

The 18th Conference on

Fungal Genetics

and

Molecular Biology

第 18 回糸状菌分子生物学コンファレンス

2018 年 11 月 15 - 16 日

シティホールプラザ「アオーレ長岡」

長岡グランドホテル

糸状菌分子生物学研究会

<http://www.biosci.osakafu-u.ac.jp/fmbsj/>

目次

コンファレンスプログラム	2
会場案内図	3
発表演題及び講演時間	6
特別講演要旨	20
シンポジウム講演要旨	22
一般講演要旨	31
ポスター発表講演要旨	41
発表者索引	100
糸状菌分子生物学研究会会則	104
糸状菌分子生物学研究会運営委員名簿	105
糸状菌遺伝子研究会賛助会員	106

第 18 回糸状菌分子生物学コンファレンス

日時：2018年11月15日(木)-16日(金)

会場：シティホールプラザ「アオーレ長岡」、長岡グランドホテル

主催：糸状菌分子生物学研究会

協賛：糸状菌遺伝子研究会

11月15日(木)

11:00 -	受付	(アオーレ長岡(ホワイエ))
12:30 - 12:40	開会の辞	(長岡グランドホテル)
12:40 - 14:40	口頭発表 (O-1~O-10)	(長岡グランドホテル)
14:40 - 15:00	休憩	
15:00 - 16:00	特別講演	(長岡グランドホテル)
16:00 - 16:20	休憩	
16:20 - 17:50	ポスター発表 (奇数)	(アオーレ長岡(ホールB,C))
18:30 - 20:30	懇親会	(長岡グランドホテル)

11月16日(金)

9:00 -	受付	(長岡グランドホテル)
9:30 - 12:00	シンポジウム	(長岡グランドホテル)
12:00 - 13:00	昼食	
13:00 - 14:30	ポスター発表 (偶数)	(アオーレ長岡(ホールB,C))
14:30 - 14:50	休憩	
14:50 - 16:50	口頭発表 (O-11~O-20)	(長岡グランドホテル)
16:50 - 17:05	総会	(長岡グランドホテル)
17:05 - 17:25	表彰式、閉会の辞	(長岡グランドホテル)

発表演題および講演時間

11月15日(木) 15:00 - 16:00

特別講演

[座長: 小林 哲夫 (名古屋大学)]

「麹菌研究 35 年を振り返って
～細胞融合, 遺伝子組換え系開発から遺伝子発現制御機構の解明まで～」

東北大学
五味 勝也

11月16日(金) 9:30 - 12:00

シンポジウム

「醸造から世界へ広がる糸状菌-文化・産業・基礎研究そして研究者」

[座長: 小笠原 渉 (S-1,2,3), 新谷 尚弘 (S-4,5)]

9:30-9:55

S-1 「麴甘酒の成分と機能性, そしてその安全性」

八海醸造株式会社
倉橋 敦

9:55-10:20

S-2 「*Trichoderma reesei*による高効率バイオマス糖化酵素開発」

花王株式会社
五十嵐 一暁

10:20-10:45

S-3 「A Genome Scale Census of Pathogenicity Transcription Factors in the Major Mould Pathogen *Aspergillus fumigatus*」

The University of Manchester
古川 隆紀

10:45-10:50 休憩

10:50-11:25

S-4 「Activation of natural product gene clusters by microbial communication and synthetic biology: New avenues to drug discovery」

Hans Knoell Institute (HKI)
Friedrich Schiller University Jena
Axel A. Brakhage

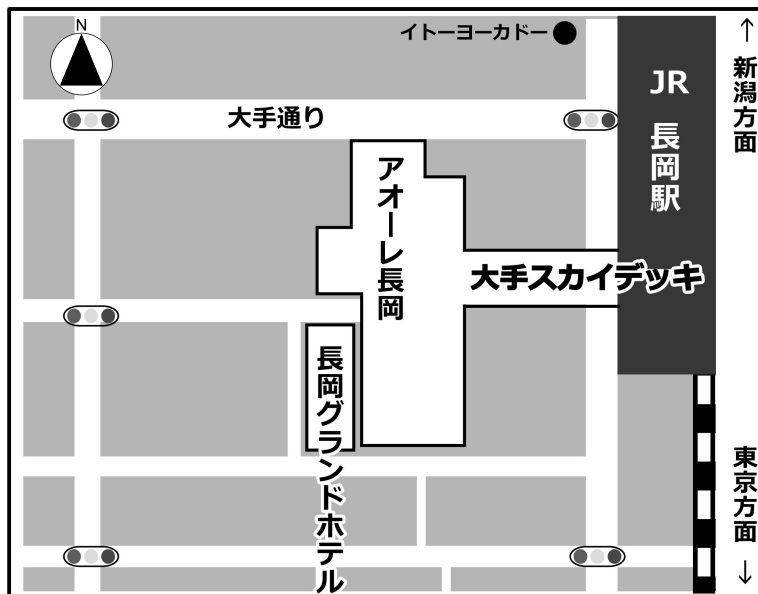
11:25-12:00

S-5 「Regulation of Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus*」

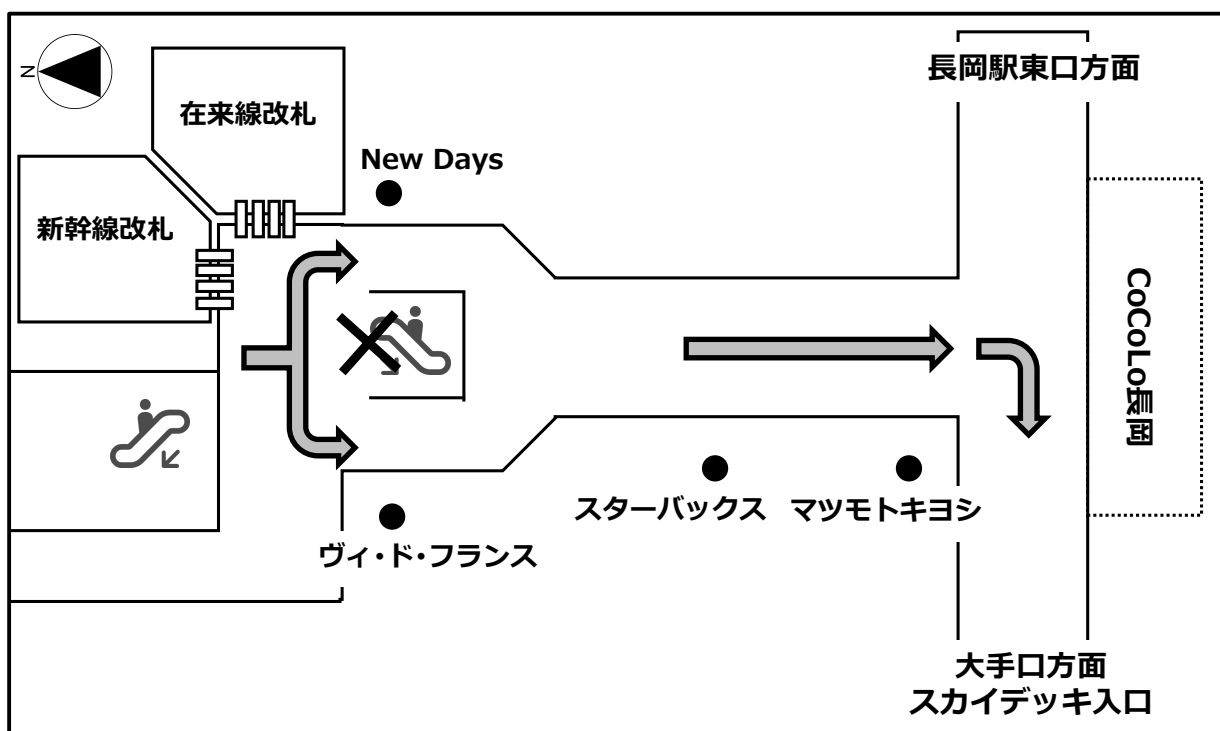
The University of Manchester
Michael Bromley

