してきた2つの耐性遺伝子 *Rtf1* および *Rtf2* を対象に, 全ゲノム解析手法を用いた同定を試みた。

ゲノム配列の比較の結果, *Rtf1* 株では2つの候補遺伝子, *Rtf2* 株では6つの候補遺伝子を見いだした。これらの候補遺伝子について子孫株のシーケンス解析を行った結果, Tolnifanide 耐性遺伝子 *Rtf1* は Protein Geranylgeranyltransferase (type-I) (GGTase-I) のβサブユニットをコードし, C406Y の1アミノ酸変異が, *Rtf2* は, Farnesyl-diphosphate farnesyltransferase をコードし, M157I 変異が, 耐性化に寄与していることが強く示唆された。

そこで, 2つの耐性遺伝子のうち, 特に高い薬剤耐性を示す *Rtf1* に着目した。トウモロコシごま葉枯病菌の野生株に C406Y 変異型遺伝子を導入したところ, Tolnifanide に対するほぼ完全な耐性化が確認できた。このことから, *Rtf1* 遺伝子が tolnifanide 耐性化に大きく関与することが実証された。*Rtf1* のコードする GGTase-I はタンパク質の修飾過程の1つであるプレニル化の中心的因子であることから, 現在, Tolnifanide によるタンパク質プレニル化の攪乱作用の検証を進めている。

Identification of Tolnifanide-resistance genes *Rfr1* and *Rfr2* by whole genome analysis

Sae Shigeyoshi¹, Toshikazu Irie¹, Kazumi Suzuki¹, Hisashi Miyagawa², Chihiro Tanaka², Kosuke Izumitsu¹

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

P-94

病原真菌 *Aspergillus fumigatus* を弱毒化するマイコウイルス各遺伝子の発現量と機能解析

穴戸絵里香¹, 高橋梓², 酒井香奈江², 萩原大祐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り, アレルギー源となるほか, 呼吸器疾患を引き起す。アスペルギルス症に対する, 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。このような状況下で我々は, マウスに対する *A. fumigatus* の病原性を抑制するクリソウイルスに類似した4本鎖 dsRNA ゲノムを持つウイルス 41362Chrysovirus (41362CV), *Aspergillus fumigatus* tetramycovirus-1 に類似した5本鎖 dsRNA ゲノムをもつマイコウイルス 54229Uncharacterized Virus (54229UV) の2種を見出し, 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, 宿主菌の病原性抑制を担うマイコウイルスの遺伝子を特定するため, 各ウイルスゲノムの ORF 由来 mRNA 発現量の比較, およびウイルス遺伝子の強制発現による宿主菌への影響を解析した結果を報告する。

菌糸形成過程および胞子形成過程におけるウイルス遺伝子の発現量を, リアルタイム PCR を用いて比較定量し, 変化を明らかにした。

また, ウイルスフリーの *A. fumigatus* (ΔKU70) にウイルスゲノムの ORF をそれぞれ強制発現させた株, protoplast fusion 法によりウイルスを導入した株それぞれにおいて, 宿主菌の形態, 生育速度, ストレス耐性, および二次代謝産物生産能などの表現型を比較した。その結果, 41362CV の ORFc, 54229UV の ORFb, c の強制発現株で糸状菌生育抑制が観察された。さらに, これらの株を用いてマウス感染実験を行い, 肺中の生菌数をコロニー形成数で比較した。41362CV の ORFc 強制発現株, ウイルス導入株, 54229UV の ORFb, d, e 強制発現株で他の株よりコロニー数が減少する傾向が見られ, これらの遺伝子が *A. fumigatus* の病原性を抑制していることが示唆された。

Evaluation of suppressive effects of mycoviral proteins in human pathogen *Aspergillus fumigatus*.

