

目次

コンファレンスプログラム	2
発表演題及び講演時間	3
特別講演要旨	15
シンポジウム講演要旨	18
一般講演要旨	30
ポスター発表講演要旨	40
発表者索引	89
糸状菌分子生物学研究会会則	92
糸状菌分子生物学研究会運営委員名簿	93
糸状菌遺伝子研究会賛助会員	94

第 17 回糸状菌分子生物学コンファレンス

日時：2017年11月16日(木)-17日(金)

会場：佐賀市立東与賀文化ホール

主催：糸状菌分子生物学研究会

協賛：糸状菌遺伝子研究会

日本生物工学会九州支部

11月16日(木)

11:00 – 受付

12:00 – 12:05 開会の辞

12:05 – 14:05 口頭発表 (O1-O10)

14:05 – 14:15 休憩

14:15 – 16:15 口頭発表 (O11-O20)

16:15 – 16:25 休憩

16:25 – 17:25 特別講演

18:30 – 20:30 懇親会 (佐賀市歴史民俗館浪漫座)

11月17日(金)

9:00 – 受付

9:30 – 11:00 ポスター発表 (奇数番号)

11:00 – 12:30 ポスター発表 (偶数番号)

12:30 – 13:30 昼食

13:30 – 15:00 シンポジウム (S1-S3)

15:00 – 15:10 休憩

15:10 – 16:10 シンポジウム (S4, S5)

16:10 – 16:40 総会及び表彰式

16:40 – 16:45 閉会の辞

発表演題および講演時間

11月16日(木) 16:25 - 17:25

特別講演 〔座長：後藤 正利 (佐賀大学)〕

「糸状菌による糖質のランキング機構に関する
遺伝子発現制御の視点からの考察」

小林 哲夫
名古屋大学

11月17日(金) 13:30 - 16:10

シンポジウム

「糸状菌の特徴解明の最前線：基礎から病原性、産業利用まで」

13:30-14:00 〔座長：樋口 裕次郎 (九州大学)〕

S-1 「菌糸生長の分子機構」

筑波大学
竹下 典男

14:00-14:30 〔座長：樋口 裕次郎 (九州大学)〕

S-2 「*Aspergillus fumigatus* が産生する
ガラクトマンナン生合成の全貌解明を目指して」

崇城大学
岡 拓二

14:30-15:00 〔座長：二神 泰基 (鹿児島大学)〕

S-3 「糸状菌が生産する植物バイオマス分解に関わる新規酵素」

名城大学
志水 元亨

15:00-15:10 休 憩

15:10-15:40 〔座長：二神 泰基 (鹿児島大学)〕

S-4 「モロミックス研究での麴菌ゲノム研究とゲノム編集技術」

酒類総合研究所
岩下 和裕

15:40-16:10 〔座長：草場 基章 (佐賀大学)〕

S-5 「炭疽病菌と植物の相互作用：エフェクター研究を中心に」

京都大学
高野 義孝

一般講演 (O-1~O-10) 11月16日(木) 12:05 - 14:05

[座長: 岡拓二 (O-1,2), 志田洋介 (O-3,4,5), 樋口裕次郎 (O-6,7,8), 竹下典男 (O-9,10)]

- 12:05 O-1 製麴時の光照射による遺伝子発現の変化
村上直之, 小高敦史, 佐原弘師, 松村憲吾, 秦洋二 (月桂冠・総研)
- 12:17 O-2 アラビノースは糖代謝系の変動を介してトウモロコシごま葉枯病菌の孢子形成を促進する
吉田裕史, 田中千尋 (京大院・農)
- 12:29 O-3 麴菌における環境ストレス応答性 MAP キナーゼの *glaB* 遺伝子発現への関与
荒井啓, 田中瑞己, 吉村緑, 新谷尚弘, 五味勝也 (東北大院農・生物産業創成)
- 12:41 O-4 麴菌 *Aspergillus oryzae* のコウジ酸生産に関わる新規制御因子 KpeR の機能解析
荒川弦矢¹, 工藤駿斗¹, 梁瀬惇史², 江口優一¹, 小川真弘³, 小山泰二³, 徳岡昌文², 進藤斉², 穂坂賢² (¹東農大院・農, ²東農大・応生, ³野田産研)
- 12:53 O-5 *Aspergillus nidulans* における cAMP 依存性プロテインキナーゼ PkaA を介したセルラーゼ生産抑制機構
國武絵美¹, 李怡², 金丸京子², 木村真², 木村哲哉¹, 小林哲夫² (¹三重大院・生資, ²名大院・生命農)
- 13:05 O-6 麴菌 *Aspergillus oryzae* の液体振盪培養における菌糸接着機構の解析
宮澤拳¹, 吉見啓², 古明地敬介³, 田畑風華¹, 佐野元昭⁴, 阿部敬悦^{1,2} (¹東北大院農・生物産業創成, ²東北大・NICHe, ³東北大農・生物化学, ⁴金沢工大・ゲノム研)
- 13:17 O-7 糸状菌 *Aspergillus nidulans* の低酸素誘導性チオレドキシンの役割
岡添孝章, 阿部央行, 梶尾俊介, 竹下典男, 高谷直樹 (筑波大・生命環境)
- 13:29 O-8 Functional analysis of AoFus3-interacting proteins in the regulation of cell fusion in *Aspergillus oryzae*
Taoning Mo¹, Takuya Katayama¹, Özgür Bayram², Daigo Takemoto³, Gerhard H. Braus⁴, Katsuhiko Kitamoto⁵, Jun-ichi Maruyama¹ (¹Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, ²Dept. of Biol., Maynooth Univ., ³Grad. School Bioagr. Sci., Nagoya Univ., ⁴Dept. of Mol. Microbial., Georg-August-University Göttingen, ⁵Nihon Pharmaceutical Univ.)
- 13:41 O-9 糸状菌 *Aspergillus nidulans* における二成分性情報伝達系の必須遺伝子 *ypdA* の発現抑制による致死性細胞障害と液胞の異常発達
小野都¹, 吉見啓², 福間泰之¹, 緑川裕良¹, 萩原大祐^{2,3}, 古川健太郎⁴, 中山真由美², 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, (現)³千葉大・真菌センター, ⁴新潟大院・医・歯学)
- 13:53 O-10 糸状菌 *Aspergillus nidulans* 核分裂におけるキネシンの役割
堀尾哲也^{1,2}, Berl R. Oakley² (¹日体大・自然科学, ²Dept. Mol. Biosci., Univ. Kansas)

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

[座長: 中沢威人 (O-11,12), 原田賢 (O-13,14), 小玉沙代 (O-15,16), 水谷治 (O-17,18), 二神泰基 (O-19,20)]

- 14:15 O-11 *Aspergillus nidulans* のセクレトーム解析から見出された新規アラビナン分解酵素
新沢祐大¹, 酒井杏匠¹, 糀谷紗季¹, 鈴木健吾¹, 高須賀太一², 堀千明², 鈴木裕満¹,
松江渚¹, 志水元亨¹, 加藤雅士¹ (¹名城大・農, ²北大・農)
- 14:27 O-12 麹菌 D-乳酸脱水素酵素 (D-LDH) のアロステリックな活性促進及び阻害特性について
渡部昭, 佐藤陽子, 五味勝也 (東北大院農・生物産業創成)
- 14:39 O-13 *Botrytis cinerea* 病原性低下変異株群の種々の植物種における病原性の比較解析
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)
- 14:51 O-14 *Bipolaris maydis* におけるジカルボキシミド系殺菌剤耐性に関わる *Dic3* 遺伝子の同定
西行優子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)
- 15:03 O-15 チューリップ球根腐敗病菌の病原性関連 *SIX* 遺伝子群の検出
川部眞登¹, 有江力² (¹富山農総セ園研, ²農工大農)
- 15:15 O-16 イネいもち病菌 RecQ helicase MUSN の DNA 修復機構への関与
木口歌菜¹, 田中寿樹¹, 國吉真史¹, 荒添貴之², 佐久間哲史³, 山本卓³, 桑田茂¹, 大里修一¹
(¹明治大院農, ²東理大院理工, ³広島大院理)
- 15:27 O-17 植物生育促進菌 *Fusarium oxysporum* RS-21 が放出する VOC は側根数増加に関わる
松本守弘¹, 福家光敏², 古谷野暢², 米田淳一², 徳永毅², 小松健¹, 有江力¹ (¹農工大院農, ²アースノート)
- 15:39 O-18 白麹菌におけるミトコンドリア局在型クエン酸輸送体 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鹿児島大・農, ²滋賀県立大・環境科学, ³佐賀大・農)
- 15:51 O-19 麹菌への生合成遺伝子クラスター導入による環状ペプチド化合物 KK-1 の異種生産
吉見啓¹, 山口滋生², 藤岡智則², 河合清², 町田雅之³, 五味勝也⁴, 阿部敬悦^{1,4} (¹東北大・NICHe, ²クミアイ化学工業, ³産総研・生物プロセス, ⁴東北大院農・生物産業創成)
- 16:03 O-20 染色体重複技術を用いた麹菌の二次代謝系クラスター制御因子の同定
高橋理, 篠原靖智, 小山泰二 (野田産研)

ポスター発表 11月17日(金) 9:30 – 11:00 (奇数番号)

11月17日(金) 11:00 – 12:30 (偶数番号)

P-1 麹菌ハイドロフォービン由来の機能性 HypA の基材吸着性の検討

栗原璃子, 中野宏軌, 朽方康裕, 加瀬明日香, 中島春紫 (明治大院・農・農化)

P-2 麹菌のミトコンドリア局在ピルビン酸キャリアタンパク質欠損による乳酸生産性の向上

張斯来¹, 若井暁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-3 麹菌への生合成遺伝子クラスター導入による環状ペプチド化合物 KK-1 の異種生産

吉見啓¹, 山口滋生², 藤岡智則², 河合清², 町田雅之³, 五味勝也⁴, 阿部敬悦^{1,4} (¹東北大・NICHe, ²クミアイ化学工業, ³産総研・生物プロセス, ⁴東北大院農・生物産業創成)

P-4 *Pleurotus salmoneostramineus* における形質転換系の開発

魚川岳登, 佐藤魁, 川野雄亮, 清原昂輝, 阿部美穂, 福田泰久, 白坂憲章 (近畿大・農応生化)

P-5 白麹菌における Sirtuin と *laeA* のホモログ遺伝子の機能解析

宮本葵¹, 門岡千尋¹, 濱田健太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鹿児島大・農, ²佐賀大・農)

P-6 糸状菌 *Emericella varicolor* IFM4210 の asteltoxin 生合成遺伝子

橋元誠, 佐藤紀恵, 藤井勲 (岩手医大・薬)

P-7 麹菌を用いた遊離型高度不飽和脂肪酸の生産化

玉野孝一¹, ロバートコックス², 柘植謙爾², 三浦愛¹, 伊藤あやの³, 石井純², 田村具博¹, 近藤昭彦², 町田雅之¹ (¹産総研・生物プロセス, ²神戸大院・イノベ, ³北海道ハイテク専門学校)

P-8 麹菌 *Aspergillus oryzae* におけるゲノム編集を用いた育種 – Deferriferrychrisin を高生産する脱鉄抑制株の作出 –

戸所健彦, 柏原宏行, 伊出健太郎, 坂東弘樹, 福田克治, 堤浩子, 秦洋二 (月桂冠・総合研究所)

P-9 染色体重複技術を用いた麹菌の二次代謝系クラスター制御因子の同定

高橋理, 篠原靖智, 小山泰二 (野田産研)

P-10 比較ゲノム解析のための *Trichoderma reesei* のセルラーゼ生産性変異株の取得と解析

佐藤直美, 鈴木義之, 志田洋介, 小笠原渉 (長岡技科大・生物)

P-11 麹菌の co-transformation 時のコピー数多型性に関する解析

若井暁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-12 白麴菌におけるミトコンドリア局在型クエン酸輸送体 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鹿児島大・農, ²滋賀県立大・環境科学, ³佐賀大・農)

P-13 植物生育促進菌 *Fusarium oxysporum* RS-21 が放出する VOC は側根数増加に関わる

松本守弘¹, 福家光敏², 古谷野暢², 米田淳一², 徳永毅², 小松健¹, 有江力¹ (¹農工大院農,
²アースノート)

P-14 黒麴菌 α -1,3-glucan 合成遺伝子 *agsE* がプロトプラスト形成に及ぼす影響

渡嘉敷直杏¹, 利田賢次², 林梨咲², 西堀奈穂子², 山田修², 渡邊泰祐³, 水谷治^{1,2}, 外山博英¹
(¹琉球大院・農, ²酒総研, ³日大・生物資源)

P-15 麴菌における植物由来二次代謝産物の生産

菅英一郎^{1,2}, 勝山陽平¹, 丸山潤一¹, 小山泰二², 大西康夫¹ (¹東大院・農生科・応生工, ²野田産
研)

P-16 麴菌マルトーストランスporter-MalP 分解時のユビキチン化リジン残基の同定

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

P-17 黒麴菌 *Aspergillus luchuensis* が生産する香気物質 1-octen-3-ol の生合成遺伝子破壊株の取得

片岡涼輔¹, 澁谷理恵², 橋本美春², 山村愛海², 渡邊泰祐^{1,2}, 荻原淳^{1,2} (¹日大院生資科・生資利
用, ²日大生資科・生命化)

P-18 キノコ由来生合成遺伝子の高発現による物質生産

榎谷貴洋, 平山裕一郎, 松崎信生, 恒松雄太, 佐藤道大, 渡辺賢二 (静岡県大薬)

P-19 黄麴菌 *Aspergillus oryzae* における分泌経路に関与する SM タンパク質の解析

原爽太郎, 竹川薫, 樋口裕次郎 (九大院・生資環・生命機能)

P-20 黒麴菌における主要転写因子破壊株ライブラリーの作製 その2

西堀奈穂子¹, 水谷治², 林梨咲¹, 有馬寿英³, 山田修¹ (¹酒総研, ²琉球大学・農, ³県立広島大
学・生環)

P-21 Analysis of unconventional protein secretion of acyl-CoA binding protein in *Aspergillus oryzae*

Hee Su Kwon¹, Kouhei Kawaguchi², Takashi Kikuma², Katsuhiko Kitamoto², Kaoru Takegawa¹, Yuiro
Higuchi¹ (¹Dept. of Biosci. Biotechnol., Kyushu Univ., ²Dept. of Biotechnol., Univ of Tokyo)

- P-22 Functional analysis of AoFus3-interacting proteins in the regulation of cell fusion in *Aspergillus oryzae***
Taoning Mo¹, Takuya Katayama¹, Özgür Bayram², Daigo Takemoto³, Gerhard H. Braus⁴, Katsuhiko Kitamoto⁵, Jun-ichi Maruyama¹ (¹Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, ²Dept. of Biol., Maynooth Univ., ³Grad. School Bioagr. Sci., Nagoya Univ., ⁴Dept. of Mol. Microbial., Georg-August-University Göttingen, ⁵Nihon Pharmaceutical Univ.)
- P-23 *Trichoderma reesei* における核挙動とセルラーゼ生産性との関連の解明**
NGUYEN LE QUYNH ANH, 藤原南帆, 志田洋介, 小笠原渉 (長岡技科大・生物)
- P-24 糸状菌 *Aspergillus nidulans* の低酸素誘導性チオレドキシンの役割**
岡添孝章, 阿部央行, 梶尾俊介, 竹下典男, 高谷直樹 (筑波大・生命環境)
- P-25 黄麹菌 *Aspergillus oryzae* のエンドサイトーシス関連タンパク質 AipA 及び相互作用因子の解析**
柿本健一, 竹川薫, 樋口裕次郎 (九大院・生資環・生命機能)
- P-26 麹菌 *A. oryzae* におけるオートファジーによる核の分解 (ヌクレオファジー) の動態観察**
菊間隆志^{1, 2}, 丸山潤一¹, 北本勝ひこ³ (¹東大院・農生科・応生工, ²理研・伊藤細胞制御化学, ³日薬大・薬)
- P-27 黄麹菌 *Aspergillus oryzae* における小胞体関連分解因子に関する解析**
菊松風大, 竹川薫, 樋口裕次郎 (九大院・生資環・生命機能)
- P-28 麹菌 *Aspergillus oryzae* の液体振盪培養における菌糸接着機構の解析**
宮澤拳¹, 吉見啓², 古明地敬介³, 田畑風華¹, 佐野元昭⁴, 阿部敬悦^{1, 2} (¹東北大院農・生物産業創成, ²東北大・NICHe, ³東北大農・生物化学, ⁴金沢工大・ゲノム研)
- P-29 糸状菌の先端生長におけるカルシウム情報伝達経路の役割**
芹澤知子¹, Bastian Jöhnk², Gerhard Braus², 高谷直樹¹, 竹下典男¹ (¹筑波大・生命環境, ²Georg-August- Univ.)
- P-30 *Aspergillus nidulans* の形態形成におけるホスファチジルセリンデカルボキシラーゼの機能解析**
吉川阿佳里, 高城景子, 福田良一, 堀内裕之 (東大院・農生科・応生工)
- P-31 イネいもち病菌のキチンデアセチラーゼ Cbp1 の付着器形成誘導時における挙動の解析**
黒木美沙, 岡内香奈, 志賀友理子, 前村知佳, 荒添貴之, 鎌倉高志 (東理大)
- P-32 *Aspergillus fumigatus* の AfMnt1 は O-マンノース型ガラクトマンナンの生合成に関わる α 1,2-マンノース転移酵素である**
坂本梓¹, 尾上拓哉², 田中大³, 柴田信之³, 太田一良¹, 岡拓二¹ (¹崇城大・生物生命, ²崇城大院・工, ³東北医薬大・薬)

P-33 麹菌 *A. oryzae* における明暗周期変化に対する一過的応答機構の解析

山本実侑¹, 川田純毅², 藤井陽平², 片山琢也², 溝上豊³, 松尾花枝³, 丸山潤一², 北本勝ひこ⁴
(¹東大・理科2類, ²東大院・農生科・応生工, ³横浜サイエンスフロンティア高校, ⁴日薬大・薬)

P-34 *Penicillium purpurogenum* のアンモニウムトランスポーター遺伝子の同定と異種発現による機能解析

小嶋涼¹, 飯嶋紗季², 光澤浩², 渡邊泰祐¹, 荻原淳¹ (¹日大生資科・生命化, ²日大生資科・くらしの生物)

P-35 糸状菌 *Aspergillus nidulans* における二成分性情報伝達系の必須遺伝子 *ypdA* の発現抑制による致死性細胞障害と液胞の異常発達

小野都¹, 吉見啓², 福間泰之¹, 緑川裕良¹, 萩原大祐^{2,3}, 古川健太郎⁴, 中山真由美², 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, (現)³千葉大・真菌センター, ⁴新潟大院・医・歯学)

P-36 麹菌 *Aspergillus oryzae* における HET ドメインをもつタンパク質の機能解析

森法子¹, 片山琢也¹, 岩下和裕², 丸山潤一¹ (¹東大院・農生科・応生工, ²酒総研)

P-37 *Aspergillus fumigatus* のβ1,5-ガラクトフラノース糖鎖は GfsA と GfsC によって生合成される

千原由莉亜¹, 尾上拓哉², 田中大³, 後藤正利⁴, 柴田信之³, 太田一良¹, 岡拓二¹ (¹崇城大・生物生命, ²崇城大院・工, ³東北医薬大・薬, ⁴佐賀大・農)

P-38 麹菌におけるアレクチン様タンパク質 CreD によるグルコース誘導性エンドサイトーシスとカーボンカタボライト抑制の制御

田中瑞己^{1,2}, 平本哲也², 多田日菜子², 一瀬桜子², 新谷尚弘², 五味勝也² (¹静県大・食栄, ²東北大院・農)

P-39 黄麹菌 *Aspergillus oryzae* における初期エンドソーム動態の有用物質生産への関与

都甲祐介, 竹川薫, 樋口裕次郎 (九大院・生資環)

P-40 *Aspergillus fumigatus* の CmsA は真菌型ガラクトマンナンのマンナン主鎖生合成に関わるα1,2-マンノース転移酵素である

尾上拓哉¹, 田中大², 後藤正利³, 柴田信之², 太田一良¹, 岡拓二¹ (¹崇城大院・工, ²東北医薬大・薬, ³佐賀大・農)

P-41 黄麹菌 *Aspergillus oryzae* の GPI アンカー型アスパラギン酸プロテアーゼ oryzapsin の機能解析

片桐珠希, 竹内道雄, 山形洋平 (東京農工大・応生化)

P-42 糸状菌 *Aspergillus nidulans* 核分裂におけるキネシンの役割

堀尾哲也^{1,2}, Berl R. Oakley² (¹日体大・自然科学, ² Dept. Mol. Biosci., Univ. Kansas)

- P-43 Characterization of a glucuronoyl esterase (GE) from *Aspergillus fumigatus*: the role of Lys209 in the preference of 4-O-methyl group in the substrate**
Hung Hiep Huynh¹, Nozomi Ishii², Ichiro Matsuo², and Manabu Arioka¹ (¹Department of Biotechnology, The University of Tokyo, ²Department of Chemistry and Chemical Biology, Gunma University)
- P-44 植物病原性糸状菌で見いだされた alternapyrone 生合成遺伝子クラスターの機能解析**
佐藤優哉¹, 南篤志¹, 熊倉直祐², Gan Pamela², 尾崎太郎¹, 劉成緯¹, 藤井勲³, 白須賢², 及川英秋¹
(¹北大院理, ²理研・植物免疫, ³岩手医科大薬)
- P-45 麹菌 *Aspergillus oryzae* 由来タンナーゼ AoTanB の生化学的特性**
市川響太郎, 佐々木克仁, 塩野義人, 小関卓也 (山形大農)
- P-46 麹菌クチナーゼ様エステラーゼ CutC の示す特徴的な酵素学的諸性質**
小幡公平, 山岸純也, 新谷智子, 渡部昭, 新谷尚弘, 五味勝也 (東北大院・農 生物産業創成)
- P-47 *Aspergillus nidulans* のセクレトーム解析から見出された新規アラビナン分解酵素**
新沢祐大¹, 酒井杏匠¹, 糀谷紗季¹, 鈴木健吾¹, 高須賀太一², 堀千明², 鈴木裕満¹, 松江渚¹, 志水元亨¹, 加藤雅士¹ (¹名城大・農, ²北大・農)
- P-48 白色腐朽菌ヒラタケにおけるキシラナーゼ群の機能欠損が木質リグニン分解に与える影響**
湯村直樹¹, 中沢威人¹, 竹中敦紀¹, 大沼広宜², 泉津弘佑³, 福田泰久⁴, 入江俊一³, 白坂憲章⁴, 坂本正弘¹, 本田与一¹ (¹京大・院農, ²近大・院農, ³滋賀県大・環境, ⁴近大・農)
- P-49 麹菌 D-乳酸脱水素酵素 (D-LDH) のアロステリックな活性促進及び阻害特性について**
渡部昭, 佐藤陽子, 五味勝也 (東北大院農・生物産業創成)
- P-50 糸状菌由来の新規ペルオキシダーゼの探索**
北村優佳, 梶尾俊介, 竹下典男, 高谷直樹 (筑波大・生命環境)
- P-51 アカパンカビ *phr* 遺伝子の発現調節に関する研究**
石橋僚, 一石昭彦 (東洋大院・生命科学)
- P-52 Identification of cis-acting elements in the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase terminator of *Ceriporiopsis subvermispora***
Dong X. Nguyen, Emi Nishisaka, Takehito Nakazawa, Masahiro Sakamoto, Yoichi Honda (Kyoto Univ.)
- P-53 麹菌 *Aspergillus oryzae* とその近縁種のエノラーゼ遺伝子における転写開始点の比較解析**
井上大志¹, 田中瑞己², 新谷尚弘¹, 五味勝也¹ (¹東北大院・農・生物産業創成, ²静岡県大・食栄)

- P-54** 麹菌カーボンカタボライト抑制関連因子 CreA の有機酸生産制御への関与
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-55** 黄麹菌 *Aspergillus oryzae* において分生子特異的に転写が起こる *csrA* 遺伝子領域の機能解析
加藤晴朗, 辻井雅, 前田浩, 山形洋平 (農工大院・応生化)
- P-56** 麹菌における環境ストレス応答性 MAP キナーゼの *glaB* 遺伝子発現への関与
荒井啓, 田中瑞己, 吉村緑, 新谷尚弘, 五味勝也 (東北大院農・生物産業創成)
- P-57** 麹菌 *Aspergillus oryzae* のコウジ酸生産に関わる新規制御因子 KpeR の機能解析
荒川弦矢¹, 工藤駿斗¹, 梁瀬惇史², 江口優一¹, 小川真弘³, 小山泰二³, 徳岡昌文², 進藤斉², 穂坂賢² (¹東農大院・農, ²東農大・応生, ³野田産研)
- P-58** *Pleurotus salmoneostramineus* L.Vass NBRC31859 株の単核体の配列解析およびデータベースの構築
佐藤魁, 中筋千晶, 福田泰久, 白坂憲章 (近畿大・農応生化)
- P-59** ウシグソヒトヨタケにおける子実体発生制御に関わる遺伝子の特定
坂本裕一¹, 佐藤志穂¹, 村口元², 中沢威³, 刑部敬⁴ (¹岩手生工研, ²秋田県立大, ³京大・院農, ⁴徳島大)
- P-60** 糸状菌 *Trichoderma reesei* におけるトランセプターCRT1 の機能解析
志田洋介¹, 北原雪菜¹, 森一樹², 油谷幸代², 小笠原渉¹ (¹長岡技科大・生物, ²産総研)
- P-61** 植物ホルモンを用いる糸状菌休眠型二次代謝経路の活性化
森下陽平¹, 岡崎裕亮¹, 羅伊伊¹, 萩原大祐³, 高橋弘喜³, 大島吉輝², 浅井禎吾¹ (¹東大院・総合文化, ²東北大院・薬, ³千葉大・真菌センター)
- P-62** 真菌特有の転写因子 HapX の鉄硫黄クラスター結合モチーフの解析
村田俊輔, 辻上誠也, 山下美春, 小森誠也, 志水元亨, 加藤雅士 (名城大・農)
- P-63** 麹菌のアゾール系薬剤耐性に関与する転写因子 AtrR の *cis-element* 解析
長野晋雄, 大場歩, 萩原大祐¹, 田中瑞己, 新谷尚弘, 川本進¹, 五味勝也 (東北大院・農・生物産業創成, ¹千葉大・真菌センター)
- P-64** *Aspergillus aculeatus* における UDP-glucose 4-epimerase とセルラーゼ生産制御の関係
白柳英俊, 谷修治, 炭谷順一, 川口剛司 (阪府大院・生命環境)
- P-65** 担子菌ヒトヨタケとヒラタケとの間における *snf5* および *rmt1* の遺伝子破壊が炭素源代謝および有性形態形成に及ぼす影響の比較解析
堀井雅人, 中沢威人, 坂本正弘, 本田与一 (京大・院農)

- P-66** 糸状菌 *Trichoderma reesei* における分泌プロテアーゼの生産応答機構の解析
鈴木義之¹, Nayani Daranagama¹, 志田洋介¹, 森一樹², 油谷幸代², 小笠原渉¹ (¹長岡技科大・生物, ²産総研)
- P-67** *Aspergillus nidulans* における cAMP 依存性プロテインキナーゼ PkaA を介したセルラーゼ生産抑制機構
國武絵美¹, 李怡², 金丸京子², 木村真², 木村哲哉¹, 小林哲夫² (¹三重大院・生資, ²名大院・生命農)
- P-68** *Aspergillus nidulans* の糖代謝に関連する 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, 岡拓二², 後藤正利³, 竹川薫¹ (¹九大院・生資環, ²崇城大・生物生命, ³佐賀大・農)
- P-69** 立体選択的デカリン形成を担う Fsa2 ファミリーDiels-Alderase の探索
加藤直樹, 野川俊彦, 衣笠清美, 高橋俊二, 長田裕之 (理研 CSRS)
- P-70** アラビノースは糖代謝系の変動を介してトウモロコシごま葉枯病菌の孢子形成を促進する
吉田裕史, 田中千尋 (京大院・農)
- P-71** *Aspergillus nidulans* の Sirtuin アイソザイムの機能解析
小田倉里佳, 伊藤英里子, 竹下典男, 榊尾俊介, 高谷直樹 (筑波大・生命環境)
- P-72** メロテルペノイド化合物アスコクロリンの後期生合成反応の解明
全智揚¹, 王冬梅^{1,2}, 淡川孝義¹, 阿部郁朗¹ (¹東大院・薬, ²中国・中山大学・薬)
- P-73** 製麹時の光照射による遺伝子発現の変化
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-74** 糸状菌ジテルペノイドピロン類のポストゲノム型天然物探索
塚田健人^{1,2}, 新木翔之¹, 金子秋穂¹, 大島吉輝², 浅井禎吾¹ (¹東大院総合文化, ²東北大院薬)
- P-75** Biosynthesis of Meroterpenoids, Verruculide A/Chrodrimanin A
Tongxuan Bai¹, Zhiyang Quan¹, Takayoshi Awakawa¹, Ikuro Abe¹ (¹Grad. Sch. of Pharm. Sci., Univ. of Tokyo)
- P-76** *Aspergillus nidulans* のグリコーゲン代謝と菌糸内不均一性
榊尾俊介, 岡添孝章, 竹下典男, 高谷直樹 (筑波大学・生命環境系)
- P-77** リポペプチド生合成におけるハイブリッド形成反応に関与する新規酵素の同定
木下浩, 北村仁見, 仁平卓也 (阪大・生物工学国際交流セ)

- P-78** トウモロコシごま葉枯病菌における *BmCrz1* 遺伝子破壊株は、生育阻害物質を分泌する
尾上魁, 住田卓也, 北出雄生, 吉田裕史, 宮下正弘, 宮川恒, 田中千尋 (京大・院・農)
- P-79** Investigation of *in vivo* phenotypic evolution in clinical isolates of *Aspergillus fumigatus*
Cai Bian¹, Daisuke Hagiwara¹, Yoko Kusuya¹, Akira Watanabe¹, Hiroki Takahashi^{1,2} (¹MMRC, Chiba Univ.,
²MCRC, Chiba Univ.)
- P-80** 牧草共生エンドファイトの細胞融合と共生確立に関与する *Cdc25* および *RasB* の機能解析
稲垣茉莉子, 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)
- P-81** ウリ類炭疽病菌における病原性欠損変異株 $\Delta coppt1$ の性状解析
梶河直起, 深田史美, 久保康之 (京府大院・生環)
- P-82** ウリ類炭疽病菌トレオニンシンターゼ *CoTHR4* は病原性と孢子発芽に関与する
原田賢, 奥野哲郎 (龍谷大・植生)
- P-83** *Botrytis cinerea* 病原性低下変異株群の種々の植物種における病原性の比較解析
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-84** 擬似有性生殖により作出した *Epichloae* エンドファイト Hybrid 菌株の染色体構成の解析
三浦里佳¹, 磯部仁美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-85** ウリ類炭疽病菌の F-box 遺伝子 *CoGRR1* は付着器細胞の生存維持に重要である
住田卓也¹, 泉津弘佑², 田中千尋¹ (¹京大院・農, ²滋賀県大・環境科学)
- P-86** 全ゲノム解析手法に基づく抗真菌性化合物 Tolnifanide 作用点の解析
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滋賀県大院・環境, ²京大院・農)
- P-87** ウリ類炭疽病菌の MOR 経路下流転写因子 *MTF4* は植物シグナル認識を介した付着器形成および病原性に関与する
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-88** ウリ類炭疽病菌のホメオボックス転写因子 *CoHox4* は多様な形態分化および病原性に関与する
小幡善也, 横山綾, 泉津弘佑, 入江俊一, 鈴木一実 (滋賀県大院・環境)
- P-89** イネいもち病菌における菌糸融合検出系の検討と関連遺伝子の解析
松尾涼平, 前田一行, 桑田茂, 大里修一 (明治大院農)

- P-90** *Bipolaris maydis* におけるジカルボキシミド系殺菌剤耐性に関わる *Dic3* 遺伝子の同定
西行優子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-91** チューリップ球根腐敗病菌の病原性関連 *SIX* 遺伝子群の検出
川部眞登¹, 有江力² (¹富山農総セ園研, ²農工大農)
- P-92** 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, 宿主の防御応答に関与する
長田暢洋¹, 原田賢², 奥野哲郎², 西内巧³, 久保康之¹ (¹京府大・生環, ²龍谷大・農, ³金沢大・学際セ)
- P-93** 植物病原糸状菌 *Colletotrichum higginsianum* のゲノム変異にトランスポゾンに関与する
津島綾子^{1,2}, Pamela Gan², 熊倉直祐², 鳴坂真理³, 高野義孝⁴, 鳴坂義弘³, 白須賢^{1,2} (¹東大院・理, ²理研・CSRS, ³岡山生物研, ⁴京大院・農)
- P-94** トウモロコシごま葉枯病菌におけるエキソサイトーシス関連因子 *Exo70* の機能解析
辻健也, 北出雄生, 住田卓也, 吉田裕史, 田中千尋 (京大院・農)
- P-95** *Aspergillus fumigatus* の銅代謝転写因子 *Afmacl1* 及び *aceA* の機能解析
植屋陽子¹, 辺彩¹, 萩原大祐¹, 矢口貴志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-96** 植物由来キチン分解酵素の抗真菌活性における各ドメインの役割
平良東紀 (琉大農・亜熱生資)
- P-97** トウモロコシごま葉枯病菌の *Septin* の同定と機能解析
北出雄生¹, 泉津弘佑², 住田卓也¹, 田中千尋¹ (¹京大・院・農, ²滋賀県大・環境科学)
- P-98** イネいもち病菌 *RecQ* helicase *MUSN* の DNA 修復機構への関与
木口歌菜¹, 田中寿樹¹, 國吉真史¹, 荒添貴之², 佐久間哲史³, 山本卓³, 桑田茂¹, 大里修一¹ (¹明治大院農, ²東理大院理工, ³広島大院理)

糸状菌分子生物学コンファレンス 特別講演

糸状菌による糖質のランキング機構に関する遺伝子発現制御の視点からの考察

小林 哲夫

(名古屋大学 大学院生命農学研究科)

微生物酵素の産業利用の始まりは 1894 年のタカジアスターゼに遡る。タカジアスターゼは麹菌の分泌酵素のミクスチャであるがその主成分はアミラーゼであり、糸状菌由来多糖分解酵素の産業利用の初めての例とも捉えられる。その後、アミラーゼを始めとして、セルラーゼ、マンナーゼ、キシラナーゼなどの糸状菌多糖分解酵素が次々と産業用酵素として生産され、我々の生活に大きく関わっていることは周知のところである。さらに、近年のバイオマス有効利用の潮流により、多糖分解酵素の産業上での重要性は増している。一方、産業用糸状菌酵素の長い歴史や需要の高まりに比べて、その生産制御に関する基礎研究は未だ途上であり、まだまだ多くの謎が解明されていない。

遺伝子の発現レベルは、転写誘導と転写抑制のバランス、ならびに当該 mRNA の安定性などにより決定される。最も研究が進んでいる *Aspergillus* 属糸状菌ではアミラーゼ遺伝子は AmyR、キシラナーゼ遺伝子は XlnR という転写活性化因子によって発現が制御される。セルラーゼとマンナーゼ遺伝子については種により少し異なり、*A. oryzae* では ManR が両者の転写誘導に関わるのに対し、*A. nidulans* では ClrB がセルラーゼ遺伝子を、そのパラログの ManS がマンナーゼ遺伝子を制御する。ManR と ClrB はオルソログである。これらの転写因子はいずれも Zn(II)₂Cys₆ 型の DNA 結合ドメインを持つことを特徴とする真菌に特異的な転写因子である。有名な出芽酵母の Gal4 もこのタイプに属するが、その転写活性化メカニズムは真菌特異的な転写因子を代表するものではない。むしろ、このタイプの転写因子の転写制御メカニズムは個々に異なると考えた方がよく、当然、多糖分解酵素遺伝子についても個々の転写活性化因子についての解析なくして転写誘導システムの理解やその結果に根差した応用は不可能である。

一方、糸状菌における多糖分解酵素遺伝子はカーボンカタボライト抑制 (CCR) を受ける。CCR に関わる転写抑制因子は CreA とされており、その関与の程度は遺伝子によって異なる。多糖分解酵素遺伝子で特に強力に CCR により制御されるのはセルラーゼ遺伝子であり、誘導物質以外のほぼ全ての糖質の存在下で抑制される。セルラーゼ遺伝子の CCR は CreA 変異でわずかにしか解除されないため、CreA 非依存的な CCR の存在は明らかである。

本講演では、個々の転写活性化因子による誘導のメカニズムと CCR による抑制のメカニズムについて我々の研究成果に基づいて考察する。

1. AmyR によるアミラーゼ遺伝子の転写誘導機構

A. nidulans の AmyR は通常は細胞質に局在し、誘導物質が存在すると核移行してアミラーゼ遺伝子群の転写を活性化する。その結合配列は CGGN₈(C/A)GG である。生理的誘導物質としてはイソマルトースが最も強力である。興味深いのは、アミラーゼ遺伝子の転写抑制物質として知られるグルコースも誘導物質として機能する点である。ただし、野生株におけるグルコース誘導は微弱あるいは検出不能であり、CreA の変異株で顕著に誘導が観察さ

れる。すなわち、グルコース存在下では転写誘導と抑制が同時に働き、結果として転写が起こらないことになる。誘導物質に応答した核移行に関しては、どのようなメカニズムが明らかとなっていない。我々の primitive なデータでは AmyR は Hsp70 と複合体形成をしていると思われ、また、誘導物質存在下で AmyR 複合体の分子量が低下する。Hsp40, Hsp70, Hsp90 やほかの数種の因子が転写活性化因子と複合体を形成して転写制御に関わる例が知られており、AmyR もシャペロンとのコンプレックスとして存在し、誘導条件下でいずれかのサブユニットが解離して、核移行が可能となると考えている。時間を追って AmyR の細胞内動態を調べると、イソマルトース誘導に伴って数分程度で AmyR は核移行し、その後 15 分程度でリン酸化される。また約 1 時間後には分解されてしまう。一方、非誘導条件下の AmyR は比較的安定である。これらから AmyR による転写活性化を Off にするシステムとして AmyR の分解が関わると考えられ、リン酸化は分解の指標になると考えている。

2. 転写活性化因子 XlnR によるキシラナーゼ遺伝子の転写誘導機構

A. oryzae では XlnR の制御下遺伝子はキシランの分解に必要なと考えられる全ての分解酵素遺伝子と、セルラーゼ遺伝子、ペントース代謝系遺伝子などである。XlnR は GGCTAAA とその類似配列に結合すると考えられているが、最近の我々の研究によれば CGGNTAAW が XlnR モノマーの結合コンセンサスであり、またダイマーとして TTAGSCTAA に結合する。モノマー結合とダイマー結合の生理的意義の違いはまだ不明である。XlnR は AmyR と異なり常に核に局在し非誘導条件下でも DNA 結合可能であるため、常に DNA に結合していると考えている。誘導物質のキシロース存在下では XlnR は速やかにリン酸化され、誘導物質を除去すると脱リン酸化される。6 カ所の推定リン酸化部位についての変異解析では、2 カ所の変異により XlnR の転写活性化能が失われた。従って、リン酸化が XlnR 活性の On/Off を担っていると考えられる。

3. セルラーゼ、マンナナーゼ遺伝子の転写誘導機構

A. nidulans のセルラーゼ遺伝子の転写誘導には ClrB に加え広域転写因子である McmA が深くかかわっている。McmA は真核生物に保存された MADS box protein であり、セルラーゼ生産だけでなく、プロテアーゼ生産や有性生殖、無性生殖にも関わる多機能転写因子である。ClrB のセルラーゼプロモーターへの結合は McmA に依存しており、McmA との相互作用により CCGN₂CCN₆GG へ結合する。ClrB はダイマーとして McmA 非依存的に DNA に結合することも可能で、その結合配列は CGGN₈CCG である。従って、ClrB 制御下の遺伝子群は McmA 依存性で二つに分類されることになる。McmA 依存性の遺伝子の発現には ClrB の活性化だけでなく、McmA の活性化も必要であると考えられるが、現在のところ McmA の活性化条件は明らかとなっていない。

ClrB と ManR はオルソログであるにもかかわらず、前者のマンナナーゼ生産への関与は微弱、後者は必須である。*A. nidulans* では ClrB パラログの ManS がマンノビオースに応答したマンナナーゼ遺伝子誘導を行う。ManS は一部の *A. nidulans* に系統的に近い一部の *Aspergillus* と *Penicillium* 属に分布している。従って、*Penicillium* と *Aspergillus* が分岐したのちに *A. oryzae* や *A. niger* で ManS が失われたと推測している。

4. カーボンカタボライト抑制 (CCR) とパラログ間競合

前述したようにセルラーゼ生産は誘導物質以外のほぼ全ての炭素源で抑制される。転写抑制因子 CreA の変異株でも、炭素源の種類によって影響は異なるとは言え、やはり抑制さ

れてしまう。この原因となる抑制メカニズムについては長年の疑問であったが、プロテインキナーゼ破壊株ライブラリーの探索によりようやく解明の糸口をつかんだ。セルラーゼ遺伝子の CCR に大きく関わるのはプロテインキナーゼ A (PkaA) であった。PkaA による CCR はセルラーゼが主と思われ、例えばアミラーゼでは PkaA 破壊による抑制解除は微弱である。また、*A. nidulans* には PkaA 上流と考えられる G α が三種存在するがその中の GanB が CCR に関わることも明らかとなった。つまり、G タンパク質共役受容体、三量体 G タンパク質が関与する cAMP シグナリングがセルラーゼ遺伝子の CCR に関わる。

また、ClrB と ManS, XlnR と AraR (XlnR パラログで XlnR と同様にペントース代謝を制御する) というパラログ間で競合が起こることも見出されている。ClrB はセロビオースとマンノビオースに応答するが、マンノビオースによるセルラーゼ誘導はわずかである。これは ManS がセルラーゼ誘導を抑制するためである。また、XlnR と AraR の DNA 結合配列は極めて類似しており、どちらも結合可能な部位では DNA 結合での競合が起こる。しかし、この競合が発現にどう影響するかはまだわかっていない。