会場案内図

JR 長岡駅からアオーレ長岡および長岡グランドホテルへは大手スカイデッキ（連絡通路）が便利です（徒歩約3分）。

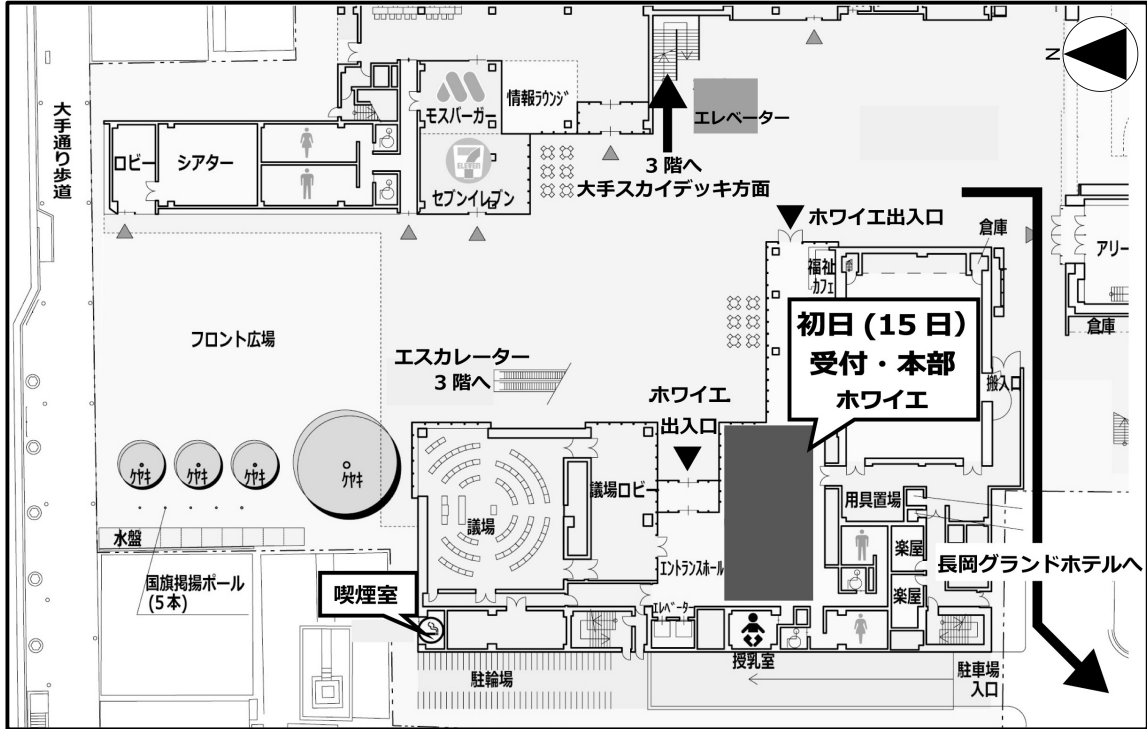


JR 長岡駅は改札口が1箇所です。階段を降りず、大手スカイデッキを利用すればアオーレ長岡3階に接続しています。

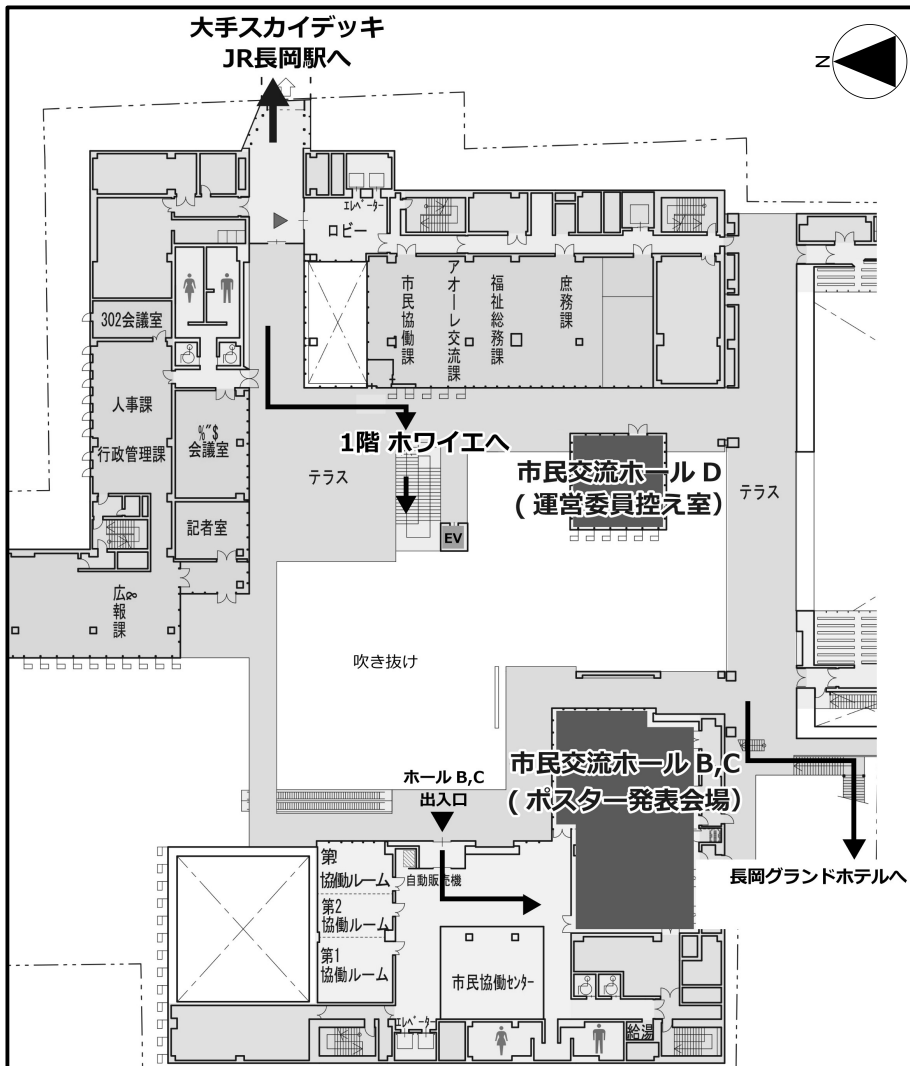


シティホールプラザ「アオーレ長岡」 (新潟県長岡市大手通 1-4-10)

1階

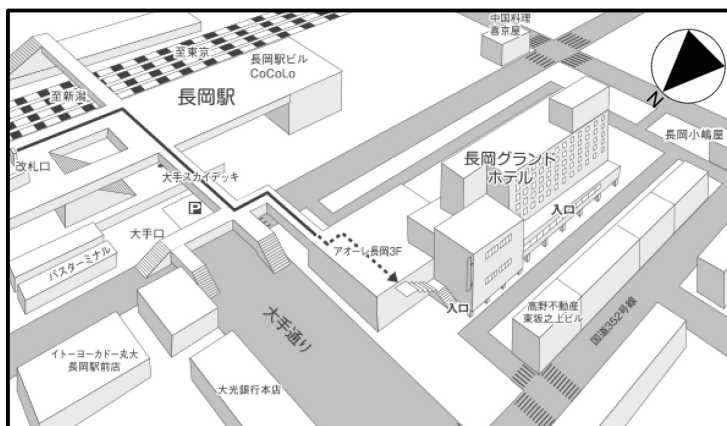


3階

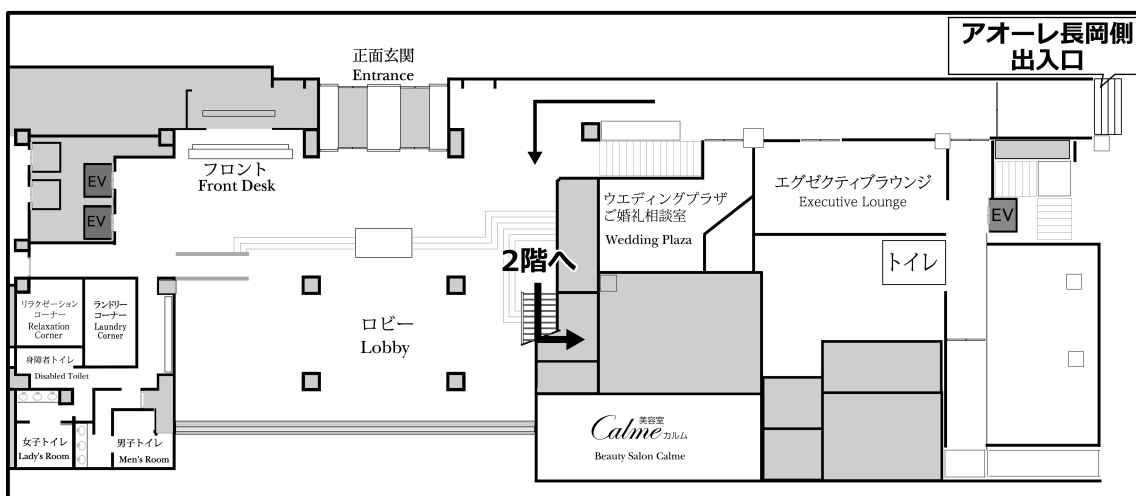


長岡グランドホテル (新潟県長岡市東坂之上町 1-2-1)