Erika Shishido¹, Azusa Takahashi-Nakaguchi², Kanae Sakai², Daisuke Hagiwara², Hiromitsu Moriyama³, Tohru Gono²

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

P-95 (O-9)

疫病菌 *Phytophthora infestans* シスト発芽阻害物質 β -rubromycin の作用解析

西尾尚堯, 谷修治, 甲斐建次, 東條元昭, 炭谷順一, 川口剛司 (阪府大院・生環科)

【目的】卵菌 *Phytophthora infestans* はナス科植物に感染し疫病を引き起こす植物病原菌である。*P. infestans* の遊走子嚢は 15°C 以下の水中で遊走子を放出する。遊走子は宿主へと走化的に泳いで行き、植物表層でシスト形成後、発芽し付着器を形成することで効率よく植物内へ侵入する。本研究ではシスト発芽機構の解明を目的としてシスト発芽阻害物質を放線菌二次代謝産物から同定し、その作用解析を行った。また同定した化合物が他の卵菌に対しても分化阻害活性を示すか調べるため *Pythium aphanidermatum* を被験菌として用いた。

【方法及び結果】土壌より単離した放線菌の培養液に等量のアセトンを加えて調製したサンプルを *P. infestans* 遊走子嚢懸濁液に添加し、10°C で 18 時間静置後の遊走子嚢の形態を観察した。505 サンプル中、2 サンプルがシスト発芽を阻害した。発芽阻害率の高かった no. 750 株の培養液 76.4 L を酢酸エチル抽出後、各種クロマトグラフィーにより発芽阻害物質 2.9 mg を取得した。精製標品の $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, MSI-MS スペクトル解析により精製物質を β -rubromycin と同定した。 β -rubromycin 標品を用いシスト発芽阻害活性を調べたところ、 IC_{50} は 37 nM であった。また 2 μM の β -rubromycin で処理した遊走子嚢をトマトの葉に接種したところ、感染を阻害した。次に β -rubromycin による *P. aphanidermatum* 卵胞子分化への影響を調べた。*P. aphanidermatum* の卵胞子を 25°C に静置し、24 時間後の形態を観察した。 β -rubromycin は卵胞子の発芽を阻害し、 IC_{50} は 60 nM であった。2 μM の β -rubromycin で処理した *P. aphanidermatum* の卵胞子をハクサイに接種し 35°C で静置した後、経時的に観察したところ同様に植物感染を阻害した。今回の結果から β -rubromycin は低濃度で 2 種類の卵菌の異なる植物感染を阻害する事が明らかとなった。

The analysis of β -rubromycin on sporangium and oospore development in oomycetes.

Nishio Naotaka, Shuji Tani, Kenji Kai, Motoaki Tojo, Jun-ichi Sumitani, Takashi Kawaguchi

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

P-96

トウモロコシごま葉枯病菌の高浸透圧応答シグナル伝達における Skn7 の機能解析

山田淳司¹, 吉田裕史¹, 泉津弘佑², 田中千尋¹ (¹京都大院・農, ²滋賀県大・環境科学)

真菌の高浸透圧応答シグナル伝達経路は、環境応答において重要な役割を持つことから研究が盛んに行われている。さらに、ジカルボキシイミド系殺菌剤等は植物病原糸状菌の本経路を標的とするため、我が研究室ではモデル病原糸状菌であるトウモロコシごま葉枯病菌を材料とし、本経路の詳細解明を目指してきた。本経路は浸透圧センサーと推定されるヒスチジンキナーゼ Dic1 から始まり、リン酸基転移酵素 Ypd1 を介して 2 つのレスポンスレギュレーター(RR) Ssk1 と Skn7 へリン酸基を移し、さらなる下流因子の活性を制御していると考えられている。2 つの RR のうち Ssk1 のリン酸化修飾による制御機構の解明は進んでいるが、Skn7 のそれは詳細不明である。酵母等の Skn7 オルソログとの配列比較から、本菌における 403 番目のアスパラギン酸(D)残基がリン酸化修飾の標的であると予測された。そこで本研究では、Skn7 のリン酸化修飾による制御機構の解明を目指して、常時リン酸化修飾不可と予測される 1 アミノ酸置換株(*skn7D403N* 株)を作成し、解析を行った。すると、ジカルボキシイミド系殺菌剤(イプロジオン)に中度耐性を示す Δ *skn7* と比べ、耐性レベルの上昇および高浸透圧ストレス感受性の上昇も確認された。このことから、Skn7 が非リン酸化状態で存在し続けることで高浸透圧応答系が大きく攪乱される可能性が示唆された。