以上のように、糸状菌多糖分解酵素遺伝子の発現は真菌特異的転写因子による誘導に加えて、CreA や cAMP シグナリング、パラログ間競合などによる抑制によって制御されている。抑制に関してはアミラーゼ遺伝子では CreA、セルラーゼ遺伝子では cAMP シグナリングが主として働く。さらに我々はキシラナーゼとマンナナーゼ遺伝子の転写抑制に関わる新たな経路を見出しつつある。自然環境のような様々な糖質の共存下では、このような転写抑制機構をかいくぐった酵素遺伝子のみが誘導される。これにより糸状菌は炭素源のランキングを行い、資化の容易なものから順次利用するのではないかと考えている。

ご略歴

1984 年 3 月	東京大学大学院農学系研究科博士課程 修了
1984 年 4 月	理化学研究所 (研究員補, 研究員, 前任研究員)
1995 年 1 月	名古屋大学農学部 助教授
2003 年 7 月	名古屋大学大学院生命農学研究科 教授 現在に至る

糸状菌分子生物学コンファレンス シンポジウム
 「糸状菌の特徴解明の最前線：基礎から病原性、産業利用まで」
 S-1

菌糸生長の分子機構

竹下 典男
 (筑波大学 生命環境系)

糸状菌の菌糸細胞は、極性を菌糸の先端に維持することで先端生長を行うことから、細胞極性と形態形成に関わる基礎研究の材料として適している (図 1A)。また、糸状菌の動植物に対する病原性やその高い酵素分泌能は菌糸状の形態と密接に関連していることから、糸状菌の菌糸状の形態を支える先端生長の機構を理解することは、糸状菌が関わる動植物への病害防除、醸造・発酵、抗生物質・有用酵素生産などの諸産業に貢献する (図 1B)。糸状菌の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、必要である (図 1C)。

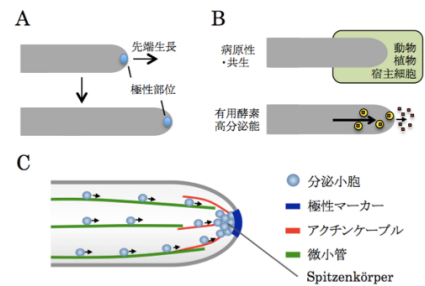


図1. (A) 糸状菌の菌糸の先端生長 (B) 糸状菌の菌糸形態の重要性 (C) 菌糸の先端生長の機構

1) 極性マーカーによる極性制御

極性マーカータンパク質 TeaA (細胞質), TeaR (膜結合性) が、菌糸先端に局在し、菌糸の伸長方向を制御する機構が示された (図 2A)。TeaA は、微小管の伸長により菌糸先端へ輸送され、微小管が菌糸先端に到達すると、TeaA は形質膜に局在する TeaR (膜結合性の TeaA receptor) との結合を介して、相互依存的に菌糸先端に局在化する。菌糸先端の TeaA は、間接的にアクチンケーブルを重合するフォーミンの局在を制御する。これら極性マーカーの遺伝子破壊株では、結果的にエキソサイトーシス部位が正常に制御されなくなり、菌糸が曲がって生長する (図 2B)。糸状菌が真っ直ぐに伸長する微小管の特性を利用して、位置情報を菌糸先端の極性マーカーに伝達し、菌糸の伸長方向を制御するという極性維持機構を示している (1, 2)。また、極性マーカーが微小管の重合を制御し、極性の焦点化、即ち Spitzenkörper の形成に関わることが示された (3, 4)。

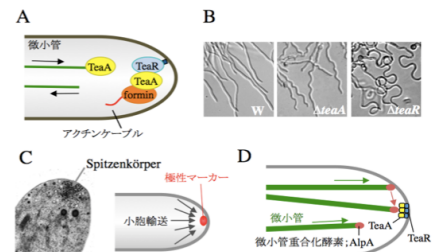


図2. (A) 極性マーカー (TeaA, TeaR) の機能 (B) 極性マーカーの遺伝子破壊株 (C) Spitzenkörper と極性マーカーの集中した局在化 (D) 微小管の収束のための重合化制御

2) 極性維持とエキソサイトーシスの超解像イメージング

糸状菌の高分泌能は、菌糸先端での活発なエキソサイトーシスに依存する。エキソサイトーシスによって菌糸先端の形質膜に新たな膜が大量に供給されるにもかかわらず、膜結合性

の極性マーカーTeaR が拡散せず極性部位に維持される機構を、超解像顕微鏡を用いた解析で見出した (図 3A)。その結果、TeaR の一時的な集合 (120 nm) と拡散が観察され、微小管に依存した極性部位の形成とアクチンケーブルに依存したエキソサイトーシスが交互に繰り返して起こることによって、極性マーカーが菌糸先端に維持される機構を発見した (図 3B) (5, 6)。この成果は、協調的かつ段階的な菌糸成長を動的モデルとして理解するものである。

3) 一時的な Ca^{2+} の流入により同調される段階的生長

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ところ、周期的な蛍光強度の振幅を示した。また、 Ca^{2+} 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、経時的に測定したところ、一時的な Ca^{2+} の流入が周期的に起きた。そして、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一時的な Ca^{2+} 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された (図 4) (7)。

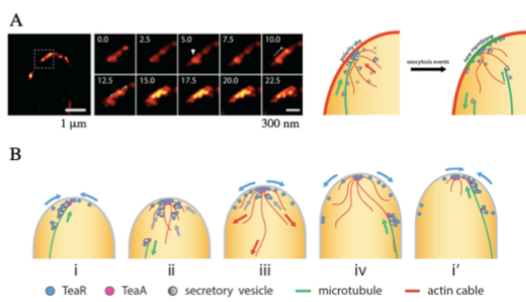


図3. (A) 超解像顕微鏡による極性マーカーTeaRの動態 (B) 一時的な極性の確立を繰り返すことで極性を維持するモデル (Transient polarity assembly model)

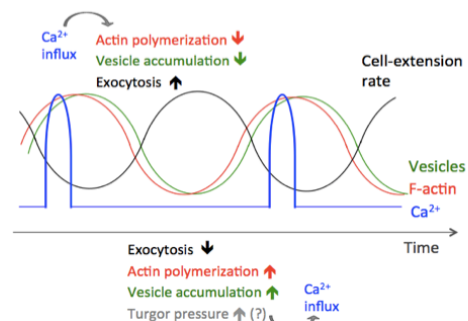


図4. 一時的な Ca^{2+} の流入により同調されるアクチン重合、エキソサイトーシスと菌糸生長

引用文献

- 1 : Takeshita N, Higashitsuji Y, Konzack S, Fischer R., *Mol. Biol. Cell*, 19, 339-351 (2008)
- 2 : Fischer R, Zekert N, Takeshita N., *Mol. Microbiol.*, 68, 813-826 (2008)
- 3 : Takeshita N, Mania D, Herrero de Vega S, Ishitsuka Y, Nienhaus GU, Podolski M, Howard J, Fischer R., *J. Cell Sci.*, 126, 5400-11 (2013)
- 4 : Takeshita N, Manck R, Grün N, Herrero S, Fischer R., *Curr. Opin. Microbiol.*, 20C, 34-41 (2014)
- 5 : Ishitsuka Y, Savage N, Li Y, Bergs A, Grün N, Kohler D, Donnelly R, Nienhaus GU, Fischer R, Takeshita N., *Science Advances*, 1, e1500947 (2015)
- 6 : Takeshita N., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 80, 1693-1699 (2016)
- 7 : Takeshita N, Evangelinos M, Zhou L, Serizawa T, Somera-Fajardo RA, Lu L, Takaya N, Nienhaus GU, Fischer R., *PNAS*, 114, 5701-5706 (2017)

Molecular mechanism of hyphal growth

Norio Takeshita

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

ご略歴

- 2001.3 東京大学農学部卒業
- 2003.3 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
- 2006.3 東京大学大学院 農学生命科学研究科 応用生命工学専攻 博士課程修了
- 2006.4 カールスルーエ大学 微生物学部
- 2008.3 アレクサンダーフンボルト財団フェローポストドク
- 2008.4 カールスルーエ工科大学 微生物学部 リサーチアソシエイト
- 2011.9
- 2011.10 カールスルーエ工科大学 微生物学部 グループリーダー
- 2016.9
- 2014.7 筑波大学 生命環境系 国際テニユア助教
- 現在
- 2016.10 筑波大学 生命環境系 ERATO 野村集団微生物制御プロジェクト
- 現在 ゲノム生化学グループリーダー

糸状菌分子生物学コンファレンス シンポジウム
 「糸状菌の特徴解明の最前線：基礎から病原性，産業利用まで」
 S-2

Aspergillus fumigatus が産生するガラクトマンナン生合成の
 全貌解明を目指して

岡 拓二
 (崇城大学 生物生命学部応用微生物工学科)

細菌類からヒトに至るまで，ほとんどの生物は六員環であるガラクトピラノースを生体物質として利用している。しかし，生物の中には五員環であるガラクトフラノース (Gal_f) を生体内の糖鎖に組み込んで利用しているものがある。 Gal_f は，結核菌をはじめとする真正細菌類，トリパノソーマなどの一部の原生生物，線虫類，担子菌類，一部の子囊菌類の糖鎖にのみ認められる単糖である。ヒトを含む高等動物や植物は， Gal_f 糖鎖を持たないことから Gal_f 糖鎖の生合成経路を阻害することが副作用の無い医薬や農薬の開発に繋がるとして期待されている^(1,2)。

糖鎖は，細胞外や細胞表層に局在することが多い。病原菌が宿主に感染する際には，宿主との接触が必要不可欠であることを鑑みると，細胞表層の糖鎖が病原菌の感染や毒性の発揮もしくは宿主側の防御機構に関与していることが容易に想像される。侵襲性肺アスペルギルス症に代表されるアスペルギルス感染症を引き起こす主要な原因となる真菌である

Aspergillus fumigatus の細胞壁最表層部にはガラクトマンナン (GM) が存在している。GM は，マンノース (Man) と Gal_f から構成されている多糖である。GM には，O-Man 型ガラクトマンナン (OMGM) と真菌型ガラクトマンナン (FTGM) が知られている。OMGMは，タンパク質のセリン (Ser) もしくはスレオニン (Thr) 残基に Man が付加した構造を基本とする糖鎖の非還元末端側に Gal_f が β 1,5-結合したオリゴ糖が β 1,6-結合した構造であるガラクトフラン側鎖

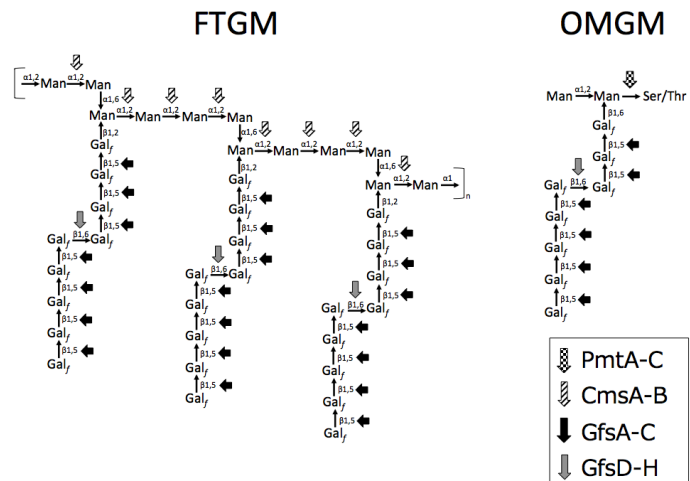


図1 FTGM および OMGM の構造と生合成に関わる糖転移酵素

が結合した糖鎖である (図1)。一方で，FTGMは，9から10個の α 1,2-テトラマンノシドが α 1,6-結合したマンナン主鎖に，ガラクトフラン側鎖が β 1,2-, β 1,3-もしくは β 1,6-結合した糖鎖である (図1)^(3,4)。GM は，1930年代には，既に子囊菌類である*Penicillium charlesii*において構造が報告されていたことから古くより知られた多糖であると言える⁽⁵⁾。また，肺アスペルギルス症患者の血清中に漏出する GM が早期診断の指標として用いられてきたことにより世界的にも広く知られていた多糖でもある。しかし，その生合成を担う糖転移酵素に関する情報は，遺伝子のもとより，その酵素活性測定法さえも全く不明であった。

演者は、これまでに逆遺伝学的手法および生化学的手法を用いてGM糖鎖生合成に関わる遺伝子や酵素の機能および、それらが作り出す糖鎖の機能を明らかにする研究を進めてきた。本シンポジウムでは、OMGMの根元のMan転移を担う酵素 (PmtA-C)⁽⁶⁻⁸⁾, OMGMの2個目の α 1,2-Man転移を担う酵素 (Mnt1), FTGMのマンナン主鎖合成に関わる α 1,2-Man転移酵素 (CmsA), OMGMとFTGMのガラクトフラン側鎖の生合成に関わる β 1,5-Gal_T転移酵素 (GfsA-C)^(9,10), OMGMとFTGMのガラクトフラン側鎖の生合成に関わる β 1,6-Gal_T転移酵素 (GfsD-E) について明らかにしてきたことを紹介させて頂く。

引用文献

- 1 : Oka T. and Goto M., *Trends in Glycosci. and Glycotech.*, 28, 1-14 (2016)
- 2 : 岡と後藤, *化学と生物*, 52, 749-756 (2014)
- 3 : Kudoh A. et al, *Glycobiology*, 25, 74-87 (2015)
- 4 : Latgé JP et al, *Infect. Immun.*, 62, 5424-5433 (1994)
- 5 : Haworth, WN et al, *Biochem. J.*, 31, 640 (1937)
- 6 : Oka T et al, *Microbiology*, 150, 1973-1982 (2004)
- 7 : Oka T. et al, *Microbiology*, 151, 3657-3667 (2005)
- 8 : Goto M et al, *Eukaryot. Cell*, 8, 1465-1474 (2009)
- 9 : Komachi Y, et al, *Mol. Microbiol.*, 90, 1054-1073 (2013)
- 10 : Katafuchi Y, et al, *Glycobiology*, 27, 568-581 (2017)

Aiming to elucidate the whole picture of galactomannan biosynthesis produced by *Aspergillus fumigatus*

Takuji Oka

(Dept. of Appl. Microb. Technol., Sojo Univ.)

ご略歴

1999年3月 九州大学農学部農芸化学科卒業

2001年3月 九州大学大学院生物資源環境科学研究科生物機能化学専攻修士課程修了

2004年3月 九州大学大学院生物資源環境科学府生物機能化学専攻博士課程修了

2004年4月より 独立行政法人産業技術総合研究所糖鎖工学研究センター特別研究員

2005年9月より 独立行政法人産業技術総合研究所セルエンジニアリング研究部門特別研究員

2008年4月より 崇城大学生物生命学部応用微生物工学科助教

2010年4月より 崇城大学生物生命学部応用微生物工学科准教授

糸状菌分子生物学コンファレンス シンポジウム

「糸状菌の特徴解明の最前線：基礎から病原性，産業利用まで」

S-3

糸状菌が生産する植物バイオマス分解に関わる新規酵素

志水 元亨

(名城大学 農学部)

はじめに

糸状菌はデンプン，セルロース，ヘミセルロース分解能を有しており，それら多糖の分解に関わる細胞外酵素およびそれらの転写制御について盛んに研究が行われている。我々は，ポストゲノム解析技術を基盤として，糸状菌が有する植物細胞壁成分の分解に関わる新規酵素を発見することを目指している。本シンポジウムでは，我々が見出した植物細胞壁成分の分解に関わる新規酵素の機能および生理学的役割について現在までの知見を紹介する。

1. 新規 GH 134 ファミリーに属する β -マンナーゼ Man134A

β -マンナン（グルコマンナンおよびガラクトマンナン）は針葉樹，グァーガムやコーヒー豆などの様々な植物に含まれる多糖で自然界に多く含まれるバイオマスの1つであることから，様々な産業分野での利用が期待されている。筆者は， β -マンナンを唯一の炭素源として，麹菌と近縁の糸状菌である *Aspergillus nidulans* を生育させた際に，Glycoside Hydrolase 5 (GH 5) ファミリーに属するよく知られた産業利用されているマンナン分解酵素（ β -マンナーゼ；40-50 kDa，アミノ酸配列から既知の β -マンナーゼは GH 5, GH 26 および GH 113 に分類されている）と同様に細胞外に多量に分泌される低分子量（18 kDa）の機能未知タンパク質（HP）を同定した。このタンパク質は，既知の β -マンナーゼを含む機能が分かっているいずれのタンパク質とも全く相同性を有しておらず，推定される機能ドメインすら含んでいなかった。精製した HP を用いた解析から，このタンパク質が新規の β -マンナーゼ（Man134A）であることを生化学的に明らかにし，新しい GH 134 ファミリーを創設した¹⁾。 β -マンナンを基質にした場合，Man134A は反応産物としてマンノビオース（M₂），マンノトリオース（M₃），マンノテトラオース（M₄）を生成し，M₃が主要な反応産物であった。また，Man134A は，産業利用されている GH 5 に属する既知の β -マンナーゼ（Man5C のアイソザイム）と比較して，高い pH および熱安定性を持つことが明らかになった^{2), 3)}。さらに， $\Delta man134A$ 株を作製し， β -マンナンを唯一の炭素源とした培地で生育させたところ，野生株（WT）と比較して生育が抑制されたことから，Man134A は β -マンナンの資化に関与していることが明らかになった。

以上，既知の β -マンナーゼと比べて Man134A は，ユニークな酵素学的性質を持つことおよび β -マンナンの資化に重要であることが明らかになった。GH 134 に属するタンパク質は植物病原菌を含む糸状菌および放線菌の一部にのみ分布しており，それらの機能および生理学的役割に興味を持たれる。

2. 糸状菌の樹木成分分解に関わる新規酵素の網羅的探索

セルロース，ヘミセルロース（キシラン，マンナン，キチンなど）のみを炭素源にして *A. nidulans* を生育させた際に生産された細胞外タンパク質を，LC-MS/MS を用いたセクレトーム解析によって網羅的に解析した。その結果，それぞれの多糖のみを炭素源にして *A. nidulans* を培養した

場合, 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 262 種のタンパク質が同定された。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ず, かつ, 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。現在, 同定された 24 種の機能未知タンパク質をメタノール資化酵母 *Pichia pastoris* および *Escherichia coli* に異種発現させ組換え酵素を調製し, それらの機能を解析することで, 植物細胞壁の分解に関わる新規な樹木成分分解酵素を探索している。

糸状菌は古くから我が国の発酵・醸造, 酵素や有機酸・抗生物質などの生産にとって不可欠の存在であり, 産業上の重要性はますます高まっている。特に, 糸状菌は酵素の宝庫といわれ, すでにアミラーゼをはじめ様々な酵素が産業利用されている。糸状菌は, 植物の貯蔵多糖として知られているデンプンだけでなく, 植物細胞壁を構成するセルロース・ヘミセルロースを分解する酵素を多数有している。今回, 我々が見出した新規 β -マンナーゼなどと同様に, アミノ酸配列レベルで既知の酵素と全く相同性を示さない未知の分解酵素は多数存在していると考えている。今後, さらに多岐にわたる分野で利用できる糸状菌由来の新規酵素が発見される可能性を秘めている。

引用文献

- 1 : Shimizu M. et al., *J. Biol. Chem.*, 290,27914-27927 (2015)
- 2 : Sakai K. et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 101:3237-3245 (2016)
- 3 : 酒井ら, 明日の食品産業, 6, 36-43 (2016)

Novel enzymes involved in plant biomass degradation from filamentous fungi

Motoyuki Shimizu

(Faculty of Agriculture, Meijo University)

ご略歴

- 1999年 鹿児島大学農学部生物資源化学科 卒業
- 2005年 九州大学大学院生物資源環境科学府森林資源科学部門 修了
- 2005年 九州大学大学院農学研究院森林資源科学部門 特任助教
- 2007年 筑波大学生命環境科学研究科生物機能科学専攻 常勤研究員
- 2009年 筑波大学生命環境科学研究科生物機能科学専攻 学振特別研究員 (PD)
- 2012年 現職 (名城大学農学部応用生物化学科 助教)

糸状菌分子生物学コンファレンス シンポジウム

「糸状菌の特徴解明の最前線：基礎から病原性，産業利用まで」

S-4

モロミックス研究での麴菌ゲノム研究とゲノム編集技術

岩下 和裕

(独立行政法人酒類総合研究所)

はじめに

麴菌のゲノムシーケンス¹⁾が公開されて早くも12年が過ぎようとしている。まさしく一回りである。麴菌のポストゲノム研究としては、細胞内輸送や細胞壁合成などの細胞生物学、2次代謝物生産などの応用研究と、多様な研究が大きく進んでいる。我々酒類総合研究所では、清酒製造に関する研究が一つの重要なミッションである。そこで我々は、醸造産業への応用を念頭にモロミックス研究として麴菌のポストゲノム研究を展開してきた。さらに近年、ゲノム編集技術についても開発を行ってきた。このゲノム編集技術により、麴菌研究は酵母に近いスピードで進める事が可能になったと考えられる。まずは、モロミックス研究の一環として行った、麴菌株群のゲノム進化についてまとめ、その後、モロミックス研究の例とゲノム編集技術を紹介し、今後の麴菌研究について考えてみたい。

麴菌群のゲノム解析

実際の醸造産業では多種多様な菌株が使用されている。我々の行った麴菌群のゲノムアレイ解析の結果、*Aspergillus Flavi* 節の菌株は、いくつかの大きな系統に分かれ、麴菌群は、他の *A. flavus* とは異なる枝を形成している事が明らかとなった。さらに麴菌群は13の系統に分かれ、各系統はその麴菌株の用途または分離源と相関する。麴菌の系統間のゲノム構造を比較すると、各系統間ではゲノムの欠失と挿入が頻繁に生じていた²⁾。麴菌では、相同組換えに依る修復系よりも、非相同末端結合 (NHEJ: Non-homologous end joining) による修復活性が強い³⁾。麴菌の生活環は一倍体であり、同核内に相同染色体がない事から、ゲノムの修復系として NHEJ が発達しているのは妥当である。そのために麴菌株群では欠失挿入、逆位や染色体間組換えが多く生じると考えられる。麴菌の分生子も多核であることから、これらの欠失等は保存されやすく、中立な欠失はより保存されやすい。これが、麴菌のゲノム進化の重要な機構の一つであると考えられる。しかし、そのために我々は、麴菌の遺伝子操作について相当苦勞することとなる。

これはさておき、麴菌株群のゲノム解析の現状を鑑みると、麴菌の遺伝子には、機能未知の遺伝子が多数残されている。これは、真核生物に広く保存されている遺伝子については、酵母等他の生物で研究が進んだ一方で、糸状菌に特有の遺伝子や *Aspergillus* 属、さらには麴菌群に特有な遺伝子の解析が遅れているためと考えられる。これらの機能未知遺伝子の多くが通常条件で高発現していることから、何らかの機能を有しているものが多い事は間違いない。そこで、固体培養で高発現しており、糸状菌株類で保存されている遺伝子から136遺伝子を破壊した。その結果、菌糸の伸長速度に変化がみられたものは少なかったが、分生子形成など、糸状菌類の特徴的な形質に関わる遺伝子は多く見られた。2次代謝遺伝子クラスターにも産物がわからないものも多くあり、同様に興味を持たれる。このように、麴菌の機能未知遺伝子は多大な可能性を秘めているため、多くの研究者が興味を持っていただけることを期待している。

麴菌モロミックス解析

先にも述べたとおり、我々にとって、醸造に関わる麴菌遺伝子の検索はもっとも重要なミッションである。先の麴菌の系統解析の結果、醤油麴菌の系統や清酒製造によく使われる系統など様々な系統を明らかにした。しかし、菌株の用途や単離源は分かっているにもかかわらず、醸造上の性質の違いは不明であった。そこで、これらの菌株を用いて実際に麴を造り、清酒を仕込んで、一般的な分析に加えメタボローム解析をおこなった。その結果、麴菌の系統と麴の酵素活性や清酒の成分には明らかな相関が見られた。しかし、系統が異なると、違いのある遺伝子数は莫大になりとても解析できない。そこで、同系統内で菌株ごとに違いが見られたアルギニンに焦点を絞って解析を行った。我々が清酒・味噌系統と名付けている系統の中には、清酒中でアルギニンを生産しない株が複数見られた。これらの株と、同じ系統でアルギニンを生産する株のシーケンスを比較したところ、2 次代謝生産のキー遺伝子とされる *laeA* 遺伝子に 1 箇所の変異が見出された。そこで、*laeA* 遺伝子の欠失株、高発現株を作製し、製麴及び仕込みを行ったところ、高発現株でアルギニンの生産性が見られなくなった。本研究により、我々は清酒の味に影響を与える遺伝子を新たに見出した。

麴菌ゲノム編集—co-ed 法とその応用

これまでの研究では破壊株の作製など多大な時間を消費している。特に、実用菌株は多様で、株ごとに宿主組換え系を構築するのは困難である。そこで我々は、Cas9 タンパク質を直接導入するゲノム編集技術の開発を行った。先述の通り、麴菌の NHEJ の活性が非常に高いが、この特性はゲノム編集には非常に有利になる。CRISPR/Cas9 による遺伝子の変異導入は、Cas9 により切断された箇所を NHEJ が修復する際に、希に起こるエラーを利用している。また、この 2 重鎖切断と NHEJ による修復を利用し DNA 断片を任意の場所に組込むと出来る。

我々は、ウリジン要求性および 5-FOA 耐性でカウンターセクションが出来る *pyrG* 遺伝子をターゲットとし gRNA と Cas9 タンパク質の直接導入によりゲノム編集をする方法を開発した。これにより、外来遺伝子を組込むことなく目的の遺伝子の改変が可能となった。しかし、ゲノム編集が起こる確率は 1/10,000 程度で、ポジティブセクション可能な遺伝子しか単離できない。そこで、co-genome editing 法(co-ed 法)を開発した。本方法は、マーカーとなる *pyrG* 遺伝子と破壊ターゲットとなる遺伝子の両方の gRNA を Cas9 タンパク質と共に取込ませ、5-FOA 耐性でスクリーニングするという方法である⁴⁾。通常であれば、本方法でもターゲット遺伝子が破壊された株は、1/10,000 の確率でしか単離できないと考えられる。しかし、実際には、20-50%の確率でターゲット遺伝子が破壊された株を単離可能である。本方法では、栄養要求株や *ligD* 破壊株等を作製する必要が無く、さらに、破壊カセットも作製する必要が無い。つまり、gRNA と Cas9 タンパク質さえあれば、明日からでも遺伝子破壊が出来るのである。複数遺伝子の破壊も簡単である。3 遺伝子程度なら同時に破壊できる。遺伝子の挿入も簡単である。*pyrG* 遺伝子破壊用の gRNA と挿入する DNA 断片を同じように加え、5-FOA 耐性株を取るだけで 20-80%の確率で目的遺伝子が挿入された株（ノックイン株）を単離できる。挿入断片は、大腸菌で構築したプラスミドを切断するだけで良い。従来の方法では、遺伝子破壊カセットの準備だけで 1 週間以上の時間がかかっていたが、これらの作業が全く必要なくなる。*ligD* 破壊株など特別なホストの準備もいらない。さらに co-ed 法とノックインを繰り返すことで、論理的には非必須遺伝子をすべて破壊する事も可能である。また、目的の遺伝子の前に任意のプロモーターを挿入する事も可能と考えられる。Co-ed 法をうまく使い回すことによりいろいろなバリエーションが広がる。

Aspergillus 属は、モデル生物として着目された時期もあるが、遺伝的取扱の面倒さから出芽酵母の様には使用されなかった。しかし、ゲノム編集技術によって酵母並みに遺伝子操作を行う事が可能になった。多細胞生物特有の現象を解析するにあたって、我々は酵母に“毛が生えた”程度のスピードで実験を回すことが出来る優れたモデル生物を手に入れたのではないだろうか？応用研究だけでなく、多細胞生物のモデルとしての研究展開も期待したい。

引用文献

- 1 : M. Machida, et al., Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature*, 438, p1157 (2005)
- 2 : 岩下和裕, ポストゲノム研究から見た麴菌株の温故知新, 温故知新, 48, p33 (2011)
- 3 : O. Mizutani et al., A defect of LigD (human Lig4 homolog) for nonhomologous end joining significantly improves efficiency of gene-targeting in *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genet. Biol.*, 45, p878 (2008)
- 4 : 特願PCT/2017/30501 ゲノム編集タンパク質の直接導入による糸状菌ゲノム編集方法

Genomics and genome editing of *Aspergillus oryzae* in Moromics study

Kazuhiro Iwashita

(National Research Institute of Brewing, Japan)

ご略歴

- | | | |
|-------|----|----------------------------|
| 平成3年 | 3月 | 佐賀大学農学部農芸化学科卒業 |
| 平成3年 | 4月 | 国税庁入庁（国税庁関税部鑑定企画官付き 大蔵技官） |
| 平成3年 | 7月 | 国税庁醸造試験所 第5研究室 研究員 |
| 平成4年 | 4月 | 福岡国税局鑑定官室 大蔵技官 |
| 平成7年 | 7月 | 国税庁醸造研究所 研究員 |
| 平成13年 | 1月 | 博士号取得（東京大学大学院農学生命研究科） |
| 平成13年 | 4月 | 独立行政法人酒類総合研究所 主任研究員 |
| 平成13年 | 7月 | 行政部門へ2年間 |
| 平成18年 | 1月 | 広島大学先端物質科学研究科客員助教授 |
| 平成19年 | 4月 | 広島大学先端物質科学研究科客員准教授 |
| 平成25年 | 7月 | 独立行政法人酒類総合研究所 副部門長 |
| 平成26年 | 4月 | 広島大学先端物質科学研究科客員教授 |
| 平成27年 | 7月 | 独立行政法人酒類総合研究所 副部門長 |
| 平成28年 | 4月 | 独立行政法人酒類総合研究所 部門長 |
| 平成28年 | 7月 | 独立行政法人酒類総合研究所 成分解析研究部門 部門長 |

糸状菌分子生物学コンファレンス シンポジウム

「糸状菌の特徴解明の最前線：基礎から病原性、産業利用まで」

S-5

炭疽病菌と植物の相互作用：エフェクター研究を中心に

高野 義孝

(京都大学大学院 農学研究科)

自然界には膨大な植物病原糸状菌が存在しているにも関わらず、植物は彼らに滅ぼされているわけではない。実際、植物病原糸状菌は遭遇した植物に対し侵略し栄養を獲得しようと試みるのだが、その試みの多くは失敗に帰すため、植物の生存は保証されているといえる。この背景には、非宿主抵抗性と呼ばれる頑強な植物抵抗性があり、植物は本抵抗性によって、ほとんどの潜在的な病原糸状菌を撃退している。しかし、極めて長い時間をかけた試行の結果として、特定の植物におけるこの頑強な抵抗性を回避し感染できる病原糸状菌が出現している。この中でヒトが栽培している作物に病害を引き起こす者たちが、現在の食糧生産を脅かす存在である。

では、どのようにして病原糸状菌は植物の抵抗性を回避しているのか？一般に病原菌は多数の分泌タンパク質遺伝子を持ち、これらの中には植物の抵抗性を抑制する機能を有するものが存在する。このように、植物免疫を抑制するなど、菌の病原力に関わる分泌タンパク質は「エフェクター(Effector)」と呼ばれる。植物は病原体関連分子パターン(Pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)を手掛かりに病原体を認識し、抵抗性を発動する。エフェクターの機能の一つが、このPAMP誘導免疫の抑制である。一方、植物はこのエフェクターを逆に認識することによって、強力な抵抗性を発動することも知られており、まさに太古の時代から現在まで植物と病原菌は壮絶な戦いを繰り広げている。

炭疽病菌(*Colletotrichum*属菌)はさまざまな作物に病害を引き起こす重要病原糸状菌であり、同時に個々の種は限定された宿主範囲を示すことが知られている。私達のグループは、とくにウリ科作物に甚大な被害をもたらしているウリ類炭疽病菌(学名 *C. orbiculare*)を対象に研究を進めている。本菌の胞子は発芽後、付着器と呼ばれる特殊な細胞を形成し、この付着器を用いて植物内に侵入菌糸を形成する。興味深いことに付着器はメラニン色素により着色しているが、このメラニン色素は付着器の機能に必要であることが明らかになっており、さらにメラニン合成阻害剤が効果的な農薬として用いられている。このことは、病原菌の感染戦略を理解することは作物保護技術開発に大きく貢献しうることを如実に物語っている。

現在、私たちはウリ類炭疽病菌のエフェクターに焦点をあて研究を進めている。本発表では、主にウリ類炭疽病菌において同定されたエフェクター-NIS1(necrosis-inducing secreted protein 1)の研究について紹介する(Yoshino et al., 2012)。NIS1は病原糸状菌において広範に保存されているエフェクターであるが、その保存性と合致する形で、本エフェクターが植物の対病原体戦略の根幹にあたるPAMP認識受容複合体の構成因子を攻撃することを見出している(論文準備中)。さらにNIS1などのエフェクターが病原菌細胞から分泌後に、特徴的な植物—病原菌間のインターフェイス領域に集積することについても紹介する(Irieda et al., 2014)。また、本菌のゲノムはすでに解読できており(Gan et al., 2013)、ゲノムスケールでのエフェクター研究を開始している。ウリ類炭疽病菌は

ウリ科作物に対する明確な宿主特異性を示すが、この現象は本菌の有するエフェクター群の機能と関連している可能性が高い。この宿主特異性の問題を研究するために実施している近縁炭疽病菌との比較ゲノム解析など、現在スタートしているトライアルについても併せて述べていきたい。

引用文献

- 1 : Yoshino et al., *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25, 625-636 (2012)
- 2 : Gan et al., *New Phytologist*, 197, 1236-1249 (2013)
- 3 : Irieda et al., *Plant Cell*, 26, 2265-2281 (2014)

Interaction between plants and anthracnose fungi, with a focus on effectors.

Yoshitaka Takano

(Graduate School of Agriculture, Kyoto University)

ご略歴

- 1993年 京都大学農学部農林生物学科 卒業
- 1995年 京都大学大学院農学研究科 修士課程 修了
- 1998年 京都大学博士（農学）
- 1997年 日本学術振興会特別研究員
- 1997年～2005年 京都大学大学院農学研究科助手
- 2000年～2001年 ノースカロライナ州立大学在外研究員
- 2005年～2008年 京都大学大学院農学研究科講師
- 2008年～2016年 京都大学大学院農学研究科准教授
- 2016年～現在 京都大学大学院農学研究科教授

O-1 (P-73)

製麴時の光照射による遺伝子発現の変化

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】清酒醸造等で産業利用されている麴菌 *Aspergillus oryzae* RIB40 は、光照射されると分生子形成が抑制されることが報告されている。一方、醸造現場では製麴時に光を長時間照射することは、麴菌の生育不良、酵素活性の低下などにつながると言われており、長時間の光照射は避けられてきた。そこでこれまでほとんど検討されていなかった光照射による製麴への影響について検討を行った。昨年度行われた大会¹⁾で青色光 (450 nm) を照射することにより一次/二次代謝物の生産性が変化したことを報告した。本発表では製麴中に青色光を照射した時の麴菌の遺伝子発現量を RNA-seq により網羅的に解析を行ったので報告する。

【方法と結果】光源には青色光を使用し、総米 100 g に麴菌の分生子 75 mg を植菌し 48 時間製麴した。麴菌は当社保有実用株 OSI 1047 を使用した。製麴は恒温恒湿機で温度 35°C, 相対湿度 70~95%で行い、植菌 24 時間後から青色光の照射 (光量子束密度 $40 \pm 5 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) を開始した。光照射により製麴 48 時間後の酵素活性が暗条件と比べやや低下していた。一方でコハク酸の生産性は約 5 倍増加しており、麴菌のグリオキシル酸回路のイソクエン酸リアーゼをコードする遺伝子の発現量が製麴 48 時間後には暗条件と比べ 10 倍程度上昇していることがわかった。近縁種である *A. niger* は分生子形成する前にグリオキシル酸回路が活性化することが報告されており、青色光照射により同様の反応が誘導された可能性が考えられた。酵素活性やその他の遺伝子発現量についても検討中である。

1) 第 16 回糸状菌分子生物学コンファレンス

Change of gene expression level of *Aspergillus oryzae* by exposure to light in koji making

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

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

O-2 (P-70)

アラビノースは糖代謝系の変動を介してトウモロコシごま葉枯病菌の孢子形成を促進する

吉田裕史, 田中千尋 (京大院・農)

菌体外の糖はそれ自体が栄養源になるだけでなく、しばしば生理調節因子として糖類分解・輸送・代謝系の活性化や抑制に働く。糖によるこのような生理作用は、これまで、栄養源利用を促進あるいはコスト面で最適化する仕組みとして説明されてきた。しかし、糖の作用はときに細胞内環境を大きく変動させ、細胞分化、形態形成、生活環ステージ移行など、栄養源利用以外の面でも重要な役割を果たすかもしれない。このたび演者らは、植物細胞壁成分 L-アラビノースの存在下で、トウモロコシごま葉枯病菌 *Bipolaris maydis* の中心的糖代謝系が変動し、これに連動して栄養生長の抑制と分生子形成の促進が生ずることを明らかにした。

各種糖類を添加した平板培地において *B. maydis* 野生型株を 6 日間培養したところ、L-アラビノース添加培地における菌体量は D-グルコース添加培地に比べ顕著に少なく、糖添加なしの培地と同程度であり、L-アラビノースが栄養生長にほとんど寄与していないことが示唆された。一方で、L-アラビノース添加培地においては分生子形成密度が D-グルコース添加培地を上回るほど大きく、その点で糖添加なしの場合とは明らかに異なった。続いて、中心的糖代謝系 (解糖, 糖新生, ホスホグルコン酸経路) のフラックスを、特定遺伝子群の発現パターンに基づいて解析した結果、L-アラビノース存在下では糖新生とホスホグルコン酸経路が特異的に亢進することが示された。ホスホグルコン酸経路のキー因子 (グルコース 6-リン酸デヒドロゲナーゼ) をコードする遺伝子を破壊したところ、L-アラビノース添加培地における分生子形成密度は著しく減少し、菌体量は逆に増加した。以上より、L-アラビノースは栄養生長を抑制して分生子形成を促進する作用を有すること、ならびに、L-アラビノース存在下でホスホグルコン酸経路が亢進し、これが栄養生長の抑制および分生子形成の促進と密接に関連することが明らかとなった。

A flux shift in carbohydrate metabolism stimulated by L-arabinose facilitates sporulation in *Bipolaris maydis*

Hiroshi Yoshida, Chihiro Tanaka

(Grad. Sch. of Agriculture, Kyoto Univ.)

O-3 (P-56)

麹菌における環境ストレス応答性 MAP キナーゼの *glaB* 遺伝子発現への関与

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

清酒醸造において重要な酵素であるグルコアミラーゼ遺伝子 *glaB* の固体培養特異的な発現を制御する因子として見出された C₂H₂ 型転写因子 F1bC は, *glaB* のみならず, 固体培養で発現が大幅に上昇するプロテアーゼ遺伝子 *pepA*, *nptA*, *nptB* や酸性カルボキシペプチダーゼ遺伝子 *ocpA*, *cpI* の発現にも関与していることを明らかにした。本報告では, 固体培養における環境ストレスに着目し, 多くの生物で浸透圧ストレスに対する応答として知られる HOG/MAPK 経路と F1bC を介した *glaB* の発現との関係について解析した結果を報告する。*glaB* はプレート培養上で低水分活性と菌糸成長阻害ストレスの両条件により誘導されることが知られているが, どちらの条件が *glaB* の発現に重要であるか定量 PCR により調べたところ, *flbC* の発現に関わらず *glaB* は両条件が揃わないと発現量が上昇しなかった。麹菌の MAPK 遺伝子 5 種類それぞれの破壊株を用いて, メンブレンを敷いたプレート培養上で GlaB の生産を調べた結果, 50mM の CaCl₂ を含む最小培地において GlaB は野生株では生産されず, $\Delta hogA$ と $\Delta mpkC$ 株において生産が認められた。同様の条件で *mpkC* と *flbC* の二重破壊株では GlaB の生産が大幅に減少した。このことから, MpkC が F1bC を負に制御することにより *glaB* の発現を制御していることが示唆された。現在, *mpkC* の上流に位置する因子の破壊株を用いた解析と, 液体培養においてチアミンにより発現の調節が可能な *thiA* プロモーターを用いて 3FLAG を付加した F1bC を発現させ F1bC の修飾状態の解析を進めている。

Involvement of stress-responsive MAP kinases in the *glaB* gene expression in *Aspergillus oryzae*.

Hiraku Arai, Mizuki Tanaka, Midori Yoshimura, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi

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

O-4 (P-57)

麹菌 *Aspergillus oryzae* のコウジ酸生産に関わる新規制御因子 KpeR の機能解析

荒川弦矢¹, 工藤駿斗¹, 梁瀬惇史², 江口優一¹, 小川真弘³, 小山泰二³, 徳岡昌文², 進藤斉², 穂坂賢²

(¹東農大院・農, ²東農大・応生, ³野田産研)

【目的】麹菌における二次代謝制御の研究はモデル糸状菌などのホモログ遺伝子の機能解析が中心であった。そこで本研究では新規制御因子の探索を目的に *Aspergillus oryzae* の転写制御因子遺伝子破壊株ライブラリーを活用したスクリーニングを行い, 選抜された新規制御因子の機能解析を行った。

【方法・結果】ライブラリーに対するコウジ酸生産量を指標としたスクリーニングから新規制御因子 *kpe* (*kojic acid production enhancement*)R を見出した。KpeR は通常 N 末端に存在する Zn(II)₂-Cys₆ モチーフがアミノ酸配列中央に存在するユニークな構造を持ち, 相同遺伝子が糸状菌に広く保存されていた。

kpeR 破壊株の表現型を親株と比較したところ, コウジ酸生産量が増加し, ペニシリン生産量と分生子数が減少しており, これらの差異は遺伝子発現解析から転写レベルで生じていることが示された。また, 電子顕微鏡観察から *kpeR* 破壊株の頂のうの数が減少し且つ頂のうが小さいことが分かり, これらの要因により分生子数が減少したと考えられた。

さらに, *kpeR* 破壊により *brlA* 発現が減少することを見出したため KpeR は BrlA を中心とした形態形成のシグナル伝達系と関与すると予想した。転写解析の結果 KpeR は SfgA や F1bB,C,D を介して BrlA の発現を制御する因子であると予想された。

現在, *kpeR* 破壊株における分生子形成関連遺伝子の発現解析と KpeR の部分欠損株の作製と解析を進めている。

Functional analysis of a novel regulator, KpeR, associated with kojic acid production in *Aspergillus oryzae*

Genya Arakawa¹, Hayato Kudo¹, Atsushi Yanase², Yuichi Eguchi¹, Masahiro Ogawa³, Yasuji Koyama³, Masafumi Tokuo², Hitoshi Shindo², Masaru Hosaka²

(¹Grad. Sch. Agric., Tokyo Univ. of Agric., ²Fac. Appl. Biosci., Tokyo Univ. of Agric., ³Noda Inst. Sci. Res.)