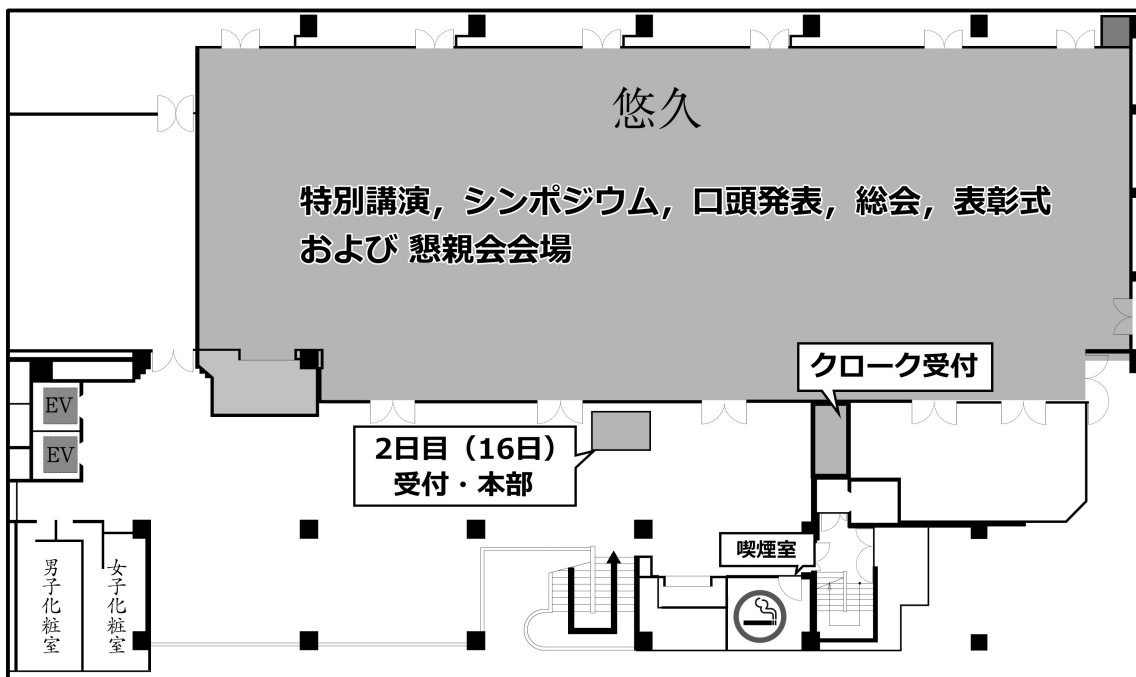
クロークは長岡グランドホテル 2 階にあります。



1 階



2 階



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

[座長: 樋口裕次郎 (O-1,2,3), 浅井禎吾 (O-4,5,6), 國武絵美 (O-7,8), 田中瑞己 (O-9,10)]

- 12:40 O-1 *Aspergillus fumigatus* が産生する真菌型ガラクトマンナンのマンナン主鎖生合成酵素に寄与する2つのマンノース転移酵素の同定
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)
- 12:52 O-2 糸状菌 *Aspergillus nidulans* の細胞壁多糖 α -1,3-グルカンの分子量は細胞壁中の局在と菌糸接着性に影響する
宮澤拳¹, 吉見啓², 山下雄章¹, 小泉亜未¹, 矢野成和³, 笠原紳⁴, 佐野元昭⁵, 阿部敬悦^{1,2}
(¹東北大院農・生物産業創成, ²東北大・未来研, ³山形大院・工, ⁴宮城大・食産業, ⁵金沢工大・ゲノム研)
- 13:04 O-3 菌糸ネットワークを介した糸状菌と細菌の相互作用の解析
久知良桃花¹, Gayan Abeysinghe¹, 榎尾俊介², 萩原大祐², 高谷直樹², 野村暢彦², 尾花望³, 竹下典男² (¹筑波大院・生命環境, ²筑波大・生命環境系, ³筑波大・トランスボーダー医学医療研究センター)
- 13:16 O-4 二次代謝を活性化する糸状菌間相互作用の探索
二宮章洋, 浦山俊一, 萩原大祐 (筑波大・生命環境)
- 13:28 O-5 Fungi 界に広がる多様なリボソームペプチド生合成因子
梅村舞子, Linh viet Dao (産総研・生物プロセス / 生体システムビッグデータ解析ラボ (CBB-D-OIL))
- 13:40 O-6 土壌糸状菌における Alternative oxidase の主要な呼吸系としての役割
宮崎つぐみ, 大泉太於, 中澤奈美, 高橋純子, 榎尾俊介, 高谷直樹 (筑波大・生命環境)
- 13:52 O-7 *Aspergillus oryzae* と *Aspergillus nidulans* のエノラーゼ遺伝子における選択的転写開始点の異なる使用法はそれぞれのグルコース資化様式と適応する
井上大志, 新谷尚弘, 五味勝也 (東北大院・農)
- 14:04 O-8 麹菌の転写因子 F1bC の細胞内局在と翻訳後修飾における解析
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)
- 14:16 O-9 RNA-sequencing による糸状菌の一酸化窒素応答の解析
萩原大祐^{1,2}, 二宮章洋¹, 浦山俊一¹, 高木博史³ (¹筑波大・生命環境, ²千葉大・真菌セ, ³奈良先端大・バイオサイエンス)
- 14:28 O-10 白麹菌 *Aspergillus kawachii* における RNA 結合タンパク質 NrdA の機能解析
門岡千尋¹, 泉津弘佑², 浅井禎吾³, 奥津果優¹, 吉崎由美子¹, 高峯和則¹, 後藤正利⁴, 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東京大院・総合文化, ⁴佐賀大・農)

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

[座長: 大沼広宜 (O-11,12), 小玉紗代 (O-13,14), 吉見啓 (O-15,16), 木下浩 (O-17,18), 山田修 (O-19,20)]

14:50 O-11 麴菌由来界面活性タンパク質 hydrophobin RolA の液中における性質と挙動

西沢知華, 大沢千晶, 田中拓未, 七谷圭, 阿部敬悦 (東北大学院・農・生物産業創成)

15:02 O-12 アミノ酸配列だけではわからない糖質加水分解酵素の機能とそのシナジー

松沢智彦, 矢追克郎 (産総研・生物プロセス)

15:14 O-13 コムギいもち病菌のエンバクに対する非病原性の分子解析

天藤陽香, 東夏希, 足助聡一郎, 土佐幸雄 (神戸大院・農)

15:26 O-14 全ゲノム比較手法に基づく殺菌剤 Tolnifanide 新規作用点の特定

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

15:38 O-15 *TFVI* is preferentially expressed in plant infection phase and is required for full virulence of *Colletotrichum orbiculare* on cucurbit plants

Ru Zhang, Yoshihiro Inoue, Masanori Kaido, Kazuyuki Mise, Yoshitaka Takano (Grad. Sch. Agric.,
Kyoto Univ.)