現在、非リン酸化修飾状態の Skn7 と Ssk1 の下流 Hog1 経路との関連性を調査するため、RT-PCR 法を用いて Hog1 下流因子として知られる *Cut1* 遺伝子等の発現量解析を進めている。

Functional analysis of Skn7 in high-osmolarity response pathway in *Bipolaris maydis*.

Atsushi Yamada¹, Hiroshi Yoshida¹, Kosuke Izumitsu², Chihiro Tanaka¹

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

P-97

抗真菌性化合物 Tolnifanide の選択毒性には GGTase-I の Cys²²¹ が関与する

松原佳耶¹, 吉田裕史¹, 泉津弘佑², 宮川恒¹, 田中千尋¹ (¹京大院・農, ²滋賀県大・環境科学)

抗真菌性化合物 Tolnifanide (TF-991) は *Bipolaris* や *Alternaria* 属菌など Pleosporales 目植物病原菌に高い選択毒性を示す。しかし、その作用機作については不明であった。我々は、*B. maydis* の Tolnifanide 耐性株と野生株とのゲノムを比較し、耐性遺伝子 *Rtfl* が Protein Geranylgeranyltransferase (type-I) (GGTase-I) の β サブユニットをコードし、C406Y の突然変異が耐性化に寄与していることを見出した(本会、重吉らの発表参照)。今回、Tolnifanide の選択毒性メカニズムを明らかにするため、同菌で独立に得られた複数の *Rtfl* 突然変異株を供試し、それぞれの GGTase-I 遺伝子の塩基配列を調査した。その結果、C406Y のほか、C221Y の突然変異が見出された。C221Y 変異を持つ *Rtfl* ならびにその上流領域計 2.4kbp を野生型の *Alb1* 遺伝子にターゲットィングし、*Rtfl^{wt} Rtfl^{C221Y}* パーシャルディプロイド株を作製した。本株は薬剤耐性を示し、*Rtfl^{wt}* のコードする GGTase-I が Tolnifanide の作用点である可能性が強く示唆された。さらにゲノム配列既知の子囊菌 149 種を用いて GGTase-I アミノ酸配列を比較した。その結果、Cys⁴⁰⁶ は子囊菌全般に広く保存されているが、Cys²²¹ は Pleosporales 目菌特異的であり、本化合物が効果を示さない *Aspergillus* 属菌 (Eurotiomycetes) や *Botrytis cinerea* (Leotiomyces) では Tyr であった。以上の結果より、Tolnifanide の選択毒性には GGTase-I の Cys²²¹ が寄与している可能性が明らかになった。

Cys²²¹ of GGTase-I is required for the antifungal mode of the action of Tolunifanide in Pleosporales fungi

Kaya Matsubara¹, Hiroshi Yoshida¹, Kosuke Izumitsu², Hisashi Miyagawa¹, Chihiro Tanaka¹

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

P-98

イネ科植物共生菌 *Epichloë/Neotyphodium* 属エンドファイトの産生する抗菌性物質の探索

三浦里佳¹, 橋川拓史¹, 磯部仁美¹, Enkhee Purev¹, 小鹿一¹, 増中章², 菅原幸哉², 佐藤育男¹, 千葉壮太郎¹, 川北一人¹, 田中愛子¹, 竹本大吾¹ (¹名大院生農・²農研機構)