O-5 (P-67)

Aspergillus nidulans における cAMP 依存性プロテインキナーゼ PkaA を介したセルラーゼ生産抑制機構

國武絵美¹, 李怡², 金丸京子², 木村真², 木村哲哉¹, 小林哲夫² (¹三重大院・生資, ²名大院・生命農)

【目的】*Aspergillus nidulans* では、カーボンカタボライト抑制機構における主要な転写抑制因子としてよく知られる CreA はセルラーゼ遺伝子の発現への関与が小さく、キナーゼ遺伝子破壊株ライブラリーを用いて同定された cAMP 依存性プロテインキナーゼ(PkaA)が CreA とは独立した生産抑制に主として関わることを見出している。本研究では PkaA が制御するセルラーゼ遺伝子発現抑制機構についての詳細な解析を実施した。

【結果】抑制炭素源存在下におけるセルラーゼ生産能を調べるため、カルボキシメチルセルロースと種々の単糖を加えてプレートアッセイを行ったところ、グルコース、マンノースに強い抑制能があった。 $\Delta creA$ は対照株とほぼ同等の結果となったのに対し、 $\Delta pkaA$ ではこれらの糖の存在下でもセルラーゼ生産を示した。次に、0.1%セロビオースを用いてセルラーゼ遺伝子の発現を誘導し、RT-qPCR を行った。 β -グルコシダーゼ阻害剤の 1-デオキシノジリマイシン(DNJ)の添加による影響を調べた結果、対照株ではセルラーゼ遺伝子の転写量に約 5 倍の違いが見られた一方で、 $\Delta creA$ 及び $\Delta pkaA$ では DNJ の有無による違いはほとんどみられなかったことから、対照株ではセロビオースが分解されて生じた低濃度のグルコースにより抑制されることが分かった。次に DNJ 添加条件でグルコースの代替として 2-デオキシ-D-グルコースを誘導培地に添加した結果、 $\Delta creA$, $\Delta pkaA$ のいずれについても部分的な抑制解除が見られ、その程度は $\Delta pkaA$ の方が大きかった。以上よりセルラーゼ遺伝子発現抑制には PkaA と CreA が共に関与しており、特に PkaA が強く寄与することが示された。現在 PkaA の上流因子である三量体 G タンパク質 α サブユニットについても解析を進めている。

cAMP-dependent protein kinase PkaA-mediated cellulase gene repression in *Aspergillus nidulans*

Emi Kunitake¹, Yi Li², Kyoko Kanamaru², Makoto Kimura², Tetsuya Kimura¹, Tetsuo Kobayashi²

(¹Grad. Sch. Biores., Mie Univ., ²Grad. Sch. Bioagric. Sci., Nagoya Univ.)

O-6 (P-28)

麹菌 *Aspergillus oryzae* の液体振盪培養における菌糸接着機構の解析

宮澤拳¹, 吉見啓², 古明地敬介³, 田畑風華¹, 佐野元昭⁴, 阿部敬悦^{1,2} (¹東北大院農・生物産業創成, ²東北大・NICHe, ³東北大農・生物化学, ⁴金沢工大・ゲノム研)

糸状菌は一般的に、液体振盪培養において菌糸が塊を形成しながら生育する。我々は以前、モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* において、細胞壁多糖 α -1,3-グルカン (AG) の欠損株の菌糸が液体培地中に均一分散する形質を見出した¹⁾。すなわち、細胞壁 AG は菌糸の接着に関与することが明らかとなった。一方、産業用糸状菌 (麹菌) *Aspergillus oryzae* の AG 欠損株は、細胞壁から AG が欠損しているにも関わらず、菌糸が分散せず小さな菌糸の塊を形成しながら生育する²⁾。このことは、麹菌には AG 以外にも菌糸接着因子が存在することを示唆している。そこで本研究では、麹菌において AG 以外の菌糸接着因子を同定し、その欠損株の表現型を解析することを目的とした。細胞外多糖ガラクトサミノガラクトン (GAG) は病原性糸状菌 *Aspergillus fumigatus* において病原性に関与することが知られている。我々は、GAG が麹菌における菌糸接着因子であるとの仮説を立て、麹菌の野生株および AG 欠損株を親株として GAG 生合成遺伝子の破壊株を作製した (GAG 欠損株および AG-GAG 欠損株)。その結果、AG-GAG 欠損株の菌糸は液体培地中に完全分散する形質を示した (麹菌では初の完全分散性の確認)。また、菌糸表面を走査型電子顕微鏡により観察したところ、GAG 欠損株および AG-GAG 欠損株では細胞表層の粘着性の凹凸が消失していた。さらに、両 GAG 欠損株において、細胞壁ガラクトサミン量の顕著な減少が認められた。このことから、麹菌においては AG に加えて GAG も菌糸接着因子として機能することが明らかとなった。興味深いことに、GAG 欠損株は野生株に比べて大きな菌糸の塊を形成し、AG 合成酵素遺伝子の発現が上昇していた。このことから、麹菌には菌糸接着性の多糖を相補する機構が存在する可能性が示唆された。

1) Yoshimi et al., *PLOS ONE*, (2013) 8:e54893; 2) Miyazawa et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, (2016) 80:1853-63

Analysis of the mechanism of hyphal adhesion under liquid culture conditions in *Aspergillus oryzae*.

Ken Miyazawa¹, Akira Yoshimi², Keisuke Komeiji³, Fuka Tabata¹, Motoaki Sano⁴, and Keietsu Abe^{1,2}

(¹Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., ²NICHe, Tohoku Univ., ³Fac. Agric., Tohoku Univ., ⁴Kanazawa Inst. Tech.)

O-7 (P-24)

糸状菌 *Aspergillus nidulans* の低酸素誘導性チオレドキシンの役割

岡添孝章, 阿部央行, 梶尾俊介, 竹下典男, 高谷直樹 (筑波大・生命環境)

糸状菌は日本の発酵・醸造産業に利用されているが多くは好気性であるため、通気が適当でないと低酸素ストレスによって生育が阻害され産物の生産効率の低下に繋がる。したがって、カビの生育制御技術を構築する上で低酸素環境下における代謝を理解することは重要である。私達はこれまでに、糸状菌 *Aspergillus nidulans* の Trx (チオレドキシンの様タンパク質の1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, AnCdc48 (ユビキチン選択的 AAA 型シャペロン) 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る。

本研究で私達は、低酸素ストレスに曝した *A. nidulans* の野生株で観察される液胞の肥大化が AN6915 の遺伝子破壊株 (AN6915 Δ) で抑制されることを見出した。また、通常の好気条件下で細胞質に局在化する AN6915-GFP 融合タンパク質が低酸素ストレスに応答して液胞へと移行することを見出した。次に、低酸素ストレス条件下でのオートファジーの役割と AN6915 の関わりを解析するため、オートファジー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用いてオートファジー活性の測定を行った。その結果、低酸素ストレス下で野生株において誘導されるオートファジーが AN6915 Δ では誘導されないという事が明らかとなった。以上の結果から、*A. nidulans* が低酸素環境において AN6915 の働きを通して細胞内タンパク質の分解機構の1つであるオートファジーを制御している事が示された。

Functional analysis of hypoxia inducible protein in *Aspergillus nidulans*

Takaaki Okazoe, Hiroyuki Abe, Shunsuke Masuo, Norio Takeshita, Naoki Takaya

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

O-8 (P-22)

Functional analysis of AoFus3-interacting proteins in the regulation of cell fusion in *Aspergillus oryzae*

Taoning Mo¹, Takuya Katayama¹, Özgür Bayram², Daigo Takemoto³, Gerhard H. Braus⁴, Katsuhiko Kitamoto⁵, Jun-ichi Maruyama¹ (¹Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, ²Dept. of Biol., Maynooth Univ., ³Grad. School Bioagr. Sci., Nagoya Univ., ⁴Dept. of Mol. Microbial., Georg-August-University Göttingen, ⁵Nihon Pharmaceutical Univ.)

In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, cell fusion, which occurs during mating, is regulated by a Fus3 mitogen-activated protein (MAP) kinase cascade and a transcription factor Ste12. In filamentous fungi, besides the sexual reproduction, cell fusion also occurs during vegetative growth, suggesting a distinctive regulatory mechanism in the regulation of cell fusion. In *Aspergillus oryzae*, our group previously identified a Ste12 ortholog AoSte12 and a novel protein FipC as AoFus3-interacting proteins, and demonstrated that the proteins are involved in cell fusion [1]. In this study, we aim to investigate the function of AoFus3-interacting proteins in the regulation of cell fusion in *A. oryzae*.

In order to analyze the epistatic relationship of AoFus3 and its interacting proteins, we constructed and characterized the double deletion strains ($\Delta Aofus3\Delta Aoste12$, $\Delta Aofus3\Delta fipC$, $\Delta Aoste12\Delta fipC$). Noteworthy is that the growth defect in $\Delta fipC$ was suppressed by further deletion of *Aoste12*. Moreover, using the Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) system for visualizing fused cells [2], the conidial anastomosis (germling fusion) defect in $\Delta fipC$ was restored by further deletion of *Aoste12*, suggesting that AoSte12 functions at the downstream of FipC. We previously showed that the transcript levels of the cell fusion-related genes were significantly downregulated by single deletions of *Aoste12* and *fipC* [1]. qRT-PCR analysis of the transcript levels of the fusion-related genes in the double deletion ($\Delta Aoste12\Delta fipC$) is being performed to clarify the relationship of AoSte12 and FipC in the regulation of cell fusion.

[1] Katayama *et al.* Annual meeting of JSBBA 2016, 2F049 [2] Okabe *et al.* Annual meeting of JSBBA 2016, 2F053

O-9 (P-35)

糸状菌 *Aspergillus nidulans* における二成分性情報伝達系の必須遺伝子 *ypdA* の発現抑制による致死性細胞障害と液胞の異常発達

小野都¹, 吉見啓², 福間泰之¹, 緑川裕良¹, 萩原大祐^{2,3}, 古川健太郎⁴, 中山真由美², 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, (現)³千葉大・真菌センター, ⁴新潟大院・医・歯学)

二成分性情報伝達系は細菌から高等植物まで保存される環境応答機構である。モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* において, *ypdA* 遺伝子の欠損は致死となるが, その要因は特定されていない。また, レスポンスレギュレーター (RR) である *SskA*, *SrrA* との相互作用機構の詳細も不明である。さらに, 抗真菌剤である *fludioxonil* は本経路を攪乱して作用すると考えられているが, 本質的な殺菌の分子機構は不明である。本研究室では, *YpdA* 量低減による細胞応答を明らかにし, 致死要因を探索するため, *ypdA* 遺伝子の発現を制御可能な Conditional-*ypdA* 株 (*CypdA* 株) 及び *CypdA* 株を親株とした RR 破壊株 (*CypdA-sskAΔsrrAΔ*) を作成した。これまでに我々は, *fludioxonil* 処理や *ypdA* 発現抑制によって, *SskA* 下流の MAP キナーゼ *HogA* が構成的にリン酸化されることを明らかにした。本研究では, HOG 経路の構成的活性化により引き起こされる細胞応答を解析し, *ypdA* 発現抑制 (細胞内 *YpdA* 量低減) による致死との関係性を解明することを目的とした。まず, *ypdA* 発現抑制時及び *fludioxonil* 処理時における細胞応答を蛍光顕微鏡により解析した。その結果, *ypdA* 発現抑制時の *CypdA* 株および *fludioxonil* 処理時の野生株では, 液胞の異常な発達が観察されたのに対し, *fludioxonil* 耐性を示す *CypdA-sskAΔsrrAΔ* 株では, 液胞の発達は確認されなかった。また, RNA-seq により遺伝子発現を網羅的に解析したところ, *ypdA* 発現抑制や *fludioxonil* 処理によってオートファジー (ATG) 関連遺伝子の発現が上昇していた。一方, *CypdA-sskAΔsrrAΔ* 株では ATG 関連遺伝子の発現はむしろ低下していた。これらのことから, 液胞の異常発達や ATG 関連遺伝子の発現上昇と *ypdA* 発現抑制による致死性との関連性が示唆された。現在, ATG 関連遺伝子破壊株を作成し, *ypdA* 発現抑制時の液胞異常発達の有無を観察している。

Cytotoxic and vacuolar development by YpdA loss of the two component signaling system in *Aspergillus nidulans*.

Miyako Ono¹, Akira Yoshimi², Yasuyuki Fukuma¹, Yura Midorikawa¹, Daisuke Hagiwara^{2,3}, Kentaro Furukawa⁴, Mayumi Nakayama², Keietsu Abe^{1,2} (¹Grad. Sch. Agric. Sci., ²NICHe. Tohoku Univ., ³Chiba Univ., ⁴Niigata Univ.)

O-10 (P-42)

糸状菌 *Aspergillus nidulans* 核分裂におけるキネシンの役割

堀尾哲也^{1,2}, Berl R. Oakley² (¹日体大・自然科学, ²Dept. Mol. Biosci., Univ. Kansas)

核分裂は, 細胞周期中で最もダイナミックな時期で, スピンドルが形成され染色体が分配される。染色体分配運動において, 主な駆動力を供給するのは, 微小管上のモーター分子であるとみなされている。

糸状菌 *Aspergillus nidulans* ゲノム中には微小管上のモーターとして, 11種類のキネシンと1種類のダイニンが存在する。我々は, 以前に5種のキネシン [*kin-5* (*BimC*), *kin-6*, *kin-8* (*KipB*), *kin-10*, *kin-14* (*KlpA*)] がスピンドル領域に局在することを示した。以前より *kin-5* (*BimC*) は, 生育に必須であることが知られていたが, *kin-14* (*KlpA*) 変異によりその変異表現系が抑制される (O'Connell MJ, et al., *J Cell Biol.* 1993; 120:153-) ことから, これらの遺伝子の二重破壊株を作成したところ, 生育は強く阻害されたものの可能であった。*A. nidulans* においては, *kin-5* (*BimC*) 以外のキネシンは全て必須ではないので, *A. nidulans* は, 組み合わせによっては任意の分裂期にスピンドルに局在するキネシンを失っても良いことになる。

そこで我々は, スピンドルに局在するキネシン遺伝子の二重, 三重破壊株を作成し, その生育と核分裂過程を観察した。*kin-5* (*BimC*), *kin-6*, *kin-14* (*KlpA*) 遺伝子三重破壊株は, *kin-5* (*BimC*), *kin-14* (*KlpA*) 遺伝子二重破壊株と同程度の増殖阻害を示した。これらの株では, 核分裂中期停止, 後期開始の遅延, 同一細胞質中の細胞周期同調の乱れ, が観察された。しかし, 核分裂が正常に進行した場合には, その様子に野生株と大きな差異は見られなかった。*kin-5* (*BimC*), *kin-8* (*KipB*), *kin-14* (*KlpA*) 遺伝子三重破壊株は, 生育不能となった。現在, この株での核分裂の観察を試みている。

我々の研究により, キネシンは核分裂の「成功」には重要であることがわかったが, 「駆動力」として必要かどうかは, まますますわからなくなった。

The function of kinesins in the mitosis of *Aspergillus nidulans*

Tetsuya Horio^{1,2}, Berl R. Oakley²

(¹ Dept. Nat. Sci., Nippon Sports Science Univ., ² Dept. Mol. Biosci., Univ. Kansas)

O-11 (P-47)

Aspergillus nidulans のセクレトーム解析から見出された新規アラビナン分解酵素

新沢祐大¹, 酒井杏匠¹, 糀谷紗季¹, 鈴木健吾¹, 高須賀太一², 堀千明², 鈴木裕満¹, 松江渚¹, 志水元亨¹, 加藤雅士¹ (¹名城大・農, ²北大・農)

【緒言】糸状菌 *Aspergillus nidulans* はデンプン, セルロース, ヘミセルロースの分解能を有していることから, それら多糖類の分解に関わる細胞外酵素および転写制御について盛んに研究が行われている。本研究では, 種々の多糖類 (結晶性セルロース (MCC), カルボキシメチルセルロース (CMC), キチン, キシラン, グルコマンナン, ガラクトマンナン) のみをそれぞれ炭素源として生育させた際に *A. nidulans* が細胞外に分泌するタンパク質についてセクレトーム解析を行った。また, 同定されたタンパク質の中で, 機能が既知のタンパク質とはアミノ酸配列レベルで相同性を示さない機能未知タンパク質 (HP) を 6 種選抜し, メタノール資化酵母に異種発現させた。さらに, 精製した組換え HP を用いて機能を解析した。

【結果と考察】上記の条件で得られた培養ろ液から TCA/アセトン沈殿によりタンパク質を回収した。トリプシン処理後, LC-MS/MS にてセクレトーム解析したところ, MCC, CMC, キチンを炭素源にして生育させたものと比較して, キシラン, グルコマンナン, ガラクトマンナンを炭素源にした場合, 多種類のタンパク質が生産されていた。その中で, 45 種が HP であった。そこで, 6 種の組換え HP を調製し種々の多糖を基質にして酵素活性を測定した。その結果, 1 種の HP が, ペクチンの構成成分の一つであるラムノガラクトツロナン I に対して分解活性を有することがわかった。ラムノガラクトツロナン I を構成する多糖を基質にして酵素活性を測定したところ, アラビナンを分解した。以上のことから, この HP は新規のアラビナン分解酵素であることが判明した。現在, 詳細な分解機構および生理学的役割について解析している。

Novel arabinan-degrading enzyme discovered by secretome analysis of *Aspergillus nidulans*

Yuta Shinzawa¹, Kiyota Sakai¹, Saki Kojiya¹, Kengo Suzuki¹, Taichi Takasuka², Chiaki Hori², Hiromitsu Suzuki¹, Nagisa Matsue¹, Motoyuki Shimizu¹, Masashi Kato¹
(¹Meijo Univ., ²Univ. of Hokkaido)

O-12 (P-49)

麹菌 D-乳酸脱水素酵素 (D-LDH) のアロステリックな活性促進及び阻害特性について

渡部昭, 佐藤陽子, 五味勝也 (東北大院農・生物産業創成)

【目的】D-乳酸脱水素酵素(D-LDH)では, アロステリック特性の解析は L-LDH に比べてほとんど行われていない。先に我々は, *Aspergillus oryzae* の D-LDH のアロステリック活性促進特性について報告した(1)が, 本発表では活性阻害を中心に, 本酵素のアロステリック制御特性をさらに詳細に検討したので報告する。

【結果と考察】*A. oryzae* 由来の D-LDH は, *Thermus* 属由来 L-LDH のアロステリックエフェクター因子であるクエン酸 2mM 存在下でアロステリックな活性促進を受けた(1)。一方, 現在までに 2 例のみ報告のある真菌類 *Pythium debaryanum* 及び *Allomyces* sp.由来の D-LDH は, 細菌由来の酵素のようなアロステリックな活性促進特性を保持せず, 各々 GTP, ATP によるアロステリックな活性阻害を受けるという制御機構を有することから, 本酵素についても解析したところ, 本酵素は 2.5mM の GTP 存在下でアロステリックな活性阻害を受けることが判明した。このように, 本酵素は真菌類由来では初となる細菌酵素型のアロステリックな活性促進特性と, 真菌類酵素型のアロステリックな活性阻害特性の両面を併せ持つ酵素であると考えられた。

(1) 渡部ほか, 2017 年度日本農芸化学会大会講演要旨集, p861

Allosteric activation and inhibition of homohexameric D-lactate dehydrogenase from *Aspergillus oryzae*

Akira Watanabe, Yoko Sato, Katsuya Gomi

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

O-13 (P-83)

***Botrytis cinerea* 病原性低下変異株群の種々の植物種における病原性の比較解析**

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。様々な植物種に対して病原性を示すことが知られている灰色かび病菌 *Botrytis cinerea* は、ジャガイモの産生するリシチン、ベンサミアナの産生するカプシジオール (共にセスキテルペノイド)、ブドウが産生するレスベラトロール (スチルペノイド) など、様々なファイトアレキシンを解毒代謝する。これまでに、プラスミド挿入変異法によりジャガイモへの病原性を失った *B. cinerea* 変異株を 5 株単離している。これらのうち 3 株で、リシチン代謝能が低下し、リシチンに対する感受性が向上したことから、*B. cinerea* のジャガイモへの病原性に重要な役割を担っていることが示された。一方で、5 株すべてでカプシジオールやレスベラトロールの代謝能に異常は認められなかった。この 5 株はベンサミアナ、ブドウ、イチゴへの病原性が低下していたが、変異株と植物種の組み合わせで病原性低下の程度が多様であった。以上の結果から、*B. cinerea* は共通した複数の病原性機構を用いて様々な植物種に感染しているものの、その重要性の程度は宿主によって異なることが示唆された。現在、これら変異株における破壊遺伝子の単離を行っており、その結果についても合わせて報告する。

Characterization of *Botrytis cinerea* mutants which showed reduced pathogenicity to potato.

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

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

O-14 (P-90)

***Bipolaris maydis* におけるジカルボキシミド系殺菌剤耐性に関わる *Dic3* 遺伝子の同定**

西行優子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)

ジカルボキシミド殺菌剤 (例えばイプロジオン) は、広範囲な作用スペクトラムをもち、その作用機構は、高浸透圧シグナル伝達系の攪乱であると考えられている。作用機構の解明の端緒は、複数の糸状菌種において本剤耐性株が高浸透圧シグナル伝達系のキー因子であるヒスチジンキナーゼ遺伝子に変異を持つことが明らかとなったことである。さらに、*Bipolaris maydis* の薬剤耐性株からレスポンスレギュレーター *Skn7* 遺伝子の突然変異も見出され、*Skn7* 経路も薬剤作用に寄与していることが明らかとなった。また、本菌では *Skn7* 経路に関連すると考えられているユニークな薬剤耐性遺伝子 *Dic3* も同定されており、その実体を明らかにすることで本剤作用機構あるいは糸状菌シグナル伝達系のより詳細が明らかにできるものと期待できる。

当研究室では、ゲノム比較手法を用い *Dic3* 遺伝子の分子遺伝学レベル解析を試みた。まず、*Dic3* 突然変異株と野生株を 10 世代にわたり戻し交雑し、その子孫を元に菌株 57-a を作出した。そして、本株と野生株のゲノムを Hiseq2000 を用いてシーケンスし得られた配列の比較を行った。その結果、57-a 株特異的な変異として 667 ヶ所の多型が同定され、そのうち 7 ヶ所が ORF 上の変異であった。

今回、菌株 57-a と野生株の交配による子孫株を用いて、前述の 7 ヶ所の多型と *Dic3* 薬剤耐性表現型の間での連鎖解析を行った。結果、*S. cerevisiae* *Prp24* ホモログと考えられる ORF 上の多型が薬剤耐性と連鎖していた。さらに分子遺伝学的手法を用いて本ホモログが *Dic3* であることを証明するため、野生型遺伝子を *Dic3* 突然変異株の *Alb1* 遺伝子内に挿入し、*Dic3^{mut} Alb1::Dic3^{WT}* パーシャルディプロイド株を作製した。本株の表現型は作出親の *Dic3* とは異なり薬剤感受性を示した。以上の結果、*Dic3* 遺伝子は酵母 *Prp24* ホモログをコードしていることが明らかとなった。また、野生型アレルが耐性アレルに対して顕性であることも判明した。

Identification of *Dic3* which is involved in dicarboximide fungicides in *Bipolaris maydis*

Yuko Saigyo¹, Hiroshi Yoshida¹, Izumitsu Kosuke², Chihiro Tanaka¹

(¹ Grad. School of Agriculture, Kyoto Univ., ² Uni. of Shiga Pref.)

O-15 (P-91)

チューリップ球根腐敗病菌の病原性関連 SIX 遺伝子群の検出

川部眞登¹, 有江力² (¹富山農総セ園研, ²農工大農)

チューリップ球根腐敗病菌は *Fusarium oxysporum* f. sp. *tulipae* によって引き起こされる病害であり, チューリップの立毛中・球根の保存中などに発生する病害である。本病害は, 収量の低下を引き起こし経済的に大きな影響を与えるだけでなく, 輸送・販売時に発病することによる地域ブランド力の低下にも発展しかねない可能性があり, チューリップ球根産地にとって非常に大きな問題となっている。

2014年に富山県で発生した複数のチューリップ球根腐敗病斑より *F. oxysporum* を単離し, rDNA IGS 領域を基にした系統解析を行った結果, 複数の系統が見られた。また, 一部の菌株を用いて, チューリップ球根への付傷接種と実生苗に対する灌漑接種による病原性調査を行い, 病原性を持つ菌株を決定した。病原性を持つ菌株 (Tu:5-1) を用い, 病原性関連 SIX 遺伝子群 (*SIX1*~*SIX14*) の PCR による検出を試みた結果, Tu:5-1からは *SIX11* を増幅するプライマーセットでのみ DNA 断片が増幅された。この増幅産物の遺伝子配列を決定したところ, 既報の *SIX11* と高い相同性を示した。チューリップ病斑から単離された *F. oxysporum* f. sp. *tulipae* 含む複数の *F. oxysporum* 菌株から *SIX11* の PCR による増幅を試みたところ, 病原性を持つ菌株からは *SIX11* が増幅されたが, 非病原菌からは増幅されなかった。

Detection of SIX genes from *Fusarium oxysporum* f. sp. *tulipae*.

Masato Kawabe¹, Tsutomu Arie²

(¹Toyama Prefecture Agric. Forestry and Fisheries Res. center, Hort. Research Inst., ²Fac. of Agric., Tokyo Univ. of Agric. and Tech.)

O-16 (P-98)

イネいもち病菌 RecQ helicase MUSN の DNA 修復機構への関与

木口歌菜¹, 田中寿樹¹, 國吉真史¹, 荒添貴之², 佐久間哲史³, 山本卓³, 桑田茂¹, 大里修一¹ (¹明治大院農, ²東理大院理工, ³広島大院理)

イネいもち病菌の病原性変異は非病原力遺伝子の変異や配列喪失によって生じ, 複雑な DNA 修復機構が関与すると考えられる。本菌ゲノムの不安定性を検証する過程で, 出芽酵母の DNA 修復経路の制御因子である RecQ helicase Sgs1 に着目した。ゲノム情報より Sgs1 ホモログとして MUSN を取得し, 薬剤マーカー置換による MUSN 破壊 (Δ MUSN) 株を作出した。 Δ MUSN 株の菌糸生育は野生株 (WT) と比較して顕著に抑制されたが, 分生子の数や形態, 付着器形成率, 病原性に有意な変化は認められなかった。 Δ MUSN 株の分生子に対し DNA 損傷薬剤を処理した結果, メチルメタンスルホン酸処理区において高感受性を示した。メラニン生合成経路に関わる Scytalone dehydratase (SDH) 遺伝子を標的とした破壊ベクターと人工ヌクレアーゼ TALENs を Δ MUSN 株に共導入し, SDH の遺伝子ターゲティング効率から HR 修復能を評価した。SDH 遺伝子の破壊により, 菌叢の白色化が高効率で観察される野生株と比較して, Δ MUSN 株では白色菌叢の割合が減少した。一方, シングルクロスオーバーによるターゲティング率は増加した。以上から, MUSN は本菌の相同組換え機構の制御因子として, 酵母 Sgs1 と同様の機能を担う可能性が示唆された。現在, 本菌のゲノム不安定性の側面から, DNA 二本鎖切断後の DNA リセクションに関する検出系を用いて Δ MUSN 株の解析を進めている。

Involvement of *Pyricularia oryzae* RecQ helicase MUSN in DNA repair mechanism

Kana Kiguchi¹, Toshiki Tanaka¹, Masafumi Kuniyoshi¹, Takayuki Arazoe², Tetsushi Sakuma³, Takashi Yamamoto³, Shigeru Kuwata¹, Shuichi Ohsato¹

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

O-17 (P-13)

植物生育促進菌 *Fusarium oxysporum* RS-21 が放出する VOC は側根数増加に関わる

松本守弘¹, 福家光敏², 古谷野暢², 米田淳一², 徳永毅², 小松健¹, 有江力¹ (¹農工大院農, ²アースノート)

植物根圏に生息する糸状菌のうち、植物に対する生育促進能を持つ菌を植物生育促進菌類 (Plant growth promoting fungi : PGPF) と呼び、一部の PGPF では、 β -caryophyllene などの揮発性物質 (Volatile organic compounds : VOC) が生育促進因子であることが知られている。沖縄県宜野座村のソルガム (*Sorghum bicolor*) 圃場において、周囲と比較して草丈の高い個体が認められ、その根圏から PGPF 候補株を分離した。ソルガム (系統名 SE70) を用いたポット試験および圃場試験での選抜で、根部処理によって最も高い生育促進 (地上部生重量の増加) 能を持つ菌株として *Fusarium oxysporum* RS-21 株を得た。RS-21 は、ソルガム、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) などに病原性を示さなかった。

RS-21 とソルガム (SE70) を、相互の物理的接触を防いだ密閉空間で 1 週間共培養したところ、ソルガムの地下部生重量の増加が見られたことから、RS-21 の VOC が機能していることが示唆された。

RS-21 の植物生育促進メカニズムをより詳細に調査するため、1/2MS 培地に播種したシロイヌナズナ Col-0 に同様な処理をしたところ、地上部および地下部の生重量が増加した。主根長への影響はみられなかったが、側根数が増加した。オーキシン応答レポーター遺伝子 DR5::GUS を Col-0 に導入した形質転換体に同様の処理をしたところ、生育に差が認められない 4 日目の段階で、主根上の側根分岐に係ると考えられる GUS 発現部位が対照の Col-0 に比べて増加していることを見出した。以上から、RS-21 の VOC が、側根数を増加させることが示され、これが植物の地下部および地上部の生育促進に関係することが示唆された。

Volatiles from a plant growth promoting fungus *Fusarium oxysporum* RS-21 induce lateral root development.

Morihiro Matsumoto¹, Mitsutoshi Fuke², Yo Koyano², Junichi Yoneda², Tsuyoshi Tokunaga², Ken Komatsu¹, Tsutomu Arie¹ (¹Graduate School of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, ²EARTHNOTE)

O-18 (P-12)

白麴菌におけるミトコンドリア局在型クエン酸輸送体 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鹿児島大・農, ²滋賀県立大・環境科学, ³佐賀大・農)

白麴菌は焼酎製造に用いられる麴菌であり、菌体外に多量のクエン酸を分泌生産する性質をもつ。これまでに、白麴菌において出芽酵母の Ctp1 (クエン酸-リンゴ酸シャトル) と Yhm2 (クエン酸-オキソグルタル酸シャトル) のホモログとして CtpA と YhmA を見出し、クエン酸高生産に関与するミトコンドリア局在型タンパク質であることを明らかにした。本研究は、白麴菌の CtpA と YhmA の生理機能の解明を目的とした。

まず、白麴菌において S タグ融合タンパク質として CtpA-S と YhmA-S を発現させて精製し、これらを再構成したリポソームと ¹⁴C 標識クエン酸を用いてクエン酸輸送活性を測定した。その結果、CtpA-S はリンゴ酸と *cis*-アコニット酸を対向基質とした際に高い輸送活性を示した。一方、YhmA-S はリンゴ酸、*cis*-アコニット酸、オキソグルタル酸、オキサロ酢酸、コハク酸の対向基質に対して幅広い活性を示すことが示唆された。白麴菌において *ctpA* と *yhmA* を破壊すると生育が遅延し、菌体あたりのクエン酸生産量が減少した。そこで、*ctpA* と *yhmA* の二重破壊株の構築を試みたが取得できなかったため、Tet-On システムにより *ctpA* を発現制御できる株において、*yhmA* を破壊した。その結果、*tet-ctpA* Δ *yhmA* 株は、*ctpA* の発現誘導時のみコロニーを形成したことから、*ctpA* と *yhmA* の二重破壊が合成致死となることが明らかになった。さらに、 Δ *ctpA* 株、 Δ *yhmA* 株、*ctpA* 非発現条件下の *tet-ctpA* Δ *yhmA* 株において細胞質と菌体外の有機酸濃度を HPLC により測定した。その結果、いずれの株も細胞質のリンゴ酸とオキソグルタル酸濃度が減少し、菌体外のクエン酸濃度が減少した。また、 Δ *yhmA* 株では菌体外のリンゴ酸が、また Δ *ctpA* 破壊株ではオキソグルタル酸が増加した。以上の結果より、YhmA と CtpA はミトコンドリアから細胞質へのクエン酸輸送体として異なる対向基質を用いているが、お互いに機能を補い合う関係にもあることが示唆された。

Functional analysis of two mitochondrial citrate carriers in *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii*

Chihiro Kadooka¹, Kosuke Izumitsu², Kayu Okutsu¹, Yumiko Yoshizaki¹, Kazunori Takamine¹, Masatoshi Goto³, Hisanori Tamaki¹, Taiki Futagami¹

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

O-19 (P-3)

麴菌への生合成遺伝子クラスター導入による環状ペプチド化合物 KK-1 の異種生産

吉見啓¹, 山口滋生², 藤岡智則², 河合清², 町田雅之³, 五味勝也⁴, 阿部敬悦^{1,4} (¹東北大・NICHe,
²クミアイ化学工業, ³産総研・生物プロセス, ⁴東北大院農・生物産業創成)

糸状菌 *Curvularia clavata* が生産する環状ペプチド化合物 (以下 KK-1) は, 植物病原菌に強い殺菌作用を示すことから, 抗真菌剤としての応用が期待されている。しかしながら, 生産菌での生産量が実用基準に満たないことや生合成経路が未知であることなどから産業利用には至っていない。最近, 生産菌 *C. clavata* において本化合物の生合成遺伝子クラスターが同定された。本クラスターは, 全長約 75 kb であり, 約 40 kb の NRPS 遺伝子を含む 9 遺伝子から構成されていた。本研究では, 本クラスター遺伝子を麴菌に導入し, KK-1 が異種生産可能か否かを明らかにすることを目的とした。まず, 40 kb の巨大な NRPS 遺伝子を麴菌に導入するため, 約 20 kb の 2 つの断片に分割してクローニングした。これらの断片を麴菌へと導入し, 麴菌内での遺伝子再構築と遺伝子発現を確認した。本 NRPS 遺伝子は麴菌の最大遺伝子の 2 倍近くあることから, 麴菌自身の最大遺伝子より巨大な遺伝子でも制御可能であることが示唆された。さらに, KK-1 生合成に必要な残りの 7 遺伝子について, 最大 3 種類の遺伝子を搭載可能な麴菌用ベクターにクローニングした (3 遺伝子搭載ベクター-x1, 2 遺伝子搭載ベクター-x2 の計 3 種類)。これらのベクターを麴菌 NRPS 発現株と同時に導入し, 全遺伝子を保持した麴菌株を複数株取得した。これらの菌株について全遺伝子の発現を解析したところ, 多少のばらつきはあるものの全ての菌株で全遺伝子の発現が認められた。さらに, 全遺伝子が高発現している株について抗菌性試験及び HPLC 分析を行ったところ, KK-1 の異種生産が確認された。以上より, *C. clavata* において同定された遺伝子が KK-1 の生産に必要な十分であることが明らかになった。

Heterologous production of a cyclic peptide compound, KK-1, by the introduction of the gene cluster into *Aspergillus oryzae*

Akira Yoshimi¹, Shigenari Yamaguchi², Tomonori Fujioka², Kiyoshi Kawai², Masayuki Machida³, Katsuya Gomi⁴, Keietsu Abe^{1,4} (¹NICHE, Tohoku Univ., ²Kumiai Chemical Industry Co. Ltd., ³AIST, ⁴Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ.)

O-20 (P-9)

染色体重複技術を用いた麴菌の二次代謝系クラスター制御因子の同定

高橋理, 篠原靖智, 小山泰二 (野田産研)

我々は麴菌の染色体の任意の領域を数 Mb レベルで重複させる技術確立した¹⁾。染色体の重複株では, 重複領域内の遺伝子の多くの発現が上昇するため, 表現型を追うことで, その原因となる因子のスクリーニングが可能である。麴菌は多数の二次代謝クラスターを保持しているが, その多くは発現しておらず, 制御系も不明である。そこで RIB40 株の染色体の部分重複株のライブラリーを作製し, 表現型を調べたところ, 7 番染色体の 1.2Mb の領域の重複株で, 2 番染色体の末端に位置するアスピロクロリン生合成遺伝子クラスターの顕著な発現上昇が観察された。解析の結果, クラスターの制御に関わる因子として 7 番染色体上の重複領域中の *traA* と *smr1* を特定した。*traA* の強制発現株では, アスピロクロリン生合成クラスターに加えて, その隣に位置する *wyk1* 遺伝子クラスター²⁾など複数のクラスターの発現上昇が見られ, RIB40 株では生産されていない WYK1 (DPPIV インヒビター)²⁾の生産が確認された。*smr1* については当初, 抑制因子と考えていたが, *traA* と同様に正の制御因子として働いていることが判明した。また, アスピロクロリンクラスター内に位置する正の制御因子である *aclZ* の破壊株でも, WYK1 の生産が確認されたことから, *aclZ* は WYK1 クラスターの抑制因子としての機能も担っていることが示唆された。また *traA* の高発現株では *aclZ* の発現が上昇することから, *traA* が上位に位置するものと考えられる。

¹⁾Takahashi et al. 2014. AEM80: 4547-4558, ²⁾Imamura et al. 2012. AEM78: 6996-7002.

Identification of novel regulatory factors of secondary metabolite clusters by using strains with segmental duplication of chromosome in *Aspergillus oryzae*.

Tadashi Takahashi, Yasutomo Shinohara, Yasuji Koyama

(Noda Institute for Scientific Research)

P-1

麴菌ハイドロフォービン由来の機能性 HypA の基材吸着性の検討

栗原璃子, 中野宏軌, 朽方康裕, 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とは、糸状菌や担子菌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。筆者らは黄麴菌 *Aspergillus oryzae* より、ハイドロフォービンをコードする遺伝子 *hypA* ~*D* を単離しており、そのうち HypA は分生子特異的に局在することを観察するとともに、液体培養による大量生産に成功している。

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。重金属吸着能をもつ His8-tag を連結した HypA-His8 をポリエステル綿に吸着させ、シリンジに詰めて重金属吸着カラムを作製した。そのカラムに水溶液を通し Ni²⁺の吸着試験を行ったところ、HypA-His8 による Ni²⁺吸着は確認されたが、吸着量は限定的であった。そこで重金属回収効率の向上のため、広い吸着面積を確保できる基材を検討している。

また、重金属吸着素材の作製工程の簡略化のため、機能性 HypA の精製工程を省略化し、機能性 HypA を含む培養上清を直接基材に滴下することによって基材への吸着を試みている。ポリエステル綿に加えて真綿、おたふく綿、ミラクロスなどの基材の吸着が観察されている。

Studies on adsorption of functional Hydrophobin HypA from *Aspergillus oryzae*

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

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

P-2

麴菌のミトコンドリア局在ピルビン酸キャリアタンパク質欠損による乳酸生産性の向上

張斯来¹, 若井暁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)

乳酸は従来のプラスチックの代替品となるポリエステル系のプラスチックであるポリ乳酸の原料となる物質である。現在までに栄養要求性株 *Aspergillus oryzae* NSPID1 株に牛 (*Bos tauros*) 由来 lactate dehydrogenase (LDH) 遺伝子を導入し、エタノール生合成経路での pyruvate decarboxylase (PDC) を破壊した株 (BtLDH-*Δpdc*) では、100 g/L グルコースから約 49 g/L, 100 g/L デンプンから約 42 g/L の乳酸生産に成功している。この時、TCA 回路の中間代謝産物あるリンゴ酸およびコハク酸の分泌生産も確認された。本研究では、LDH の基質であるピルビン酸の TCA 回路への流れを抑制することにより乳酸生産の向上を目指した。

Saccharomyces cerevisiae では、ピルビン酸は三つのタンパク質 (Mpc1, Mpc2, Mpc3) からなるミトコンドリア局在ピルビン酸キャリアタンパク質複合体によりミトコンドリアに取り込まれている。麴菌では、これらのオーソログとして AO090023000796 と AO0900026000785 が存在し、本研究ではそれぞれ MpcA/MpcB と命名した。BtLDH-*Δpdc* を宿主株とし、*mpc* の単独破壊株を作製し、乳酸生産を調べたところ、*ΔmpcA* では 100 g/L グルコースから約 70 g/L, *ΔmpcB* では約 55 g/L の乳酸生産が確認された。また、*ΔmpcA* は 100 g/L デンプンから約 61 g/L の乳酸を生産した。TCA 回路中間代謝産物のリンゴ酸とコハク酸の生産が著しく低下した。以上の結果から、*mpcA* 破壊によりピルビン酸のミトコンドリアへの輸送が抑制され、乳酸生産に効率的に利用されたと考える。今後、*mpc* 多重破壊株を作製し、その乳酸生産を調べる予定である。

Improvement of lactate production by deficient for mitochondrial pyruvate carrier protein in *Aspergillus oryzae*

Silai Zhang¹, Satoshi Wakai¹, Chiaki Ogino², Hiroko Tsutsumi³, Yoji Hata³, Akihiko Kondo¹

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

P-3 (O-19)

麴菌への生合成遺伝子クラスター導入による環状ペプチド化合物 KK-1 の異種生産

吉見啓¹, 山口滋生², 藤岡智則², 河合清², 町田雅之³, 五味勝也⁴, 阿部敬悦^{1,4} (¹東北大・NICHe,²クミアイ化学工業,³産総研・生物プロセス,⁴東北大院農・生物産業創成)

糸状菌 *Curvularia clavata* が生産する環状ペプチド化合物(以下 KK-1)は、植物病原菌に強い殺菌作用を示すことから、抗真菌剤としての応用が期待されている。しかしながら、生産菌での生産量が実用基準に満たないことや生合成経路が未知であることなどから産業利用には至っていない。最近、生産菌 *C. clavata* において本化合物の生合成遺伝子クラスターが同定された。本クラスターは、全長約 75 kb であり、約 40 kb の NRPS 遺伝子を含む 9 遺伝子から構成されていた。本研究では、本クラスター遺伝子を麴菌に導入し、KK-1 が異種生産可能か否かを明らかにすることを目的とした。まず、40 kb の巨大な NRPS 遺伝子を麴菌に導入するため、約 20 kb の 2 つの断片に分割してクローニングした。これらの断片を麴菌へと導入し、麴菌内での遺伝子再構築と遺伝子発現を確認した。本 NRPS 遺伝子は麴菌の最大遺伝子の2倍近くあることから、麴菌自身の最大遺伝子より巨大な遺伝子でも制御可能であることが示唆された。さらに、KK-1 生合成に必要な残りの 7 遺伝子について、最大 3 種類の遺伝子を搭載可能な麴菌用ベクターにクローニングした(3 遺伝子搭載ベクター-x1, 2 遺伝子搭載ベクター-x2 の計 3 種類)。これらのベクターを麴菌 NRPS 発現株と同時に導入し、全遺伝子を保持した麴菌株を複数株取得した。これらの菌株について全遺伝子の発現を解析したところ、多少のばらつきはあるものの全ての菌株で全遺伝子の発現が認められた。さらに、全遺伝子が高発現している株について抗菌性試験及び HPLC 分析を行ったところ、KK-1 の異種生産が確認された。以上より、*C. clavata* において同定された遺伝子が KK-1 の生産に必要な十分であることが明らかになった。

Heterologous production of a cyclic peptide compound, KK-1, by the introduction of the gene cluster into *Aspergillus oryzae*

Akira Yoshimi¹, Shigenari Yamaguchi², Tomonori Fujioka², Kiyoshi Kawai², Masayuki Machida³, Katsuya Gomi⁴, Keietsu Abe^{1,4}

(¹NICHe, Tohoku Univ., ²Kumiai Chemical Industry Co. Ltd., ³AIST, ⁴Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ.)