15:50 O-16 非病原性 *Fusarium oxysporum* W5 ゲノムはコア染色体でない領域を有する

齋藤大幹¹, 浅井秀太^{2,3}, 小寺俊丞⁴, 小松健^{1,4,5}, 有江力^{1,4,5} (¹農工大院・連農, ²JST さきがけ,
³理研 CSRS, ⁴農工大院・農, ⁵農工大・GIR)

16:02 O-17 ゲノム編集による麴菌 *Aspergillus oryzae* の異種二次代謝産物生産系の構築

齋藤直也¹, 片山琢也^{1,2}, 南篤志³, 及川英秋³, 丸山潤一^{1,2} (¹東大院・農生科・応生工,
²東大・CRIIM, ³北大院・理)

16:14 O-18 黄麴菌 *Aspergillus oryzae* における Cdc48 オルソログの有用物質生産性への関与

菊松風大, 竹川薫, 樋口裕次郎 (九大院・生資環・生命機能)

16:26 O-19 黄麴菌 *Aspergillus oryzae* における糖鎖欠損型分泌糖タンパク質生産

李秋実, 竹川薫, 樋口裕次郎 (九大院・生資環)

16:38 O-20 セルラーゼ高生産糸状菌 *Trichoderma reesei* における推定トランセプター Crt1 の局在解析

北原雪菜¹, 吉澤和将², 谷口大樹², 古川隆紀², 志田洋介², 大隅正子³, 小笠原涉^{1,2} (¹長岡技科大院・技学イノベーション, ²長岡技科大院・生物, ³総合画像研究支援)

ポスター発表 11月15日(木) 16:20 – 17:50 (奇数番号)

11月16日(金) 13:00 – 14:30 (偶数番号)

- P-1 酵母におけるミトコンドリアオートファジーの負の制御機構**
古川健太郎, 神吉智丈 (新潟大院・医歯)
- P-2 イネいもち病菌におけるキチン脱アセチル化酵素を介した細胞分化誘導**
黒木美沙, 志賀友理子, 前村知佳, 荒添貴之, 鎌倉高志 (東理大・応用生物)
- P-3 近接する麹菌コロニーが示す成長拒否反応の観察**
浜中祐弥¹, 原佑介², 黒田裕樹^{1,2} (¹慶應大・環境情報, ²慶應大・政メ)
- P-4 *uvs-4* 変異がマイトファジーおよび細胞壁合成に与える影響**
齊藤智恵子, 木村さつき, 田中秀逸, 畠山晋 (埼玉大院・理工研)
- P-5 アカパンカビの短寿命抑圧変異株の取得**
鈴木千春エレーナ, 齊藤智恵子, 田中秀逸, 畠山晋 (埼玉大・理工研)
- P-6 A Pezizomycotina-specific gelsolin-like protein regulates growth and septum formation**
M. Abdulla Al Mamun¹, Takuya Katayama^{1,2}, Jun-ichi Maruyama^{1,2} (¹Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, ²CRIM, The Univ. of Tokyo)
- P-7 麹菌 *Aspergillus oryzae* の不和合性における HET ドメイン遺伝子の機能解析**
森法子¹, 片山琢也¹, 齊藤亮太², 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-8 糸状菌 *Aspergillus nidulans* の細胞壁多糖 α -1,3-グルカンの分子量は細胞壁中の局在と菌糸接着性に影響する**
宮澤拳¹, 吉見啓², 山下雄章¹, 小泉亜未¹, 矢野成和³, 笠原紳⁴, 佐野元昭⁵, 阿部敬悦^{1,2} (¹東北大院農・生物産業創成, ²東北大・未来研, ³山形大院・工, ⁴宮城大・食産業, ⁵金沢工大・ゲノム研)
- P-9 マイクロ流体デバイスを用いた糸状菌の菌糸の屈性と可塑性の解析**
福田紗弓¹, 島宗悠太郎², 芹澤知子¹, 横川雅俊², Andrew Utada¹, 柳沢直樹³, 高谷直樹¹, 佐藤良勝³, 竹下典男¹ (¹筑波大・生命環境, ²数理物質系, ³名古屋大・ITbM)
- P-10 糸状菌の先端生長におけるカルシウム情報伝達経路**
芹澤知子, 榎尾俊介, 別役重之, 高谷直樹, 竹下典男 (筑波大・生命環境)
- P-11 イネいもち病菌におけるクロラムフェニコールの作用点の探索**
田代綾子, 野坂亮仁, 樋口絵莉香, 荒添貴之, 鎌倉高志 (東理大院理工・応生)

- P-12** 麹菌 *Aspergillus oryzae* 菌糸完全分散変異株の5 Lジャー型発酵槽を用いた酵素生産性評価
古明地敬介¹, 宮澤拳¹, 吉見啓², 市川暉³, 佐野元昭⁴, 阿部敬悦^{1,2} (東北大院農・生物産業創成,
²東北大・未来研, ³東北大・農学部, ⁴金沢工大・ゲノム研)
- P-13** 代謝シフトと ROS 生成による *Bipolaris maydis* の栄養生長抑制ならびに分生子形成促進
吉田裕史, 田中千尋 (京大院・農)
- P-14** 米麹におけるコウジカビの破精込みの蛍光イメージング解析
安井瑞稀¹, 高谷直樹¹, 丸山潤一², 竹下典男¹ (¹筑波大・生命環境系, ²東京大・応生工)
- P-15** *Aspergillus fumigatus* が産生する真菌型ガラクトマンナンシマンナンのマンナン主鎖生合成酵素に寄与する2つのマンノース転移酵素の同定
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-16** 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) の解析
湯浅晶¹, 三谷隆宏¹, 菊間隆志², 吉田稔^{1,3,4}, 有岡学^{1,3} (¹東大院・農生科, ²立命館大・生命科,
³東大・微生物連携機構, ⁴理研)
- P-17** 糸状菌の真菌型ガラクトマンナン生合成に関与する新規ガラクトフラノース転移酵素の同定の試み
守田湧貴¹, 尾上拓哉², 太田一良¹, 岡拓二¹ (¹崇城大・生物生命, ²崇城大院・工)
- P-18** 菌糸ネットワークを介した糸状菌と細菌の相互作用の解析
久知良桃花¹, Gayan Abeysinghe¹, 榊尾俊介², 萩原大祐², 高谷直樹², 野村暢彦², 尾花望³, 竹下典男² (¹筑波大院・生命環境, ²筑波大・生命環境系, ³筑波大・トランスボーダー医学医療研究センター)
- P-19** 新規なガラクトフラノース転移酵素活性測定法を用いた GfsA および GfsC の機能解析
千原由莉亜, 尾上拓哉, 太田一良, 岡拓二 (崇城大院・工)
- P-20** オートファジーの誘導条件から見た担子菌 *Coprinopsis cinerea* の子実体形成の解析
今村友紀, 小川直紀, 麻田恭彦, 渡邊彰 (香川大・農)
- P-21** アミノ酸配列だけではわからない糖質加水分解酵素の機能とそのシナジー
松沢智彦, 矢追克郎 (産総研・生物プロセス)
- P-22** ゲノムマイニングによって新たに見出した麹菌のキシラナーゼ(XynB)の酵素学的諸性質
渡部昭, 小幡公平, 笹嶋由佳, 氏家成隆, 新谷尚弘, 五味勝也 (東北大院農・生物産業創成)
- P-23** 各種キシナーゼの糸状菌に対する植物生体防御機構における役割
平良東紀¹, 大沼貴之² (¹琉大・農, ²近畿大・農)