Epichloë/Neotyphodium 属エンドファイトはイネ科植物に共生的に感染し、宿主植物内で種々の生理活性物質を生成する。これらエンドファイトの産生する生理活性物質が、宿主植物の昆虫による捕食の抑制、病原菌に対する耐性向上などの効果をもたらす。耐虫性に関わる生理活性物質が単離され、また耐虫性を向上させる菌株が害虫防除に実用的に利用されている一方で、病原菌に対する耐性を向上させる機構は殆ど明らかになっていない。本研究では、国内のイネ科植物由来の *Epichloë/Neotyphodium* エンドファイト 29 菌株と 8 種のイネ科植物病原糸状菌との対峙培養により、抗菌活性の高い菌株の選抜を行った。その結果、エンドファイトの宿主植物の病原菌であるペレニアルライグラス斑点病菌 *Drechslera erythrospila*, 炭疽病菌 *Colletotrichum graminicola*, 夏斑点病菌 *Bipolaris sorokiniana*, 網斑病菌 *D. dictyoides* などに対して抗菌活性を示す菌株が多数認められたが、菌株によって生育抑制効果を示す植物病原菌が異なっていた。この結果から、抗菌活性を示したエンドファイト菌株は、それぞれが異なる抗菌物質を産生していると推定された。本発表では、以前報告した抗菌性物質を生産するエンドファイト菌株である *E. festucae* E437 株から精製した抗菌物質の構造および活性の解析についても併せて報告する。

Production of anti-fungal compounds by isolates of *Epichloë/Neotyphodium* endophyte.

Rika Miura¹, Takushi Hashikawa¹, Hitomi Isobe¹, Enkhee Purev¹, Makoto Ojika¹, Akira Masunaka², Koya Sugawara², Ikuo Sato¹, Sotaro Chiba¹, Kazuhito Kawakita¹, Aiko Tanaka¹ and Daigo Takemoto¹ (¹Grad. School Bioagr. Sci., Nagoya Univ., ²NARO)

P-99 (O-10)

ナス科植物の産生するファイトアレキシンの植物病原性糸状菌による代謝の解析

黒柳輝彦, 小鹿一, 佐藤育男, 千葉壮太郎, 川北一人, 竹本大吾 (名大院生農)

植物は病原性糸状菌の攻撃に対して抗菌物質であるファイトアレキシンを産生することで、抵抗性を発揮している。ナス科植物の主なファイトアレキシンとして、ベンサミアナなど *Nicotiana* 属植物やピーマンなどの *Capsicum* 属が産生するカプシジオールやジャガイモやトマトなど *Solanum* 属植物が産生するリシチンなどのセスキテルペノイドが挙げられる。本研究では、カプシジオール存在下で病原糸状菌および卵菌 16 種を培養し、カプシジオール耐性および代謝能を解析した。その結果、供試した 16 種の植物病原菌のうち 8 種がカプシジオール耐性を示し、それらのうち少なくとも 6 種がカプシジオールを他の物質に代謝する能力を持っていることが確認された。一方、供試した 4 種の卵菌 *Phytophthora infestans*, *P. nicotianae*, *P. capsici* および *P. cryptogea* はカプシジオール感受性であり、代謝能を示さなかった。宿主範囲の広い病原菌であることが知られる *Botrytis cinerea* および *Stemphylium lycopersici* はカプシジオールをそれぞれ異なる物質に代謝し、共にベンサミアナに病原性を示した。さらに両病原菌はリシチン代謝能を持ち、ジャガイモに対しても病原性を示した。以上の結果から、病原菌と植物の組み合わせにより、植物の産生するファイトアレキシンを代謝する能力が、病原糸状菌の植物への感染に重要な役割を担う可能性が示された。

Detoxification of Solanaceae phytoalexins by plant pathogenic fungi

Teruhiko Kuroyanagi, Makoto Ojika, Ikuo Sato, Sotaro Chiba, Kazuhito Kawakita and Daigo Takemoto