P-4

Pleurotus salmoneostramineus における形質転換系の開発

魚川岳登, 佐藤魁, 川野雄亮, 清原昂輝, 阿部美穂, 福田泰久, 白坂憲章 (近畿大・農応生化)

キノコは栄養分を十分に貯えた栄養成長期の菌糸体に、温度や光などのトリガーとなる刺激を与えることで子実体原基の形成が始まる。しかし、その詳しいメカニズムはほとんど解明されていない。キノコの子実体形成のメカニズムが解明できれば食用キノコ類の更なる人工栽培技術の開発に重要な知見を提供できると考えられる。子実体形成のメカニズム解明に子実体形成時に大きく動きのあるターゲット遺伝子を形質転換で破壊することで子実体形成に関与する遺伝子の推定が、スエヒロタケ (*Schizophyllum commune*)、ウシグソヒトヨタケ (*Coprinopsis cinerea*) で行われてきた。当研究室では、①食用である②人工栽培が安定して容易に行える③原基形成時にピンク色に発色するという利点があるトキイロヒラタケ (*Pleurotus salmoneostramineus*) に着目し、実験モデルとして適していると考えた。また、トキイロヒラタケにおける菌糸期・子実体原基形成期・子実体期における RNAseq 解析により子実体形成に関与すると考えられるターゲット遺伝子が特定済みである。

そこで本研究では、このトキイロヒラタケをモデルとし、ターゲット遺伝子破壊効率が上昇するとされる ku80 遺伝子を破壊すると共に、効率よく形質転換が行える形質転換条件の検討を行い、トキイロヒラタケにおける形質転換系の開発を行った。

Development of transformation methods in *Pleurotus salmoneostramineus*

Taketo Uokawa, Kaito Sato, Yusuke Kawano, Koki Kiyohara, Miho Abe, Yasuhisa Fukuta, Norifumi Sirasaka

(Kindai Univ., Fac. Of Agri.)

P-5

白麴菌における Sirtuin と *laeA* のホモログ遺伝子の機能解析

宮本葵¹, 門岡千尋¹, 濱田健太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鹿児島大・農, ²佐賀大・農)

白麴菌は菌体外に多量のクエン酸を分泌生産する性質をもつ。焼酎用の麴造りでは後半に温度を下げる工程があり、これにより白麴菌のクエン酸高生産が開始する。先行研究におけるマイクロアレイ解析の結果、温度低下時の発現変動遺伝子の中に Sirtuin 遺伝子が含まれていた。Sirtuin はヒストン脱アセチル化酵素としてエピジェネティックな遺伝子発現制御に関与する因子である。また、*Aspergillus* 属糸状菌では Sirtuin の下流でメチルトランスフェラーゼをコードする *laeA* が様々な生命現象に関わっており、*A. niger* では *laeA* がクエン酸生産に関与することも報告されている。本研究では、白麴菌の Sirtuin と *laeA* ホモログ遺伝子の機能解析を行った。

まず、白麴菌の5つの Sirtuin ホモログ遺伝子 *sirA*, *sirB*, *sirC*, *sirD*, *sirE* の破壊株を構築し、表現型を観察した。その結果、グルコースを炭素源とする M 培地において Δ *sirD* 株ではコロニー径が小さくなり、 Δ *sirE* 株ではコロニーの厚みが薄くなった。また、 Δ *sirD* 株においてはカルコフルオロホワイト、コンゴーレッド、ジチオスレイトールに対する感受性が上昇したことから *sirD* が cell wall integrity と小胞体ストレスに関与することが示唆された。また、製麴した際、 Δ *sirD* 株では黄色色素の高生産が認められた。さらに、出麴の際の酸度とクエン酸量を測定した結果、 Δ *sirD* 株と Δ *sirE* 株では酸度が顕著に低下し、 Δ *sirD* 株のクエン酸生産量は野生株の約47%にまで減少した。続いて、3つの *laeA* ホモログ遺伝子 *laeA*, *laeB*, *laeC* の破壊株を構築したところ、 Δ *laeA* 株においてのみクエン酸生産が低下することが示唆された。以上の結果から、白麴菌において Sirtuin と *laeA* のホモログ遺伝子がクエン酸生産において重要な役割をもつことが考えられた。

Functional analysis of Sirtuin and *laeA* homologous genes in *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii*

Aoi Miyamoto¹, Chihiro Kadooka¹, Kenta Hamada¹, Kayu Okutsu¹, Yumiko Yoshizaki¹, Kazunori Takamine¹, Masatoshi Goto², Hisanori Tamaki¹, Taiki Futagami¹ (¹Kagoshima Univ., ²Saga Univ.)

P-6

糸状菌 *Emericella varicolor* IFM4210 の asteltoxin 生合成遺伝子

橋元誠, 佐藤紀恵, 藤井勲 (岩手医大・薬)

asteltoxin はビスフラン環を有するマイコトキシンであり、F₁-ATPase の阻害作用などが報告されている。我々は asteltoxin 生合成遺伝子の同定と機能解析により、その特徴的なビスフラン環の生成機構解明を目標として研究を行っている。一昨年の本コンファレンスにおいて、*E. varicolor* IFM4210 由来のポリケタイド合成酵素 (PKS) 遺伝子 Ev460PKS がヘキサエン β -ケトラクトン生成に関与することを報告したが¹⁾、その後の破壊株の代謝解析により Ev460PKS が asteltoxin 生産には関与しないことが明らかとなった。そこで、新たな候補 PKS 遺伝子を検索し、麴菌を宿主とした異種発現を試みたので報告する。

E. varicolor IFM4210 ドラフトゲノムデータに対する BLAST 検索により、メチル基転移酵素ドメインがあり、エノイル還元酵素ドメインを含まない還元型 PKS 遺伝子として Ev152PKS の存在を見出した。次いで、本 PKS 遺伝子を *amyB* プロモーター下に組み込んだ発現プラスミド pTA-Ev152PKS を構築し、*Aspergillus oryzae* に形質転換・導入した。誘導培養物を HPLC 分析および LC-MS 分析した結果、形質転換体の培養液中に、asteltoxin 生合成の中間体と予想されるヘキサエン α -ピロンの存在を確認した。このことから、Ev152PKS を含む遺伝子クラスターが asteltoxin 生合成遺伝子クラスターであることが示唆された。現在、Ev152PKS による生成物の構造解析を進めるとともに、PKS 遺伝子周辺のメチル基転移酵素遺伝子、フラビン依存酸化酵素遺伝子、加水分解酵素遺伝子を順次導入した形質転換体の作製と代謝物の解析を進めている。

¹⁾ 橋元ら, 第15回糸状菌分子生物学コンファレンス要旨集, p.40 (2015)

Asteltoxin biosynthetic gene cluster from *Emericella varicolor* IFM4210

Makoto Hashimoto, Kie Sato, Isao Fujii

(School of Pharmacy, Iwate Med. Univ.)

P-7

麹菌を用いた遊離型高度不飽和脂肪酸の生産化

玉野孝一¹, ロバートコックス², 柘植謙爾², 三浦愛¹, 伊藤あやの³, 石井純², 田村具博¹, 近藤昭彦², 町田雅之¹ (¹産総研・生物プロセス, ²神戸大院・イノベ, ³北海道ハイテク専門学校)

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として利用が可能なものがある。そこで, 物質生産能力に優れた麹菌 *Aspergillus oryzae* を代謝工学的に改変することで, FFA の高生産化と機能改良に取り組んできた。以前の研究でアシル CoA 合成酵素遺伝子 *faaA* の破壊により, FFA 生産性を野生株の 9.2 倍に増大させることができた。そこで今回機能改良に取り組んだ。

麹菌 *faaA* 破壊株は, 4 種類の FFA (パルミチン酸・ステアリン酸・オレイン酸・リノール酸) を生合成している。これらの中で最も高度不飽和化されているリノール酸を基質として, 更にその高度不飽和化に働く酵素遺伝子 3 種類を他の微生物から単離して *faaA* 破壊株に導入した。3 種類の遺伝子は $\Delta 6$ デサチュラーゼ・エロンゲース・ $\Delta 5$ デサチュラーゼをコードしている。これらを麹菌に一度の形質転換で導入するためには 15.1 kb もの DNA 断片を調製する必要があった。そこで長鎖 DNA 構築技術である OGAB 法により DNA 断片を調製した。麹菌にそれを導入した結果, 中間物質のガンマリノレン酸 (GLA) やジホモガンマリノレン酸 (DGLA) は生産が確認されたが, 最終物質のアラキドン酸 (ARA) の生産は確認されなかった。そこで追加の遺伝子組換えにより ARA の生産化に取り組んでいる。また $\Delta 5$ デサチュラーゼやエロンゲースの遺伝子を導入株から遺伝子組換えにより除去した株も構築し, GLA や DGLA の生産の方向性でも研究を行っている。

Polyunsaturated free fatty acid production via heterologous gene expression in *Aspergillus oryzae*

Koichi Tamano¹, Robert Sidney Cox III², Kenji Tsuge², Ai Miura¹, Ayano Ito³, Jun Ishii², Tomohiro Tamura¹, Akihiko Kondo², Masayuki Machida¹

(¹BPRI, AIST, ²Grad. Sci. Tech. Innov., Kobe Univ., ³Hokkaido High-Tech. Col.)

P-8

麹菌 *Aspergillus oryzae* におけるゲノム編集を用いた育種 —Deferriferrichrysin を高生産する脱鉄抑制株の作出—

戸所健彦, 柏原宏行, 伊出健太郎, 坂東弘樹, 福田克治, 堤浩子, 秦洋二 (月桂冠・総合研究所)

麹菌 *A. oryzae* は鉄を特異的にキレートするシデロフォア Defferiferrichrysin (Dfcy) を生産する。Dfcy は酸化活性などの有用な機能性を有し, 長い食経験からも新規機能性食品素材として期待される。我々は Dfcy 大量生産を目的とし, これまでに清酒用麹菌を親株として自然変異により Dfcy を 10 倍以上高生産する育種株 F16 を作出している。しかしながら, Dfcy は麹菌が環境中の鉄を効率良く細胞内に取り込む目的で生産するため, Dfcy 生産量は細胞外の鉄濃度に影響を受ける。Dfcy 生合成に関与する遺伝子群は環境中の鉄に応答する GATA タイプの転写調節因子 SreA により抑制され, *sreA* 破壊により脱抑制の表現型となることが報告されている。育種株 F16 の *sreA* は野生型遺伝子が保持されており, 環境中の鉄による Dfcy 生産抑制が生じる。そこで, *sreA* 破壊により Dfcy 生産の鉄制限解除された株の作出を CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集により検討した。その結果, 目的とする F16 *sreA* 遺伝子破壊株の作出に成功し, 得られた株の表現型解析を行ったので報告する。

Genome editing of *Aspergillus oryzae* for de-repression of Defferiferrichrysin production by iron

Takehiko Todokoro, Hiroyuki Kashihara, Kentaro Ide, Hiroki Bando, Katsuharu Fukuda, Hiroko Tsutsumi, Yoji Hata (Research Inst, Gekkeikan sake Co., Ltd.)

P-9 (O-20)

染色体重複技術を用いた麹菌の二次代謝系クラスター制御因子の同定

高橋理, 篠原靖智, 小山泰二 (野田産研)

我々は麹菌の染色体の任意の領域を数 Mb レベルで重複させる技術を確立した¹⁾。染色体の重複株では、重複領域内の遺伝子の多くの発現が上昇するため、表現型を追うことで、その原因となる因子のスクリーニングが可能である。麹菌は多数の二次代謝クラスターを保持しているが、その多くは発現しておらず、制御系も不明である。そこで RIB40 株の染色体の部分重複株のライブラリーを作製し、表現型を調べたところ、7 番染色体の 1.2Mb の領域の重複株で、2 番染色体の末端に位置するアスピロクロリン生合成遺伝子クラスターの顕著な発現上昇が観察された。解析の結果、クラスターの制御に関わる因子として 7 番染色体上の重複領域中の *traA* と *smr1* を特定した。*traA* の強制発現株では、アスピロクロリン生合成クラスターに加えて、その隣に位置する *wyk1* 遺伝子クラスター²⁾など複数のクラスターの発現上昇が見られ、RIB40 株では生産されていない WYK1(DPPIV インヒビター)²⁾の生産が確認された。*smr1* については当初、抑制因子と考えていたが、*traA* と同様に正の制御因子として働いていることが判明した。また、アスピロクロリンクラスター内に位置する正の制御因子である *aclZ* の破壊株でも、WYK1 の生産が確認されたことから、*aclZ* は WYK1 クラスターの抑制因子としての機能も担っていることが示唆された。また *traA* の高発現株では *aclZ* の発現が上昇することから、*traA* が上位に位置するものと考えられる。

¹⁾Takahashi et al. 2014. AEM80: 4547-4558, ²⁾Imamura et al. 2012. AEM78: 6996-7002.

Identification of novel regulatory factors of secondary metabolite clusters by using strains with segmental duplication of chromosome in *Aspergillus oryzae*.

Tadashi Takahashi, Yasutomo Shinohara, Yasuji Koyama

(Noda Institute for Scientific Research)

P-10

比較ゲノム解析のための *Trichoderma reesei* のセルラーゼ生産性変異株の取得と解析

佐藤直美, 鈴木義之, 志田洋介, 小笠原渉 (長岡技科大・生物)

糸状菌 *Trichoderma reesei* は、細胞外のセルロース・ヘミセルロースやその誘導体に応答して、誘導的にセルラーゼを大量に生産する。しかしながら、そのセルラーゼ生産制御機構に関わる因子にはまだ不明な点が多い。現在、ゲノム解析技術の進展によって比較ゲノム解析を行うことが可能となったが、これまでの解析はセルラーゼ高生産株と野生株の比較に限られていた。しかし、セルラーゼ生産性が弱化的、もしくは失われている変異株の異なる表現型を持つ高生産変異株のゲノム情報も、セルラーゼ生産メカニズムを理解する上で重要である。そこで、本研究ではセルラーゼ生産制御機構に関わる因子の探索を目的として、分泌酵素の生産性に变化をきたした変異体を突然変異導入によって作出し、その性質を明らかにした。

セルラーゼ高生産株である PC-3-7 株を親株として、生存率を 0.01% から 0.1% に設定した UV 変異の結果、約 2 万株の変異株が得られた。これら変異株を「セルラーゼ生産性」および「セルラーゼ遺伝子プロモーターの支配下でのレポーター遺伝子の発現」の二つの方法でスクリーニングした。その結果、炭素源異化抑制解除株 10 株、分泌セルラーゼ量低下株 17 株および分泌セルラーゼ生産性強化株 10 株が得られた。親株である PC-3-7 は、グルコースを含む培養でセルラーゼをほとんど生産しない。それに対して炭素源異化抑制解除株は、グルコースを含むセルラーゼ生産培養条件で、セルラーゼの生産速度と最大生産量が増加していた。セルラーゼ高生産/低生産株としては、アビセルやセロビオースでのセルラーゼ生産速度が向上している株や、最大生産量が増加している株、あるいは低下している株が取得できた。今後は、これら株の転写レベルでの生産応答の解析やゲノム解析等を通じて、グルコース耐性やセルラーゼ生産の向上/低下に関与する因子を特定していく。

Generation and characterisation of *Trichoderma reesei* mutants, high/low cellulase activity or glucose tolerance

Naomi Sato, Yoshiyuki Suzuki, Yosuke Shida, Wataru Ogasawara

(Nagaoka Univ. of Tech.)

P-11

麹菌の co-transformation 時のコピー数多型性に関する解析

若井暁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)

麹菌 *Aspergillus oryzae* の形質転換では, マーカープラスミドと導入遺伝子断片を同時に導入する co-transformation が可能である。Co-transformation は, 複数の遺伝子をマルチコピーで導入することが可能であり, 物質生産株を構築する際には有用な手法である。一方で, マルチコピーで導入される際の分子メカニズムは明らかにされておらず, 導入パターン等は不明である。演者らは, これまでに導入遺伝子断片の末端配列に相当するプロモーターとターミネーターを変更することで, コピー数の多型性が異なることを明らかにしている。本研究では, これらのマルチコピー遺伝子導入株の多型性に関して, 導入遺伝子断片の末端配列を変更した際の形質転換体の獲得率, 導入遺伝子コピー数, それらの導入部位について報告する。

具体的には, コピー数多型性の幅が小さく, 形質転換体が得やすい傾向にあるプロモーターPsodM とターミネーターTglaB の末端配列を, コピー数多型性の幅が広く, 形質転換体が得にくいプロモーターPhlyA とターミネーターThlyA の外側に任意の長さで導入して, その形質転換体の獲得率や導入遺伝子コピー数を測定した。導入部位の解析は次世代シーケンサを用いた全ゲノムのリシーケンス解析により同定した。

Study on the copy number polymorphism in co-transformation of *Aspergillus oryzae*

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

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

P-12 (O-18)

白麹菌におけるミトコンドリア局在型クエン酸輸送体 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鹿児島大・農, ²滋賀県立大・環境科学, ³佐賀大・農)

白麹菌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生産する性質をもつ。これまでに, 白麹菌において出芽酵母の Ctp1 (クエン酸-リンゴ酸シャトル) と Yhm2 (クエン酸-オキシグルタル酸シャトル) のホモログとして CtpA と YhmA を見出し, クエン酸高生産に関与するミトコンドリア局在型タンパク質であることを明らかにした。本研究は, 白麹菌の CtpA と YhmA の生理機能の解明を目的とした。

まず, 白麹菌において S タグ融合タンパク質として CtpA-S と YhmA-S を発現させて精製し, これらを再構成したりポソームと ¹⁴C 標識クエン酸を用いてクエン酸輸送活性を測定した。その結果, CtpA-S はリンゴ酸と cis-アコニット酸を対向基質とした際に高い輸送活性を示した。一方, YhmA-S はリンゴ酸, cis-アコニット酸, オキシグルタル酸, オキサロ酢酸, コハク酸の対向基質に対して幅広い活性を示すことが示唆された。白麹菌において *ctpA* と *yhmA* を破壊すると生育が遅延し, 菌体あたりのクエン酸生産量が減少した。そこで, *ctpA* と *yhmA* の二重破壊株の構築を試みたが取得できなかったため, Tet-On システムにより *ctpA* を発現制御できる株において, *yhmA* を破壊した。その結果, *tet-ctpA ΔyhmA* 株は, *ctpA* の発現誘導時にもみコロニーを形成したことから, *ctpA* と *yhmA* の二重破壊が合成致死となることが明らかになった。さらに, $ΔctpA$ 株, $ΔyhmA$ 株, *ctpA* 非発現条件下の *tet-ctpA ΔyhmA* 株において細胞質と菌体外の有機酸濃度を HPLC により測定した。その結果, いずれの株も細胞質のリンゴ酸とオキシグルタル酸濃度が減少し, 菌体外のクエン酸濃度が減少した。また, $ΔyhmA$ 株では菌体外のリンゴ酸が, また $ΔctpA$ 破壊株ではオキシグルタル酸が増加した。以上の結果より, YhmA と CtpA はミトコンドリアから細胞質へのクエン酸輸送体として異なる対向基質を用いているが, お互いに機能を補い合う関係にもあることが示唆された。

Functional analysis of two mitochondrial citrate carriers in *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii*

Chihiro Kadooka¹, Kosuke Izumitsu², Kayu Okutsu¹, Yumiko Yoshizaki¹, Kazunori Takamine¹, Masatoshi Goto³, Hisanori Tamaki¹, Taiki Futagami¹

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

P-13 (O-17)

植物生育促進菌 *Fusarium oxysporum* RS-21 が放出する VOC は側根数増加に関わる

松本守弘¹, 福家光敏², 古谷野暢², 米田淳一², 徳永毅², 小松健¹, 有江力¹ (¹農工大院農,²アースノート)

植物根圏に生息する糸状菌のうち、植物に対する生育促進能を持つ菌を植物生育促進菌類 (Plant growth promoting fungi : PGPF) と呼び、一部の PGPF では、 β -caryophyllene などの揮発性物質 (Volatile organic compounds : VOC) が生育促進因子であることが知られている。沖縄県宜野座村のソルガム (*Sorghum bicolor*) 圃場において、周囲と比較して草丈の高い個体が認められ、その根圏から PGPF 候補株を分離した。ソルガム (系統名 SE70) を用いたポット試験および圃場試験での選抜で、根部処理によって最も高い生育促進 (地上部生重量の増加) 能を持つ菌株として *Fusarium oxysporum* RS-21 株を得た。RS-21 は、ソルガム、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) などに病原性を示さなかった。

RS-21 とソルガム (SE70) を、相互の物理的接触を防いだ密閉空間で 1 週間共培養したところ、ソルガムの地下部生重量の増加が見られたことから、RS-21 の VOC が機能していることが示唆された。

RS-21 の植物生育促進メカニズムをより詳細に調査するため、1/2MS 培地に播種したシロイヌナズナ Col-0 に同様な処理をしたところ、地上部および地下部の生重量が増加した。主根長への影響はみられなかったが、側根数が増加した。オーキシン応答レポーター遺伝子 DR5::GUS を Col-0 に導入した形質転換体に同様の処理をしたところ、生育に差が認められない 4 日目の段階で、主根上の側根分岐に係ると考えられる GUS 発現部位が対照の Col-0 に比べて増加していることを見出した。以上から、RS-21 の VOC が、側根数を増加させることが示され、これが植物の地下部および地上部の生育促進に関係することが示唆された。

Volatiles from a plant growth promoting fungus *Fusarium oxysporum* RS-21 induce lateral root development.

Morihiro Matsumoto¹, Mitsutoshi Fuke², Yo Koyano², Junichi Yoneda², Tsuyoshi Tokunaga², Ken Komatsu¹, Tsutomu Arie¹ (¹Graduate School of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, ²EARTHNOTE)

P-14

黒麹菌 α -1,3-glucan 合成遺伝子 *agsE* がプロトプラスト形成に及ぼす影響

渡嘉敷直杏¹, 利田賢次², 林梨咲², 西堀奈穂子², 山田修², 渡邊泰祐³, 水谷治^{1,2}, 外山博英¹ (¹琉球大院・農,²酒総研,³日大・生物資源)

黒麹菌は主に沖縄の泡盛醸造の現場で伝統的に用いられ、醤油や味噌、清酒の製造で用いられる黄麹菌と共に、日本醸造協会より国菌として認定されている産業微生物である。黒麹菌は、市販細胞壁溶解酵素によるプロトプラスト化が困難であるため、これまでプロトプラスト-PEG 法による形質転換が用いられず、その形質転換は主にアグロバクテリウム法に頼っていた。現在までに我々は、これまで困難であった黒麹菌のプロトプラスト化を α -1,3-glucanase を使用することで可能とし、プロトプラスト-PEG 法による形質転換系を開発してきた。そこで本研究では、細胞壁 α -1,3-glucan 合成酵素が黒麹菌のプロトプラスト形成に及ぼす影響を調べた。黒麹菌ゲノム中に存在する 5 つの α -1,3-glucan 合成に関わる遺伝子のうち、*A. nidulans* の主要な α -1,3-glucan 合成遺伝子である *agsB* のホモログにあたる遺伝子、*AlagsE* をアグロバクテリウム法によって欠損させた黒麹菌 Δ *ligD::ptrA, \Delta**agsE::hph* (Δ *agsE*) を造成し、市販細胞壁溶解酵素 Yatalase で、プロトプラスト化を行った。その結果、 Δ *agsE* 株において黄麹菌と同程度のプロトプラスト化が可能であった。また、これらプロトプラストを用いてプロトプラスト・PEG 法による形質転換を行った所、問題なく形質転換が可能であることを確認した。

Influence of α -1,3-glucan synthase gene *agsE* on protoplast formation for gene manipulation in *Aspergillus luchuensis*

Jikian Tokashiki¹, Kenji Toshida², Risa Hayashi², Nahoko Nishibori², Osamu Yamada², Taisuke Watanabe³, Osamu Mizutani^{1,2}, Hirohide Toyama¹

(¹Grad. Agric., Univ. Ryukyus, ²NRIB, ³Cell. Bioresour. Sci., Nihon Univ.)

P-15

麹菌における植物由来二次代謝産物の生産

菅英一郎^{1,2}, 勝山陽平¹, 丸山潤一¹, 小山泰二², 大西康夫¹ (¹東大院・農生科・応生工, ²野田産研)

【背景】麹菌は様々な二次代謝産物生産能を有しており、二次代謝産物生合成遺伝子も複数有しているがその多くは発現していない。そのため、麹菌に異種の二次代謝産物生合成遺伝子を導入した場合、生産される化合物の単離及び解析が容易であることから、二次代謝産物の生産宿主としての利用が期待されている。そこで、我々は麹菌に植物由来のポリケタイド合成遺伝子を導入し、植物由来二次代謝産物の生産を目指した。また、基質として利用される malonyl-CoA の供給量を増やすことで生産性向上を試みた。

【方法および結果】*A. oryzae* ΔKu70 株を宿主とし、内在性の amylase B 遺伝子領域にチロシンアンモニリアーゼ (TAL), 4-クマル酸 CoA リガーゼ (4CL), クルクミノイド合成酵素 (CUS) をコードする遺伝子を導入した。マルトースを炭素源とした寒天培地に CUS の基質アナログである feruloyl-NAC を添加し、3日間培養したところクルクミンの生産が確認された。一方、培地に TAL の基質であるチロシンを添加した場合はカフェ酸が高蓄積し、クルクミンは生産されなかった。クルクミンの生産性を向上させるため、大腸菌 *E. coli* および酵母 *S. cerevisiae* において malonyl-CoA 蓄積に関与すると報告されている 4 つの酵素遺伝子のホモログを麹菌内で見出し、malonyl-CoA 生産に正に働くと推測される場合は過剰発現株を、負に働くと推測される場合は遺伝子破壊株を作製した。作製した株のクルクミン生産量を比較したところ、遺伝子破壊株の一つにおいて、クルクミン生産量が 2 倍以上に増加した。現在、malonyl-CoA 量と二次代謝産物生産量の相関を調べるため解析を進めている。

Production of plant secondary metabolites in *Aspergillus oryzae*

Eiichiro Kan^{1,2}, Yohei Katsuyama¹, Jun-ichi Maruyama¹, Yasuji Koyama², Yasuo Ohnishi¹

(¹Dept. of Biotech., Grad. Sch. of Life Sci., Univ. of Tokyo, ²Noda Ins. Sci. Res.)

P-16

麹菌マルトーストランスポーターMa1P 分解時のユビキチン化リジン残基の同定

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

麹菌のマルトーストランスポーターMa1P は、マルトース存在下で細胞膜上に局在するが、グルコースが添加されると転写抑制を受けるとともに、タンパク質レベルでもエンドサイトーシス依存的な取り込みおよび分解を受ける。この分解時に、Ma1P はユビキチン化(Ub 化)されることが予想されている。この Ub 化は、Ma1P タンパク質の細胞内に露出しているアミノ末端領域、カルボキシ末端領域、タンパク質中央部に存在するいずれかのリジン残基 (K) で起こると考えられる。本研究では、Ma1P の Ub 化を観察し、さらに被ユビキチン化領域の同定を行なった。

まず、アミノ末端に FLAG タグを付加した Ma1P を免疫沈降法を用いて検出したところ、Ub 化 Ma1P のバンドが観察できたことから、Ma1P は実際に Ub 化を受けていることが明らかとなった。次に、アミノ末端に GFP を付加させ、Ma1P のアミノ末端領域に存在する 3 個の K、カルボキシ末端領域に存在する 4 個の K を含む領域を欠失させた株、タンパク質中央部に存在する K を 2 個ずつアルギニン (R) に置換した株を作製した。これらの株で、GFP-Ma1P の蛍光顕微鏡観察と Western blotting を行い、グルコース添加後の Ma1P の挙動とタンパク質の分解の様子を観察した。その結果、カルボキシ末端欠失株において、GFP-Ma1P の取り込みと分解の遅延が観察された。さらに詳細な解析をするため、カルボキシ末端領域の 4 個の K の各々を R に置換した株を作製し、同様の実験を行なった。その結果、548 番目の K の置換株で GFP-Ma1P の取り込みと分解が遅延した。これらの結果から、Ma1P 分解時の Ub 化部位は、548 番目の K 残基であることが示唆された。

Identification of the ubiquitinated lysine residue of Ma1P in its endocytic degradation in *Aspergillus oryzae*

Hinako Tada, Mizuki Tanaka, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi

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

P-17

黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* が生産する香気物質 1-octen-3-ol の生合成遺伝子破壊株の取得

片岡涼輔¹, 澁谷理恵², 橋本美春², 山村愛海², 渡邊泰祐^{1, 2}, 荻原淳^{1, 2} (¹日大院生資科・生資利用, ²日大生資科・生命化)

黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* は、沖縄県を代表する蒸留酒である泡盛や焼酎の醸造に用いられている。これらの醸造において、黒麹菌は原料米の糖化の他、クエン酸を大量に生産し、発酵醪を雑菌汚染から保護する役割を果たしている。一方、黒麹菌はこれらの優れた醸造学的性質に加えて、最終産物の香気成分生成にも関与することが近年指摘されている。しかしながら、黒麹菌由来の香気物質の分析やそれら香気物質の生合成経路についてはほとんど明らかになっていない。そこで本研究では、糸状菌が生産し、泡盛の主要な香気物質の一種である 1-octen-3-ol について、黒麹菌による生産を確認すると共に、生合成に関与すると予想される遺伝子の破壊株の取得を試みた。

タイ産のインディカ米を用いて調製した蒸米に対して、実験室株である *A. luchuensis* NBRC4314 株、泡盛醸造に使用されている *A. luchuensis* ISH1 および ISH2 株を植菌し、製麹を行った。SPME-GCMS 法を用いて、これらの麹に含まれる 1-octen-3-ol の生成を確認した。一方、*A. luchuensis* ゲノムデータベース上に、*Aspergillus nidulans* において 1-octen-3-ol の生合成に関与すると予想されている *ppoA*, *ppoC* 遺伝子と相同性が高い遺伝子の一つずつ見出した。形質転換の選択マーカーとして用いたハイグロマイシン耐性遺伝子の両側に、上記候補遺伝子の上流および下流域の配列を連結した遺伝子破壊用 DNA カセットを構築した。ハイグロマイシン含有寒天培地上に生育した形質転換体について、PCR 法による遺伝子破壊の確認を行っている。

Construction of 1-octen-3-ol biosynthetic gene disruptants in *Aspergillus luchuensis*

Ryousuke Kataoka¹, Rie Shibuya², Miharu Hashimoto², Manami Yamamura², Taisuke Watanabe^{1, 2} and Jun Ogihara^{1, 2}

(¹Dept. Biores. Util. Sci., Grad. Sch. Biores. Sci., Nihon Univ., ² Dept. Chem. Life.Sci., Nihon Univ.)

P-18

キノコ由来生合成遺伝子の高発現による物質生産

榎谷貴洋, 平山裕一郎, 松崎信生, 恒松雄太, 佐藤道大, 渡辺賢二 (静岡県大薬)

担子菌類は他の生物種には無いユニークな天然物を生産することが知られている。しかしながら、担子菌は種によっては研究室での栽培や培養が困難であることや、菌糸体や子実体（キノコ）といった形態により生合成産物が変化することから、未知生合成産物がいまだ多く残されていると考えられている。また、担子菌は実験室での培養条件では二次代謝産物の生合成に関与する遺伝子の多くが休眠型であり、多くの二次代謝産物が生合成されていないと予測されている。これら遺伝子を強制的に発現させることができれば、多くの二次代謝産物を獲得することができると考えられる。そこで、本研究では担子菌二次代謝産物の生合成遺伝子の高発現系の確立を目的として、キノコのモデル生物であるウシグソヒトヨタケ (*Coprinopsis cinerea*) に導入する天然物生合成遺伝子と、それに付与するプロモータ配列の検討を行った。

ウシグソヒトヨタケのゲノムに存在する CC1G_05377 は orsellinic acid を生合成するポリケチド合成酵素をコードし、CC1G_03563 は lagopodin A を生合成するテルペン環化酵素をコードすることがすでにわかっている。そこで、ウシグソヒトヨタケの強発現遺伝子のプロモータ領域をこの生合成遺伝子に連結したベクターを作製し、ウシグソヒトヨタケを形質転換した。得られた形質転換株の orsellinic acid や lagopodin A の生産量を調べた結果、orsellinic acid の生産量は大きく上昇することはなかったが、lagopodin A の生産量は大きく増加した。この結果は、本手法を用いることで、キノコ由来の休眠型生合成遺伝子を強制発現することにより新規天然物の獲得に道を拓く大きな一歩となった。

Engineered biosynthesis of sesquiterpenes in mushroom *Coprinopsis cinerea*.

Takahiro Masuya, Yuichiro Hirayama, Nobuo Matsuzaki, Yuta Tsunematsu, Michio Sato, Kenji Watanabe

(Department of pharmaceutical sciences, Univ. of Shizuoka)

P-19

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* における分泌経路に関与する SM タンパク質の解析

原爽太朗, 竹川薫, 樋口裕次郎 (九大院・生資環・生命機能)

真核生物における分泌タンパク質の小胞輸送経路において, soluble *N*-ethylmaleimide sensitive factor (NSF) attachment protein receptor (SNARE) 及び Sec1/Munc18 (SM) タンパク質は, 小胞の膜融合過程において重要な機能を有する。SNARE タンパク質は, ターゲット膜と小胞膜上に存在し, 複合体を形成して膜融合を行う。SM タンパク質は, SNARE タンパク質複合体に作用し, 膜融合を補助する。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* に存在する SM タンパク質 Sly1p, Sec1p はそれぞれ小胞体からゴルジ体, ゴルジ体から細胞膜において機能しており, それぞれの過剰発現株では異種タンパク質 (黄麹菌由来 α -amylase) の分泌量の増加が報告されている。しかし黄麹菌を含む糸状菌において, 分泌に寄与する SM タンパク質に関する報告は今のところ無い。

そこで我々は, 出芽酵母 Sec1p, Sly1p の黄麹菌におけるオルソログ AoSec1, AoSly1 の局在観察及びタンパク質分泌に与える影響を解析した。局在解析において, AoSec1, AoSly1 それぞれの C 末端に EGFP を融合したタンパク質を発現する株を作製し, 蛍光顕微鏡観察を行った。その結果, AoSec1-EGFP は細胞質に観察され, 局在性は見られなかった。一方, AoSly1-EGFP にはドット状の局在が観察され, ゴルジ体への局在が推察された。タンパク質分泌の解析においては先述の株を用い (各 SM 遺伝子を過剰発現用の *amyB* プロモーターで制御), 培養上清中の α -amylase 活性及びタンパク質総分泌量を測定した。その結果, SM 遺伝子過剰発現株では, タンパク質総分泌量がコントロール株と比較して増加した。

現在, 異種タンパク質分泌量に与える影響を解析するため, 仔牛由来キモシン発現株の作製を進めている。条件発現株を用いた表現型解析も併せて行っている。

Functional analysis of SM proteins involved in secretory pathway in *Aspergillus oryzae*

Shotaro Hara, Kaoru Takegawa, Yujiro Higuchi

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

P-20

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 その 2

西堀奈穂子¹, 水谷治², 林梨咲¹, 有馬寿英³, 山田修¹ (¹酒総研, ²琉球大学・農, ³県立広島大学・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。2016年, 黒麹菌ゲノム解読が報告され, 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 (Yamada et al., *DNA Res.*, **23**, 507, 2016)。そこで, 昨年度のコンファレンスにおいて, 黒麹菌研究のプラットフォームの一つとして, これらの主要転写因子破壊株ライブラリーの作製に着手したことを報告した。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 1kb 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。現在までに, 56 個の主要転写因子破壊株を取得しており, 順次公開予定である。

Construction of transcription factor gene deletion library in *Aspergillus luchuensis*, part 2

Nahoko Nishibori¹, Osamu Mizutani², Risa Hayashi¹, Toshihide Arima³, and Osamu Yamada¹

(¹ NRIB, ² Fac. of Agric., Univ. Ryukyus, ³ Fac. of Life & Environ. Sci., Pref. Univ. Hiroshima)

P-21

Analysis of unconventional protein secretion of acyl-CoA binding protein in *Aspergillus oryzae*

Hee Su Kwon¹, Kouhei Kawaguchi², Takashi Kikuma², Katsuhiko Kitamoto², Kaoru Takegawa¹, Yuiro Higuchi¹

(¹Dept. of Biosci. Biotechnol., Kyushu Univ., ²Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo)

It has been reported that there are certain proteins that do not have signal peptides and be secreted via a novel pathway, named unconventional protein secretion (UPS). In the model yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, acyl-CoA binding protein 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 peptides. Unlike *S. cerevisiae*, there were few reports about UPS in filamentous fungi, including *A. oryzae*. We have previously reported that in *A. oryzae*, AoAcb2 is secreted under nutrient starved condition.

In order to analyze the protein secretion, western blot analyses were performed using strains expressing either AoAcb2 or enhanced green fluorescent protein (EGFP) tagged with hemagglutinin (HA) epitope, in which EGFP-HA was used as a control of cytoplasmic protein. Both strains were cultured in nutrient-rich DPY medium for 10 hours and shifted to carbon starved minimal medium for another 30 minutes. In carbon starvation, only AoAcb2-HA was detected in culture supernatant, whereas EGFP-HA was mainly detected inside cells, suggesting that AoAcb2 secretion was induced by carbon starvation, where most of cells were not lysed. AoAcb2 secretion was further analyzed in different mutant backgrounds, autophagy-related gene, *Aoatg1* and a t-SNARE gene *Aosso1*, in both of which genes were expressed under the regulatable *thiA* promoter. AoAcb2-HA was detected in the supernatant from the *Aoatg1*-repressed cells, suggesting that AoAtg1 might not be involved in AoAcb2 secretion. In contrast, AoAcb2-HA was less secreted in the supernatant from the *Aosso1*-repressed cells, suggesting that AoSso1 is essential for the last step of AoAcb2 secretion at the plasma membrane. To further identify which region was required for UPS, AoAcb2 was divided into two parts, the latter including the domain of acyl-CoA binding protein (ACBP) and are being under investigation.

P-22 (O-8)

Functional analysis of AoFus3-interacting proteins in the regulation of cell fusion in *Aspergillus oryzae*

Taoning Mo¹, Takuya Katayama¹, Özgür Bayram², Daigo Takemoto³, Gerhard H. Braus⁴, Katsuhiko Kitamoto⁵, Jun-ichi Maruyama¹ (¹Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, ²Dept. of Biol., Maynooth Univ., ³Grad. School Bioagr. Sci., Nagoya Univ., ⁴Dept. of Mol. Microbial., Georg-August-University Göttingen, ⁵Nihon Pharmaceutical Univ.)

In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, cell fusion, which occurs during mating, is regulated by a Fus3 mitogen-activated protein (MAP) kinase cascade and a transcription factor Ste12. In filamentous fungi, besides the sexual reproduction, cell fusion also occurs during vegetative growth, suggesting a distinctive regulatory mechanism in the regulation of cell fusion. In *Aspergillus oryzae*, our group previously identified a Ste12 ortholog AoSte12 and a novel protein FipC as AoFus3-interacting proteins, and demonstrated that the proteins are involved in cell fusion [1]. In this study, we aim to investigate the function of AoFus3-interacting proteins in the regulation of cell fusion in *A. oryzae*.

In order to analyze the epistatic relationship of AoFus3 and its interacting proteins, we constructed and characterized the double deletion strains ($\Delta Aofus3\Delta Aoste12$, $\Delta Aofus3\Delta fipC$, $\Delta Aoste12\Delta fipC$). Noteworthy is that the growth defect in $\Delta fipC$ was suppressed by further deletion of *Aoste12*. Moreover, using the Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) system for visualizing fused cells [2], the conidial anastomosis (germling fusion) defect in $\Delta fipC$ was restored by further deletion of *Aoste12*, suggesting that AoSte12 functions at the downstream of FipC. We previously showed that the transcript levels of the cell fusion-related genes were significantly downregulated by single deletions of *Aoste12* and *fipC* [1]. qRT-PCR analysis of the transcript levels of the fusion-related genes in the double deletion ($\Delta Aoste12\Delta fipC$) is being performed to clarify the relationship of AoSte12 and FipC in the regulation of cell fusion.