- P-24 麹菌の酸性ホスファターゼ A 遺伝子の破壊および高発現が醤油醸造に及ぼす影響**
 安田 (吉野) 庄子, 小野奈津子, 長谷川撰, 間野博信 (あいち産科技総セ・食工技セ)
- P-25 *Aspergillus oryzae* によるタンナーゼの高発現とその酵素学的諸性質**
 市川響太郎¹, 塩野義人¹, 新谷智子², 渡部昭², 神崎浩³, 五味勝也², 小関卓也¹ (¹山形大・農,
²東北大院・農, ³岡山大院・環境生命)
- P-26 担子菌ヒラタケにおける *vp2*, *vp3* の破壊が, リグニン分解および他のリグニン分解酵素の転写発現に及ぼす影響**
 坂知奈美¹, 中沢威人¹, 山田美紗登², 西村裕志², 竹中敦紀¹, 渡辺隆司², 坂本正弘¹, 本田与一¹
 (¹京大院・農, ²京大・生存研)
- P-27 白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* 由来のシトクロム P450 CYP505D6 の基質特異性に重要なアミノ酸残基の特定**
 ワイズ里沙, 酒井杏匠, 志水元亨, 加藤雅士 (名城大院・農)
- P-28 *Aspergillus luchuensis* 由来フェノール酸脱炭酸酵素の諸性質および誘導物質の探索**
 眞榮田麻友美¹, 渡嘉敷正司², 渡嘉敷みどり², 上地敬子³, 平良東紀^{1,3} (¹鹿大院・連農, ²石川種
 麴店, ³琉大・亜熱生資)
- P-29 麹菌由来界面活性タンパク質 hydrophobin RoLA の液中における性質と挙動**
 西沢知華, 大沢千晶, 田中拓未, 七谷圭, 阿部敬悦 (東北大学院・農・生物産業創成)
- P-30 マツタケゲノム上に存在する GH7, Cellobiohydrolase と相同性を示す遺伝子の機能解析**
 大沼広宜, 福田泰久, 白坂憲章 (近畿大・農)
- P-31 糸状菌分泌ペルオキシダーゼの探索と解析**
 北村優佳, 榊尾俊介, 竹下典男, 高谷直樹 (筑波大・生命環境)
- P-32 麹菌のオリゴペプチドトランスポーターの同定とその遺伝子発現様式の解析**
 田中瑞己¹, 伊藤圭祐¹, 河原崎泰昌¹, 五味勝也² (¹静岡県大・食栄, ²東北大院・農)
- P-33 RNA-sequencing による糸状菌の一酸化窒素応答の解析**
 萩原大祐^{1,2}, 二宮章洋¹, 浦山俊一¹, 高木博史³ (¹筑波大・生命環境, ²千葉大・真菌セ, ³奈良先
 端大・バイオサイエンス)
- P-34 青色光によるウシグソヒトヨタケの子実体発生誘導に関わる遺伝子の解析**
 坂本裕一¹, 佐藤志穂¹, 中沢威人², 村口元³, 石井一夫⁴, 刑部敬史⁵ (¹岩手生工研, ²京大院・農,
³秋田県立大, ⁴久留米大, ⁵徳島大)

- P-35 麴菌の二次代謝系遺伝子の転写制御の迅速な解析
町田雅之, 石井智子, 佐野元昭 (金沢工業大学・ゲノム研)
- P-36 *Trichoderma reesei* の新規糖質加水分解酵素発現制御因子の同定
鈴木義之¹, 佐藤直美¹, 内山拓², 尾崎克也², 小林良則², 掛下大視³, 五十嵐一暁³, 田代康介⁴, 森一樹⁵, 油谷幸代⁵, 志田洋介¹, 小笠原渉¹ (長岡技科大院・技学イノベーション,²JBA,³花王,⁴九大院・農,⁵産総研)
- P-37 担子菌ヒラタケにおける多様なリグニン分解不全変異株の比較トランスクリプトーム解析
竹中敦紀, 中沢威人, 呉紅麗, 小寺里奈, 森本亮太, 坂本正弘, 本田与一 (京大院・農)
- P-38 *Aspergillus oryzae* と *Aspergillus nidulans* のエノラーゼ遺伝子における選択的転写開始点の異なる使用法はそれぞれのグルコース資化様式と適応する
井上大志, 新谷尚弘, 五味勝也 (東北大院・農)
- P-39 ヒラタケのミトコンドリア DNA 変異体についての RNA sequencing 解析
太田早紀子^{1,2}, 三浦千裕¹, 奥田康仁³, 上中弘典¹, 松本晃幸¹ (鳥取大・農,²九大院・生資環,³(一財)日本きのこセンター・菌蕈研)
- P-40 白麴菌 *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii* における Sirtuin D の機能解析
宮本葵¹, 門岡千尋¹, 奥津果優¹, 吉崎由美子¹, 高峯和則¹, 後藤正利², 玉置尚徳¹, 二神泰基¹
(¹鹿児島大・農,²佐賀大・農)
- P-41 白麴菌 *Aspergillus kawachii* における RNA 結合タンパク質 NrdA の機能解析
門岡千尋¹, 泉津弘佑², 浅井禎吾³, 奥津果優¹, 吉崎由美子¹, 高峯和則¹, 後藤正利⁴, 玉置尚徳¹, 二神泰基¹ (鹿児島大・農,²滋賀県立大・環境科学,³東京大院・総合文化,⁴佐賀大・農)
- P-42 アカパンカビのミトコンドリア電子伝達系複合体 I 変異株の QoI 感受性と *aod-1* 発現解析
堀内愛実, 高橋辰乃介, 田邊貴啓, 藤村真 (東洋大・生命)
- P-43 黄麴菌 *Aspergillus oryzae* における *pepO* 遺伝子の cis-element の探索
佐々木克仁, 久下貴紀, 山崎周平, 前田浩, 山形洋平 (東京農工大院・応生化)
- P-44 糸状菌 *Aspergillus nidulans* におけるマンナナーゼ解酵素遺伝子群の転写因子 ManS の DNA 結合特性
玉城彰悟¹, 李諾¹, 國武絵美², 金丸京子¹, 木村真¹, 小林哲夫¹ (名大院生命農学・応用生命,²三重大院生物資源・生物圏生命)
- P-45 黄麴菌における汎用性高発現プロモーター
片山周平¹, 張斯来², 若井暁², 堤浩子³, 秦洋二³, 荻野千秋¹, 近藤昭彦² (神戸大院・工,²神戸大院・イノベ,³月桂冠・総研)

- P-46** *Trichoderma reesei* における窒素源応答調節因子の機能解析
岡山大地, 平沢大樹, 志田洋介, 小笠原渉 (長岡技科大院・生物)
- P-47** *Aspergillus aculeatus* SepM のセルラーゼ誘導生産と cell wall integrity 経路への関与
澤田和美, 津村亮輔, 谷修治, 炭谷順一, 川口剛司 (阪府大院・生環科)
- P-48** *Aspergillus aculeatus* の塩ストレス応答における SrpkF の遺伝学的解析
小林夏実, 片山椋平, 谷修治, 炭谷順一, 川口剛司 (阪府大院・生環科)
- P-49** 黄麹菌 *Aspergillus oryzae* におけるペプチダーゼ遺伝子の転写に窒素源が与える影響
白石敦土, 前田浩, 山形洋平 (東京農工大院・応用生)
- P-50** 麹菌の転写因子 F1bC の細胞内局在と翻訳後修飾における解析
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-51** 黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* における 2 種類の α -アミラーゼの発現制御機構解析
橋本渉¹, 荒井啓¹, 水谷治², 山田修³, 新谷尚弘¹, 五味勝也¹ (¹東北大院・農, ²琉球大・農, ³酒総研)
- P-52** トウモロコシごま葉枯病菌 (*Bipolaris maydis*) の多面的変異株 UD10 のポリオキシシン耐性メカニズム
 解明
陳帯娣, 二神加奈恵, 田中千尋 (京大院・農)
- P-53** 二次代謝を活性化する糸状菌間相互作用の探索
二宮章洋, 浦山俊一, 萩原大祐 (筑波大・生命環境)
- P-54** 乳酸生産麹菌のピルビン酸ミトコンドリアキャリアタンパク質欠損における代謝変動
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-55** デカリン合成酵素遺伝子置換による非天然型天然物誘導体の創出
加藤直樹, 野川俊彦, 衣笠清美, 長田裕之, 高橋俊二 (理研 CSRS)
- P-56** 菌寄生菌 *Dicyma pulvinata* と麹菌 *Aspergillus oryzae* が分泌する sporogen-AO1 の生合成遺伝子クラスターの構造と機能
西大海¹, 須志田浩稔¹, 東佑実子¹, 中川博之^{2,3}, 飯田祐一郎¹ (農研機構・野花研¹, 農研機構・食品研², 農研機構・高度解析センター³)
- P-57** Fungi 界に広がる多様なリボソームペプチド生合成因子
梅村舞子, Linh viet Dao (産総研・生物プロセス / 生体システムビッグデータ解析ラボ (CBBB-OIL))