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

P-100

擬似有性生殖様の現象を介して作出した epichloae エンドファイト菌株の諸性質の解析

磯部仁美¹, 増中章², 菅原幸哉², 多賀正節³, 佐藤育男¹, 千葉壮太郎¹, 川北一人¹, 田中愛子¹, 竹本大吾¹

(¹名大院生農・²農研機構・³岡山大院自然科学)

Epichloae (*Epichloë*/*Neotyphodium* 属菌) 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糸状菌である。有性生殖能を持たない *Neotyphodium* 属菌は、宿主植物内で生育し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限られていると考えられるが、自然からの分離菌株には高い多様性が認められる。また、*Neotyphodium* 属菌の多くが *Epichloë* 属菌と比較してゲノムサイズが著しく大きく、子のう菌が通常 1 コピーしか持たない遺伝子を複数コピー持つ例が頻繁に認められることから、有性生殖とは異なる機構を介してエンドファイトの雑種菌株が出現していると推定されている。これまでに、エンドファイトの同種の異なる菌株間および異種間において、擬似有性生殖様の現象（菌株間の菌糸融合および核融合）を観察した。また、同じ 2 つの親株から作出した 5 株の hybrid 菌について、遺伝子の分布、成長速度、胞子サイズ、抗菌活性などの特徴を解析したところ、表現型の多様性が認められた。さらに hybrid 菌株の染色体を CHEF 解析により調べたところ、hybrid 菌株間で親株から受け継いでいる染色体の組み合わせが異なるだけでなく、親株では検出されないサイズの染色体が出現する例が認められた。一方で、ミトコンドリア DNA の分布を調査したところ、hybrid 菌はどちらかの親株由来のミトコンドリア DNA を受け継いでいることが示された。以上の結果から、エンドファイトは擬似有性生殖様の現象による染色体の大規模かつランダムな再編成により、遺伝的に多様な不完全菌 (*Neotyphodium* 属菌) を出現させている可能性が示された。

Characterization of hybrid endophyte strains produced via parasexual cycle-like phenomenon

Hitomi Isobe¹, Akira Masunaka², Koya Sugawara², Masatoki Taga³, Ikuo Sato¹, Sotaro Chiba¹, Kazuhito Kawakita¹, Aiko Tanaka¹ and Daigo Takemoto¹ (¹Grad. School Bioagr. Sci., Nagoya Univ., ²NARO・³Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Okayama Univ.)

P-101 (O-10)

牧草共生糸状菌 *Epichloë festucae* の Ras 活性化因子 Cdc25 の共生確立における役割

神谷昇汰, 岡村文音, 榎野友香, 佐藤育男, 千葉壮太郎, 川北一人, 田中愛子, 竹本大吾 (名大院生農)

E. festucae はイネ科牧草であるペレニアルライグラスの細胞間隙に共生的に感染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形成酵素 NoxA, ヘテロ三量体 G タンパク質 α サブユニット GpaA, 機能未知の核タンパク質 NsiA などを見出しており、これらの遺伝子を欠損したエンドファイト菌株は、宿主植物と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、いずれも培地上での菌糸融合能をも失っていることから、菌糸融合能と共生確率能には密接な関係があると推定された。そこで、プラスミド挿入変異法を用いて菌糸融合能を欠損するエンドファイト株のスクリーニングを行い、菌糸融合能欠損株 RPA41 を単離した。RPA41 株では低分子量 G タンパク質 Ras の活性化因子をコードする *Cdc25* 遺伝子の Ras 結合ドメインをコードする領域にベクターが挿入されていた。そこで、*Cdc25* 遺伝子を完全に欠損する変異株および Ras 結合ドメインのみを欠損する変異株を作出し、その表現型の解析を行った。その結果、いずれの変異株においても菌糸融合能および宿主植物への感染能が失われており、*Cdc25* の Ras 活性化がエンドファイトの菌糸融合および宿主植物との共生確立に必須であることが示された。

Cdc25, a GEF for small GTPase Ras, is essential for symbiotic infection of *Epichloë festucae* in host grass plant

Shota Kamiya, Ayane Okamura, Yuka Kayano, Ikuo Sato, Sotaro Chiba, Kazuhito Kawakita, Aiko Tanaka and Daigo Takemoto (Grad. School Bioagr. Sci., Nagoya Univ.)