[1] Katayama *et al.* Annual meeting of JSBBA 2016, 2F049 [2] Okabe *et al.* Annual meeting of JSBBA 2016, 2F053

P-23

Trichoderma reesei における核挙動とセルラーゼ生産性との関連の解明

NGUYEN LE QUYNH ANH, 藤原南帆, 志田洋介, 小笠原渉 (長岡技科大, 生物)

セルラーゼ高生産糸状菌 *Trichoderma reesei* はその産業上の有用性から転写制御を中心としたセルラーゼ生産メカニズムの研究が進められてきた。しかしながら、糸状菌が菌糸の先端伸長により増殖する多細胞微生物であり、多核細胞という形態学的特徴を持っているにも関わらず、形態とセルラーゼ生産性との関連についての知見は少ない。集束イオンビーム走査電子顕微鏡(Focused Ion Beam Scanning Electron Microscopes: FIB-SEM)を用いて、*T. reesei* の菌糸の三次元像を再構築したところ、セルラーゼ生産条件下では細胞を占める核の割合が非生産条件下より少ないことを見出した。そこで、本研究はライブセルイメージングによる核挙動とセルラーゼ生産との関連を解明することを目的とした。

核局在タンパク質ヒストン H2B と蛍光タンパク質 GFP との融合タンパク質発現ベクターを構築し、標準株 QM9414 と高生産変異株 PC-3-7 で発現させた。DAPI 染色を用いて形質転換体の核を染色したところ、GFP の蛍光と DAPI の蛍光が一致していたため、H2B-GFP 発現株の構築に成功したと判断した。共焦点顕微鏡を用いた分生子から発芽を経て成長菌糸に至るまでの過程のタイムラプス撮影から、ほとんどの分生子が単核細胞であり、同じ細胞の核分裂も異なるタイミングで行われていることが明らかとなった。また、セルラーゼ生産条件下および非生産条件下で培養して細胞あたりの核の数を計測した結果、セルラーゼ生産条件下では非生産条件下よりも核が少なく、単核細胞の割合が高いことが観察された。以上の結果より、核の挙動とセルラーゼ生産性には強い関連があると推測された。

Relationship between cellulase productivity and nuclear dynamics in *Trichoderma reesei*

NGUYEN LE QUYNH ANH, Minaho Fujiwara, Yosuke Shida, Wataru Ogasawara

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

P-24 (O-7)

糸状菌 *Aspergillus nidulans* の低酸素誘導性チオレドキシンの役割

岡添孝章, 阿部央行, 梶尾俊介, 竹下典男, 高谷直樹 (筑波大・生命環境)

糸状菌は日本の発酵・醸造産業に利用されているが多くは好気性であるため、通気が適当でないと低酸素ストレスによって生育が阻害され産物の生産効率の低下に繋がる。したがって、カビの生育制御技術を構築する上で低酸素環境下における代謝を理解することは重要である。私達はこれまでに、糸状菌 *Aspergillus nidulans* の Trx (チオレドキシンの様タンパク質) 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、AnCdc48 (ユビキチン選択的 AAA 型シャペロン) 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る。

本研究で私達は、低酸素ストレスに曝した *A. nidulans* の野生株で観察される液胞の肥大化が AN6915 の遺伝子破壊株 (AN6915 Δ) で抑制されることを見出した。また、通常の好気条件下で細胞質に局在化する AN6915-GFP 融合タンパク質が低酸素ストレスに応答して液胞へと移行することを見出した。次に、低酸素ストレス条件下でのオートファジーの役割と AN6915 の関わりを解析するため、オートファジー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用いてオートファジー活性の測定を行った。その結果、低酸素ストレス下で野生株において誘導されるオートファジーが AN6915 Δ では誘導されないという事が明らかとなった。以上の結果から、*A. nidulans* が低酸素環境において AN6915 の働きを通して細胞内タンパク質の分解機構の一つであるオートファジーを制御している事が示された。

Functional analysis of hypoxia inducible protein in *Aspergillus nidulans*

Takaaki Okazoe, Hiroyuki Abe, Shunsuke Masuo, Norio Takeshita, Naoki Takaya

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

P-25

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* のエンドサイトーシス関連タンパク質 AipA 及び相互作用因子の解析

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あまり進んでいない。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った。その結果, AipA は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 coiled-coil 領域を介して相互作用することがわかった。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, 細胞膜に局在す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, 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。さらに, *aipA* と *Aoabp1* の単独破壊株と二重破壊株を作製し, エンドサイトーシスにおける AipA のさらなる機能を解析している。

Functional analysis of AipA and its interacting protein related to endocytosis in *Aspergillus oryzae*

Ken-ichi Kakimoto, Kaoru Takegawa, Yujiro Higuchi

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

P-26

麹菌 *A. oryzae* におけるオートファジーによる核の分解 (ヌクレオファジー) の動態観察

菊間隆志^{1,2}, 丸山潤一¹, 北本勝ひこ³ (¹東大院・農生科・応生工, ²理研・伊藤細胞制御化学, ³日薬大・薬)

【目的】真核生物ではオートファジーにより様々なオルガネラが分解されることが知られているが, 多核細胞からなる糸状菌においては核全体がオートファジーにより分解されることが報告されている。なかでも, 麹菌 *Aspergillus oryzae* では核全体をオートファゴソームで取り囲み, 液胞へ輸送し分解する過程が観察されている。これまで *A. oryzae* のヌクレオファジーは3日以上長期培養によって観察されていたが, この条件では菌糸が密に生長しているため詳細な観察が困難であった。最近, 我々はヌクレオファジーが炭素源枯渇により効率的に誘導されることを見出した¹⁾。そこで本研究では, *A. oryzae* における詳細な核の分解過程を解析するために, 炭素源枯渇条件下でのヌクレオファジーの観察を行った。

【方法・結果】*A. oryzae* を DPY 培地で24時間培養した後, 炭素源枯渇培地に置換しヌクレオファジーを誘導した。その後顕微鏡解析を行ったところ, 一つの細胞に核が複数個存在するなかで, 一つの核のみをオートファゴソームが取り囲む様子が観察された。また, 発芽した後の分生子の細胞内においてもオートファゴソームに囲まれた核が観察された。さらに, 核膜孔を AoNsp1-EGFP, 小胞体を AoClxA-mDsRed により可視化し, それぞれ核を取り囲むオートファゴソーム膜との位置関係を観察した。その結果, 核膜孔は核に沿って伸長するオートファゴソームの反対側に局在する様子が観察されたが, 核周縁部の小胞体の形態はヌクレオファジーによって影響を受けなかった。以上, 炭素源枯渇によりヌクレオファジーを誘導することで, 比較的若い菌糸での観察が可能となり, より詳細なヌクレオファジーの過程が明らかとなった。

1) Kikuma *et al.*, 2017, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 63, 139-146

Observations on dynamics of nucleophagy in *Aspergillus oryzae*

Takashi Kikuma^{1,2}, Jun-ichi Maruyama¹, Katsuhiko Kitamoto³

(¹Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, ²Synth. Cell. Chem. Lab., RIKEN, ³Nihon Pharm. Univ.)

P-27

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* における小胞体関連分解因子に関する解析

菊松風大, 竹川薫, 樋口裕次郎 (九大院・生資環・生命機能)

【背景・目的】 国菌とされる黄麹菌 *Aspergillus oryzae* は、アミラーゼ等の発酵・醸造産業において有用な酵素を大量に分泌生産することができる。これらの分泌タンパク質は通常、小胞体 (ER), ゴルジ体を経て細胞外へと輸送されるが、小胞体において分泌タンパク質が過剰になると適切な構造が形成されず、ミスフォールドが誘導される。動物細胞においては、小胞体内腔でミスフォールドした分泌タンパク質は AAA (Δ ATPases associated with diverse cellular activities) ATPase である p97/valosin-containing protein (VCP) により細胞質へと排出され、ER-associated degradation (ERAD) と呼ばれるプロテアソームによる分解経路へと導かれる。出芽酵母においては、p97/VCP のホモログとして Cdc48 が存在し、黄麹菌においても Cdc48 のオルソログが一つ存在する。しかし黄麹菌を含む糸状菌において、Cdc48 オルソログの機能や ERAD と関連した詳細な分子メカニズムは明らかになっていない。近年、黄麹菌のタンパク質高分泌時には小胞体ストレスが恒常的に起こっていることが報告されており、この時 ERAD との関連も示唆されている。本研究では、黄麹菌に存在する Cdc48 オルソログの解析を通じて、ERAD とタンパク質分泌への関与について解析した。

【方法・結果】 出芽酵母 *CDC48* は致死遺伝子であるとの報告から、黄麹菌においてもそのオルソログ *Aocdc48* は生育に必須な遺伝子である可能性が高いと考えられた。そこで、チアミン存在下で下流の遺伝子発現を抑制する *nmtA* プロモーターによる *Aocdc48* 条件発現株を作製した。*Aocdc48* 条件発現株は、チアミンを含む培地ではほぼ生育しないことを確認した。現在、異なる炭素源培地による生育比較等の表現型解析を行っている。また、AoCdc48-EGFP 発現株を作製し、各種培養条件における局在解析を行っている。

Analysis of an endoplasmic reticulum-associated degradation related protein in *Aspergillus oryzae*

Futa Kikumatsu, Kaoru Takegawa, Yujiro Higuchi

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

P-28 (O-6)

麹菌 *Aspergillus oryzae* の液体振盪培養における菌糸接着機構の解析

宮澤拳¹, 吉見啓², 古明地敬介³, 田畑風華¹, 佐野元昭⁴, 阿部敬悦^{1,2} (¹東北大院農・生物産業創成, ²東北大・NICHe, ³東北大農・生物化学, ⁴金沢工大・ゲノム研)

糸状菌は一般的に、液体振盪培養において菌糸が塊を形成しながら生育する。我々は以前、モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* において、細胞壁多糖 α -1,3-グルカン (AG) の欠損株の菌糸が液体培地中に均一分散する形質を見出した¹⁾。すなわち、細胞壁 AG は菌糸の接着に関与することが明らかとなった。一方、産業用糸状菌 (麹菌) *Aspergillus oryzae* の AG 欠損株は、細胞壁から AG が欠損しているにも関わらず、菌糸が分散せず小さな菌糸の塊を形成しながら生育する²⁾。このことは、麹菌には AG 以外にも菌糸接着因子が存在することを示唆している。そこで本研究では、麹菌において AG 以外の菌糸接着因子を同定し、その欠損株の表現型を解析することを目的とした。細胞外多糖ガラクトサミノガラクトン (GAG) は病原性糸状菌 *Aspergillus fumigatus* において病原性に関与することが知られている。我々は、GAG が麹菌における菌糸接着因子であるとの仮説を立て、麹菌の野生株および AG 欠損株を親株として GAG 生合成遺伝子の破壊株を作製した (GAG 欠損株および AG-GAG 欠損株)。その結果、AG-GAG 欠損株の菌糸は液体培地中に完全分散する形質を示した (麹菌では初の完全分散性の確認)。また、菌糸表面を走査型電子顕微鏡により観察したところ、GAG 欠損株および AG-GAG 欠損株では細胞表面の粘着性の凹凸が消失していた。さらに、両 GAG 欠損株において、細胞壁ガラクトサミン量の顕著な減少が認められた。このことから、麹菌においては AG に加えて GAG も菌糸接着因子として機能することが明らかとなった。興味深いことに、GAG 欠損株は野生株に比べて大きな菌糸の塊を形成し、AG 合成酵素遺伝子の発現が上昇していた。このことから、麹菌には菌糸接着性の多糖を相補する機構が存在する可能性が示唆された。

1) Yoshimi et al., *PLOS ONE*, (2013) 8:e54893; 2) Miyazawa et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, (2016) 80:1853-63

Analysis of the mechanism of hyphal adhesion under liquid culture conditions in *Aspergillus oryzae*.

Ken Miyazawa¹, Akira Yoshimi², Keisuke Komeiji³, Fuka Tabata¹, Motoaki Sano⁴, and Keietsu Abe^{1,2}

(¹Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., ²NICHe, Tohoku Univ., ³Fac. Agric., Tohoku Univ., ⁴Kanazawa Inst. Tech.)

P-29

糸状菌の先端生長におけるカルシウム情報伝達経路の役割

芹澤知子¹, Bastian Jöhnk², Gerhard Braus², 高谷直樹¹, 竹下典男¹ (¹筑波大・生命環境, ²Georg-August-
Univ.)

糸状菌の菌糸生長に必要となる膜やタンパク質は、菌糸先端への分泌小胞の輸送とエキソサイトーシスによって供給される。この際、菌糸先端から合成されるアクチンケーブルが、中心的な役割を担っている。これまでに *Aspergillus nidulans* において、アクチンの重合とエキソサイトーシスが、一時的な Ca^{2+} の流入により周期的に制御されていることが示された。また、 Ca^{2+} の細胞内への流入にはカルシウムチャンネルが関わっていることが示されており、この過程に細胞内の膨圧が関与している可能性がある。実際に、 Ca^{2+} の細胞膜への透過性を増加させるイオノフォアを添加すると、菌糸は伸長せず、アクチンの重合とエキソサイトーシスの周期的な増減は確認できなかった。また、高浸透圧ストレスで膨圧を低下させた際にも、同様に増減が見られなくなった。さらに、菌糸先端で極性の制御に関わる極性マーカーと相互作用するタンパク質を、GFP-trap 法で網羅的に同定したところ、calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) が含まれていた。 Ca^{2+} がアクチンの重合や菌糸伸長に関わっていることから、CaMK や calmodulin (CaM) も先端生長の機構に関与する可能性が高く、それらの機能解析を行っている。

Role of Calcium signaling on tip growth of filamentous fungi

Tomoko Serizawa¹, Bastian Jöhnk², Gerhard Braus², Naoki Takaya¹, Norio Takeshita¹

(¹Faculty of Life and Environmental Sciences, Univ. of Tsukuba, ²Georg-August-University)

P-30

Aspergillus nidulans の形態形成におけるホスファチジルセリンデカルボキシラーゼの機能解析

吉川阿佳里, 高城景子, 福田良一, 堀内裕之 (東大院・農生科・応生工)

生体膜の主要な構成成分であるリン脂質は、細菌から動物まで広く種を超えて保存され、生体膜の機能に重要な役割を果たしている。その細胞内での合成経路や機能についても保存されている部分が多いと考えられているが、糸状菌におけるリン脂質合成や形態形成におけるリン脂質の役割に関しては未解明の部分が多く残されている。

我々はこれまでに、糸状菌 *Aspergillus nidulans* において酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のホスファチジルセリンデカルボキシラーゼ (PSD) と高い配列類似性を示す遺伝子 3 つについてそれぞれ遺伝子破壊株を作製、解析し、そのうち AN3188 がコードするタンパク質が *A. nidulans* においてホスファチジルセリン(PS)からホスファチジルエタノールアミン(PE)を合成する PSD として機能していることを示唆した¹⁾。

今回、AN3188 遺伝子破壊株(Δ AN3188 株)について更なる解析を行ったところ、 Δ AN3188 株の最少培地における細胞内 PE 量の減少が、PSD によらない細胞内 PE 合成の基質となるエタノールアミンの培地への添加によって回復し、また Δ AN3188 株の細胞破碎液が *in vitro* での PSD 活性の著しい低下を示したことから、AN3188 が *A. nidulans* の PE 合成に大きく関わっていることが示された。また、 Δ AN3188 株は菌糸や分生子形成器官に形態異常を示したことから、*A. nidulans* の菌糸生長、形態形成に PS や PE が何らかの役割を果たしている可能性が考えられる。現在、これらについて更に詳細な解析を行っている。

1) 吉川ら, 第 15 回糸状菌分子生物学コンファレンス要旨集 p.60 (2015)

Roles of a phosphatidylserine decarboxylase in the morphogenesis of *Aspergillus nidulans*.

Akari Kikkawa, Keiko Takagi, Ryoichi Fukuda, Hiroyuki Horiuchi

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

P-31

イネいもち病菌のキチンデアセチラーゼ Cbp1 の付着器形成誘導時における挙動の解析

黒木美沙, 岡内香奈, 志賀友理子, 前村知佳, 荒添貴之, 鎌倉高志 (東理大)

イネいもち病菌の感染特異的器官である付着器の形成には様々な因子が関与していると考えられる。本研究では, そのコード遺伝子の欠損により付着器形成の遅延が観察できる, キチンデアセチラーゼ (CDA) 様タンパク質 Cbp1 について解析を行っている。

まず大腸菌を用いた異種発現系での CDA 活性試験, およびイネいもち病菌における CDA 不活性型 Cbp1 の機能解析を行ったことで, CDA 活性が付着器形成の誘導に関与している可能性が示唆された。また, 付着器形成誘導時において CDA 活性産物であるキトサンの局在を観察すると, 野生株では発芽管の先端にキトサンが蓄積していく様子が観察できたが, *CBP1* 破壊株では観察できなかった。*CBP1* 破壊株では *CBP1* 以外の CDA ホモログについても発現量の低下が見られたことから, 発芽管における全般的な CDA 活性の低下が付着器形成の遅延と相関しているのではないかと考えた。また, Cbp1 はその配列から GPI アンカー型タンパク質と推測されている。そこで GPI アンカー化検証として, 酵母において GPI アンカー型タンパク質であることが実験的に証明されているタンパク質の GPI 付加シグナル配列を Cbp1 の C 末端に挿入し, その変異型 Cbp1 の機能について解析を行った。

これらの結果から, 発芽管先端における CDA 活性が主として Cbp1 に依存したものであり, その活性が付着器形成の誘導に関与している可能性が示唆された。

How chitin deacetylase Cbp1 behaves during appressorium formation in *Pyricularia oryzae*?

Misa Kuroki, Kana Okauchi, Yuriko Shiga, Chika Maemura, Takayuki Arazoe, Takashi Kamakura

(TUS)

P-32

Aspergillus fumigatus の AfMnt1 は O-マンノース型ガラクトマンナンの生合成に関わる α 1,2-マンノース転移酵素である

坂本梓¹, 尾上拓哉², 田中大³, 柴田信之³, 太田一良¹, 岡拓二¹ (¹崇城大・生物生命, ²崇城大院・工,

³東北医薬大・薬)

【目的】 *Afmnt1* は, 出芽酵母の α 1,2-マンノース転移酵素遺伝子のオルソログであり, Δ *Afmnt1* 株では, 高温感受性, 薬剤感受性の増加, 病原性の低下などが報告されている (Wagener *et al.*, 2008)。しかし, AfMnt1 によって生合成される糖鎖構造は明らかになっていない。本研究では, AfMnt1 が O-マンノース型ガラクトマンナン (OMGM) 構造中に含まれる α 1,2-マンノース残基の生合成に関わる唯一の酵素であることを明らかにし, AfMnt1 酵素の諸性質を解析したことについて報告する。

【方法・結果】 Δ *Afmnt1* 株を作製し, さらに, マンノース (Man) 糖鎖構造解析の障壁となるガラクトフラノース糖鎖を欠失させるために Δ *Afmnt1* Δ *glfA* 株を作製した。 Δ *glfA* 株および Δ *Afmnt1* Δ *glfA* の OMGM をゲルろ過カラムによって解析したところ, Δ *glfA* 株ではマンノビオース (Man2) が主要な成分として検出された。それに対して, Δ *Afmnt1* Δ *glfA* 株では, Man2 が完全に消失し, Man のみが検出された。一方, 精製 AfMnt1 を用いた結果, 本酵素は GDP-Man を糖供与体として pNP- α -Man に対して Man を 2 つまで転移する酵素であることが明らかになった。その反応産物は α 1,2-マンノシダーゼによって消化されたことから, AfMnt1 が α 1,2-Man 転移酵素であることが明らかになった。酵素は至適反応温度 45°C, 至適反応 pH 7.0 を示した。また, AfMnt1 は 2 価金属イオン要求性の酵素であり, $Mn^{2+} > Co^{2+} > Ca^{2+} > Mg^{2+}$ の順に高い活性値を示した。

AfMnt1 is the α 1,2-mannosyltransferase involved in biosynthesis of O-mannose-type galactomannan in *Aspergillus fumigatus*.

Azusa Sakamoto¹, Takuya Onoue², Yutaka Tanaka³, Nobuyuki Shibata³, Kazuyoshi Ohta¹, Takuji Oka¹

(¹Fac. Biotech. Life Sci., Sojo Univ., ²Grad. Sch. Eng., Sojo Univ., ³Dept. Pharm., TMPU)

P-33

麹菌 *A. oryzae* における明暗周期変化に対する一過的応答機構の解析

山本実侑¹, 川田純毅², 藤井陽平², 片山琢也², 溝上豊³, 松尾花枝³, 丸山潤一², 北本勝ひこ⁴ (¹東大・理科2類, ²東大院・農生科・応生工, ³横浜サイエンスフロンティア高校, ⁴日薬大・薬)

自然界において明暗は1日の昼夜の繰り返しによって周期的に変化する。動物の睡眠や植物の開花といった例に見られるように、地球上の生物はこのような環境条件の変化に応答する性質を有している。麹菌 *Aspergillus oryzae* は、古くから日本の伝統的な醸造産業に用いられてきた糸状菌である。*A. oryzae* は祖先の糸状菌より家畜化されたと考えられているが、環境条件の周期的な変化への応答についてはほとんど解析がなされてこなかった。本研究で我々は *A. oryzae* の明暗周期変化に対する応答を調べるために、明暗条件の変化に対する一過的な応答とその分子機構の解析を行った。

A. oryzae 野生株 RIB40 を寒天培地中央にスポットし明暗を12時間ごとに周期的に変化させて培養を行った結果、暗条件から明条件へのシフトにより気中菌糸形成が一時的に阻害される様子が観察された。しかし、*A. oryzae* がもつ青色光受容体タンパク質 AoLreA の欠損株について同様の培養を行うと菌糸形成の阻害は見られなかった。さらに、DNA マイクロアレイ解析および定量 RT-PCR 解析により、明条件にシフトしてから30分後に AoLreA に依存して転写産物量が増加する遺伝子を明らかにした。以上のことから、*A. oryzae* は明条件へのシフトに応答して菌糸生育の制御を行っており、この応答に必要な AoLreA が遺伝子発現を変化させることにより関与すると考えられた。

Analysis of transient response to periodic change of light condition in *Aspergillus oryzae*

Miyu Yamamoto¹, Junki Kawada², Youhei Fujii², Takuya Katayama², Yutaka Mizokami³, Hanae Matsuo³, Jun-ichi Maruyama², Katsuhiko Kitamoto⁴

(¹Natural Sciences II, The Univ. of Tokyo, ²Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, ³Yokohama Science Frontier High School, ⁴Nihon Pharmaceutical Univ.)

P-34

Penicillium purpurogenum のアンモニウムトランスポーター遺伝子の同定と異種発現による機能解析

小嶋涼¹, 飯嶋紗季², 光澤浩², 渡邊泰祐¹, 荻原淳¹ (¹日大生資科・生命化, ²日大生資科・くらしの生物)

Penicillium purpurogenum は azaphilone 系 *Monascus* 色素同族体を生産する。本糸状菌のうち IAM15392 株は4種の色素を生産することが知られている。そのうち、主生産色素として、母核のピラン環に酸素原子を含む PP-O とそれがアミノ基に置換した PP-V が知られている。以前に我々が行った研究と、PP-V 生産培地に含まれる窒素源が NH_4NO_3 であることを踏まえ、外来からのアンモニウムの取込み量が PP-V 生合成のために重要だと推測されている。細胞内外のアンモニウムの輸送を仲介するのは、アンモニウムトランスポーター (Amt) と呼ばれる膜タンパク質である。本研究では、IAM15392 株の *amt* を同定し、その機能解析を行った。我々は、まずドラフトゲノムシーケンスから、本菌の *amt* (*amtA*, *amtB*, *amtC*, *amtD*) を4つ同定した。次に、*Schizosaccharomyces pombe* を宿主としてこれらの機能解析を行った。4つ assay を行ったところ、本菌で主に機能しているのは AmtA と AmtB であることが分かった。一方、AmtD はほとんどアンモニウムを取込まないことが分かった。AmtC に関しては、今回行われた実験から機能を特定することはできなかった。

Isolation and functional characterization of ammonium transporter genes in *Penicillium purpurogenum*

Ryo Kojima¹, Saki Iijima², Hiroshi Mitsuzawa², Taisuke Watanabe¹ and Jun Ogihara¹

(¹Dept. Chem. Life. Sci., Nihon Univ., ²Dept. Biosci. Dai. Life, Nihon Univ.)

P-35 (O-9)

糸状菌 *Aspergillus nidulans* における二成分性情報伝達系の必須遺伝子 *ypdA* の発現抑制による致死性細胞障害と液胞の異常発達

小野都¹, 吉見啓², 福間泰之¹, 緑川裕良¹, 萩原大祐^{2,3}, 古川健太郎⁴, 中山真由美², 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, (現) ³千葉大・真菌センター, ⁴新潟大院・医・歯学)

二成分性情報伝達系は細菌から高等植物まで保存される環境応答機構である。モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* において, *ypdA* 遺伝子の欠損は致死となるが, その要因は特定されていない。また, レスポンスレギュレーター (RR) である *SskA*, *SrrA* との相互作用機構の詳細も不明である。さらに, 抗真菌剤である fludioxonil は本経路を攪乱して作用すると考えられているが, 本質的な殺菌の分子機構は不明である。本研究室では, *YpdA* 量低減による細胞応答を明らかにし, 致死要因を探索するため, *ypdA* 遺伝子の発現を制御可能な Conditional-*ypdA* 株 (*CypdA* 株) 及び *CypdA* 株を親株とした RR 破壊株 (*CypdA-sskAΔsrrAΔ*) を作成した。これまでに我々は, fludioxonil 処理や *ypdA* 発現抑制によって, *SskA* 下流の MAP キナーゼ *HogA* が構成的にリン酸化されることを明らかにした。本研究では, HOG 経路の構成的活性化により引き起こされる細胞応答を解析し, *ypdA* 発現抑制 (細胞内 *YpdA* 量低減) による致死との関係性を解明することを目的とした。まず, *ypdA* 発現抑制時及び fludioxonil 処理時における細胞応答を蛍光顕微鏡により解析した。その結果, *ypdA* 発現抑制時の *CypdA* 株および fludioxonil 処理時の野生株では, 液胞の異常な発達が観察されたのに対し, fludioxonil 耐性を示す *CypdA-sskAΔsrrAΔ* 株では, 液胞の発達は確認されなかった。また, RNA-seq により遺伝子発現を網羅的に解析したところ, *ypdA* 発現抑制や fludioxonil 処理によってオートファジー (ATG) 関連遺伝子の発現が上昇していた。一方, *CypdA-sskAΔsrrAΔ* 株では ATG 関連遺伝子の発現はむしろ低下していた。これらのことから, 液胞の異常発達や ATG 関連遺伝子の発現上昇と *ypdA* 発現抑制による致死性との関連性が示唆された。現在, ATG 関連遺伝子破壊株を作成し, *ypdA* 発現抑制時の液胞異常発達の有無を観察している。

Cytotoxic and vacuolar development by *YpdA* loss of the two component signaling system in *Aspergillus nidulans*.

Miyako Ono¹, Akira Yoshimi², Yasuyuki Fukuma¹, Yura Midorikawa¹, Daisuke Hagiwara^{2,3}, Kentaro Furukawa⁴, Mayumi Nakayama², Keietsu Abe^{1,2} (¹Grad. Sch. Agric. Sci., ²NICHe. Tohoku Univ., ³Chiba Univ., ⁴Niigata Univ.)

P-36

麹菌 *Aspergillus oryzae* における HET ドメインをもつタンパク質の機能解析

森法子¹, 片山琢也¹, 岩下和裕², 丸山潤一¹ (¹東大院・農生科・応生工, ²酒総研)

【背景】糸状菌では特定の株間で細胞融合を行った際に, 異核共存体が生育できない不和合性という性質が知られている。一般に株間における遺伝子の配列多型が不和合性の原因となり, なかでも HET ドメイン (Pfam06985) をもつタンパク質 (以下, HET ドメインタンパク質) が, 株間の不和合性に関与する例が複数報告されている。麹菌 *Aspergillus oryzae* では, 食品醸造をはじめ様々な用途に多くの実用株が用いられており, 我々は最近 *A. oryzae* 実用株において不和合となる株の組み合わせの存在を発見した¹⁾。そこで本研究では, 不和合性のメカニズムを解明するため, *A. oryzae* において HET ドメインタンパク質の機能解析を行った。

【方法・結果】*A. oryzae* のゲノムデータベースによると 40 個の遺伝子が HET ドメインタンパク質をコードすると推定された。不和合の組み合わせである野生株 RIB40 と日本酒製造用株 RIB128 について塩基配列の違いがある 30 個の遺伝子のうち 26 個について, RIB128 株由来の遺伝子を RIB40 株で過剰発現させた。その結果, 生育を著しく阻害する遺伝子 AO090001000078 (*Ao078*) を見出した。*Ao078* 遺伝子は RIB40 株と RIB128 株との間で 12 個の塩基が異なり, その結果 9 個のアミノ酸の違いが存在した。RIB40 株において自身のもつ *Ao078*⁴⁰ 遺伝子を過剰発現させた場合には著しい生育阻害は見られず, 過剰発現による生育阻害は RIB128 株由来の *Ao078*¹²⁸ 遺伝子に特異的な現象であった。現在, 本遺伝子の破壊株を作製し, プロトプラスト融合実験による不和合性の検討を行うことで, RIB40 株と RIB128 株の不和合性への寄与について解析を進めている。

1) 岡部ら, 2016 年度日本農芸化学会大会講演要旨 2F053

Functional analysis of HET domain proteins in *Aspergillus oryzae*

Noriko Mori¹, Takuya Katayama¹, Kazuhiro Iwashita², Jun-ichi Maruyama¹

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

P-37

Aspergillus fumigatus の β 1,5-ガラクトフラノース糖鎖は GfsA と GfsC によって生合成される

千原由莉亜¹, 尾上拓哉², 田中大³, 後藤正利⁴, 柴田信之³, 太田一良¹, 岡拓二¹ (¹崇城大・生物生命,
²崇城大院・工, ³東北医薬大・薬, ⁴佐賀大・農)

【目的】*Aspergillus fumigatus* の細胞壁最表層に存在する真菌型ガラクトマンナン (FTGM) は、 α 1,2/ α 1,6-マンナン主鎖と β 1,5/ β 1,6-ガラクトフラン側鎖で構成される多糖であり、新規な抗真菌薬の標的となることが期待されている。先の研究において、我々は GfsA が O-マンノース型ガラクトマンナン (OMGM) の β 1,5-ガラクトフラノース (Gal_f) 転移酵素であることを明らかにしてきた。しかし、 Δ gfsA 株では細胞壁糖鎖中の β 1,5-Gal_f 残基は完全に失われない。本研究では、gfsA のホモログである gfsC が残りの β 1,5-Gal_f 糖鎖合成を担っていることを明らかにすることを試みた。

【方法・結果】組換え GfsC を発現、精製した。精製 GfsC を用いて Gal_f 転移酵素活性を検出したところ、GfsC は GfsA と同様に UDP- α -Gal_f を糖供与体として pNP- β -Gal_f に対して Gal_f を転移する酵素であることが明らかになった。次に、 Δ gfsC 株および Δ gfsAC 株を作製したところ、 Δ gfsAC 株では菌糸の伸長速度が親株の 68%にまで減少していることが明らかになった。さらに、各菌株より FTGM を抽出し、メチル化分析および¹H-NMR 解析に供した。その結果、 Δ gfsC 株では β 1,5-Gal_f 残基が著しく減少し、 Δ gfsAC 株では、 β 1,5-Gal_f 残基が全く検出されなかった。以上の結果より、*A. fumigatus* の β 1,5-Gal_f 糖鎖生合成は GfsA および GfsC が協調的に機能することで生合成されることが明らかになった。

β 1,5-galactofuranosyl chains in *Aspergillus fumigatus* are biosynthesized by GfsA and GfsC.

Yuria Chihara¹, Takuya Onoue², Yutaka Tanaka³, Masatoshi Goto⁴, Nobuyuki Shibata³, Kazuyoshi Ohta¹, Takuji Oka¹

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

P-38

麹菌におけるアレスチン様タンパク質 CreD によるグルコース誘導性エンドサイトーシスとカーボンカタボライト抑制の制御

田中瑞己^{1,2}, 平本哲也², 多田日菜子², 一瀬桜子², 新谷尚弘², 五味勝也² (¹静岡県大・食栄, ²東北大院・農)

麹菌のアミラーゼ遺伝子の発現は、グルコースが存在するとカーボンカタボライト抑制 (CCR) により抑制される。また、アミラーゼの発現誘導基質であるマルトースを取り込むトランポーター (MalP) は、グルコースが存在するとエンドサイトーシス依存的に細胞膜から液胞に輸送されて分解される。この MalP のエンドサイトーシスには、ユビキチンリガーゼ HulA が必要であることが明らかになっている。出芽酵母では、アレスチン様タンパク質がユビキチンリガーゼと膜タンパク質のアダプターとしてエンドサイトーシスに必要であることが知られている。糸状菌の CCR 制御因子の一つとしてアレスチン様タンパク質 CreD が同定されていたことから、CreD の MalP エンドサイトーシスと CCR 制御への関与について解析を行った。

creD 破壊株における GFP 融合 MalP の局在と分解を調べた結果、グルコース添加後の MalP の液胞への輸送と分解が抑制されていることが明らかになった。CreD と HulA の相互作用を調べた結果、CreD はリン酸化修飾の有無にかかわらず HulA と相互作用していることが明らかになった。また、CCR が解除されるユビキチンプロテアーゼ CreB の破壊株において creD を破壊したところ、CCR 解除が抑制された。さらに、creB 破壊株において CreD のリン酸化部位に変異を導入した結果、擬リン酸化変異導入で CCR 解除が抑制され、非リン酸化変異導入により CCR 解除が促進され、アミラーゼ生産が増加した。

Dual regulation of glucose-induced endocytosis and carbon catabolite repression by CreD in *Aspergillus oryzae*.

Mizuki Tanaka^{1,2}, Tetsuya Hiramoto², Hinako Tada², Sakurako Ichinose², Takahiro Shintani², Katsuya Gomi²

(¹Sch. Food Nutr. Sci., Univ. of Shizuoka, ²Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ.)

P-39

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* における初期エンドソーム動態の有用物質生産への関与

都甲祐介, 竹川薫, 樋口裕次郎 (九大院・生資環)

初期エンドソーム(early endosome, EE)は多くの生物種で恒常的な動態を示し, その動態は微小管モータータンパク質系によって制御されている。モデル糸状菌 *Ustilago maydis* と *Aspergillus nidulans* においては, EE 動態が数種のオルガネラの細胞内分布制御に関与することが報告されているものの, EE 動態と分泌経路に関する詳細な報告はなされていない。また近年, タンパク質に限らず, 糸状菌においては二次代謝産物も細胞内膜輸送によって細胞外に分泌されていることが示唆されてきた。我々はこれまでに黄麹菌 *Aspergillus oryzae* において, EE とモータータンパク質を繋げる推定リンカータンパク質である *AoHok1* の遺伝子破壊株を作製し, 実際に EE 動態が停止していることを確認し, 各種表現型解析を行ってきた。本研究ではさらに, 黄麹菌において EE 動態が有用物質(分泌タンパク質, 二次代謝産物)生産に及ぼす影響について解析した。

タンパク質分泌経路について解析するために, 小胞体とゴルジ体を可視化したところ, *Aohok1* 破壊株ではそれらのオルガネラの細胞内分布に顕著な異常は見られなかった。それに対し, 野生株では菌糸最先端に観察される分泌小胞の集合体であるスピッツェンケルパーが, *Aohok1* 破壊株では菌糸最先端から拡散していた。そこでタンパク質分泌解析を行ったところ, 培養後期において *Aohok1* 破壊株では野生株に比べて α -アミラーゼ分泌量の低下が見られたことから, EE 動態が少なくとも一部のタンパク質分泌に関与することが示唆された。次に, 二次代謝産物生産をコウジ酸の分泌量測定により解析したところ, 野生株と比較して *Aohok1* 破壊株ではコウジ酸分泌生産量の低下が見られた。しかし, 通常のコウジ酸生産条件(pH 6.0, 30°C)よりも高 pH 及び高温条件においては, *Aohok1* 破壊株が野生株に比べてコウジ酸を多く分泌する結果が得られた。以上から, EE 動態がタンパク質分泌だけでなく二次代謝産物の分泌生産制御にも関与していることが示唆された。

Involvement of early endosome motility in valuable material production in *Aspergillus oryzae*

Yusuke Togo, Kaoru Takegawa, Yujiro Higuchi

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

P-40

Aspergillus fumigatus の CmsA は真菌型ガラクトマンナンのマンナン主鎖合成に関わる α 1,2-マンノース転移酵素である

尾上拓哉¹, 田中大², 後藤正利³, 柴田信之², 太田一良¹, 岡拓二¹ (¹崇城大院・工, ²東北医薬大・薬, ³佐賀大・農)

Aspergillus fumigatus は肺アスペルギルス症の原因となる真菌であり, 本菌が産生する真菌型ガラクトマンナン (FTGM) は α 1,2-/ α 1,6-マンナン主鎖に β 1,5-/ β 1,6-ガラクトフラン側鎖が結合した構造をしている。FTGM は *A. fumigatus* 細胞壁の最表層を覆っていることから病原性との関わりが示唆されている。本研究では, FTGM のマンナン主鎖の生合成に関わる糖転移酵素遺伝子の同定を試みた。マンナン主鎖が α 1,2-テトラマンノドを基本構造としていることから, 出芽酵母の α 1,2-マンノース (Man) 転移酵素遺伝子である *Scm11* のパラログのうち進化系統的に離れた 2 つの遺伝子に着目し, *cmsA*, *cmsB* と名付けて解析を進めた。

大腸菌を用いて *CmsA*, *CmsB* の発現を試みたところ, *CmsA* の発現に成功した。精製した *CmsA* を用いて, Man 転移酵素活性の検出したところ, 本酵素は GDP-Man を糖供与体として pNP- α -Man に対して Man を転移する酵素であった。その反応産物は α 1,2-マンノシダーゼによって消化されたことから, *CmsA* が α 1,2-Man 転移酵素であることが明らかになった。また, Δ *cmsA*, Δ *cmsB* を作製し, FTGM を抽出して ¹H-NMR 解析に供したところ, マンナン主鎖の存在を示す固有のケミカルシフトが消失していることが明らかになった。さらに, 菌糸の生育速度が親株と比較し, Δ *cmsA* で 10.2%, Δ *cmsB* で 8.1%にまで低下していた。分生子形成数は, 共に親株の 2.5%にまで低下していた。また, 菌糸が膨らむバルーン構造が高頻度に形成されていた。

CmsA is an α 1,2-mannosyltransferase involved in biosynthesis of core-mannan chain of fungal galactomannans in *Aspergillus fumigatus*.

Takuya Onoue¹, Yutaka Tanaka², Masatoshi Goto³, Nobuyuki Shibata², Kazuyoshi Ohta¹, Takuji Oka¹

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

P-41

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* の GPI アンカー型アスパラギン酸プロテアーゼ oryzapsin の機能解析

片桐珠希, 竹内道雄, 山形洋平 (東京農工大・応生化)

【背景・目的】黄麹菌 *Aspergillus oryzae* において, 出芽酵母の GPI アンカー型アスパラギン酸プロテアーゼ yapsin のホモログとして oryzapsin が見出された。*A. oryzae* のゲノム情報より, oryzapsin をコードする 3 つの遺伝子が推定された (*opsA*, *opsB*, *opsC*)。しかし, 本研究室 宮本により *opsC* は偽遺伝子であることが示されている。*opsA*, *opsB* は, 酵母 yapsin との基質特異性等の違いが示唆されているものの, 未だ *A. oryzae* における oryzapsin の生物学的機能は明らかになっていない。そこで本研究では oryzapsin の機能解析を目的として, *opsA*, *opsB*, *opsC* の各単独欠損株と *opsA*, *opsB* 二重欠損株の作製および, それらの表現型観察を行った。

【方法・結果】oryzapsin 欠損株は, *A. oryzae* RIB40 Δ *ligD* Δ *pyrG* 株をホストに, *pyrG* をマーカー遺伝子とした破壊用カセットとの相同組換えにより作製した。カセットはマーカーのリサイクリングのため選択培地に播種することでループアウトが可能となるよう設計し, カセットループアウト後, 形質転換のため破壊していた *ligD* と *pyrG* を *ligD* ローカスに復帰させることで oryzapsin のみを欠損した株を作製した。yapsin が細胞壁合成に関与することが報告されていることから, 主に細胞壁や細胞膜に対して影響する条件および薬剤存在下における oryzapsin 破壊株の表現型について報告する。

Analysis on physiological functions of oryzapsins in *Aspergillus oryzae*.