- P-58 糸状菌脂肪族マクロライド化合物のポストゲノム型天然物探索
森下陽平, 浅井禎吾 (東大院・総合文化)
- P-59 Pyrrolizilactone の生合成機構の解析
廣澤早香^{1,2}, 加藤直樹¹, 衣笠清美¹, 高橋俊二¹, 長田裕之^{1,2} (理研・CSRS, ² 埼大院・理工)
- P-60 *Aspergillus fischeri* ジテルペノイドピロン生合成遺伝子クラスターの機能解析
新木翔之¹, 塚田健人^{1,2}, 浅井禎吾¹ (東大院・総合文化, ² 東北大院・薬)
- P-61 糸状菌未利用 Type III PKS クラスターに着目するポストゲノム型天然物探索
金子秋穂, 浅井禎吾 (東大院・総合文化)
- P-62 白麹菌 *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii* の推定クエン酸輸送体 CitT の機能解析
中村恵理¹, 門岡千尋¹, 奥津果優¹, 吉崎由美子¹, 高峯和則¹, 後藤正利², 玉置尚徳¹, 二神泰基¹
(¹ 鹿児島大・農, ² 佐賀大・農)
- P-63 麹菌異種発現系を用いた *Aspergillus* 属由来の新規マクロライドの探索
伊藤芽衣^{1,2}, 森下陽平¹, 清水公德², 浅井禎吾¹ (東大院・総合文化, ² 東理大・生物工)
- P-64 ウリ炭疽病菌の特異なポリケタイド合成酵素遺伝子クラスターの生合成産物の解明
岡崎裕亮, 浅井禎吾 (東大院・総合文化)
- P-65 *Aspergillus nidulans* の sirtuin アイソザイムは一次代謝及び二次代謝を制御する
小田倉里佳, 伊藤英里子, 竹下典男, 梶尾俊介, 高谷直樹 (筑波大・生命環境)
- P-66 土壌糸状菌における Alternative oxidase の主要な呼吸系としての役割
宮崎つぐみ, 大泉太於, 中澤奈美, 高橋純子, 梶尾俊介, 高谷直樹 (筑波大・生命環境)
- P-67 ポリオキシシン耐性株のアントラキノン類合成に関与する遺伝子の同定と発現解析
陳帯娣, 竹山さわな, 十一浩典, 宮下正弘, 宮川恒, 田中千尋 (京大院・農)
- P-68 ウリ類炭疽病菌の病原性因子 CoNpc2 は細胞内ステロール輸送と付着器貫穿に関与する
梶河直起, 小玉紗代, 深田史美, 久保康之 (京府大院・生環)
- P-69 *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², 矢口貴志¹, 高橋弘喜^{1,3} (千葉大・真菌センター, ² 筑波大・生命環境系, ³ 千葉大・分子キラリティー研究センター)
- P-70 炭疽病菌に対するシロイヌナズナの付着器侵入抵抗性と表皮葉緑体の動的変化
入枝泰樹^{1,2}, 高野義孝³, 塩見大輔² (信大・学術院農, ² 立教大・理, ³ 京大院・農)

- P-71 比較ゲノム・トランスクリプトーム解析によるウリ類炭疽病菌の強病原性関連因子の探索**
井上喜博¹, Pamela Gan², 白須賢², 鳴坂義弘³, 高野義孝¹ (¹京大院・農, ²理研 CSRS, ³岡山生物研)
- P-72 植物病原糸状菌における細胞外分泌多糖ガラクトサミノガラクトサンの機能解析**
吉見啓¹, 泉津弘佑², 宮澤拳³, 鈴木一実², 阿部敬悦^{1,3} (¹東北大・NICHe, ²滋賀県大院・環境, ³東北大院農・生物産業創成)
- P-73 コムギいもち病菌のエンバクに対する非病原性の分子解析**
天藤陽香, 東夏希, 足助聡一郎, 土佐幸雄 (神戸大院・農)
- P-74 Investigation of the *in vivo* evolution of *Aspergillus fumigatus***
Cai Bian¹, Yoko Kusuya¹, Daisuke Hagiwara², Akira Watanabe¹, Hiroki Takahashi^{1,3} (¹MMRC, Chiba Univ., ²Life Env. Sci., Tsukuba Univ., ³MCRC, Chiba Univ)
- P-75 *TFVI* is preferentially expressed in plant infection phase and is required for full virulence of *Colletotrichum orbiculare* on cucurbit plants**
Ru Zhang, Yoshihiro Inoue, Masanori Kaido, Kazuyuki Mise, Yoshitaka Takano (Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)
- P-76 ウリ類炭疽病菌の Lipid Phosphate Phosphatase 遺伝子 *CoPAP2* の機能解析**
榎谷美衣奈, 竹山さわな, 豊田裕実, 小玉紗代, 久保康之 (京都府立大・生命環境)
- P-77 ウリ類炭疽病菌の宿主特異性に関する研究：アルファルファ炭疽病菌との比較解析**
小川泰生¹, 井上喜博¹, Pamela Gan², 海道真典¹, 三瀬和之¹, 鳴坂義弘³, 白須賢², 高野義孝¹
(¹京大院・農, ²理研 CSRS, ³岡山生物研)
- P-78 LysM ドメイン多連結体および LysM ドメイン多連結体融合キチナーゼの抗真菌活性**
高島智也^{1,2}, 上地敬子², 平良東紀^{1,2} (¹鹿大院・連農, ²琉大・農)
- P-79 イネ科植物に感染する *Epichloë* 属菌の異種間での菌糸融合の観察および擬似有性生殖による Hybrid 菌株の作出**
三浦里佳, 磯部仁美, 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-80 コスモス炭疽病菌の付着器を介した植物侵入にメラニン化は必須ではない**
武末和穂¹, 入枝泰樹² (¹信大・農, ²信大・大学院農)
- P-81 イネいもち病菌の RNA サイレンシング関連遺伝子の MoCV1-A 感染への影響**
高野翔¹, 木口歌菜², 高崎恵利花³, 有江力¹, 森山裕充¹, 大里修一^{2,3}, 小松健¹ (¹農工大院・農, ²明治大院・農, ³明治大・農)

- P-82** 非病原性 *Fusarium oxysporum* W5 ゲノムはコア染色体でない領域を有する
 齊藤大幹¹, 浅井秀太^{2,3}, 小寺俊丞⁴, 小松健^{1,4,5}, 有江力^{1,4,5} (¹農工大院・連農, ²JST さきがけ, ³理研 CSRS, ⁴農工大院・農, ⁵農工大・GIR)
- P-83** 全ゲノム比較手法に基づく殺菌剤 Tolnifanide 新規作用点の特定
 重吉沙衣¹, 入江俊一¹, 鈴木一実¹, 宮川恒², 田中千尋², 泉津弘佑¹ (¹滋賀県大院・環境, ²京大院・農)
- P-84** トマト葉かび病菌のベンズイミダゾール剤と SDHI 剤に対する耐性変異の同定とパイロシーケンス法による診断系の構築
 佐竹諒子¹, 渡辺秀樹², 藤村真¹ (¹東洋大院・生命科 ²岐阜農技セ)
- P-85** 外生菌根菌ホンシメジにおける 2 種の MAP kinase の遺伝子破壊および機能解析
 前田和穂¹, 松永有佳理¹, 広瀬優樹¹, 重吉沙衣¹, 田中千尋², 入江俊一¹, 鈴木一実¹, 泉津弘佑¹
 (¹滋賀県大院, ²京大院・農)
- P-86** トウモロコシごま葉枯病菌における NADPH オキシダーゼ遺伝子群の機能解析
 竹村綾乃, 奥谷芙季, 入江俊一, 鈴木一実, 泉津弘佑 (滋賀県立大院・環境)
- P-87** イネ科植物の共生糸状菌 *Epichloë festucae* の細胞融合と共生確立に関与する RasB 活性化因子 Cdc25 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・農)
- P-88** 灰色かび病菌 *Botrytis cinerea* が植物由来の抗菌物質の解毒時に発現する遺伝子群の RNAseq 解析
 黒柳輝彦¹, 小鹿一¹, 鈴木孝征², 佐藤育男¹, 千葉壮太郎¹, 川北一人¹, 竹本大吾¹ (¹名大院・生農, ²中部大・応生)
- P-89** トウモロコシごま葉枯病菌の子嚢胞子形成における 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-90** エンドウ萎凋病菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* が持つピサチン脱メチル化酵素遺伝子とその周辺領域のゲノム解析
 小寺俊丞¹, 浅井秀太^{2,3}, 齊藤大幹⁴, 小松健^{1,4,5}, 有江力^{1,4,5} (¹農工大院・農, ²JST さきがけ, ³理研 CSRS, ⁴農工大院・連農, ⁵農工大・GIR)
- P-91** *Cre-loxP* を利用した糸状菌からの標的遺伝子領域クローニング法
 木下浩, Nguyen Nhu Ha Vy, 仁平卓也, 木谷茂 (阪大・生物学国際交流セ)