発表者索引

- C*
- Chang Li 66
- E*
- Enkhee Purev 89
- J*
- Jae-Hyuk JANG..... 78
- Jong Seog AHN 78
- K*
- Kaoru Takegawa 53
- Katsuhiko
 Kitamoto..... 53
- Ken Komatsu..... 64
- Kouhei Kawaguchi
 53
- Kwon Hee Su..... 53
- M*
- Minoas Evangelinos52
- P*
- Pamela Gan 83
- R*
- Reinhard Fischer.... 52
- S*
- Seong-Mi Jo 64
- Sung-Hwan Yun..... 64
- T*
- Takashi Kikuma. 53
- Tsutomu Arie 64
- Y*
- Yujiro Higuchi 53
- あ
- 相川俊一 70, 72
- 浅井菜々実.... 31, 50,
 79
- 浅井恒滋 33, 76
- 麻田恭彦 64
- 足立健太郎..... 70
- 浴野圭輔 58, 61
- 阿部郁朗 66, 80
- 阿部敬悦 .37, 42, 46,
 56, 57, 59, 73
- 阿部央行 55
- 阿保春花 76
- 鮎川侑 57
- 荒添貴之 49
- 有江力 57
- 有馬寿英 40, 42
- 淡川孝義 66, 80
- 安藤晃規 41, 51
- 安藤直子 .68, 69, 70,
 72
- い
- 石川格靖 32, 67
- 石川真衣 68
- 石倉幹大 44
- 和泉自泰 41, 51
- 磯部仁美 89, 90
- 一瀬桜子 75
- 井出紗奈江.... 41, 51
- 伊藤考太郎..... 16
- 稲葉真由子.... 37, 63
- 井上大志 75
- 入江俊一 .34, 84, 85,
 87
- 入枝泰樹 81
- 岩井謙一 11, 72
- 岩下和裕 48
- う
- 梅山秀明 37, 59
- え
- 遠藤正伍 36, 61
- お
- 王冬梅..... 80
- 大岩達郎 62
- 太田一良 58, 61
- 大谷冴果 58
- 大沼広宜 67, 74
- 大野聡一郎..... 64
- 小笠原涉 73, 74
- 岡添孝章 55
- 岡拓二..... 58, 61
- 岡村文音 91
- 岡本綾子 76
- 小川順..... 41, 51
- 小川直紀 64
- 小川真弘 54
- 小川雅義 68, 69
- 荻野千秋 ..31, 50, 79
- 荻野千明 49
- 奥田知生 41
- 奥谷芙季 85
- 奥田将生 48
- 奥津果優 45
- 刑部敬史 40, 48
- 刑部裕里子.... 40, 48
- 尾崎紀昭 58
- 長田暢洋 83
- 長田裕之 78
- 小高敦史 38, 46
- 織田健..... 48
- 小野都..... 57
- か
- 甲斐建次 35, 88
- 柿本健一 53
- 梶河直起 34, 82
- 加瀬明日香..... 43
- 片山周平 50
- 片山琢也 .37, 43, 54,
 59
- 勝木理子 41
- 加藤直樹 78
- 加藤光..... 41
- 加藤雅士 ..39, 47, 71
- 門岡千尋 45
- 金丸京子 .33, 37, 63,
 76
- 鎌倉高志 36, 61
- 紙透伸治 36, 61
- 神谷昇汰 91
- 亀井克彦 78
- 亀井健吾 67
- 榎野友香 91
- 河合清..... 37, 59
- 川北一人 .35, 89, 90,
 91
- 川口剛司 .33, 35, 77,
 88
- 川田純毅 56
- 川満洋平 61
- 菅野茂夫 40, 48
- き
- 菊川寛史 51
- 岸野重信 41, 51
- 岸本真治 32, 67
- 北出雄生 80
- 北本勝ひこ..... 54
- 衣笠清美 78
- 木村真33, 68, 69, 70,
 72, 76
- 木村眞 37, 63
- 木本大地 45
- 金京運..... 62
- 金允卿..... 46
- く
- 久下貴紀 77
- 楠屋陽子 ..78, 82, 86
- 楠本憲一 60, 70
- 朽方康裕 43
- 久保康之 .34, 81, 82,
 83, 86
- 栗原璃子 43