Tamaki Katagiri, Michio Takeuchi, Youhei Yamagata

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

P-42 (O-10)

糸状菌 *Aspergillus nidulans* 核分裂におけるキネシンの役割

堀尾哲也^{1,2}, Berl R. Oakley² (¹日体大・自然科学, ²Dept. Mol. Biosci., Univ. Kansas)

核分裂は, 細胞周期中で最もダイナミックな時期で, スピンドルが形成され染色体が分配される。染色体分配運動において, 主な駆動力を供給するのは, 微小管上のモーター分子であるとみなされている。

糸状菌 *Aspergillus nidulans* ゲノム中には微小管上のモーターとして, 11種類のキネシンと1種類のダイニンが存在する。我々は, 以前に5種のキネシン [kin-5 (BimC), kin-6, kin8 (KipB), kin-10, kin-14 (KlpA)] がスピンドル領域に局在することを示した。以前より kin-5 (BimC)は, 生育に必須であることが知られていたが, kin-14 (KlpA)変異によりその変異表現系が抑制される (O'Connell MJ, et al., J Cell Biol. 1993; 120:153-) ことから, これらの遺伝子の二重破壊株を作成したところ, 生育は強く阻害されたものの可能であった。*A. nidulans* においては, kin-5 (BimC)以外のキネシンは全て必須ではないので, *A. nidulans* は, 組み合わせによっては任意の分裂期にスピンドルに局在するキネシンを失っても良いことになる。

そこで我々は, スピンドルに局在するキネシン遺伝子の二重, 三重破壊株を作成し, その生育と核分裂過程を観察した。kin-5 (BimC), kin-6, kin-14 (KlpA)遺伝子三重破壊株は, kin-5 (BimC), kin-14 (KlpA)遺伝子二重破壊株と同程度の増殖阻害を示した。これらの株では, 核分裂中期停止, 後期開始の遅延, 同一細胞質中の細胞周期同調の乱れ, が観察された。しかし, 核分裂が正常に進行した場合には, その様子を野生株と大きな差異は見られなかった。kin-5 (BimC), kin8 (KipB), kin-14 (KlpA)遺伝子三重破壊株は, 生育不能となった。現在, この株での核分裂の観察を試みている。

我々の研究により, キネシンは核分裂の「成功」には重要であることがわかったが, 「駆動力」として必要かどうかは, ますますわからなくなった。

The function of kinesins in the mitosis of *Aspergillus nidulans*

Tetsuya Horio^{1,2}, Berl R. Oakley²

(¹Dept. Nat. Sci., Nippon Sports Science Univ., ²Dept. Mol. Biosci., Univ. Kansas)

P-43

Characterization of a glucuronoyl esterase (GE) from *Aspergillus fumigatus*: the role of Lys209 in the preference of 4-*O*-methyl group in the substrate

Hung Hiep Huynh¹, Nozomi Ishii², Ichiro Matsuo², and Manabu Arioka¹ (¹Department of Biotechnology, The University of Tokyo, ²Department of Chemistry and Chemical Biology, Gunma University)

Introduction: Lignocellulose in biomass is a promising renewable energy. However, cellulose is surrounded by hemicellulose and lignin, which hampers the complete degradation of cellulose. These components can form a stubborn covalent bonds such as the linkage between the free carboxyl group of D-glucuronic acid in hemicellulose and the aromatic alcohol groups in lignin. The recent discovery of glucuronoyl esterase (GE) which is able to cleave this linkage could contribute to solve this issue. Herein we report the functional expression and characterization of a fungal GE, AfGE of *Aspergillus fumigatus*.

Methods: C-terminally Myc-His₆ tagged AfGE was heterologously expressed in *Aspergillus oryzae*, and purified by Ni²⁺-NTA and ion exchange chromatographies. GE activity was measured by the ability to degrade the synthetic substrates that mimic the ester linkage between hemicellulose and lignin. AfGEs mutated at Lys209 were generated by overlap-extension PCR.

Results: AfGE was expected to be an industrially applicable enzyme due to its characteristics as a thermophilic enzyme with optimum pH at 5.0 and high resistance to the temperature around 50°C. It is generally accepted that GE favors the substrate containing 4-*O*-methyl substituent in the glucuronic acid moiety. To elucidate the structural basis of this preference, we performed molecular modeling of AfGE and found that Lys209 is involved in the recognition of 4-*O*-methyl group. We then examined the activities of four AfGE variants differentially mutated at Lys209 toward two substrates which differ at the *O4* position. The results obtained strongly suggest that the positive charge in the side chain of Lys209 plays a key role in the preference of 4-*O*-methyl group in the substrate.

P-44

植物病原性糸状菌で見いだされた alternapyrone 生合成遺伝子クラスターの機能解析

佐藤優哉¹, 南篤志¹, 熊倉直祐², Gan Pamela², 尾崎太郎¹, 劉成緯¹, 藤井勲³, 白須賢², 及川英秋¹ (¹北大院理, ²理研・植物免疫, ³岩手医科大薬)

糸状菌は、多様な生物活性を示すポリケタイド系天然物の主要な供給源である。我々は、麹菌を宿主として用いた遺伝子の強制発現により、*Alternaria solani* がもつポリケタイド合成酵素遺伝子 (*alt5*) が alternapyrone を生産することを報告している。この *alt5* の近傍には 4 種の修飾酵素遺伝子 (3 種のチトクロム P450 遺伝子 (*alt123*) および 1 種の FAD 依存性酸化酵素遺伝子 (*alt4*)) が存在しているが、その機能は明らかにされていない。相同な遺伝子はウリ科の植物に炭疽病を引き起こす植物病原性糸状菌 *Colletotrichum orbiculare* MAFF 240422 (Co-*alt234*) などにも保存されており、最終産物の構造と機能には興味をもたれた。そこで本研究では、各遺伝子の発現解析と麹菌異種発現系を用いた修飾酵素遺伝子の機能解析を行った。

遺伝子発現解析の結果、*C. orbiculare* では 3 種の修飾酵素遺伝子 (Co-*alt234*) が感染時特異的に転写されていることがわかった。これら修飾酵素遺伝子の機能を明らかにするため、異種発現用ベクター (pUSA2, pAdeA2) にクローニングした。次いで、alternapyrone を生産する形質転換体に追加導入したところ、3 種の化合物の生産が確認された。各化合物を単離・構造決定したところ、いずれも alternapyrone のカルボン酸誘導体であることがわかった。その詳細について、発表する。

Functional analysis of alternapyrone biosynthetic gene cluster found in filamentous fungi

Yuuya SATOH¹, Atushi MINAMI¹, Naoyoshi KUMAKURA², Pamela GAN², Taro OZAKI¹, Chengwei LIU¹, Isao FUJII³, Ken SHIRASU², Hideaki OIKAWA¹

(¹Grad. Sch. Sci., Hokkaido Univ., ²RIKEN., ³Sch. Pharm., Iwate Medical Univ.)

P-45

麹菌 *Aspergillus oryzae* 由来タンナーゼ AoTanB の生化学的特性

市川響太郎, 佐々木克仁, 塩野義人, 小関卓也 (山形大農)

タンナーゼはタンニンやカテキンガレート中の没食子酸エステルの加水分解を触媒する。本酵素は茶飲料やワイン及びビールの清澄等の食品産業や生理機能を有する没食子酸の回収に活用されている。本研究では *Aspergillus oryzae* 由来の *AotanB* 遺伝子を *Pichia pastoris* で発現させ、その酵素学的諸性質を解析した。大腸菌でクローン化した *AotanB* (AO090023000047) 遺伝子を *P.pastoris* GS115 株に組み込み、リコンビナント酵素を発現させた。AoTanA と AoTanB の活性中心セリン残基の近傍には共通の GX SXG モチーフが存在する。*A.oryzae* を含む *Aspergillus* 種由来 TanA での GX SXG モチーフの配列は GCSDG であり、一方、TanB では GCSEG であった。そこで、AoTanB の GX SXG モチーフを TanA と同じ配列にした E203D、さらに E203Q を作成し、タンナーゼ活性に及ぼす影響を検討した。

P.pastoris は通常の 30°C の培養では AoTanB の産生が低いが、18°C の培養で高い生産性を示した。精製したリコンビナント AoTanB は、至適温度 30°C、至適 pH6.0 であった。AoTanA は Kex2 によってプロセッシングされるため、SDS-PAGE では 2 本のバンドを示したが、AoTanB は Kex2 認識部位がなく、SDS-PAGE で 1 本のバンドのみを示した。また AoTanB の至適 pH は、至適 pH5.0 の AoTanA よりやや高く、至適温度は 30°C で同じであったが、比活性は顕著に低かった。一方、特許 4370395 で *A.oryzae* を宿主に産生された AoTanB は至適 pH7.0、至適温度 70°C であり、至適 pH、至適温度ともに *P.pastoris* で発現させた AoTanB とは著しく異なった。AoTanA と AoTanB の活性の違いを検討するために AoTanB の E203D および E203Q を作成し、グルタミン酸残基の影響を調べたところ E203D および E203Q 変異酵素のタンナーゼ活性は極端に低下した。このことから、AoTanB の GX SXG モチーフにあるグルタミン酸残基は本酵素の活性に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

Biochemical characterization of tannase, AoTanB, from *Aspergillus oryzae*

Kyotaro Ichikawa, Katsuto Sasaki, Yoshihito Shiono, Takuya Koseki

(Faculty of Agriculture, Yamagata Univ.)

P-46

麹菌クチナーゼ様エステラーゼ CutC の示す特徴的な酵素学的諸性質

小幡公平, 山岸純也, 新谷智子, 渡部昭, 新谷尚弘, 五味勝也 (東北大院・農 生物産業創成)

クチナーゼは天然の脂肪族ポリエステルであるクチンを分解することから、可溶性エステルや長鎖脂肪酸、種々のポリエステルに対しても分解能を有するため、化学反応触媒や油脂成分等の除去酵素として食品・繊維の加工、洗剤やクリーニングなどの目的で工業的に利用される。一方、麹菌 *Aspergillus oryzae* は脂肪族ポリエステルである poly-(butylene succinate co-adipate) (PBSA) を唯一の炭素源として生育させるとクチナーゼ様エステラーゼである CutL1 を分泌することが知られており [1]、加えて麹菌ゲノム上にはこの他に 3 つのホモログ遺伝子 (*cutB*, *cutC*, *cutD*) が存在する。今回は、このホモログの内 CutC が示す特徴的な酵素学的諸性質について報告する。

tefl 遺伝子のプロモーターにより *cutC* を高発現する株を作製し、生産させた CutC を精製した。本酵素のエステラーゼ活性を *p*-nitrophenyl butyrate を基質として測定することにより至適温度を決定したところ、4°C であり、それ以上の温度では 50°C までは緩やかに活性は低下し、60°C 以上ではほとんど活性を示さなくなった。一方、PBSA 乳化液の分解における CutC の至適温度は 40°C 付近であり、4°C の条件においては基質の分解は認められず、好冷性を示さなかった。しかし、PBSA 寒天プレートにおけるハローアッセイの結果では、4°C の条件において 37°C とは異なったタイプのハローが観察された。これにより、CutC は PBSA 分解において低温で特殊な分解様式を有する可能性が示唆された。

[1] Maeda *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 67, 778–788 (2005)

Novel psychrophilic characteristics of the cutinase-like esterase CutC from *Aspergillus oryzae*

Kohei Obata, Junya Yamagishi, Tomoko Shintani, Akira Watanabe, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi

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

P-47 (O-11)

Aspergillus nidulans のセクレトーム解析から見出された新規アラビナン分解酵素

新沢祐大¹, 酒井杏匠¹, 糀谷紗季¹, 鈴木健吾¹, 高須賀太一², 堀千明², 鈴木裕満¹, 松江渚¹, 志水元亨¹, 加藤雅士¹ (¹名城大・農, ²北大・農)

【緒言】糸状菌 *Aspergillus nidulans* はデンプン, セルロース, ヘミセルロースの分解能を有していることから, それら多糖類の分解に関わる細胞外酵素および転写制御について盛んに研究が行われている。本研究では, 種々の多糖類 (結晶性セルロース (MCC), カルボキシメチルセルロース (CMC), キチン, キシラン, グルコマンナン, ガラクトマンナン) のみをそれぞれ炭素源として生育させた際に *A. nidulans* が細胞外に分泌するタンパク質についてセクレトーム解析を行った。また, 同定されたタンパク質の中で, 機能が既知のタンパク質とはアミノ酸配列レベルで相同性を示さない機能未知タンパク質 (HP) を 6 種選抜し, メタノール資化酵母に異種発現させた。さらに, 精製した組換え HP を用いて機能を解析した。

【結果と考察】上記の条件で得られた培養ろ液から TCA/アセトン沈殿によりタンパク質を回収した。トリプシン処理後, LC-MS/MS にてセクレトーム解析したところ, MCC, CMC, キチンを炭素源にして生育させたものと比較して, キシラン, グルコマンナン, ガラクトマンナンを炭素源にした場合, 多種類のタンパク質が生産されていた。その中で, 45 種が HP であった。そこで, 6 種の組換え HP を調製し種々の多糖を基質にして酵素活性を測定した。その結果, 1 種の HP が, ペクチンの構成成分の一つであるラムノガラクトツロナン I に対して分解活性を有することがわかった。ラムノガラクトツロナン I を構成する多糖を基質にして酵素活性を測定したところ, アラビナンを分解した。以上のことから, この HP は新規のアラビナン分解酵素であることが判明した。現在, 詳細な分解機構および生理学的役割について解析している。

Novel arabinan-degrading enzyme discovered by secretome analysis of *Aspergillus nidulans*

Yuta Shinzawa¹, Kiyota Sakai¹, Saki Kojiya¹, Kengo Suzuki¹, Taichi Takasuka², Chiaki Hori², Hiromitsu Suzuki¹, Nagisa Matsue¹, Motoyuki Shimizu¹, Masashi Kato¹
(¹Meijo Univ., ²Univ. of Hokkaido)

P-48

白色腐朽菌ヒラタケにおけるキシラナーゼ群の機能欠損が木質リグニン分解に与える影響

湯村直樹¹, 中沢威人¹, 竹中敦紀¹, 大沼広宜², 泉津弘佑³, 福田泰久², 入江俊一³, 白坂憲章², 坂本正弘¹, 本田与一¹ (¹京大・院農, ²近大・院農, ³滋賀県大・環境, ⁴近大・農)

木質は, 主に多糖とリグニンが相互に絡み合って構成されている。白色腐朽菌は, この複雑な木質中のリグニンを, 単独で効率的に無機化可能な点で特徴的である。この過程には, 様々な菌体内外の因子が関与しており, 未だ不明な点が多い。本研究では, 木質中のリグニンとヘミセルロースとの間に共有結合が報告されていることを踏まえて, 主要なキシラナーゼ (主要なヘミセルロース) 分解酵素だと考えられている GH10, GH11 の機能欠損が, リグニン分解に与える影響を調査した結果を報告する。白色腐朽菌ヒラタケで, GH10 及び GH11 をコードする各遺伝子 (合計 5 種類) の単独および二重破壊株を作成した。これらをブナ木粉培地で 28 日間培養し, Klason 法によって残存リグニン量を定量した。この結果, 1 種類の GH11 単独破壊が, リグニン分解能力を低下させることが分かった。この結果について, 木粉培養条件およびリグニン分解不全変異体における遺伝子発現プロファイル・データに加えて, 各遺伝子破壊株の菌体外酵素および *Pichia pastoris* で発現させた GH10/GH11 酵素を用いた, 様々な基質に対する *in vitro* 反応解析結果に基づいて議論する。

Effects of targeted disruption of genes encoding GH10 and GH11 on the ligninolytic activity in the white rot agaricomycete *Pleurotus ostreatus*.

Naoki Yumura¹, Takehito Nakazawa¹, Hiroki Ohnuma², Kosuke Izumitsu³, Yasuhisa Fukuda², Kazutoshi Irie³, Noriaki Shirasaka², Masahiro Sakamoto¹, Yoichi Honda¹
(¹Kyoto Univ., ²Kindai Univ., ³Univ. Shiga Pref.)

P-49 (O-12)

麹菌 D-乳酸脱水素酵素 (D-LDH) のアロステリックな活性促進及び阻害特性について

渡部昭, 佐藤陽子, 五味勝也 (東北大院農・生物産業創成)

【目的】D-乳酸脱水素酵素(D-LDH)では, アロステリック特性の解析はL-LDH に比べてほとんど行われていない。先に我々は, *Aspergillus oryzae* のD-LDH のアロステリック活性促進特性について報告した(1)が, 本発表では活性阻害を中心に, 本酵素のアロステリック制御特性をさらに詳細に検討したので報告する。

【結果と考察】*A. oryzae* 由来のD-LDH は, *Thermus* 属由来L-LDH のアロステリックエフェクター因子であるクエン酸2mM 存在下でアロステリックな活性促進を受けた(1)。一方, 現在までに2例のみ報告のある真菌類 *Pythium debaryanum* 及び *Allomyces* sp.由来のD-LDH は, 細菌由来の酵素のようなアロステリックな活性促進特性を保持せず, 各々GTP, ATP によるアロステリックな活性阻害を受けるという制御機構を有することから, 本酵素についても解析したところ, 本酵素は2.5mM のGTP 存在下でアロステリックな活性阻害を受けることが判明した。このように, 本酵素は真菌類由来では初となる細菌酵素型のアロステリックな活性促進特性と, 真菌類酵素型のアロステリックな活性阻害特性の両面を併せ持つ酵素であると考えられた。

(2) 渡部ほか, 2017年度日本農芸化学会大会講演要旨集, p861

Allosteric activation and inhibition of homohexameric D-lactate dehydrogenase from *Aspergillus oryzae*

Akira Watanabe, Yoko Sato, Katsuya Gomi

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

P-50

糸状菌由来の新規ペルオキシダーゼの探索

北村優佳, 榎尾俊介, 竹下典男, 高谷直樹 (筑波大・生命環境)

ペルオキシダーゼは, 過酸化水素を電子受容体として基質の酸化反応を触媒する酵素であり, 紙パルプの漂白や難分解化合物の分解などの様々な用途に利用されている重要な酵素である。また, リグニン分解菌をはじめとした腐生性の糸状菌は, 多様なペルオキシダーゼ様酵素を有することが知られている。

我々は, 新たに有用なペルオキシダーゼを発見することを目的として, ペルオキシダーゼ活性の高い糸状菌を探索した。まず, カルチャーコレクション由来の66種の糸状菌株を, YeastMalt-Sucroce 培地を用いて液体培養した。菌体破砕液を用いて, 過酸化水素存在下での2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)

(ABTS)の酸化呈色を指標としてペルオキシダーゼ生産菌のスクリーニングを行い, 高いペルオキシダーゼ活性(2.43~42.5 nmol min⁻¹ mg⁻¹)を示す糸状菌 *Virgatospora echinofibrosa* JCM9128, *Lachnum palmae* JCM12909, *Graphibum pleomorphum* JCM3810 が選抜された。*V. echinofibrosa* JCM9128 と *L. palmae* JCM12909 は培養上清にも2.5~3.7 nmol min⁻¹ ml⁻¹のペルオキシダーゼ活性が観察され, *L. palmae* JCM12909 を10 ml で培養した時, 培養上清は菌体破砕液に比べ20倍以上の全活性を示した。いずれの培養上清中の活性もペルオキシダーゼの性質と同様に, 熱処理をすることで失活し, 1 mM アジ化ナトリウムまたはシアン化カリウムの添加によって93%以上の活性が阻害されることが確認された。*L. palmae* JCM12909 の培養上清に対してNative-PAGEを用いて活性染色したところ, 過酸化水素存在下で呈色するバンドが確認された。また, 興味深いことに, *V. echinofibrosa* JCM9128 の培養上清は過酸化水素の非存在下で10.5 nmol min⁻¹ ml⁻¹のABTS酸化活性を示した。

Screening of novel peroxidases derived from fungi

Yuka Kitamura, Shunsuke Masuo, Norio Takeshita, Naoki Takaya

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

P-51

アカパンカビ *phr* 遺伝子の発現調節に関する研究

石橋 僚, 一石 昭彦 (東洋大院・生命科学)

アカパンカビ (*Neurospora crassa*)は紫外線に対する DNA 修復機構を複数保持している。可視光のエネルギーを利用して DNA 損傷を修復する光回復, 広範に DNA 損傷を修復するヌクレオチド除去修復 (NER)などがある。WC-1 (white collar-1)と WC-2 (white collar-2)タンパク質は, 青色光受容体であり, 複合体 WCC (white collar complex)を形成する。WCC は青色光受容体および転写活性因子として機能し, 概日リズム調節や分生子形成などを調節している。また, WCC は光回復酵素 (*phr*)遺伝子の発現誘導も行っていることが報告されている。また, 光回復とは別の経路である NER に関与する遺伝子である *mus-38* 遺伝子や *mus-44* 遺伝子に欠損をもつ株では, 光回復能が不完全である部分的な光回復欠損 (PPD)が観察されることが報告されている。本研究では, このアカパンカビの PPD 表現型の機構を明らかにするために *phr* 遺伝子の発現について調べた。

光回復と NER に関与する遺伝子欠損株を用いて光回復能を調べた結果, *wc-1*, *wc-2* 遺伝子欠損株では, 紫外線照射後に可視光を照射しても光回復がみられなかった。同様に, *mus-44* 遺伝子欠損株でも光回復能の低下がみられた。このことから *mus-44* 遺伝子が光回復の誘導に関与している可能性が示唆された。そこで, 各遺伝子欠損株において *phr* 遺伝子からの mRNA の発現量をリアルタイム PCR 法により解析を行った。*wc-1*, *wc-2* 遺伝子欠損株では可視光照射による *phr* 遺伝子の発現が誘導されなかったが, *mus-44* 遺伝子欠損株では可視光照射により *phr* 遺伝子の発現が誘導されていることがわかった。

Expression analysis of *phr* gene from *Neurospora crassa*

Ryo Ishibashi, Akihiko Ichiishi

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

P-52

Identification of *cis*-acting elements in the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase terminator of *Ceriporiopsis subvermispota*

Dong X. Nguyen, Emi Nishisaka, Takehito Nakazawa, Masahiro Sakamoto, Yoichi Honda (Kyoto Univ.)

In almost all eukaryotic protein-coding transcripts, pre-mRNA cleavage followed by polyadenylation is a key step for mRNA 3' end formation, which is controlled by *cis*-acting elements in terminator. Although it has been extensively elucidated conserved and divergent elements across eukaryotes, less is known about *cis*-acting elements in basidiomycetes including wood-decaying fungi. Recently, the transient gene expression system was successfully developed in the selective white rot basidiomycetes *Ceriporiopsis subvermispota*, which was applied to elucidate *cis*-acting elements in promoter in our previous study. Here we used this system for characterizing sequence involved in mRNA 3' end formation in glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gpd*) terminator in *C. subvermispota*.

In order to determine *cis*-acting elements in the *gpd* terminator, reporter constructs containing hygromycin phosphotransferase (*hph*) followed by a series of mutant sequences of the *gpd* terminator region were transformed into *C. subvermispota*. Deletion of the 72 nt sequence upstream of the polyA site resulted in significant decreased the number of colonies. Further observation revealed that the AT-rich region located at 13 nt upstream of the polyA site played crucial role in the function of *gpd* terminator. Our ongoing works are examining the effects of substitution at this region on the expression of *hph* as well as finding out the other *cis*-acting elements.

P-53

麹菌 *Aspergillus oryzae* とその近縁種のエノラーゼ遺伝子における転写開始点の比較解析

井上大志¹, 田中瑞己², 新谷尚弘¹, 五味勝也¹ (¹東北大院・農・生物産業創成, ²静岡県大・食栄)

麹菌 *Aspergillus oryzae* における解糖系酵素エノラーゼの遺伝子 *AoenA* は、グルコース等の発酵性炭素源と酢酸等の非発酵性炭素源の違いに応じ、開始コドン上流 36 bp(-36)と-510 付近に位置する 2 つの転写開始点 (TSS) が厳密に使い分けられる。このような選択的転写機構は糸状菌においては報告例が少なく、その生物学的意義は十分に検討されていない。本研究では、*A. oryzae* の近縁種 *Aspergillus nidulans* と *Penicillium chrysogenum* のエノラーゼ遺伝子 (*AnenoA*, *PcenoA*) における TSS 解析により、エノラーゼ遺伝子の選択的転写機構の進化的意義に関する知見を得ることを目的とした。2%グルコースまたは 2%酢酸ナトリウムを単一炭素源とした最少培地で 4 時間インキュベートした *A. nidulans* FGSCA4 株と *P. chrysogenum* Q176 株の菌体サンプルを用いて、*AnenoA* と *PcenoA* の 5' RACE 解析を行った。その結果、*AnenoA* には -20~-60 付近と -440 付近、*PcenoA* には -25 付近と -390 付近にそれぞれ 5' 末端配列が検出され、両遺伝子において *AoenA* 同様 2 つの TSS の存在が示唆された。しかし、*AnenoA* と *PcenoA* における -440 と -390 付近の TSS はグルコースと酢酸の両条件において優先的に検出され、*AoenA* における TSS 選択パターンとは異なる傾向を示した。以上の結果から、*AoenA* における選択的転写パターンは *AnenoA* と *PcenoA* には保存されていないことが示唆され、選択的転写機構による転写制御は近縁種間において多様性を有することが考えられた。今後は、TSS 選択と遺伝子発現量の関係性を評価するため、*AoenA* と *AnenoA* について詳細な転写量解析を行う予定である。

Comparative analysis for transcription start sites of enolase genes in *Aspergillus oryzae* and the related species

Taishi Inoue¹, Mizuki Tanaka², Takahiro Shintani¹, Katsuya Gomi¹

(¹Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., ²Dpt. of Food and Nutri. Sci., Univ. of Shizuoka)

P-54

麹菌カーボンカタボライト抑制関連因子 CreA の有機酸生産制御への関与

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)

糸状菌におけるカーボンカタボライト抑制(CCR)は、広域制御型転写因子 CreA 及び脱ユビキチン化酵素 CreB により制御されることが知られている。これまでに、麹菌において *creA* 及び *creB* 遺伝子を破壊することで CCR が解除され、マルトースを含む完全培地において α -アミラーゼ活性が野生株よりも増加することを明らかにした。一方、0.1% ポリペプトンを窒素源とした最小培地では、興味深いことに *creA* 破壊株においてのみ野生株よりも顕著に低い α -アミラーゼ活性を示した。そこで、培養上清の pH を測定した結果、野生株及び *creB* 破壊株では pH 5 前後を示すのに対し、*creA* 破壊株では pH が 4 以下を示したことから、*creA* 破壊株では pH の低下により α -アミラーゼが失活したと考えられた。本研究では、*creA* 破壊株において pH が低下した原因を特定することを目的とした。

まず、培養上清中の有機酸の量を解析した結果、*creA* 破壊株ではピルビン酸の量が野生株よりも約 3 倍増加していた。次にマイクロアレイ解析により網羅的な転写解析を行った結果、*creA* 破壊株では野生株と比較して有機酸合成遺伝子やアミノ酸代謝に関与する遺伝子の発現量が増加していた。そこで、様々な窒素源を用いて経時的に培養上清の pH を測定した結果、ポリペプトンと同様にアミノ酸を多量に含むカザミノ酸培地において、*creA* 破壊株は野生株と比較して pH の顕著な低下が観察されたものの、硝酸ナトリウム培地では pH の低下は観察されなかった。以上の結果より、CreA はアミノ酸の代謝制御に関与しており、アミノ酸代謝の活性化により有機酸の生産量が増加し、培養上清の pH が低下したことが示唆された。

Involvement of the glucose repression regulator CreA in organic acid production in *Aspergillus oryzae*

Sakurako Ichinose, Mizuki Tanaka, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi

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

P-55

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* において分生子特異的に転写が起こる *csrA* 遺伝子領域の機能解析

加藤晴朗, 辻井雅, 前田浩, 山形洋平 (農工大院・応生化)

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* の分生子について行った EST 解析の結果, 分生子内で最も多く検出された EST はゲノム解析から予測された *csrA* (conidia specific reductase) 遺伝子領域の antisense 鎖由来の RNA であった。我々はこの RNA がオルタナティブスプライシングを受け, 最大 60 アミノ酸残基のペプチドしかコードできないことから, CSLNR (Conidia Specific Long Non-coding RNA) と名付けた。さらに, *csrA* 遺伝子領域由来の RNA である *csrA* mRNA, CSLNR はともに分生子特異的に転写されており, 分生子内で tail-to-tail 型の二本鎖 RNA を形成していることを明らかにしてきた。また, *csrA* 遺伝子領域を欠損させた株 $\Delta csrA$ 株 [*niaD*, $\Delta ligD$::*ptrA*, $\Delta csrA$] の解析の結果, ホスト株 $\Delta ligD$ 株 [*sC*, *niaD*, $\Delta ligD$::*ptrA*] と比べて寒天培地における培養で分生子数と発芽率が減少していた。しかしながら, *csrA* 遺伝子領域が分生子の形成から発芽に至るプロセスに作用する詳細な機構は未だ不明である。

csrA 遺伝子領域由来の二つの RNA *csrA* mRNA, CSLNR それぞれが分生子内でもつ機能を明らかにするため, *csrA* 遺伝子のプロモーター領域を欠損させた $\Delta pcsrA$ 株と, *csrA* 遺伝子の下流に逆向きに配置された CSLNR のプロモーター領域を欠損させた $\Delta pCSLNR$ 株の二株を作製した。この二つの株について様々な条件での表現型の違いについて報告する。

Functional analysis of conidia-specific transcript from *csrA* region in *Aspergillus oryzae*

Haruro Kato, Masaru Tsujii, Hiroshi Maeda, Youhei Yamagata

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

P-56 (O-3)

麹菌における環境ストレス応答性 MAP キナーゼの *glaB* 遺伝子発現への関与

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

清酒醸造において重要な酵素であるグルコアミラーゼ遺伝子 *glaB* の固体培養特異的な発現を制御する因子として見出された C₂H₂ 型転写因子 FlbC は, *glaB* のみならず, 固体培養で発現が大幅に上昇するプロテアーゼ遺伝子 *pepA*, *nptA*, *nptB* や酸性カルボキシペプチダーゼ遺伝子 *ocpA*, *cpl* の発現にも関与していることを明らかにした。本報告では, 固体培養における環境ストレスに着目し, 多くの生物で浸透圧ストレスに対する応答として知られる HOG/MAPK 経路と FlbC を介した *glaB* の発現との関係について解析した結果を報告する。*glaB* はプレート培養上で低水分活性と菌糸成長阻害ストレスの両条件により誘導されることが知られているが, どちらの条件が *glaB* の発現に重要であるか定量 PCR により調べたところ, *flbC* の発現に関わらず *glaB* は両条件が揃わないと発現量が上昇しなかった。麹菌の MAPK 遺伝子 5 種類それぞれの破壊株を用いて, メンブレンを敷いたプレート培養上で GlaB の生産を調べた結果, 50mM の CaCl₂ を含む最小培地において GlaB は野生株では生産されず, $\Delta hogA$ と $\Delta mpkC$ 株において生産が認められた。同様の条件で *mpkC* と *flbC* の二重破壊株では GlaB の生産が大幅に減少した。このことから, MpkC が FlbC を負に制御することにより *glaB* の発現を制御していることが示唆された。現在, *mpkC* の上流に位置する因子の破壊株を用いた解析と, 液体培養においてチアミンにより発現の調節が可能な *thiA* プロモーターを用いて 3FLAG を付加した FlbC を発現させ FlbC の修飾状態の解析を進めている。

Involvement of stress-responsive MAP kinases in the *glaB* gene expression in *Aspergillus oryzae*.

Hiraku Arai, Mizuki Tanaka, Midori Yoshimura, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi

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

P-57 (O-4)

麹菌 *Aspergillus oryzae* のコウジ酸生産に関わる新規制御因子 KpeR の機能解析

荒川弦矢¹, 工藤駿斗¹, 梁瀬惇史², 江口優一¹, 小川真弘³, 小山泰二³, 徳岡昌文², 進藤斉², 穂坂賢²

(¹東農大院・農, ²東農大・応生, ³野田産研)

【目的】麹菌における二次代謝制御の研究はモデル糸状菌などのホモログ遺伝子の機能解析が中心であった。そこで本研究では新規制御因子の探索を目的に *Aspergillus oryzae* の転写制御因子遺伝子破壊株ライブラリーを活用したスクリーニングを行い、選抜された新規制御因子の機能解析を行った。

【方法・結果】ライブラリーに対するコウジ酸生産量を指標としたスクリーニングから新規制御因子 *kpeR* (*kojic acid production enhancement*)*R* を見出した。KpeR は通常 N 末端に存在する Zn(II)₂-Cys₆ モチーフがアミノ酸配列中央に存在するユニークな構造を持ち、相同遺伝子が糸状菌に広く保存されていた。

kpeR 破壊株の表現型を親株と比較したところ、コウジ酸生産量が増加し、ペニシリン生産量と分生子数が減少しており、これらの差異は遺伝子発現解析から転写レベルで生じていることが示された。また、電子顕微鏡観察から *kpeR* 破壊株の頂のうの数が減少し且つ頂のうが小さいことが分かり、これらの要因により分生子数が減少したと考えられた。

さらに、*kpeR* 破壊により *brlA* 発現が減少することを見出したため KpeR は BrlA を中心とした形態形成のシグナル伝達系と関与すると予想した。転写解析の結果 KpeR は SfgA や FlbB,C,D を介して BrlA の発現を制御する因子であると予想された。

現在、*kpeR* 破壊株における分生子形成関連遺伝子の発現解析と KpeR の部分欠損株の作製と解析を進めている。

Functional analysis of a novel regulator, KpeR, associated with kojic acid production in *Aspergillus oryzae*

Genya Arakawa¹, Hayato Kudo¹, Atsushi Yanase², Yuichi Eguchi¹, Masahiro Ogawa³, Yasuji Koyama³, Masafumi Tokuoka², Hitoshi Shindo², Masaru Hosaka²

(¹Grad. Sch. Agric., Tokyo Univ. of Agric., ²Fac. Appl. Biosci., Tokyo Univ. of Agric., ³Noda Inst. Sci. Res.)

P-58

Pleurotus salmoneostramineus L.Vass NBRC31859 株の単核体の配列解析およびデータベースの構築

佐藤魁, 中筋千晶, 福田泰久, 白坂憲章 (近畿大・農応生化)

キノコの分子生物学・遺伝学的研究における問題点として、各種キノコ類のデータベースの不足があげられる。特に次世代シーケンサーによる全ゲノム解析データの大部分は二核体(n+n)で解析したものであり、複数の核の遺伝子情報が混在していることから、アセンブリが正確に行われず精度の高い解析が困難となっている。したがって、単核体(n)を用いて解析を行うことで、より正確な配列データが得られると考えられる。一方、キノコの子実体形成などの解析を行うためには、遺伝子の発現解析などは子実体形成能を示す二核体で行うことが多く、単核体の配列情報からの解析は困難なことも多い。しかしながら、単核体においても、種を規定するための領域など配列が高度に保存されている領域は当然ながら存在していること、また株間においてみられる表現型が異なることより保存されていない領域も多数存在することが推測される。そこで本研究では、*Pleurotus salmoneostramineus* L.Vass (トキイロヒラタケ)NBRC31859 株の胞子およびプロトプラスト由来の単核体の配列解析を行いデータベースを構築すると共に配列間の比較を行うことを目的とした。

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。

Whole genome sequence analysis and database construction of *Pleurotus salmoneostramineus* L.Vass NBRC31859 monokaryon.

Kaito Sato, Chiaki Nakasuzi, Yasuhisa Fukuta, Norifumi Shirasaka

(Kindai Univ., Fac.of Agri)

P-59

ウシグソヒトヨタケにおける子実体発生制御に関わる遺伝子の特定

坂本裕一¹, 佐藤志穂¹, 村口元², 中沢威³, 刑部敬⁴ (¹岩手生工研, ²秋田県立大, ³京大・院農, ⁴徳島大)

子実体発生に必須な因子を明らかにするために、モデル生物であるウシグソヒトヨタケを用いて、子実体発生メカニズムの解析を行っている。ウシグソヒトヨタケの培養方法を検討し、最短 15 分の青色 LED の照射で同調的かつ、同心円上に子実体原基 (knot) 形成を誘導できることを明らかにした。また、培地上のグルコース濃度を 0.2% と 1% にして子実体発生を比較したところ、0.2% では knot 形成が同調する一方、1% では knot が形成されないことを明らかにした。光照射後の遺伝子発現を調べたところ、脂質修飾酵素である cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase (*cfs1*, *cfs2*)、及び細胞接着に関わる fasciclin (*fas1*) の発現が 15 分の光照射で 1 時間後に誘導されることを明らかにした。さらにそれらの遺伝子は赤色光照射では発現しないこと、knot が形成されない領域では発現が低いことを明らかにした。一方、それらの遺伝子は、1% グルコース濃度の培地でも光照射で発現することから、グルコース濃度には影響を受けないことが示唆された。CFS1 は脂質修飾酵素であることから、シグナル分子を生産している可能性が考えられる。一方、knot で発現量が高いことが知られている遺伝子について、光照射後の発現を解析した。その結果、knot ができる条件であるグルコース 0.2% の場合は発現し、knot ができない 1% では発現が上昇しない遺伝子があることが明らかになった。その中には、菌糸同士の接着に関わると考えられているガレクチン (*cgli-3*)、フェロモンペプチド及びフェロモンペプチド修飾酵素などがあつた。以上のことから、knot 発生誘導に関わる遺伝子の一部は、光照射直後にグルコース濃度に依存せず発現する (*fas1*, *cfs1* 等) が、それ以降に発現する遺伝子はグルコース濃度が高いと発現が抑制される (*cgli-3* 等) ことが示唆された。

Identification of genes that regulate fruiting body initiation in *Coprinopsis cinerea*

Yuichi Sakamoto¹, Shiho Sato¹, Hajime Muraguchi², Takehito Nakazawa³, Keishi Osakabe⁴

(¹IBRC, ²Akita Pref. Univ., ³Kyoto Univ., ⁴Tokushima Univ.)

P-60

糸状菌 *Trichoderma reesei* におけるトランセプター CRT1 の機能解析

志田洋介¹, 北原雪菜¹, 森一樹², 油谷幸代², 小笠原渉¹ (¹長岡技科大・生物, ²産総研)

セルラーゼ高生産糸状菌である *Trichoderma reesei* は、誘導物質としてセルロースおよびその分解産物の存在下でのみセルラーゼを生産する。また、グルコースが β -1,2-結合したソホロースもセルラーゼ発現の強力な誘導物質となる。このメカニズムについて、転写調節因子、セルラーゼ遺伝子プロモーターの詳細な解析が進められてきた。しかしながら、誘導物質の認識、取り込みに関する知見は未だに少ない。近年、セルラーゼ生産性糸状菌がセロデキストリントランスポーターを有していることが報告されてきた。また、*T. reesei* においては、セルロースによるセルラーゼの生産条件下で、2糖トランスポーターである CRT1 が糖の取り込みではなく認識に関与していることが明らかとなっている。本研究では、タンパク質工学的的手法および網羅的遺伝子発現解析をおして、CRT1 の分子メカニズムに新たな知見を加えることを目的としている。

12 回膜貫通ドメインをもつ CRT1 の細胞内に露出している部分のうち、C 末端をターゲットとして削除解析を行った。*T. reesei* の種々の C 末端削除型 CRT1 発現株のうち、C 末端領域の 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、この領域についてさらなる解析を進めている。また、セルラーゼ生産条件下において CRT1 の影響を受ける因子を解析するために、*T. reesei* の CRT1 破壊株を種々の条件で誘導し、得られた mRNA をマイクロアレイ解析に供した。発現データを親株と比較することで、CRT1 はソホロースによるセルラーゼ誘導に関与していないこと、多くの糖質加水分解酵素、トランスポーターの発現に関与していることが明らかとなった。

Functional analysis of the putative tranceptor CRT1 in filamentous fungus *Trichoderma reesei*

Yosuke Shida¹, Yukina Kitahara¹, Kazuki Mori², Sachiyo Aburatani², Wataru Ogasawara¹

(¹Department of Bioengineering, Nagaoka Univ. of Technol., ²AIST)

P-61

植物ホルモンを用いる糸状菌休眠型二次代謝経路の活性化

森下陽平¹, 岡崎裕亮¹, 羅伊伊¹, 萩原大祐³, 高橋弘喜,³ 大島吉輝², 浅井禎吾¹ (¹東大院・総合文化,
²東北大院・薬, ³千葉大・真菌センター)

【背景】一般的に、糸状菌のゲノム上には数十か百近くの二次代謝物生合成遺伝子クラスターが存在する。これまでも、培養条件を検討することで、多様な天然物が取得されてきた。しかし、従来の培養条件下では、ほとんどの生合成遺伝子クラスターは、それらがコードする二次代謝物の生産に至るほど十分には発現していない、いわゆる休眠遺伝子である。当研究室では、これらを簡便に活性化する方法を確立し、従来の培養条件では生産されない二次代謝物の中から新規天然物の獲得を目指して研究を進めている。これまでに、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤について、様々な糸状菌の二次代謝を活性化する阻害剤と条件を確立し、多様な新規天然物を獲得してきた。本研究では、新たな糸状菌二次代謝活性化剤の開拓を目的として、植物ホルモンに着目した。自然界において糸状菌と植物は化学物質を介して相互作用していると考えられている。特に、植物ホルモンは糸状菌の生理作用へ影響を及ぼすこと、また、糸状菌でも生合成されることから、様々な外的要因に支配される二次代謝の制御にも影響を与えることが期待された。

【結果と考察】入手容易な植物ホルモンについて、数種の糸状菌に対する二次代謝活性化能を評価した。その結果、サイトカニン作用を有する kinetin, 6-benzylaminopurine, 及び forchlorfenuron によって、クモ内生糸状菌 *Arthrinium sacchari* の芳香族ポリケタイドの生産ならびに生合成に関わる遺伝子の発現が顕著に活性化されることを見出した。現在、上記の植物ホルモンによる二次代謝活性化のメカニズム解明の足がかりを得るために、RNA-seq による解析を進めている。

サイトカニン作用を示す植物ホルモンの他にも、オーキシシンやジャスモン酸メチルでも、実施例が少なく今のところ劇的な活性化は認められていないものの、糸状菌二次代謝に影響を与えることを見出している。現在、幅広い糸状菌に対してスクリーニングを行っており、それらについても合わせて報告する。

Activation of Fungal Silent Secondary Metabolite Biosynthetic Pathway by Plant Hormone

Yohei Morishita¹, Yusuke Okazaki¹, Luo Yi Yi¹, Daisuke Hagiwara³, Hiroki Takahashi³, Yoshiteru Oshima², Teigo Asai¹
(¹Grad. Sch. Arts & Sci., Univ. of Tokyo, ²Grad. Sch. Pharmaceutical Sciences, Tohoku Univ., ³MMRC, Chiba Univ.)