- P-92** カーボンカタボライト抑制関連遺伝子破壊株を用いた米麴の特性
村上直之, 小高敦史, 松村憲吾, 秦洋二 (月桂冠・総研)
- P-93** 新規糸状菌細胞壁溶解酵素剤の開発
木田真理衣¹, 山田浩之¹, 坪井宏和¹, 幸田明生¹, 矢野成和², 坊垣隆之¹ (¹大関・総研, ²山形大院・工)
- P-94** *Aspergillus niger* における亜リン酸脱水素酵素の形質転換用マーカーとしての使用
明星裕美, 各務清美, 榎理恵, 寺本寛, 松井知子 (ノボザイムズ ジャパン (株))
- P-95** ゲノム編集を用いた麴菌実用株の褐変性に寄与するチロシナーゼ遺伝子の同定
片山琢也^{1,2}, 白石洋平³, 和久豊³, 丸山潤一^{1,2} (¹東大院・農生科・応生工, ²東大・CRIIM, ³ビオック)
- P-96** 黒麴菌糖質分解酵素高生産変異株の取得法と芋焼酎醸造特性について
富本和也¹, 柿菌ダララット², 韓錦順², 長船行雄², 向井伸彦² (¹酒総研・醸造微生物, ²酒総研・醸造技術)
- P-97** マルチコピー遺伝子導入黄麴菌のゲノム構造解析
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-98** 新規麴菌ポリケタイドの同定と生合成経路の解析
菅英一郎^{1,2}, 勝山陽平^{1,3}, 丸山潤一^{1,3}, 小山泰二², 大西康夫^{1,3} (¹東大院・農生科・応生工, ²野田産研, ³東大・微生物連携機構)
- P-99** ナノポアシーケンサーを用いた麴菌 *Aspergillus oryzae* RIB40 のゲノム配列決定
西澤明人¹, 弓場一輝², 織田健³, 齊藤亮太³, 岩下和裕^{2,3}, 上村泰央¹ (¹株式会社ジーンベイ, ²広大先端研, ³酒類総合研究所)
- P-100** 麴菌の不飽和化酵素遺伝子の過剰発現化による遊離ジホモ- γ -リノレン酸の生産向上
玉野孝一^{1,2}, 伊藤あやの³, 安中優太³, 三浦愛¹, 菅英一郎⁴, 小山泰二⁴, 田村具博^{1,2} (¹産総研・生物プロセス研究部門, ²産総研・CBBDOIL, ³北海道ハイテク専門学校, ⁴野田産業科学研究所)
- P-101** 黒麴菌 *Aspergillus luchuensis* の全ゲノム情報を用いた比較解析
塚原正俊¹, 阿部峻之¹, 東春奈¹, 外山博英², 水谷治², 山田修³ (¹(株)バイオジェット, ²琉球大・農, ³酒類総合研究所)

- P-102 セルフクローニングによるバイオマス分解酵素高生産麹菌の造成**
笹嶋由佳, 太田夏野子, 新谷智子, 渡部昭, 新谷尚弘, 五味勝也 (東北大・農・遺伝子情報システム学)
- P-103 黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* における 1-octen-3-ol 生合成遺伝子 *ppo* の解析**
片岡涼輔¹, 植松千暁², 長谷川泰子², 水谷治^{3,4}, 山田修⁴, 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, 3琉大農・亜熱生資, 4酒総研)
- P-104 Phleomycin 耐性を指標にした黒麹菌 *ΔagsE* の形質転換**
渡嘉敷直杏¹, 水谷治^{1,2}, 山田修³, 外山博英^{1,2} (1鹿児島連大・農, 2琉球大院・農, 3酒総研)
- P-105 *Paenibacillus alginolyticus* 由来 α-1,3-グルカナナーゼの担子菌類プロトプラスト形成への影響**
佐藤魁¹, 鍋谷海², 福田泰久¹, 白坂憲章¹ (1近大院・農応生化, 2近大・農応生化)
- P-106 白色腐朽菌ヒラタケにおける *gat1* 遺伝子変異は, 優性的にリグニン分解活性を低下させる**
森本亮太, 中沢威人, 小寺里奈, 坂本正弘, 本田与一 (京大院・農)
- P-107 ゲノム編集による麹菌 *Aspergillus oryzae* の異種二次代謝産物生産系の構築**
齋藤直也¹, 片山琢也^{1,2}, 南篤志³, 及川英秋³, 丸山潤一^{1,2} (1東大院・農生科・応生工, 2東大・CRIIM, 3北大院・理)
- P-108 セルラーゼ高生産糸状菌 *Trichoderma reesei* における推定トランセプター-Crt1 の局在解析**
北原雪菜¹, 吉澤和将², 谷口大樹², 古川隆紀², 志田洋介², 大隅正子³, 小笠原涉^{1,2} (1長岡技科大院・技学イノベーション, 2長岡技科大院・生物, 3総合画像研究支援)
- P-109 黄麹菌 *Aspergillus oryzae* における Cdc48 オルソログの有用物質生産性への関与**
菊松風大, 竹川薫, 樋口裕次郎 (九大院・生資環・生命機能)
- P-110 黄麹菌 *Aspergillus oryzae* における糖鎖欠損型分泌糖タンパク質生産**
李秋実, 竹川薫, 樋口裕次郎 (九大院・生資環)
- P-111 黄麹菌 *Aspergillus oryzae* における有用物質生産に関与する 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-112 *Aspergillus itaconicus* の *cad* 遺伝子の同定と白麹菌のイタコン酸生産能の獲得**
野中咲希¹, 久保真紀¹, 二神泰基², 高下秀春³, 小林元太¹, 後藤正利¹ (1佐賀大・農, 2鹿児島大・農, 3三和酒類(株))

P-113 担子菌ヒラタケにおける *xyn10* 及び *xyn11* ファミリーの破壊が、稲わらの細胞壁構成成分の分解に及ぼす影響の解析

湯村直樹, 中沢威人, 呉紅麗, 坂本正弘, 本田与一 (京大院・農)

P-114 麹菌 hydrophobin RolA-cutinase CutL1 間の相互作用における RolA N 末端側領域の寄与

佐藤一¹, 田中拓未¹, 寺内裕貴¹, 高橋徹², 七谷圭¹, 吉見啓², 阿部敬悦^{1,2} (¹東北大院・農・生物産業創成, ²東北大・未来研)

P-115 米糠を用いた(2*S*)-3-(2-selenoxo-2,3-dihydro-1*H*-imidazol-4-yl)-2-(trimethyl-azaniumyl)propanoate の合成

湯山珠莉, 石川雄樹, 大島敏明 (東京海洋大院・食機能)

P-116 CRISPR/Cas9 系を用いたイネいもち病菌における標的遺伝子ノックダウン法の確立

平岡輪子, 林平, 荒添貴之, 鎌倉高志 (東理大院理工・応生科)

P-117 *Aspergillus oryzae* 由来のヒドロフォービン HypD の超親水性 C 末端領域の機能解析

天貝拓海¹, 寺島可那子², 関公一郎², 石倉幹大¹, 中野宏軌¹, 中島春紫^{1,2} (¹明治大院・農・農化, ²明治大・農・農化)

Special Lecture

麴菌研究 35 年を振り返って

～細胞融合，遺伝子組換え系開発から遺伝子発現制御機構の解明まで～

五味 勝也

(東北大学大学院農学研究科)

糸状菌分子生物学コンファレンスの実行委員長の小笠原先生から特別講演を頼まれてどのような話をして良いのか頭を悩ましたのですが，来年の3月末で大学を定年退職することでもありますし，麴菌における分子生物学的な研究を始めてから30年以上経過したこともあり，私が麴菌の研究を開始した当時のこと（細胞融合・遺伝子組換え系の開発）から，ライフワークとまで言えるほどではないですが，遺伝子組換え系を利用した麴菌のデンプン分解酵素生産制御機構の解析についてお話して責任を果たせられればと思います。