黒柳輝彦 35, 90

こ

糀谷紗季 71

高峯和則 45

小鹿一 35, 89, 90

小関卓也 68

小玉紗代 86

小寺里奈 .. 32, 65, 66

後藤駿介 34, 85

後藤正利 .31, 45, 58, 61, 65

五ノ井透 .. 82, 86, 87

小林拓嗣 62

小林哲夫 .33, 37, 63, 76

小松健 57

五味勝也 .38, 54, 55, 71, 75

小森誠也 39, 47

小山泰二 54

近藤昭彦 .31, 49, 50, 79

今野宏 19

さ

斉藤開 66

齊藤亮太 48

酒井杏匠 71

酒井香奈江 82, 86, 87

阪本鷹行 41, 51

坂本正弘 .. 32, 65, 66

坂本裕一 44

櫻谷英治 41, 51

笹倉直也 31, 79

佐藤育男 .35, 89, 90, 91

佐藤志穂 44

佐藤弘基 69, 70

佐藤祐紀 58

佐藤陽子 71

佐原弘師 38, 46

し

塩野義人 68

塩見大輔 81

塩谷友佑 33, 76

宍戸絵里香 87

志田洋介 73, 74

柴田信之 58, 61

島 純 41, 51

島村拓実 68, 69

嶋本孝平 48

志水元亨 .. 39, 47, 71

下北英輔 40, 48

重吉沙衣 87

姑射誠佳 84

庄司郁央 37, 59

白坂憲章 .. 25, 67, 74

白須賢 83

新海航輝 72

新谷尚弘 .38, 54, 55, 75

す

菅生麻友 59

菅原亜寿美 37, 59

菅原二三男 36, 61

菅原幸哉 89, 90

杉江雄太 68, 69

杉本賢吾 33, 76

鈴木一実 .34, 84, 85, 87

鈴木聡 60, 70

鈴木遥香 63

鈴木博子 40, 48

鈴木梨央 71

炭谷順一 .33, 35, 77, 88

せ

関桃子 76

瀬戸口翔 72

全智揚 80

泉津弘佑 .34, 45, 84, 85, 87, 88, 89

そ

外山博英 51

た

高城景子 62

高須賀太一 71

高瀬良和 72

高谷直樹 55

高野義孝 81, 83

高橋梓 87

高橋俊二 78

高橋徹 42, 72

高橋徹 46

高橋弘喜 .. 78, 82, 86

多賀正節 57, 90

高間充 75

田口速男 36, 61

竹内真理衣 76

竹内道雄 .62, 63, 76, 77

竹川薫 31, 53, 58, 60, 61, 65

竹下典男 52

竹本大吾 .35, 89, 90, 91

多田功生 70

多田日菜子 54

田中愛子 .. 89, 90, 91

田中彰 68, 69, 70

田中希望 69

田中千尋 .34, 80, 84, 85, 87, 88, 89

田中信清 36, 61

田中拓未 42, 46

田中大 58, 61

田中瑞己 .38, 54, 55, 75

谷口大樹 74

谷修治 33, 35, 77, 88

田畑麻由良 49

玉置尚徳 45, 72

玉野孝一 47

ち

千葉壮太郎 35, 89, 90, 91

千葉洋史 40, 48

陳帯娣 80

つ

塚本佐知子 41

堤浩子 31, 50, 79

恒松雄太 .. 32, 67, 79

津村亮輔 33, 77

て

寺内裕貴 46

照井亜美 41

と

田路洋紀 75

東條元昭 35, 88

堂前圭佑 43

渡嘉敷直杏 51

都甲祐介 60

外内尚人 23

富永康子 41, 51