P-62

真菌特有の転写因子 HapX の鉄硫黄クラスター結合モチーフの解析

村田俊輔, 辻上誠也, 山下美春, 小森誠也, 志水元亨, 加藤雅士 (名城大・農)

【目的】HapX は 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な bZip 型転写因子である。HapX は、鉄欠乏時に HapB/C/E 複合体と相互作用し、鉄含有タンパク質などの転写を抑制することから、真菌の鉄恒常性維持機構におけるマスターレギュレーターと考えられている。HapX の C-末端側ドメインにはオルソログ間で保存されたシステイン残基に富む 4 つの Cysteine-rich motif (CrmA-D) が存在している。我々は、C-末端側ドメインが鉄硫黄クラスター保持に重要であることを既に明らかにしている。本研究では、HapX の CrmA-D の機能を詳細に解析することを目的とした。

【結果】CrmA-D 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。さらに、 $\Delta hapX$ 株で脱抑制されている遺伝子をターゲットに RT-PCR を行ったところ、 $\Delta hapX::hapX^{\Delta 200}$ 株でも同様に脱抑制されたことから、C-末端側ドメインは HapX による転写抑制に必要であることが分かった。また、CrnC 中のシステイン残基をセリン置換した変異型 HapX の紫外可視吸光スペクトルを測定したところ、野生型 HapX で見られる鉄硫黄クラスター由来のピークがほぼ消失した。CrmA, CrmB, CrmD 中のシステイン残基をセリン置換した変異型 HapX は野生型 HapX と同様であった。これらのことから、HapX は CrnC (³³⁵CX₆CX₂CX₉C³⁵⁵) に鉄硫黄クラスターを保持し、この鉄硫黄クラスターが HapX の機能に必要であることが示唆された。現在、HapX と HapB/C/E との相互作用における鉄硫黄クラスターの役割についての解析を進めている。

Analysis of iron sulfur cluster binding motif of fungus-specific transcription factor HapX

Shunsuke Murata, Masaya Tsujikami, Miharuru Yamashita, Masaya Komori, Motoyuki Shimizu, Masashi Kato
(Meijo Univ.)

P-63

麴菌のアゾール系薬剤耐性に関与する転写因子 AtrR の cis-element 解析

長野晋雄¹, 大場歩¹, 萩原大祐², 田中瑞己¹, 新谷尚弘¹, 川本進², 五味勝也¹ (¹東北大院・農・生物産業創成, ²千葉大・真菌センター)

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

はじめに ABC トランスポーターである AtrG の ORF 上流域を段階的に欠損させた株を用いて、GUS レポーターアッセイを行った。その結果、上流 1000 bp - 1300 bp に転写因子結合部位が存在することが示唆された。また、ゲルシフトアッセイ法により AtrR の DNA 結合モチーフと DNA プローブの結合性について解析した。この結果、特異的な CG トリプレット配列を含む 25 bp の配列が AtrR の cis-element として機能することが示唆された。この cis-element 領域は一部のエルゴステロール合成酵素遺伝子のプロモーター領域上にも存在し、AtrR がエルゴステロール合成酵素遺伝子の発現も制御していることを示している。

Identification of a cis-element for AtrR involved in azole drug resistance in *Aspergillus oryzae*

Akio Nagano¹, Ayumi Ohba¹, Daisuke Hagiwara², Mizuki Tanaka¹, Takahiro Shintani¹, Susumu Kawamoto², Katsuya Gomi¹ (¹Div. Biosci. Biotechnol. Future Bioind, Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., ²MMRC, Chiba Univ)

P-64

Aspergillus aculeatus における UDP-glucose 4-epimerase とセルラーゼ生産制御の関係

白柳英俊, 谷修治, 炭谷順一, 川口剛司 (阪府大院・生命環境)

糸状菌 *Aspergillus aculeatus* における新規セルラーゼ系酵素生産調節因子を遺伝学的手法により同定し、その機能を解明する事を目的として実験を行った。新規因子は、セルロースにより発現が誘導されるセロビオヒドロラーゼ遺伝子 (*cbhl*) プロモーターの下流で orotidine 5'-monophosphate decarboxylase と β -glucuronidase 遺伝子 (*gus*) を発現するレポーターを有す株を宿主に用い、変異はアグロバクテリウム形質転換法を介した T-DNA 挿入により行った。本研究では、興味深いことにセルロース資化能が低下する一方で、GUS 生産量が増加した No. 68 株について詳細に解析した。No. 68 株では、ガラクトース資化に関わる UDP-glucose 4-epimerase (*uge5*) 遺伝子内に T-DNA が挿入されていた。新たに *uge5* 欠損株 (Δ *uge5*)、相補株 (*uge5+*) を作出したところ、 Δ *uge5* は、セルロース、locust bean gum (LBG)、およびガラクトース資化能が低下していた。まず、1% Avicel, 1% LBG, 1% wheat bran で 9 時間の誘導をかけた際の各遺伝子発現量を解析した。コントロール株、*uge5+* と比べ Δ *uge5* において、転写因子 ManR の制御下にある *cbhl*, *cmc2*, *cel7b* の Avicel および wheat bran に応答した発現は減少傾向にある一方で、LBG に応答した発現が著しく低下したことから、*uge5* は ManR を介した遺伝子発現調節に関与していることが示唆された。一方で、 Δ *uge5* において、小麦ふすま培養における培養上清中のセルラーゼ生産量は増加しており、*uge5* はセルラーゼ生産を誘導初期では正に、培養後期では負に調節していることが示唆された。また、1% LBG 培養時の Δ *uge5* の培養上清のマンナナーゼ生産量が低下していたことから、マンナナーゼ系酵素遺伝子の発現に関する解析を進めている。

Relations of UDP-glucose 4-epimerase and the cellulase production control in *Aspergillus aculeatus*

Hidetoshi Shiroyanagi, Shuji Tani, Jun-ichi Sumitani, Takashi Kawaguchi

(biomolecular functions, Osaka Prefecture Univ.)

P-65

担子菌ヒトヨタケとヒラタケとの間における *snf5* および *rmt1* の遺伝子破壊が炭素源代謝および有性形態形成に及ぼす影響の比較解析

堀井雅人, 中沢威人, 坂本正弘, 本田与一 (京大・院農)

ゲノム情報に基づいた分子時計解析の結果, 担子菌の木材腐朽能力の変遷に関する時系列が提唱された。これに従うと腐生菌ウシグソヒトヨタケ (以下, ヒトヨタケ) と白色腐朽菌ヒラタケは進化上比較的近縁であると考えられる。昨年度の当コンファレンスで, この2種におけるペルオキシソーム形成関連因子 *pex1* 遺伝子破壊はともに子実体発生不全を引き起こすが, 一方で特定の木粉培地およびオレイン酸を炭素源とする最少培地上での生長への影響が著しく異なることを報告した (中沢ら, 2016)。このことは木材腐朽菌の進化と共に, 炭素源代謝もしくはその制御機構も変化している可能性を示唆する。この結果を踏まえ, ヒトヨタケにおいて炭素源代謝に影響する可能性があり有性形態形成に必須な遺伝子 *snf5* および *rmt1* について, ヒラタケにおいて変異させた場合の炭素源代謝に与える影響を調査した。ヒラタケ *snf5* 遺伝子の機能ドメインを破壊した変異株は, ヒトヨタケの場合と同様に, 有性形態形成不全であったが, スクロースを炭素源とする最少培地における生長速度に影響は観察されなかった。これは, *Cryptococcus neoformans* における *snf5* 変異の影響と異なる。一方, ヒラタケ *rmt1* 遺伝子破壊株では, ヒトヨタケで報告されたグルコース存在下における生長速度低下や異常な菌糸形態は観察されず, また有性形態形成に影響は見られなかった。これは, *Aspergillus* 属における *rmt1* オルソログ破壊の結果と符合するものであった。本研究から, 担子菌において木材腐朽能力の獲得および変遷の過程で炭素源代謝機構が変化していることが改めて示唆された。

The comparative analyses of effects of *snf5* and *rmt1* disruptions on sexual development and the assimilation of carbon sources between *Coprinopsis cinerea* and *Pleurotus ostreatus*

Masato Horii, Takehito Nakazawa, Masahiro Sakamoto, Yoichi Honda

(Kyoto Univ.)

P-66

糸状菌 *Trichoderma reesei* における分泌プロテアーゼの生産応答機構の解析

鈴木義之¹, Nayani Daranagama¹, 志田洋介¹, 森一樹², 油谷幸代², 小笠原渉¹ (¹長岡技科大・生物, ²産総研)

糸状菌 *Trichoderma reesei* は, セルラーゼの工業的な生産菌である。培養上精中の分泌セルラーゼは, 分泌プロテアーゼによって分解される (Hagspiel et al., 1989)。しかし, 分泌プロテアーゼの転写調節機構は, ほとんど知られていない。我々は, これまでに *T. reesei* の分泌プロテアーゼである Trichodermapepsin (TrAsP) について, その酵素学的諸性質, セルラーゼ分解能, 遺伝子破壊によってセルラーゼ活性が向上することおよび最適な誘導炭素源がガラクトースであることを明らかにしてきた。そこで本研究では, TrAsP を代表とする分泌プロテアーゼ群の転写調節機構の解明を目的とした。

qRT-PCR 解析の結果, 標準株である QM9414 株の TrAsP は, ガラクトースとタンパク質を個別に栄養源とすると転写される一方で, 両者を混合すると転写されなかった。それに対して窒素源応答因子である AreA 遺伝子破壊株 QM9414 Δ areA は, ガラクトースでは転写されなくなる一方で, 有機窒素源と混合条件では転写されていた。このことから, TrAsP が AreA 以外の転写調節因子からも制御されていると示唆される。そこで, 未知の転写調節因子と既知転写調節因子の関係性を調べるために, 種々のセルラーゼ転写調節因子遺伝子破壊株を用いた発現解析を行った結果, セルラーゼの転写調節因子 Xyr1 による TrAsP の制御が示唆された。この制御の詳細を明らかにする目的でトランスクリプトーム解析を行った結果, TrAsP と一部の分泌プロテアーゼが, Xyr1 と未知の因子による発現制御を受けていることが示唆された。現在, *T. reesei* の転写制御因子群と分泌プロテアーゼ群の相関解析を行っている。

Transcriptional regulation of secreted proteases in filamentous fungus *Trichoderma reesei*.

Yoshiyuki Suzuki¹, Yosuke Shida¹, Kazuki, Mori², Sachiyo Aburatani², Wataru Ogasawara¹

(¹Nagaoka Univ. of Tech., ²AIST)

P-67 (O-5)

Aspergillus nidulans における cAMP 依存性プロテインキナーゼ PkaA を介したセルラーゼ生産抑制機構

國武絵美¹, 李怡², 金丸京子², 木村真², 木村哲哉¹, 小林哲夫² (¹三重大院・生資, ²名大院・生命農)

【目的】*Aspergillus nidulans* では、カーボンカタボライト抑制機構における主要な転写抑制因子としてよく知られる CreA はセルラーゼ遺伝子の発現への関与が小さく、キナーゼ遺伝子破壊株ライブラリーを用いて同定された cAMP 依存性プロテインキナーゼ(PkaA)が CreA とは独立した生産抑制に主として関わることを見出している。本研究では PkaA が制御するセルラーゼ遺伝子発現抑制機構についての詳細な解析を実施した。

【結果】抑制炭素源存在下におけるセルラーゼ生産能を調べるため、カルボキシメチルセルロースと種々の単糖を加えてプレートアッセイを行ったところ、グルコース、マンノースに強い抑制能があった。 $\Delta creA$ は対照株とほぼ同等の結果となったのに対し、 $\Delta pkaA$ ではこれらの糖の存在下でもセルラーゼ生産を示した。次に、0.1%セロビオースを用いてセルラーゼ遺伝子の発現を誘導し、RT-qPCR を行った。 β -グルコシダーゼ阻害剤の 1-デオキシノジリマイシン(DNJ)の添加による影響を調べた結果、対照株ではセルラーゼ遺伝子の転写量に約 5 倍の違いが見られた一方で、 $\Delta creA$ 及び $\Delta pkaA$ では DNJ の有無による違いはほとんどみられなかったことから、対照株ではセロビオースが分解されて生じた低濃度のグルコースにより抑制されることが分かった。次に DNJ 添加条件でグルコースの代替として 2-デオキシ-D-グルコースを誘導培地に添加した結果、 $\Delta creA$, $\Delta pkaA$ のいずれについても部分的な抑制解除が見られ、その程度は $\Delta pkaA$ の方が大きかった。以上よりセルラーゼ遺伝子発現抑制には PkaA と CreA が共に関与しており、特に PkaA が強く寄与することが示された。現在 PkaA の上流因子である三量体 G タンパク質 α サブユニットについても解析を進めている。

cAMP-dependent protein kinase PkaA-mediated cellulase gene repression in *Aspergillus nidulans*

Emi Kunitake¹, Yi Li², Kyoko Kanamaru², Makoto Kimura², Tetsuya Kimura¹, Tetsuo Kobayashi²

(¹Grad. Sch. Biores., Mie Univ., ²Grad. Sch. Bioagric. Sci., Nagoya Univ.)

P-68

Aspergillus nidulans の糖代謝に関連する 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, 岡拓二², 後藤正利³, 竹川薫¹ (¹九大院・生資環,
²崇城大・生物生命, ³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-Galactofuranosidase(Galf-ase)は、Galf 含有糖鎖の代謝機構に重要な酵素である。Galf-ase 遺伝子の同定を行うために、Galf と構造が類似した Arabinofuranose(Araf)に着目し、既知の α -L-Arabinofuranosidase(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し、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 と相同性の高い遺伝子 AN2395 と AN3200 が存在するとわかったため、両遺伝子が大腸菌内で発現させ、精製および酵素活性測定を行った結果、Galf-ase 活性のみを示す Galf 特異的な Galf-ase であった。また、単独破壊株および二重破壊株を作製し、培養液と菌体内の Galf-ase 活性を測定したところ、AN2395 破壊株では野生株と比較して、培養液中の Galf-ase 活性が極度に低下しているとわかった。以上の結果から、*A. nidulans* において AN2395 は細胞外で Galf 含有糖鎖の代謝に関連することが示唆された。また、AN2395 と AN3200 遺伝子の上流塩基配列を解析したところ、推定 CreA 結合配列が複数存在することがわかり、両遺伝子の発現は培地のグルコースにより抑制され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, Takuji Oka², Masatoshi Goto³, Kaoru Takegawa¹

(¹Dept. of Biosci. & Biotechnol., Fac. of Agric., Kyushu Univ., ²Fac. of Biotechnol. & Lifesci., Sojo Univ., ³Fac. of Agric., Saga Univ.)

P-69

立体選択的デカリン形成を担う Fsa2 ファミリー-Diels-Alderase の探索

加藤直樹, 野川俊彦, 衣笠清美, 高橋俊二, 長田裕之 (理研 CSRS)

Diels-Alder (DA) 反応は, 合成化学における最重要反応の 1 つである。近年, 天然物生合成経路において本反応を触媒する酵素 Diels-Alderase (DAase) の発見が相次いでいる。しかしながら, 互いにアミノ酸配列の同一性に乏しく, それぞれの生合成経路に特化していることから, 酵素機能の統合的な理解には至っていない。我々は近年, *Fusarium* 属糸状菌の生産する equisetin の生合成研究において, 立体選択的なデカリン環形成を担う DAase 遺伝子 *fsa2* を発見した。類縁化合物の推定生合成遺伝子クラスターには, *fsa2* ホモログが常に含まれており, それらの機能・構造を Fsa2 のそれと比較することは, 本酵素ファミリーが関与する DA 反応の分子レベルでの理解につながる。今回は, equisetin とは異なる立体配座を有する化合物の生合成に関わる *fsa2* ホモログの探索を行ったので報告する。

はじめに, 研究室が所有する土壤単離糸状菌約 1,500 株の中から, equisetin とは反対の立体化学を有する類縁化合物 phomasetin の生産菌として, *Pyrenochaetopsis* sp. RK10-F058 株を同定した。次いで, ゲノム解読により, PKS-NRPS ハイブリッド酵素遺伝子, および *fsa2* ホモログ遺伝子を含む生合成遺伝子 (*phm*) クラスターを見出した。本遺伝子クラスターの phomasetin 生合成への関与, ならびに遺伝子の生合成経路における役割を調べるため, ノックアウト実験を行った。遺伝子欠失株の代謝物分析より, 本遺伝子クラスターが RK10-F058 株において phomasetin 生合成に関与していること, *fsa2* ホモログである *phm7* が, *fsa2* と同様, 立体選択的デカリン形成に関与していることを明らかにした。

Fsa2-family Diels-Alderases are responsible for the stereoselective decaline formation

Naoki Kato, Toshihiko Nogawa, Kiyomi Kinugasa, Shunji Takahashi, Hiroyuki Osada

(RIKEN CSRS)

P-70 (O-2)

アラビノースは糖代謝系の変動を介してトウモロコシごま葉枯病菌の孢子形成を促進する

吉田裕史, 田中千尋 (京大院・農)

菌体外の糖はそれ自体が栄養源になるだけでなく, しばしば生理調節因子として糖類分解・輸送・代謝系の活性化や抑制に働く。糖によるこのような生理作用は, これまで, 栄養源利用を促進あるいはコスト面で最適化する仕組みとして説明されてきた。しかし, 糖の作用はときに細胞内環境を大きく変動させ, 細胞分化, 形態形成, 生活環ステージ移行など, 栄養源利用以外の面でも重要な役割を果たすかもしれない。このたび演者らは, 植物細胞壁成分 L-アラビノースの存在下で, トウモロコシごま葉枯病菌 *Bipolaris maydis* の中心的糖代謝系が変動し, これに連動して栄養生長の抑制と分生子形成の促進が生ずることを明らかにした。

各種糖類を添加した平板培地において *B. maydis* 野生型株を 6 日間培養したところ, L-アラビノース添加培地における菌体量は D-グルコース添加培地に比べ顕著に少なく, 糖添加なしの培地と同程度であり, L-アラビノースが栄養生長にほとんど寄与していないことが示唆された。一方で, L-アラビノース添加培地においては分生子形成密度が D-グルコース添加培地を上回るほど大きく, その点で糖添加なしの場合とは明らかに異なった。続いて, 中心的糖代謝系 (解糖, 糖新生, ホスホグルコン酸経路) のフラックスを, 特定遺伝子群の発現パターンに基づいて解析した結果, L-アラビノース存在下では糖新生とホスホグルコン酸経路が特異的に亢進することが示された。ホスホグルコン酸経路のキー因子 (グルコース 6-リン酸デヒドロゲナーゼ) をコードする遺伝子を破壊したところ, L-アラビノース添加培地における分生子形成密度は著しく減少し, 菌体量は逆に増加した。以上より, L-アラビノースは栄養生長を抑制して分生子形成を促進する作用を有すること, ならびに, L-アラビノース存在下でホスホグルコン酸経路が亢進し, これが栄養生長の抑制および分生子形成の促進と密接に関連することが明らかとなった。

A flux shift in carbohydrate metabolism stimulated by L-arabinose facilitates sporulation in *Bipolaris maydis*

Hiroshi Yoshida, Chihiro Tanaka

(Grad. Sch. of Agriculture, Kyoto Univ.)

P-71

Aspergillus nidulans の Sirtuin アイソザイムの機能解析

小田倉里佳, 伊藤英里子, 竹下典男, 榊尾俊介, 高谷直樹 (筑波大・生命環境)

Sirtuin は真核生物に広く保存されている, NAD^+ に依存的なヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) である。糸状菌 *Aspergillus nidulans* は 5 つの sirtuin (SirA-SirE) を有する。我々は, SirA が NAD^+ 依存的にヒストン H4 の 16 番目のアセチルリジン残基を脱アセチル化することによってステリグマトシチン (ST) およびペニシリリン G の生合成遺伝子の発現とそれらの生産を抑制することを見出した。また, SirE が定常期に一次代謝遺伝子の発現を抑制し, 自己溶菌や胞子形成の代謝を増強する機能を有することが明らかとなっている。しかし, SirA と SirE 以外の sirtuin タンパク質の機能については未解明の部分が多い。

本菌の sirtuin タンパク質をコードする AN1782 (*sirC*) および AN11873 (*sirD*) の遺伝子破壊株を, 液体最少培地中で 48 時間培養した。得られた菌体から核タンパク質を抽出し, ウェスタンブロットング解析によりヒストンのアセチル化レベルを定量した。その結果, これらの遺伝子破壊株では, ヒストン H3 の K9, K18, K56 のアセチル化レベルが野生株よりも増加していた。このことから, SirC と SirD が, これらの 3 つのアセチルリジン残基を脱アセチル化することが見出された。また, *sirC* 遺伝子破壊株, *sirD* 遺伝子破壊株を最少培地で培養し, 表現型を比較した結果, 分生子の着生数に変化は見られなかった。このことから, SirC, SirD は分生子形成の制御系に関与しないことが示された。さらに, これらの遺伝子破壊株を最少培地で 7 日間培養し, 代謝産物を HPLC により解析したところ, オースチノール (AUS), デヒドロ AUS および ST の生産量が野生株よりも多かった。これらのことから, SirC および SirD が AUS, デヒドロ AUS, ST の生合成を抑制していることが明らかとなった。

Functional analysis of *Aspergillus nidulans* sirtuins

Rika Odakura, Eriko Ito, Norio Takeshita, Shunsuke Masuo, and Naoki Takaya

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

P-72

メロテルペノイド化合物アスコクロリンの後期生合成反応の解明

全智揚¹, 王冬梅^{1,2}, 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, 多種の糸状菌から (*Ascochyta viciae*, *Fusarium* sp., *Cylindrocladium* sp. など) 単離されるメロテルペノイドであり, 抗ウイルス活性, 血糖降下作用, 血中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とハロゲン化された芳香環から構成され, 特異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, 糸状菌 *Aspergillus oryzae* の異種発現系を用いて, アスコクロリン生合成酵素の各反応を同定することで, アスコクロリン生合成反応の全容解明を目指した。

前大会までに, アスコクロリンの生合成遺伝子クラスター *asc* の同定に成功し, 膜貫通型テルペン環化酵素 AscF による環化までの反応の解明を達成した。今年度は, シトクロム P450 酸化酵素である AscG, フラビン結合型ハロゲン化酵素 AscD の機能に注目した。まず, AscG と AscD をそれぞれ AscF までの酵素と共発現し, 得られた各菌体内の代謝産物を HPLC および LC-MS で分析したところ, それぞれ, 脱水素, ハロゲン化された化合物を検出し, AscG を脱水素酵素, AscD を芳香環のハロゲン化に関わる酵素であると同定した。また, アラインメントにより環化酵素 AscF より他の環化酵素では保存性の低いアミノ酸残基を見出し, その変異体を作って, 反応に重要なアミノ酸残基を同定したので, それに関しても合わせて報告する。

Investigation of the late step pathway in ascochlorin biosynthesis

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

(¹Grad. Sch. of Pharm. Sci., Univ. of Tokyo, ²Sun Yat-sen Univ., China)

P-73 (O-1)

製麴時の光照射による遺伝子発現の変化

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】清酒醸造等で産業利用されている麹菌 *Aspergillus oryzae* RIB40 は、光照射されると分生子形成が抑制されることが報告されている。一方、醸造現場では製麴時に光を長時間照射することは、麹菌の生育不良、酵素活性の低下などにつながると言われており、長時間の光照射は避けられてきた。そこでこれまでほとんど検討されていなかった光照射による製麴への影響について検討を行った。昨年度行われた大会¹⁾で青色光 (450 nm) を照射することにより一次/二次代謝物の生産性が変化したことを報告した。本発表では製麴中に青色光を照射した時の麹菌の遺伝子発現量を RNA-seq により網羅的に解析を行ったので報告する。

【方法と結果】光源には青色光を使用し、総米 100 g に麹菌の分生子 75 mg を植菌し 48 時間製麴した。麹菌は当社保有実用株 OSI 1047 を使用した。製麴は恒温恒湿機で温度 35°C, 相対湿度 70~95%で行い、植菌 24 時間後から青色光の照射 (光量子束密度 40±5 μmol/m²/s) を開始した。光照射により製麴 48 時間後の酵素活性が暗条件と比べやや低下していた。一方でコハク酸の生産性は約 5 倍増加しており、麹菌のグリオキシル酸回路のイソクエン酸リアーゼをコードする遺伝子の発現量が製麴 48 時間後には暗条件と比べ 10 倍程度上昇していることがわかった。近縁種である *A. niger* は分生子形成する前にグリオキシル酸回路が活性化することが報告されており、青色光照射により同様の反応が誘導された可能性が考えられた。酵素活性やその他の遺伝子発現量についても検討中である。

1) 第 16 回糸状菌分子生物学コンファレンス

Change of gene expression level of *Aspergillus oryzae* by exposure to light in koji making

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

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

P-74

糸状菌ジテルペノイドピロン類のポストゲノム型天然物探索

塚田健人^{1,2}, 新木翔之¹, 金子秋穂¹, 大島吉輝², 浅井禎吾¹ (¹東大院総合文化, ²東北大院薬)

麹菌 *Aspergillus oryzae* は、糸状菌の二次代謝物の優れた異種生産ホストの一つである。当研究室では、麹菌異種発現系を利用して、機能未知な休眠型二次代謝物生合成遺伝子やある特殊な状況でのみ一過的に発現するような二次代謝物生合成遺伝子を標的として、新規骨格天然物や新規機能性天然物の探索を行っている。本アプローチは、生合成遺伝子資源と生産ホストを分割する点で従来の天然物探索とは全く異なるアプローチであり、今後ますます蓄積するであろう遺伝子情報を活用する新しい天然物探索の試みである。本研究では、昆虫寄生菌や植物病原菌を中心に分布するジテルペノイドピロン類生合成遺伝子クラスターを標的とする天然物探索を行った。

ジテルペノイドピロン類はテルペン (ジテルペン) とポリケタイド (ピロン) のハイブリッド経路で生合成されるメロテルペノイドの一種である。*Acremonium* 属菌などから単離された sesquicillin 類は抗がん活性や多彩な生物活性を示すことで注目されている。また、昆虫寄生菌 *Metarhizium flavoviride* から強力な細胞毒性を示す metarhizin 類が、植物病原菌 *Fusarium subglutinans* から免疫抑制活性を示す subglutinol A が単離されている。これまでの生合成研究で推定されている subglutinol 類の生合成遺伝子クラスターの情報をもとにゲノムマイニングを行ったところ、ジョロウグモ内生菌 *Arthrinium sacchari*, 植物病原菌 *F. graminearum*, *Macrophomina phaseolina*, *Colletotrichum higginsianum*, および昆虫寄生菌 *M. anisopliae* のゲノム上に候補遺伝子クラスターを見出した。これらのクラスターを麹菌内で再構築し、生産される代謝物を単離・同定した。その結果、ジテルペノイドピロン類の生合成系の全容の解明、ならびにこれらの経路上で作られるジテルペノイドピロン類を網羅的に獲得した。新規化合物の取得にも成功し、本アプローチが新しい天然物の探索に有効であることを示す良い例となった。さらに、菌種を越えた組み合わせの遺伝子を麹菌で共発現させ、人工生合成経路を設計することで、天然にはない新規ジテルペノイドピロン類の作製も行っている。

Post-Genomic Approach for Discovering Fungal Diterpenoid Pyrone Natural Products

Kento Tsukada^{1,2}, Shono Shinki¹, Akiho Kaneko¹, Yoshiteru Oshima², Teigo Asai¹

(¹Grad. Sch. Arts & Sci., Univ. of Tokyo, ²Grad. Sch. Pharmaceutical Sciences, Tohoku Univ.)

P-75

Biosynthesis of Meroterpenoids, Verruculide A/Chrodrimanin A

Tongxuan Bai¹, Zhiyang Quan¹, Takayoshi Awakawa¹, Ikuro Abe¹ (¹Grad. Sch. of Pharm. Sci., Univ. of Tokyo)

Fungi are prolific producers of diverse types of natural product, including hybrid metabolites such as the meroterpenoids which consist of polyketide and terpenoid structures. The meroterpenoids possess a wide chemical diversity, leading to diverse biological activities. The meroterpenoids, verruculideA/chrodrimaninA are isolated from *Penicillium verruculosum*, and shown to possess inhibitory activity against protein tyrosine phosphatase 1B. The purpose of research is to test the catalyses of biosynthetic enzymes of verruculide A and chrodrimanin A, aiming to construct a future platform of combinatorial biosynthesis of bioactive meroterpenoids.

The genomic DNA of *P. verruculosum* was isolated, and subjected to a draft genome sequencing analysis. From the genomic data, we found one biosynthetic gene cluster (named *vrc* cluster) which consists of genes encoding a PKS, a prenyltransferase, a flavin monooxygenase, a terpene cyclase, a short-chain dehydrogenase/reductase, two α -KG monooxygenases, and a cytochrome P-450. To link *vrc* gene cluster with verruculideA/chrodrimaninA and clarify each biosynthetic step, we conducted heterologous expression of *vrc* genes with *Aspergillus oryzae* as a host. The product accumulated in each expression host was identified by HPLC-MS and NMR analyses, respectively. Throughout these processes, we clarified polyketide synthesis, prenyltransfer, terpene cyclization, and ketoreduction in this pathway. Now, we are investigating three oxidation pathways in the late step of this pathway by using the same strategy.

P-76

Aspergillus nidulans のグリコーゲン代謝と菌糸内不均一性

梶尾俊介, 岡添孝章, 竹下典男, 高谷直樹 (筑波大学・生命環境系)

グリコーゲンは多くの生物が生体内の貯蔵糖として利用する重要な化合物である。今回我々は、糸状菌のモデルである *Aspergillus nidulans* のグリコーゲン代謝について研究した。*A. nidulans* のゲノム配列情報からグリコーゲン代謝に関与すると予想される遺伝子を選抜した。野生株および遺伝子破壊株の解析から、他の真核生物と同様に、glycogenin (GlgA) および glycogen synthase (GsyA) がグリコーゲンの合成、glycogen phosphorylase (GphA) がその分解に寄与することを示した。細胞内グリコーゲン量およびその代謝遺伝子の発現量は、培地中のグルコース含量が低下、枯渇する対数増殖期後期から定常期にかけて増加した。酵母と同様に *A. nidulans* のグリコーゲン代謝は細胞外のグルコース濃度の低下に伴い活性化することが示された。GsyA および GphA と GFP との融合タンパク質を用いて両者の細胞内局在性を観察した。GsyA-GFP 発現株では細胞質にて多数の点状の蛍光シグナルが観察され、この点状の構造は菌糸先端部に比べ基部により多かった。GphA-GFP 発現株は細胞質全体に蛍光シグナルが観察されたが、その一部は繊維状の構造をとっていた。また、グルコース飢餓時には菌糸基部にてより長い繊維状構造物が多く観察された。2-deoxy-2-[(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]-D-glucose を用いて細胞内グリコーゲンを可視化させたところ、菌糸基部にて多数の点状構造が観察され、そのうち4割以上が GsyA-mCherry と共局在した。これらは、菌糸の先端部に比べ基部でより活発なグリコーゲン代謝が行われていることを示す。多細胞生物である糸状菌がグリコーゲンの合成・分解を空間的に制御することが明らかとなった。

Spatial heterogeneity of glycogen and its metabolizing enzymes in *Aspergillus nidulans* hyphal tip cells

Shunsuke Masuo, Takaaki Okazoe, Norio Takeshita, Naoki Takaya

(Life and Environmental Sciences, Univ. of Tsukuba)

P-77

リポペプチド生合成におけるハイブリッド形成反応に関与する新規酵素の同定

木下 浩, 北村 仁見, 仁平 卓也 (阪大・生物学国際交流セ)

脂肪酸と非リボソームペプチド (NRP) からなるハイブリッド化合物 (リポペプチド) は糸状菌が生産する代表的な生理活性物質の一つであり, 抗真菌剤エキノキャンディン, 抗 MRSA 剤エメリセルアミド等, 特異な活性を示すことが知られている。通常リポペプチド生合成においては脂肪酸合成酵素もしくはポリケチド合成酵素 (PKS) から遊離した脂肪酸が, NRP 合成酵素 (NRPS) に受渡される。これまでの解析により, 受渡しには二種類の機構が提唱されているが, 未同定機構の存在も示唆されており, 不明な点が多い。

我々が昆虫病原性糸状菌から発見したトポイソメラーゼ阻害活性を示すフザリスタチン類縁体も, リポペプチドであるが, その生合成遺伝子群には骨格を形成する PKS 遺伝子と NRPS 遺伝子の他にシスタチオニγγシンターゼ (CGS) に高い相同性を示す機能未知遺伝子が存在していた。CGS はシステインとホモセリンからシスタチオンを生合成する酵素であるため, 今回見出された CGS 様タンパク質もスルフィド結合形成もしくは解離に関与すると予想される。しかし, フザリスタチンは硫黄原子を含まないことから, 生合成過程の中間体形成, さらに言えば脂肪酸の PKS からの解離もしくは NRPS への受渡しに関与することが強く示唆された。そこで当該遺伝子を破壊したところ, フザリスタチンの生産が消失し, 脂肪酸鎖と思われる化合物の遊離が確認された。これまでに CGS 様タンパク質が二次代謝産物生合成に関与するという報告はなく, 本結果はリポペプチド生合成機構に新たな知見をもたらすものである。

Identification of a new enzyme related to the synthesis of hybrid compound.

Hiroshi Kinoshita, Hitomi Kitamura, Takuya Nihira

(ICBiotech, Osaka Univ.)

P-78

トウモロコシごま葉枯病菌における *BmCrz1* 遺伝子破壊株は, 生育阻害物質を分泌する

尾上 魁, 住田 卓也, 北出 雄生, 吉田 裕史, 宮下 正弘, 宮川 恒, 田中 千尋 (京大・院・農)

Crz1p は, 出芽酵母 (*S.cerevisiae*) や *C.neoformans* などにおいて, カルシニューリンシグナル伝達機構の中の重要な転写因子として知られている。この転写因子の機能は, 多くの菌で解明されてきているが, 植物病原性糸状菌においては未解明の部分が多い。そこで, 植物病原性糸状菌の一種であるトウモロコシごま葉枯病菌 (*Bipolaris maydis*) を用いて, *BmCrz1* 遺伝子の機能解析を試みた。

BmCrz1 遺伝子を破壊した破壊株を作出し, その表現型を調べたところ, 破壊株の生育 5 日目におけるコロニー直径は, 野生株のそれに比べて 50~60% 小さくなった。さらに破壊株では, 野生株に比べて早期の段階でメラニン化や分生子の形成が生じることが観察された。また, 破壊株を野生株や他の糸状菌と対峙培養したところ, 相手株のコロニー生育を阻害することが観察されたことから, 破壊株は, 培地中に何らかの生育阻害物質を分泌していることが示唆された。そこで, 破壊株の培養濾液を添加した平板培地で野生株と破壊株のコロニー生育を観察したところ, 培養濾液添加培地では, 両菌株のコロニー直径が CM 培地でのそれに比べて約 30% 小さくなり, 阻害活性の存在と, 阻害物質が破壊株自身の生育にも影響することが示された。この生育阻害物質の特定のために, 培養濾液をオートクレーブ処理して同様の実験を行ったが, 阻害活性は失われなかった。また, 酢酸エチルを用いて培養濾液を分液し, 得られた酢酸エチル層を TLC にスポットした。その上に野生株分生子を含む CM 寒天培地に噴霧, 培養して, 生理活性を確かめたところ, 酢酸エチル層に生育阻害活性と, メラニン化の促進活性があることが認められた。

現在, この阻害物質の詳細な分析のために, 検定法の改良及び薄層クロマトグラフィーによる更なる解析を試みている。

$\Delta BmCrz1$ strain of *Bipolaris maydis* secretes colony growth inhibitor.

Kai Onoe, Takuya Sumita, Yuki Kitade, Hiroshi Yoshida, Masahiro Miyashita, Hisashi Miyagawa, Chihiro Tanaka

(Grad. Sch. of Agriculture, Kyoto Univ.)

P-79

Investigation of *in vivo* phenotypic evolution in clinical isolates of *Aspergillus fumigatus*

Cai Bian¹, Daisuke Hagiwara¹, Yoko Kusuya¹, Akira Watanabe¹, Hiroki Takahashi^{1,2} (¹ MMRC, Chiba Univ., ² MCRC, Chiba Univ.)

Aspergillus fumigatus is a ubiquitous fungus commonly found in soil, but is also reported as a major cause of invasive fungal infections in humans. We previously reported that *A. fumigatus* strains serially isolated from same patients with aspergillosis become resistant to azole drugs. Besides antifungals, it is conceivable that *A. fumigatus* is challenged by diverse environmental stresses, e.g. heat stress, and oxidative stress. Using the strains serially isolated from same patients, here we investigated whether *A. fumigatus* is evolving to adapt to those stresses in the host environment. First, we examined MIC test and the microsatellite typing for our collected strains. Among twelve sets of the strains, the strains in seven sets became more resistant to azole drugs than formerly isolated ones. Next, we investigated the growth upon the stress treatment by using the reagents, i.e. Congo red, Calcofluor white and hydroperoxide. We found that some strains exhibited increased resistance to cell wall perturbing drugs and increased susceptibility to hydroperoxide compared with the formerly isolated ones. Our results suggest that the cell wall evolution and adaptation to the oxidative damage occurred in *A. fumigatus* during infection.

P-80

牧草共生エンドファイトの細胞融合と共生確立に関与する Cdc25 および RasB の機能解析

稲垣茉莉子, 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)

Epichloë 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様々な遺伝子を単離している。例えば活性酸素形成酵素 NoxA, 転写制御因子 ProA などの遺伝子を欠損したエンドファイト菌株は、宿主植物内で過剰に生育し、宿主植物の生育を著しく阻害する。一方で、MAP キナーゼである Mak2 の遺伝子破壊株は、宿主植物への全身的感染能を失っている。これまでに単離されたこれら共生変異株は、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立能には密接な関係があると推定されている。以前、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、低分子量 G タンパク質 Ras の活性化因子をコードする Cdc25 遺伝子を単離した。cdc25 破壊株は、菌糸融合能および宿主植物への感染能が失われていた。また、Yeast-two-hybrid 法を用いて Cdc25 と *E. festucae* ゲノムから見出される 5 つの Ras の相互作用を調査したところ、RasB とのみ結合することが示された。rasB 破壊株では菌糸融合能が失われ、また cdc25 破壊株に恒常活性型 RasB を発現したところ、菌糸融合能が回復した。以上の結果から、エンドファイトの Cdc25 は RasB の活性化を介して菌糸融合や共生確立に関与している可能性が示された。

Involvement of Cdc25 and RasB in hyphal cell fusion and symbiotic infection of *Epichloë festucae*

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

P-81

ウリ類炭疽病菌における病原性欠損変異株 $\Delta coppt1$ の性状解析

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いて細胞周期制御に関与する GTPase CoTem1 の酵母ツーハイブリッド法における物理的相互作用因子として CoPpt1 を同定し, CoPpt1 が本菌の病原性に関与することを報告した。今回, N 端にシグナルペプチドを含む CoPpt1 の局在解析を行ったところ, 細胞外への分泌は検出されず, 付着器成熟過程において付着器内の液胞, および顆粒構造でオートファゴソームマーカー CoAtg8 と共局在した。そこでオートファジー, およびオートファジーが関与する付着器内の膨圧に着目した。サイトリシス法にて膨圧を評価したところ, $\Delta coppt1$ では培養 12 時間後の付着器内部における核のオートファジーに僅かな遅延が認められたが, 付着器内部の膨圧に顕著な異常は確認されなかった。出芽酵母における Npc2 は, エンドソーム内部においてステロール輸送に関与することが知られており, 遺伝子配列および局在性において CoPpt1 と高い相同性を示す。出芽酵母における Npc2 とウリ類炭疽病菌における CoPpt1 の機能の相同性を評価した。出芽酵母 $\Delta npc2$ は, 細胞膜のエルゴステロールに結合して抗菌作用を示すナイスタチンに対して感受性が增大することから, ウリ類炭疽病菌における CoPpt1 とナイスタチン感受性との関与を評価したところ, $\Delta coppt1$ では野生株と比較して感受性の増大は確認されなかった。さらに, $\Delta coppt1$ に対して CoPPT1 を再導入した $\Delta coppt1:CoPPT1$ では $\Delta coppt1$ と比較して病原性が回復したのに対して, NPC2 を導入した $\Delta coppt1:NPC2$ では回復しなかった。一方で, CoPPT1 の一部を NPC2 に置換して導入すると $\Delta coppt1$ の病原性が部分的に回復した。現在, ウリ類炭疽病菌 CoPpt1 の Npc2 との機能的な相同性に関してステロール輸送に着目して解析を進めている。

Characterization analysis of pathogenic defective mutant $\Delta coppt1$ in *Colletotrichum orbiculare*

Naoki Kajikawa, Fumi Fukada, Yasuyuki Kubo

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

P-82

ウリ類炭疽病菌トレオニンシンターゼ $CoTHR4$ は病原性と胞子発芽に関与する

原田賢, 奥野哲郎 (龍谷大・植生)

ウリ類炭疽病菌はウリ科植物に炭疽病斑を形成する植物病原糸状菌である。本菌は胞子発芽を起点とし, ダイナミックな形態分化を経て宿主植物への感染を成立させる。本菌の胞子発芽に関わるこれまでの知見は Ras/MAPK シグナル伝達経路, cAMP シグナル伝達経路などのシグナル伝達構成因子に限られている。我々は, アグロバクテリウム形質転換法により T-DNA 挿入変異株 (5248 株) を作出し, 胞子形成と病原性の低下を指標にスクリーニングを行い, 変異株 CP223 を取得した。Tail PCR の増幅産物のシーケンス解析から CP223 の推定変異遺伝子はトレオニンシンターゼをコードし, 出芽酵母のトレオニンシンターゼ Thr4 のアミノ酸配列と高い相同性を示した。そこで, 本遺伝子を $CoTHR4$ とし, $cothr4$ 株を用い, $CoTHR4$ の病原性と胞子形成における機能解析を進めた。まず, キュウリ子葉への接種試験と PDA 培地上での胞子形成の測定を行ったところ, $cothr4$ 株の病斑形成能と胞子形成量は野生株と比較し, 顕著に低下することが分かった。さらに, $cothr4$ 株における感染器官の形態形成を観察した結果, $cothr4$ 株は野生株と比較し, 顕著な胞子発芽欠損を示した。以上のことから, $CoTHR4$ は病原性と胞子発芽に必要であることが示唆された。

Colletotrichum orbiculare threonine synthase $CoTHR4$ is involved in pathogenesis and conidial germination.

Ken Harata, Tetsuro Okuno

(Dept. Plant Life Science, Ryukoku Univ.)