豊田早紀 31, 65

な

中沢威人 .32, 36, 52, 65, 66

中島春紫 43, 44

中島将博 36, 61

中野宏軌 43

中野美紀 39, 49

中前彩加 83

中村英淳 54

中山真由美 37, 57, 59, 73

成川恵 36, 61

鳴坂真理 83

鳴坂義弘 83

に

西内巧 81, 83, 86

西尾尚堯 35, 88

西田敬二	49	広瀬優樹	84	松田侑大	66	山形洋平 . 42, 62, 63,	
西堀奈穂子	40, 42	ふ		松永恵美子	31, 65	76, 77	
西村裕志	32, 66	深田史美 .. 34, 81, 82		松永有佳理	84	山川結	44
西村麻里江	39, 49	福田泰久	67, 74	松原佳耶	89	山崎周平	77
の		福岡泰之	57	松渕美月	59	山田淳司	88
野坂亮仁	36, 61	藤井勲	41	松村憲吾	38, 46	山田修	40, 42, 72
は		藤井陽平	54	丸山潤一 .. 43, 54, 56		山田陽香	32, 67
萩原大祐 . 57, 78, 86,		藤井渉	43	み		よ	
87		藤岡智則	37, 59	三浦愛	47	横山綾	84
橋川拓史	89	伏木亨	29	三浦里佳	89	吉崎由美子	45
橋元誠	41	プシュパ S ムルティ		水谷治	40, 42, 72	吉澤和将	74
秦洋二 31, 38, 46, 49,		60	緑川裕良	57	吉田紘樹	34, 85
50, 79		二神泰基	45, 72	三橋隆章	66	吉田裕史	88, 89
服部領太	60, 70	古川健太郎	57, 73	宮川恒	80, 87, 89	吉田泰彦	70, 72
馬場健史	41, 51	古川隆紀	74	三宅晃司	39, 49	吉永良平	63
濱岡修平	64	ほ		宮澤拳	56	吉見啓 37, 56, 57, 59,	
濱野百花	51	堀井雅人	65	宮下正弘	80	73	
早川芙佑華	44	堀内裕之 .. 37, 59, 62		む		り	
林梨咲	40, 42	堀千明	71	村上直之	38, 46	李秋実	58, 61
原田賢	83	本田与一 . 32, 36, 52,		村口元 36, 52, 58, 59		わ	
原田昌彦	57	65, 66		村田俊輔	39, 47	若井暁 31, 49, 50, 79	
ひ		本間ちはる	59	も		渡邊彰	64
樋口裕次郎	31, 53,	ま		森田真由美	70	渡邊彩奈	84
60, 65		前田一行	69, 70	森山裕充	87	渡辺賢二 .. 32, 67, 79	
平沢大樹	73	前田浩	62, 76, 77	や		渡辺隆司	32, 66
平本哲也	54	榊尾俊介	55	八色奈央	31, 65	渡邊哲	78
平山裕一郎	32, 67	増中章	89, 90	矢口貴志	78, 86	渡部昭	71
廣木寛之	44	松井宏介	72			和田悠作	48

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 佐賀大学 農学部
櫻谷 英治 徳島大学大学院 生物資源産業学研究部
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
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 16 回糸状菌分子生物学コンファレンス要旨集

平成 28 年 10 月 24 日 印刷

平成 28 年 10 月 24 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