P-83 (O-13)

***Botrytis cinerea* 病原性低下変異株群の種々の植物種における病原性の比較解析**

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。様々な植物種に対して病原性を示すことが知られている灰色かび病菌 *Botrytis cinerea* は、ジャガイモの産生するリシチン、ベンサミアナの産生するカプシジオール (共にセスキテルペノイド)、ブドウが産生するレスベラトロール (スチルペノイド) など、様々なファイトアレキシンを解毒代謝する。これまでに、プラスミド挿入変異法によりジャガイモへの病原性を失った *B. cinerea* 変異株を 5 株単離している。これらのうち 3 株で、リシチン代謝能が低下し、リシチンに対する感受性が向上したことから、*B. cinerea* のジャガイモへの病原性に重要な役割を担っていることが示された。一方で、5 株すべてでカプシジオールやレスベラトロールの代謝能に異常は認められなかった。この 5 株はベンサミアナ、ブドウ、イチゴへの病原性が低下していたが、変異株と植物種の組み合わせで病原性低下の程度が多様であった。以上の結果から、*B. cinerea* は共通した複数の病原性機構を用いて様々な植物種に感染しているものの、その重要性の程度は宿主によって異なることが示唆された。現在、これら変異株における破壊遺伝子の単離を行っており、その結果についても合わせて報告する。

Characterization of *Botrytis cinerea* mutants which showed reduced pathogenicity to potato.

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

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

P-84

擬似有性生殖により作出した *Epichloae* エンドファイト Hybrid 菌株の染色体構成の解析

三浦里佳¹, 磯部仁美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)

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。不完全菌である *Neotyphodium* 属菌は、*Epichloë* 属菌と比較してゲノムが著しく大きく、*Epichloë* 属菌が 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形成された雑種菌株であると推定されている。これまでに、*Epichloë* 属菌の擬似有性生殖様の現象を観察し、培地上での人工的な Hybrid 菌株の作出に成功している。同じ 2 つの親株から作出した 5 株の Hybrid 菌の CHEF 解析を行なったところ、受け継いでいる染色体の組み合わせが異なり、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。この結果から、Hybrid 菌の形成の過程で染色体のランダムな再編成が起きている可能性が示された。そこで、5 つの Hybrid 株の全ゲノム解析を行い、染色体の再編成について解析したので、その結果について報告する。また、得られた Hybrid 菌のうち Hybrid A 株は両親株由来の染色体をすべて受け継いでいることが明らかになっている。そこで培養および植物へ感染している際の Hybrid A 株の染色体の安定性について評価したので、合わせて報告する。

Characterization of chromosomal composition of hybrid endophyte strains produced via parasexual cycle

Rika Miura¹, Hitomi Isobe¹, Akira Masunaka², Koya Sugawara², Ikuo Sato¹, Sotaro Chiba¹, Kazuhito Kawakita¹, Aiko Tanaka¹ and Daigo Takemoto¹

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

P-85

ウリ類炭疽病菌の F-box 遺伝子 *CoGRR1* は付着器細胞の生存維持に重要である

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

ユビキチン・プロテアソーム経路によるタンパク質分解において、E3 リガーゼによる基質のユビキチン化は重要なプロセスの一つである。SCF 型 E3 リガーゼ複合体においては、F-box タンパク質が基質の特異的認識に決定的な役割を果たす。今回、我々はウリ類炭疽病菌の F-box タンパク質遺伝子 *CoGRR1* の病原性、感染器官形成後の細胞機能の維持への役割を解析した。*CoGRR1* 破壊株はメラニン化した感染器官である付着器を宿主および人工基質上で形成したが、いずれにおいても侵入菌糸形成はほとんど認められず、宿主への病原性を失った。破壊株は有傷接種においては病斑を形成しており、付着器侵入能を失ったものと考えられた。その原因を探る中で、ガラス面上での付着器形成過程における核の挙動をヒストン H1-mCherry 融合遺伝子の導入によって可視化したところ、分生子における核分裂から付着器への 1 娘核の移行、分生子側の娘核のオートファジーによる分解に至る過程の進行が破壊株においても認められた。また、野生株では接種 2 日後でもほとんどの付着器において mCherry が塊状に局在し、核の存在が確認された。一方、破壊株では 8 割前後の付着器において mCherry の細胞全体への拡散、著しい縮小・変形といった異常が観察された。FDA 染色により付着器細胞の生存性を調査したところ、野生株では接種 2 日後の時点でほとんどの付着器が生存していたのに対し、破壊株では生存率が 1/3 程度まで低下することが明らかとなった。現在、破壊株付着器において何らかのプログラム細胞死様の現象が生じている可能性を検討するため、オートファジー遺伝子との二重破壊株の作出を行う等、調査を進めている。

Involvement of the F-box gene *CoGRR1* in the maintenance of vitality of appressorial cells in *Colletotrichum orbiculare*.

Takuya Sumita¹, Kosuke Izumitsu², Chihiro Tanaka¹

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

P-86

全ゲノム解析手法に基づく抗真菌性化合物 Tolnifanide 作用点の解析

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滋賀県大院・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。殺菌剤の研究分野においても、これまで困難であった新規薬剤作用点の迅速な同定も可能になるものと期待される。本研究では、既存剤には見られないユニークな作用を示す抗真菌性化合物 Tolnifanide (TF-991) に注目した。

これまでに、人為的に作出した Tolnifanide 耐性株を対象に全ゲノム解析による同定を行い、Protein Geranylgeranyl transferase (type-I) (GGTase-I) の β サブユニットをコードする遺伝子の 1 アミノ酸変異 (C406Y) が耐性化を引き起こすことを実証した。既存の多くの殺菌剤においては、“薬剤の作用点”にあたる遺伝子の突然変異が耐性化を引き起こすことが知られており、GGTase-I は Tolnifanide の作用点候補と考えられる。

GGTase-I はタンパク質プレニル化修飾の中心的因子であり、標的タンパク質の C 末端の -CaaL (a: 脂質アミノ酸) の配列を認識して修飾を行なうことが知られている。このことから、Tolnifanide はタンパク質プレニル化修飾機構に攪乱を引き起こすと予測した。トウモロコシごま葉枯病菌の全ゲノムからプレニル化修飾を受けると推定されるタンパク質をコードする遺伝子を検索した結果、RHO/CDC42 Family の 6 遺伝子を含む計 10 遺伝子が候補に挙がった。そこで、これらの中から *Rho1* 遺伝子に着目し、*eGFP-BmRho1* 融合遺伝子発現株を作出した。この菌株ではセプタム (隔壁) において緑色蛍光の局在が観察された。一方で、Tolnifanide を作用させるとセプタムでの緑色蛍光の局在が著しく減少し、セプタム形成も阻害されることが明らかとなった。RHO/CDC42 Family はセプタム形成に重要な役割を果たすことが知られており、Tolnifanide はプレニル化修飾を攪乱することでのこれらの局在や機能に変調をもたらしていることが示唆された。

Analysis of the mode of action of Tolnifanide based on whole genome analysis

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

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

P-87

ウリ類炭疽病菌の MOR 経路下流転写因子 *MTF4* は植物シグナル認識を介した付着器形成および病原性に関与する

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)

これまでにウリ類炭疽病菌の NDR(nuclear Dbf2-related)キナーゼ Cbk1, 足場タンパク Pag1 からなる MOR (morphogenesis-related NDR kinase pathway)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, MOR 下流転写因子を同定するために野生株, *pag1Δ*, Cbk1-AS (analog-sensitive) 株を用いてマイクロアレイ解析を行った結果, 野生株と比較して *pag1Δ*, Cbk1-AS 株で下方制御される MOR 下流遺伝子の 95%が植物上特異的に上方制御された植物シグナル応答遺伝子であった。これらの MOR 下流遺伝子群から転写因子をコードすると推定される遺伝子 *MTF1~10* (MOR-related transcription factor)を同定し破壊株を作出した。その結果, *mtf4* 破壊株は *pag1* 破壊株と類似した表現型を示した。次に, *mtf4* 破壊株へ恒常活性型 Cbk1 を導入したところ, 表現型に影響は見られなかった。また, *MTF4* 過剰発現により *pag1* 破壊の表現型が相補された。以上の結果より, *MTF4* は MOR 下流で付着器形成および病原性に寄与することが示唆された。次に, Mtf4-GFP の細胞内局在を観察した結果, キュウリ葉上では付着器形成時の胞子核への局在が見られた一方, スライドガラス上での局在は見られなかった。さらに, Mtf4-GFP の核局在は *pag1Δ*, Cbk1 活性阻害下では観察されなかった。これらの結果から, Mtf4 は植物シグナルにตอบสนองして付着器形成時に MOR 因子依存的に核局在性を示すことが示唆された。以上より, *MTF4* は MOR 経路下流で植物シグナル認識を介した付着器形成および病原性に関与する転写因子であることが示唆された。

The *Colletotrichum orbiculare* *MTF4* is a key transcription factor downstream of MOR essential for plant-derived signal dependent appressorium development

Sayo Kodama¹, Takumi Nishiuchi² and Yasuyuki Kubo¹

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

P-88

ウリ類炭疽病菌のホメオボックス転写因子 *CoHox4* は多様な形態分化および病原性に関与する

小幡善也, 横山綾, 泉津弘佑, 入江俊一, 鈴木一実 (滋賀県大院・環境)

ホメオボックスは動物, 植物, 菌類など様々な生物に保存されている転写因子である。動物や植物では多くの研究が行われており, 形態形成に重要な役割を果たすことが明らかになっている。一方で, 菌類においては解析がほとんど進んでいない。本研究では, ウリ類炭疽病菌が保有する 10 個のホメオボックス遺伝子の内のひとつである *CoHox4* について遺伝子破壊株を作出し, 機能解析を行った。PDA 培地上において, Δ *CoHox4* 株のコロニー直径の減少が観察された。また, Δ *CoHox4* 株は野生株と比較して栄養菌糸の分枝数が多いことが観察された。さらに, Δ *CoHox4* 株により形成される分生胞子は野生株と比べて約 1.4 倍に長くなっていた。この分生胞子は異常な付着器形成を示し, 形態的に正常である付着器の形成率は 10%以下であった。 Δ *CoHox4* 株は宿主キュウリ子葉に対して, 顕著な病原性の低下を示した。以上の結果より, *CoHox4* 遺伝子が栄養菌糸生育, 分生胞子の形態, 付着器形成および病原性に関与することが示唆された。

Homeobox transcription factor *CoHox4* is required for morphogenesis and pathogenicity in *Colletotrichum orbiculare*

Yoshiya Obata, Aya Yokoyama, Kosuke Izumitu, Toshikazu Irie and Kazumi Suzuki

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

P-89

イネいもち病菌における菌糸融合検出系の検討と関連遺伝子の解析

松尾涼平, 前田一行, 桑田茂, 大里修一 (明治大院農)

イネいもち病菌 (*Pyricularia oryzae*) や麴菌 (*Aspergillus oryzae*) などの子囊菌類では, 菌糸融合に続いておこる準有性生殖によって遺伝的多様性を生じることが知られている。イネいもち病菌は無性世代で生活環を完結する植物病原菌であり, 病原性変異の原動力として本菌特有のゲノムの不安定性の他に準有性生殖の関与が考えられる。そこで本菌の準有性生殖プロセスを正確に把握し, 分子レベルで解析することを目的に, まず準有性生殖の第一段階である菌糸融合と続く核融合の検出を試みた。核移行シグナル (NLS) を融合した蛍光タンパク質 (YFP-NLS, mCherry-NLS) の発現ベクターを構築し, それぞれ本菌に導入したところ混合培養した両系統は 2 種類の異なる菌糸として識別することができたが, ヘテロカリオンおよび核融合状態を観察するに至らなかった。当該分野のモデル糸状菌であるアカパンカビ (*Neurospora crassa*) の *SO* と *MAK-2* は, 菌糸融合に関わる主導遺伝子であり, 両遺伝子産物は菌糸融合時に菌糸先端に蓄積することが知られている。そこで, 本菌ゲノムよりホモログを取得し配列を決定した。RT-PCR によって *PoSO* と *PoMAK-2* の発現解析を行ったところ, 培養 24, 48, 60 時間後の菌糸において両遺伝子の発現が確認できた。さらに, 蛍光タンパク質と融合した *PoMAK-2::EGFP* と *PoSO::mCherry* を, 恒常発現プロモーター下で過剰発現して, 菌糸融合能に与える影響を評価するとともに, 両因子の細胞内局在について蛍光観察を行った。現在両遺伝子の欠損変異株を作出し, 表現型や各種ストレスに対する応答など, さらなる機能解析を進めている。

Investigation of cell fusion detection system and analysis of related genes for anastomosis in *Pyricularia oryzae*

Ryohei Matsuo, Kazuyuki Maeda, Shigeru Kuwata, Shuichi Ohsato

(Grad. Sch. Agric., Meiji Univ.)

P-90 (O-14)

Bipolaris maydis におけるジカルボキシミド系殺菌剤耐性に関わる *Dic3* 遺伝子の同定

西行優子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)

ジカルボキシミド殺菌剤 (例えばイプロジオン) は, 広範囲な作用スペクトラムをもち, その作用機構は, 高浸透圧シグナル伝達系の攪乱であると考えられている。作用機構の解明の端緒は, 複数の糸状菌種において本剤耐性株が高浸透圧シグナル伝達系のキー因子であるヒスチジンキナーゼ遺伝子に変異を持つことが明らかとなったことである。さらに, *Bipolaris maydis* の薬剤耐性株からレスポンスレギュレーター *Skn7* 遺伝子の突然変異も見出され, *Skn7* 経路も薬剤作用に寄与していることが明らかとなった。また, 本菌では *Skn7* 経路に関連すると考えられているユニークな薬剤耐性遺伝子 *Dic3* も同定されており, その実体を明らかにすることで本剤作用機構あるいは糸状菌シグナル伝達系のより詳細が明らかにできるものと期待できる。

当研究室では, ゲノム比較手法を用い *Dic3* 遺伝子の分子遺伝学レベル解析を試みた。まず, *Dic3* 突然変異株と野生株を 10 世代にわたり戻し交雑し, その子孫を元に菌株 57-a を作出した。そして, 本株と野生株のゲノムを HiSeq2000 を用いてシーケンスし得られた配列の比較を行った。その結果, 57-a 株特異的な変異として 667 ヶ所の多型が同定され, そのうち 7 ヶ所が ORF 上の変異であった。

今回, 菌株 57-a と野生株の交配による子孫株を用いて, 前述の 7 ヶ所の多型と *Dic3* 薬剤耐性表現型の間での連鎖解析を行った。結果, *S. cerevisiae Prp24* ホモログと考えられる ORF 上の多型が薬剤耐性と連鎖していた。さらに分子遺伝学的手法を用いて本ホモログが *Dic3* であることを証明するため, 野生型遺伝子を *Dic3* 突然変異株の *Alb1* 遺伝子内に挿入し, *Dic3^{mut} Alb1::Dic3^{WT}* パーシャルディプロイド株を作製した。本株の表現型は作出親の *Dic3* とは異なり薬剤感受性を示した。以上の結果, *Dic3* 遺伝子は酵母 *Prp24* ホモログをコードしていることが明らかとなった。また, 野生型アレルが耐性アレルに対して顕性であることも判明した。

Identification of *Dic3* which is involved in dicarboximide fungicides in *Bipolaris maydis*

Yuko Saigyo¹, Hiroshi Yoshida¹, Izumitsu Kosuke², Chihiro Tanaka¹

(¹ Grad. School of Agriculture. Kyoto Univ., ² Uni. of Shiga Pref.)

P-91 (O-15)

チューリップ球根腐敗病菌の病原性関連 *SIX* 遺伝子群の検出

川部眞登¹, 有江力² (¹富山農総セ園研, ²農工大農)

チューリップ球根腐敗病菌は *Fusarium oxysporum* f. sp. *tulipae* によって引き起こされる病害であり, チューリップの立毛中・球根の保存中などに発生する病害である。本病害は, 収量の低下を引き起こし経済的に大きな影響を与えるだけでなく, 輸送・販売時に発病することによる地域ブランド力の低下にも発展しかねない可能性があり, チューリップ球根産地にとって非常に大きな問題となっている。

2014年に富山県で発生した複数のチューリップ球根腐敗病斑より *F. oxysporum* を単離し, rDNA IGS 領域を基にした系統解析を行った結果, 複数の系統が見られた。また, 一部の菌株を用いて, チューリップ球根への付傷接種と実生苗に対する灌漑接種による病原性調査を行い, 病原性を持つ菌株を決定した。病原性を持つ菌株 (Tu:5-1) を用い, 病原性関連 *SIX* 遺伝子群 (*SIX1*~*SIX14*) の PCR による検出を試みた結果, Tu:5-1からは *SIX11* を増幅するプライマーセットでのみ DNA 断片が増幅された。この増幅産物の遺伝子配列を決定したところ, 既報の *SIX11* と高い相同性を示した。チューリップ病斑から単離された *F. oxysporum* f. sp. *tulipae* 含む複数の *F. oxysporum* 菌株から *SIX11* の PCR による増幅を試みたところ, 病原性を持つ菌株からは *SIX11* が増幅されたが, 非病原菌からは増幅されなかった。

Detection of *SIX* genes from *Fusarium oxysporum* f. sp. *tulipae*.

Masato Kawabe¹, Tsutomu Arie²

(¹ Toyama Prefecture Agric. Forestry and Fisheries Res. center, Hort. Research Inst., ² Fac. of Agric., Tokyo Univ. of Agric. and Tech.)

P-92

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, 宿主の防御応答に関与する

長田暢洋¹, 原田賢², 奥野哲郎², 西内巧³, 久保康之¹ (¹京府大・生環, ²龍谷大・農, ³金沢大・学際セ)

アブラナ科炭疽病菌 *Colletotrichum higginsianum* は, 植物細胞の壊死を伴わない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菌である。ウリ類炭疽病菌 *C. orbiculare* においてストレス応答制御因子 *CoWHI2* が活物寄生確立, 病原性に関与することを報告している。今回, 炭疽病菌の感染確立における *WHI2* の機能を解明するため, 活物寄生から死物寄生への移行が明瞭である *C. higginsianum* と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を用いて解析を行った。 Δ *Chwhi2* 株は, 野生株と比較し病原性, 宿主上における侵入菌糸形成率の低下を示した。また, Δ *Chwhi2* 株が植物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。さらに, 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った結果, Δ *Chwhi2* 株接種時における植物防御応答関連遺伝子発現の上方制御が見られた。以上より, *ChWHI2* は病原性, 宿主の防御応答回避に関与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 defense responses.

Nobuhiro Nagata¹, Ken Harata², Tetsuro Okuno², Takumi Nishiuchi³, Yasuyuki Kubo¹

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

P-93

植物病原糸状菌 *Colletotrichum higginsianum* のゲノム変異にトランスポゾンに関与する

津島綾子^{1,2}, Pamela Gan², 熊倉直祐², 鳴坂真理³, 高野義孝⁴, 鳴坂義弘³, 白須賢^{1,2} (¹東大院・理, ²理研・CSRS, ³岡山生物研, ⁴京大院・農)

植物病原体はエフェクターと呼ばれるタンパク質を分泌し、植物細胞をかく乱して感染を促進している。エフェクター遺伝子の多くは病原体-宿主間相互作用の中で正の選択圧を受けており、変異を多く含むゲノム領域に座乗することが明らかにされてきた。我々はモデル植物のシロイヌナズナに感染する病原糸状菌である、*Colletotrichum higginsianum* のゲノム変異を調べることを目的に、比較ゲノム解析を行った。

比較ゲノム解析を行うため、我々は *C. higginsianum* MAFF305635-RFP 株のゲノムを PacBio RSII を用いて解読し、28 コンティグからなる 49.8 Mb のゲノムアセンブリを得た。このゲノムアセンブリと IMI349063 株のゲノムアセンブリ (Zampounis *et al.*, 2016) を用いた比較ゲノム解析により、両者のゲノムには 15kb 以上にわたる大規模なゲノム構造の変異や株特異的なゲノム領域が存在することがわかった。また、それぞれの株に特異的なエフェクター候補遺伝子も見出した。これらのゲノム変異はトランスポゾン様配列の近傍に位置する傾向が見られたため、トランスポゾンを介したゲノムの再編成が、本種の病原性に関わる変異を生み出している可能性が示唆された。本研究は、農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業によって推進された。

Transposable elements contribute to genomic variations in the plant pathogenic fungus *Colletotrichum higginsianum*

Ayako Tsushima^{1,2}, Pamela Gan², Naoyoshi Kumakura², Mari Narusaka³, Yoshitaka Takano⁴, Yoshihiro Narusaka³, Ken Shirasu^{1,2}

(¹Grad. Sch. Sci., Univ. Tokyo, ²CSRS, RIKEN, ³RIBS Okayama, ⁴Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

P-94

トウモロコシごま葉枯病菌におけるエキソサイトーシス関連因子 Exo70 の機能解析

辻健也, 北出雄生, 住田卓也, 吉田裕史, 田中千尋 (京大院・農)

真核細胞は膜に包まれた細胞小器官を多数有しており、細胞小器官間での物質のやり取りは小胞を介して行われる。エキソサイトーシスは小胞輸送の一種であり、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) をモデルとして分子機構の解明が進められている。エキソサイトーシスにおいて重要とされている複合体に exocyst がある。Exocyst は Sec3, Sec5, Sec6, Sec8, Sec10, Sec15, Exo70, Exo84 から成る八量体であり、小胞と膜の融合を仲介し細胞膜と小胞をつなぎとめておく役割を持つ。Exocyst が菌類の形態形成において重要な役割を果たすことが知られているが未解明な点も存在する。

本研究では、トウモロコシごま葉枯病菌 (*Bipolaris maydis*) において酵母 exocyst 構成因子の一つである Exo70 の本菌の形態形成における役割を調査した。まず、相同組換えを利用し Exo70 遺伝子破壊株を作出した。破壊株では菌糸成長速度の低下が見られた。宿主葉を用いた病原性試験では、破壊株において病原性の低下が見られた。野生株との交配試験において、破壊株は偽子嚢殻形成能を有しており、子嚢胞子形成も認められた。しかし、単孢子分離によって得られた子孫株の野生型株と破壊型株は 1:1 に分離しなかった。顕微鏡により子嚢を観察したところ、子嚢胞子形成が異常であり胞子の完全な喪失、あるいは部分的喪失が認められた。以上の結果からエキソサイトーシス関連因子 Exo70 欠損は各種菌での報告同様に菌糸成長および病原性に影響与えることが示され、本菌では有性世代においても関与していることが示唆された。現在、子嚢胞子形成への関与についてはさらなる解析を進めているところである。

Functional analysis of exocytosis-related factor Exo70 in *Bipolaris maydis*.

Kenya Tsuji, Yuki Kitade, Takuya Sumita, Hiroshi Yoshida, Chihiro Tanaka

(Grad. School of Agriculture, Kyoto Univ.)

P-95

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

楠屋陽子¹, 辺彩¹, 萩原大祐¹, 矢口貴志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)

必須金属である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。その一方で、銅の過剰な蓄積は生体にとって有害となるため、その濃度は厳密に制御されている。アスペルギルス症の原因菌である *Aspergillus fumigatus* の宿主への感染においても、宿主内の銅濃度を感知して細胞内の銅濃度を恒常的に維持することが必要となる。我々は、*A. fumigatus* の銅制御機構を解明するために、転写因子 *Afmac1* (Afu1g13190) および *aceA* (Afu6g07780) の機能解析を進めた。*Afmac1* の遺伝子破壊株では、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孢子が観察された。また、*aceA* の遺伝子破壊株は、銅に対して高い感受性を示した。これらの結果から、*Afmac1* が銅の獲得機構を、*aceA* が銅の解毒化機構を制御する転写因子として機能していることが示唆された。現在、これら転写因子の制御を受ける因子を同定するために、RNA-seq 法を用いたトランスクリプトーム解析を進めている。これらのデータを元に、銅代謝制御の全体像と、関連する転写因子の機能について報告したい。

Functional analysis of copper-sensing transcription factors *Afmac1* and *aceA* in *Aspergillus fumigatus*

Yoko Kusuya¹, Cai Bian¹, Daisuke Hagiwara¹, Takashi Yaguchi¹, Hiroki Takahashi^{1,2}

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

P-96

植物由来キチン分解酵素の抗真菌活性における各ドメインの役割

平良東紀 (琉大農・亜熱生資)

植物においてキチン分解酵素 (キチナーゼ) は、真菌細胞壁の主な構成多糖の 1 つであるキチンを分解することによって、真菌の侵入・増殖を抑制する生体防御タンパク質の 1 つであると考えられている。キチナーゼは触媒ドメインの構造に基づき糖質加水分解酵素 family 18 (GH18) と 19 (GH19) に分類され、いくつかのキチナーゼはキチン結合性の糖質結合モジュール (CBM) を有し、ドメイン構成の異なる様々なキチナーゼが存在する。各種植物キチナーゼとその変異体を用いて、抗真菌活性におけるそれぞれのドメインの役割を調べた。GH19 の方が GH18 よりも強い抗真菌活性を示した。塩基性の高い触媒ドメインを持つキチナーゼの方が抗真菌活性が強かった。加水分解活性を消失させた変異体は抗真菌活性を消失した。CBM18 キチン結合ドメインを有する GH19 は、菌糸の先端だけでなく側壁や隔壁に結合・作用するために、菌糸先端にのみ作用する触媒ドメインのみの GH19 よりも抗真菌活性が強いことが示唆された。我々が新たに発見したシダ植物由来キチナーゼは 2 つの CBM50 と 1 つの GH18 キチナーゼが連結した構造を有し比較的強い抗真菌活性を示すが、CBM50 を欠失した変異体では抗真菌活性が消失した。

Roles of domains in antifungal activity of plant chitinase

Toki Taira

(Dept. of Biosci. & Biotechnol., Univ. of Ryukyus)

P-97

トウモロコシごま葉枯病菌の Septin の同定と機能解析

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

トウモロコシごま葉枯病菌はトウモロコシの最重要病原菌の一つである。これまでに本菌の PAK 様キナーゼ Cla4 を同定し, $\Delta cla4$ が病原性や形態形成の低下を示すこと, また, 栄養菌糸で高頻度の先端分裂が生じる点など細胞極性異常を示すことを報告してきた。出芽酵母では, Cla4 が Septin を介して形態形成や細胞分裂などを制御することが明らかとなっている。そこで, 今回我々は, 本菌における Septin の同定ならびに機能解析を試みた。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の Core septin の一つ, Cdc3 のアミノ酸配列を用いた BLAST 解析から, 本菌ゲノム中に 5 つの Septin の存在が推定された。分子系統解析の結果, これらは *Aspergillus nidulans* の AspA, AspB, AspC, AspD, AspE のホモログであると考えられた。AspA, AspB, AspC, AspD は出芽酵母の Core septin, Cdc11, Cdc3, Cdc12, Cdc10 とそれぞれ相同であり, AspE は糸状菌特異的である。各遺伝子の破壊試験の結果, すべての遺伝子破壊株は生存可能であった。 $\Delta aspa$, $\Delta aspb$, $\Delta aspc$, $\Delta aspd$ では菌糸生育能の低下が認められた。ただし, $\Delta cla4$ と比較すると, その影響は軽微であった。一方で, $\Delta aspe$ は野生株同様の生育能を示した。次に, Septin の細胞極性への関与を調査するために, 菌糸先端の経時的観察を行った。その結果, いずれの破壊株においても, $\Delta cla4$ でみられる先端分裂の増加は認められなかった。また, 宿主葉を用いた病原性試験では, $\Delta aspa$, $\Delta aspb$, $\Delta aspc$, $\Delta aspd$ は病原性の低下を示したが, $\Delta aspe$ は野生株同様の病原性を示した。以上より, Cla4 による細胞極性の制御が Septin を介して行われているかは現時点で不明ではあるが, 少なくとも Core septin が菌糸生育や病原性に関与することが明らかとなり, また, 糸状菌特異的 Septin がこれらに関与しない可能性が示唆された。

Identification and characterization of septins in *Bipolaris maydis*

Yuki Kitade¹, Kosuke Izumitsu², Takuya Sumita¹, Chihiro Tanaka¹

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

P-98 (O-16)

イネいもち病菌 RecQ helicase MUSN の DNA 修復機構への関与

木口歌菜¹, 田中寿樹¹, 國吉真史¹, 荒添貴之², 佐久間哲史³, 山本卓³, 桑田茂¹, 大里修一¹ (¹明治大院農, ²東理大院理工, ³広島大院理)

イネいもち病菌の病原性変異は非病原力遺伝子の変異や配列喪失によって生じ, 複雑な DNA 修復機構が関与すると考えられる。本菌ゲノムの不安定性を検証する過程で, 出芽酵母の DNA 修復経路の制御因子である RecQ helicase Sgs1 に着目した。ゲノム情報より Sgs1 ホモログとして MUSN を取得し, 薬剤マーカー置換による MUSN 破壊($\Delta MUSN$)株を作出した。 $\Delta MUSN$ 株の菌糸生育は野生株(WT)と比較して顕著に抑制されたが, 分生子の数や形態, 附着器形成率, 病原性に有意な変化は認められなかった。 $\Delta MUSN$ 株の分生子に対し DNA 損傷薬剤を処理した結果, メチルメタンスルホン酸処理区において高感受性を示した。メラニン生合成経路に関わる Scytalone dehydratase (SDH) 遺伝子を標的とした破壊ベクターと人工ヌクレアーゼ TALENs を $\Delta MUSN$ 株に共導入し, SDH の遺伝子ターゲティング効率から HR 修復能を評価した。SDH 遺伝子の破壊により, 菌叢の白色化が高効率で観察される野生株と比較して, $\Delta MUSN$ 株では白色菌叢の割合が減少した。一方, シングルクロスオーバーによるターゲティング率は増加した。以上から, MUSN は本菌の相同組換え機構の制御因子として, 酵母 Sgs1 と同様の機能を担う可能性が示唆された。現在, 本菌のゲノム不安定性の側面から, DNA 二本鎖切断後の DNA リセクションに関する検出系を用いて $\Delta MUSN$ 株の解析を進めている。

Involvement of *Pyricularia oryzae* RecQ helicase MUSN in DNA repair mechanism

Kana Kiguchi¹, Toshiki Tanaka¹, Masafumi Kuniyoshi¹, Takayuki Arazoe², Tetsushi Sakuma³, Takashi Yamamoto³, Shigeru Kuwata¹, Shuichi Ohsato¹

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

発表者索引

- A*
- Akira Watanabe.....79
- B*
- Bastian Jöhnk.....54
- Berl R. Oakley...34, 60
- C*
- Cai Bian79, 87
- D*
- Daigo Takemoto.....33, 50,
- Daisuke Hagiwara...79
- Dong X. Nguyen.....65
- E*
- Emi Nishisaka65
- G*
- Gerhard H. Braus...33, 50, 55
- H*
- Hee Su Kwon50
- Hiroki Takahashi.....79
- Hung Hiep Huynh...61
- I*
- Ichiro Matsuo.....61
- Ikuro Abe77
- J*
- Jun-ichi Maruyama 33, 50
- K*
- Kaoru Takegawa50
- Katsuhiko Kitamoto33, 50,
- Kouhei Kawaguchi..50
- M*
- Manabu Arioka.....61
- Masahiro Sakamoto 65
- N*
- Nayani Daranagama 72
- NGUYEN LE QUYNH ANH....51
- Nozomi Ishii.....61
- Ö*
- Özgür Bayram...33, 50
- P*
- Pamela Gan61, 86
- T*
- Takashi Kikuma50
- Takayoshi Awakawa 77
- Takehito Nakazawa 65
- Takuya Katayama...33, 50
- Taoning Mo.....33, 50
- Tongxuan Bai.....77
- Y*
- Yoichi Honda65, 72
- Yoko Kusuya.....79
- Yuiro Higuchi.....50
- Z*
- Zhiyang Quan.....77
- あ*
- 浅井禎吾.....70, 76
- 油谷幸代.....69, 72
- 阿部郁朗.....75
- 阿部敬悦...32, 34, 39, 41, 53, 57
- 阿部央行.....33, 51
- 阿部美穂.....41
- 荒井啓.....31, 67
- 荒川弦矢.....31, 68
- 荒添貴之.....37, 55, 88
- 有江力...37, 38, 46, 85
- 有馬寿英.....49
- 淡川孝義.....75
- い*
- 飯嶋紗季.....56
- 石井純.....43
- 石橋僚.....65
- 泉津弘佑...36, 38, 45, 63, 82, 83, 84, 88
- 磯部仁美.....81
- 市川響太郎.....62
- 一瀬桜子.....58, 66
- 一石昭彦.....65
- 伊出健太郎.....43
- 伊藤あやの.....43
- 伊藤英里子.....75
- 稲垣茉莉子.....79
- 井上大志.....66
- 入江俊一.....63, 82, 83
- 岩下和裕.....25, 57
- う*
- 魚川岳登.....41
- え*
- 江口優一.....31, 68
- お*
- 及川英秋.....61
- 王冬梅.....75
- 大里修一...37, 84, 88
- 大島吉輝.....70, 76
- 太田一良...55, 58, 59
- 大西康夫.....47
- 大沼広宜.....63
- 大場歩.....71
- 岡内香奈.....55
- 岡崎裕亮.....70
- 小笠原涉...44, 51, 69,
- 72
- 岡添孝章...33, 51, 77
- 岡拓二...21, 55, 58, 59, 73
- 岡村文音.....79
- 小川真弘.....31, 68
- 荻野千秋.....40, 45
- 荻原淳.....48, 56
- 奥津果優...38, 42, 45
- 奥野哲郎.....80, 85
- 刑部敬史.....69
- 尾崎太郎.....61
- 長田裕之.....74
- 小鹿一.....36, 81
- 小田倉里佳.....75
- 尾上拓哉...55, 58, 59
- 尾上魁.....78
- 小野都.....34, 57
- 小幡公平.....62
- 小幡善也.....83
- か*
- 柿本健一.....52
- 梶河直起.....80
- 柏原宏行.....43
- 加瀬明日香.....40
- 片岡涼輔.....48
- 片桐珠希.....60
- 片山琢也.....56, 57
- 勝山陽平.....47
- 加藤直樹.....74
- 加藤晴朗.....67
- 加藤雅士...35, 63, 70
- 門岡千尋...38, 42, 45
- 金丸京子.....32, 73
- 金子秋穂.....76
- 鎌倉高志.....55
- 神谷昇汰.....79
- 樫野友香.....79
- 河合清.....39, 41
- 川北一人...36, 79, 81

- 川口剛司.....71
川田純毅.....56
川野雄亮.....41
川部眞登.....37, 85
川本進.....71
菅英一郎.....47
- き
- 木口歌菜.....37, 88
菊間隆志.....52
菊松風大.....53
北出雄生.....78, 86, 88
北原雪菜.....69
北村仁見.....78
北村優佳.....64
北本勝ひこ.....52, 56
吉川阿佳里.....54
衣笠清美.....74
木下浩.....78
木村哲哉.....32, 73
木村真.....32, 73
清原昂輝.....41
- く
- 楠屋陽子.....87
朽方康裕.....40
工藤駿斗.....31, 68
國武絵美.....32, 73
國吉真史.....37, 88
久保康之.....80, 83, 85
熊倉直祐.....61, 86
栗原璃子.....40
黒木美沙.....55
黒柳輝彦.....36, 81
桑田茂.....37, 84, 88
- こ
- 糴谷紗季.....35, 63
小嶋涼.....56
小関卓也.....62
小高敦史.....30, 76
小玉紗代.....83
後藤正利.....38, 42, 45,
58, 59, 73
- 小林哲夫.....15, 32, 73
小松健.....38, 46
五味勝也.....31, 35, 39,
41, 47, 58, 62, 64,
66, 67, 71
古明地敬介.....32, 53
小森誠也.....70
古谷野暢.....38, 46
小山泰二.....31, 39, 44,
47, 68
近藤昭彦.....40, 43, 45
- さ
- 西行優子.....36, 84
酒井杏匠.....35, 63
坂本梓.....55
坂本正弘.....63, 72
坂本裕一.....69
佐久間哲史.....37, 88
佐々木克仁.....62
佐藤育男.....36, 79, 81
佐藤魁.....41, 68
佐藤紀恵.....42
佐藤志穂.....69
佐藤直美.....44
佐藤道大.....48
佐藤優哉.....61
佐藤陽子.....35, 64
佐野元昭.....32, 53
佐原弘師.....30, 76
- し
- 塩野義人.....62
志賀友理子.....55
重吉沙衣.....82
志田洋介.....44, 51, 69,
72
篠原靖智.....39, 44
柴田信之.....55, 58, 59
澁谷理恵.....48
志水元亨.....23, 35, 63,
70
白坂憲章.....41, 63, 68
白須賢.....61, 86
- 白柳英俊.....71
新木翔之.....76
新沢祐大.....35, 63
新谷尚弘.....31, 47, 58,
62, 66, 67, 71
新谷智子.....62
進藤齊.....31, 68
- す
- 菅原幸哉.....81
鈴木一実.....82, 83
鈴木健吾.....35, 63
鈴木裕満.....35, 63
鈴木義之.....44, 72
住田卓也.....78, 82, 86,
88
炭谷順一.....71
- せ
- 芹澤知子.....54
全智揚.....75
- た
- 平良東紀.....87
高城景子.....54
高須賀太一.....35, 63
高野義孝.....28, 86
高橋俊二.....74
高橋理.....39, 44
高橋弘喜.....70, 87
高峯和則.....38, 42, 45
高谷直樹.....33, 51, 54,
64, 75, 77
竹内道雄.....60
竹川薫.....49, 52, 53, 59,
73
竹下典男.....18, 33, 51,
54, 64, 75, 77
竹中敦紀.....63
竹本大吾.....36, 79, 81
多田日菜子.....47, 58
田中愛子.....79, 81
田中千尋.....30, 36, 74,
78, 82, 84, 86, 88
- 田中寿樹.....37, 88
田中瑞己.....31, 47, 58,
66, 67, 71
田中大.....55, 58, 59
谷修治.....71
田畑風華.....32, 53
玉置尚徳.....38, 42, 45
玉野孝一.....43
田村具博.....43
- ち
- 千葉壮太郎.....36, 79, 81
千原由莉亜.....58
張斯来.....40
- つ
- 塚田健人.....76
柘植謙爾.....43
辻井雅.....67
辻上誠也.....70
辻健也.....86
堤浩子.....40, 43, 45
恒松雄太.....48
津島綾子.....86
- と
- 渡嘉敷直杏.....46
徳岡昌文.....31, 68
徳永毅.....38, 46
都甲祐介.....59
利田賢次.....46
戸所健彦.....43
外山博英.....46
豊田早紀.....73
- な
- 中沢威人.....63, 69, 72
中島春紫.....40
中筋千晶.....68
長田暢洋.....85
長野晋雄.....71
中野宏軌.....40
中山真由美.....34, 57
鳴坂真理.....86

鳴坂義弘.....86	福田良一.....54	松本守弘.....38, 46	山下美春.....70
に	福間泰之.....34, 57	丸山潤一....47, 52, 56, 57	山田修.....46, 49
西内巧.....83, 85	福家光敏.....38, 46	み	山村愛海.....48
西堀奈穂子.....46, 49	藤井勲.....42, 61	三浦愛.....43	山本卓.....37, 88
仁平卓也.....78	藤井陽平.....56	三浦里佳.....81	山本実侑.....56
の	藤岡智則.....39, 41	水谷治.....46, 49	ゆ
野川俊彦.....74	藤原南帆.....51	溝上豊.....56	湯村直樹.....63
は	二神泰基....38, 42, 45	光澤浩.....56	よ
萩原大祐....34, 57, 70, 71, 87	古川健太郎....34, 57	緑川裕良.....34, 57	横山綾.....83
橋元誠.....42	ほ	南篤志.....61	吉崎由美子.38, 42, 45
橋本美春.....48	穂坂賢.....31, 68	宮川恒.....78, 82	吉田裕史....30, 36, 74, 78, 84, 86
秦洋二...30, 40, 43, 45, 76	堀井雅人.....72	宮澤拳.....32, 53	吉見啓..32, 34, 39, 41, 53, 57
濱田健太.....42	堀内裕之.....54	宮下正弘.....78	吉村緑.....31, 67
林梨咲.....46, 49	堀尾哲也.....34, 60	宮本葵.....42	米田淳一.....38, 46
原爽太郎.....49	堀千明.....35, 63	む	り
原田賢.....85	本田与一.....65	村上直之.....30, 76	李怡.....32, 73
原田賢.....80	ま	村口元.....69	劉成緯.....61
坂東弘樹.....43	前田一行.....84	村田俊輔.....70	る
ひ	前田浩.....67	も	羅伊伊.....70
樋口裕次郎49, 52, 53, 59, 73	前村知佳.....55	森一樹.....69, 72	ろ
平本哲也.....58	榊尾俊介...33, 51, 64, 75, 77	森下陽平.....70	ロバートコックス.43
平山裕一郎.....48	増中章.....81	森法子.....57	わ
ふ	榊谷貴洋.....48	や	若井暁.....40, 45
深田史美.....80	町田雅之....39, 41, 43	八色奈央.....73	渡部昭.....35, 62, 64
福田克治.....43	松江渚.....35, 63	矢口貴志.....87	渡辺賢二.....48
福田泰久....41, 63, 68	松尾花枝.....56	梁瀬惇史.....31, 68	渡邊泰祐....46, 48, 56
	松尾涼平.....84	山形洋平.....60, 67	
	松崎信生.....48	山岸純也.....62	
	松永恵美子.....73	山口滋生.....39, 41	
	松村憲吾.....30, 76		

糸状菌分子生物学研究会 会則

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

以上

補則

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

(平成 28 年 1 月 18 日一部改正)

糸状菌分子生物学研究会運営委員会名簿

会 長

有江 力 東京農工大学大学院 農学研究院

運営委員

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
伊藤 考太郎 キッコーマン株式会社
小笠原 涉 (編集担当) 長岡技術科学大学大学院 生物機能工学専攻
加藤 雅士 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 生物資源産業学部
佐野 元昭 金沢工業大学 ゲノム生物工学研究所
新谷 尚弘 東北大学大学院 農学研究科
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
高野 義孝 京都大学大学院 農学研究科
高谷 直樹 筑波大学大学院 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
山形 洋平 (会計担当) 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
八海醸造株式会社
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
マルコメ株式会社
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