コンファレンスに参加されている方には今さら説明する必要はないと思いますが，麴菌はご存知のように，古くからわが国で清酒や醤油・味噌の製造に利用され，私たちの食生活にはなくてはならない重要な微生物です。私たちとの付き合いは優に1000年を超え，このことから「国菌」と呼んでも良いのではないかとさえ言われています。ところで，麴菌の清酒製造における最も重要な働きはデンプン分解酵素（ α -アミラーゼ，グルコアミラーゼ， α -グルコシダーゼ）の供給源となることです。麴菌は米麴製造中にこれらのデンプン分解酵素を高分泌生産しますが，その生産はデンプンやマルトースなどのマルトオリゴ糖で誘導され，グルコースの存在下では抑制されることが古くから知られていました。麴菌の生産する α -アミラーゼ（タカアミラーゼA）については，1894年に高峰讓吉が世界初の酵素製剤として商品化したタカジアスターゼの主成分であり，その後わが国の研究者たちによりタンパク質化学的に解析され，結晶のX線解析による立体構造の解明や全アミノ酸配列の決定など，わが国の酵素学研究的発展の礎にもなった重要な酵素ですが，遺伝子レベルの研究は麴菌の遺伝子組換え系の誕生まで待たなければなりませんでした。

私は麴菌の有用菌株の育種や α -アミラーゼなどのデンプン分解酵素の生産制御機構の解明を目指し，1985年頃に最も基盤ともなる遺伝子組換え系の開発に着手しました。その当時は麴菌の仲間であるアカパンカビや *Aspergillus nidulans* における遺伝子組換えの報告が数報発表されたばかりであり，方法論があまりはっきりしなかったのですが，それまでに蓄積のあった酵母の遺伝子組換え系に関する研究を参考にして，何とか効率の良い形質転換系を開発することができました。私はそれ以前に麴菌の細胞融合の研究を行っていて満足のいくような成果を出すことができなかったのですが，この時に習得していた栄養要求性変異株の取得法やプロトプラスト調製法と再生法などが遺伝子組換え系開発に大きく役立ちました。また，わが国はカビの産業では世界一だと思いますが，私たちが麴菌の遺伝子組換え系を開発するまでこのような試みをされる研究者がほとんどいなかったのも驚きでした。何事においても重要ではあるが難しいこともあって誰も行っていなかったことにチャレンジすることは重要なことと思います。その後，この遺伝子組換え系を活用してデンプン分解酵素遺伝子の発現制御機構の解析を進めることができました。

以上のような昔話を中心になって参加者の方々にはあまりお役に立たないかもしれませんが，私の思い出話にお付き合いいただければ幸いです。

ご略歴

- 1976年3月 東京大学農学部農芸化学科卒業
- 1978年3月 東京大学大学院農学系研究科農芸化学専攻修士課程修了
- 1978年4月 東京国税局鑑定官室（国税庁醸造試験所併任）
- 1982年7月 国税庁醸造試験所研究員
- 1992年7月～1993年1月 科学技術庁中期在外派遣研究員（英国シェフィールド大学）
- 1993年7月 生物系特定産業技術研究推進機構融資課長
- 1995年7月 国税庁醸造研究所主任研究員
- 1997年4月 広島大学大学院工学研究科助教授（併任）
- 1998年4月 東北大学大学院農学研究科教授（ - 現在）

Symposium

S-1

麴甘酒の成分と機能性，そしてその安全性

倉橋 敦

(八海醸造株式会社)

1. はじめに

麴菌を穀物に生育させることで作る「麴」は，アルコール飲料である清酒，焼酎，調味料として欠かせない味醂，醤油，味噌，食酢，そして漬物まで日本の食事には無くてはならない存在である。この麴を使った最もシンプルな食品が，日本の伝統甘味飲料の甘酒である。甘酒は，麴（または麴と米）から造られる「麴甘酒」と酒粕から造られる「酒粕甘酒」の2種類に大別される。古くから愛飲されてきたのは麴甘酒であり，古墳時代から飲用されてきたとされる¹⁾。江戸時代には，現在とほぼ同じ製法で造られており，和漢三才図会²⁾には「硬（かた）造り」と呼ばれる製法³⁾が記載され，これは現在でいう濃縮タイプである。ストレートタイプは「軟（なん）造り」と呼ばれ，硬造りに比べて麴歩合が低い。また，麴だけで造られるタイプを「早（はや）造り」と呼ぶ。これは，米を使うタイプに比べて文字通り出来上がる時間が早いからである。このように一言に甘酒といっても，実は多くのタイプが存在している。

さて，しばらくその味が忘れられていた感のある麴甘酒であるが，2011年頃に起きた塩麴ブームに端を発する麴の魅力の再認識から2015年に甘酒ブームが起きた。2012年頃の甘酒市場は約50億円であったが，現在では200億円の市場を形成するまでになっている。特に，アルコールが含まれず，砂糖を使わない麴甘酒の売り上げが急伸した。この背景には，やはり「健康・機能性」への期待が大きくあると考えている。しかしながら，謳われている効果・効能については，原料である「米麴」や「米」から類推されるものや全く根拠のないものまでである。弊社は，このような状況を大変憂慮しており，お客様に正しい情報を発信していくべく研究を行っている。

2. 麴甘酒の成分

麴甘酒の研究は，日本の伝統飲料であるのにもかかわらず大変少なく，成分の分析についても含有糖類⁴⁾やアミノ酸⁵⁾，有機酸⁶⁾での報告例がある程度であった。そこで，麴甘酒中に含まれる成分の網羅的検出を目指してメタボローム解析を実施した。その結果，350以上の物質を検出することが出来た⁷⁾。グルコースを主成分としてアミノ酸，ビタミンB群を含むため，麴甘酒は「飲む点滴」と比喻されることがあるが，点滴成分と比較するとTPN輸液（高濃度のグルコースを含み，消化器疾患などで長期間にわたって経口摂取が出来ない時に使用される）に近い成分組成であることが判った。特徴的な成分としてはオリゴ糖が挙げられ，12種類以上ものオリゴ糖が含まれることを明らかにした。その他にも，高い抗酸化能が注目されているエルゴチオネインやグルコシルセラミド⁸⁾などが含まれる。

3. 麴甘酒の機能性

弊社にはお客様からのお声として「お通じの改善」や「肌質の改善」などが多く寄せられ

る。そのひとつひとつについて、効果効能の真贋を検証している。その中でも便秘改善には明らかな効果があることが分かってきた。水分の摂取制限があることから便秘になりがちで下剤が処方されている透析患者に麴甘酒を飲用してもらったところ、飲用3ヶ月で75%の方で下剤が不要になった⁹⁾。飲用を中止すると下剤の服用率が元に戻ることから、継続的な飲用が効果発揮に重要であることも明らかとなった¹⁰⁾。この便秘改善効果は、便秘気味な健常成人でも同様に確認できた¹¹⁾。現在のところ、機能性関与成分の同定には至っていないが、成分分析と機能性解析を両輪として進めることで解明していきたい。

4. 麴甘酒の安全性

成分・機能性が明らかになっていく中で、麴甘酒の安全性に関するお問い合わせも多くなってきている。特に、麴甘酒はグルコースが主成分であるため、体重の増加や血糖値への影響を気にされる方は多い。

そこで、弊社では過剰摂取試験をはじめとする安全性試験についても取り組んでいる。過剰摂取試験は、空腹時血糖が正常高値もしくは境界域の方に麴甘酒118gを1日あたり3本、4週間連続飲用していただき、飲用前、飲用2週後、飲用4週後、飲用期間を終えた非飲用2週後の観察を行った¹²⁾。その結果、本試験に起因する有害な事象は一切認められず、体重、体脂肪率、BMIについて有意な変動はなかった。糖代謝指標である血糖値・グリコアルブミン(GA)・HbA1cについて、血糖値は飲用前の血糖値が高めの集団であるが有意な変動はなく、GAについては一過性に基準範囲内での軽微な増加が認められたのみであった。HbA1cは、飲用前と比較して飲用4週後で有意な増加があったものの、過剰摂取時における基準値内変動は許容できるものと判断できた。このように、健常な方において弊社の麴甘酒118gを1日1本お飲みいただくことは何ら健康に問題ないことを明らかにできたが、より安心してお飲みいただけるように安全性の試験を引き続き行っていく。

5. おわりに

弊社は、麴甘酒についての歴史や文化、含有成分、機能性、そして安全性に至るまで全ての情報をお客様にお届けし、豊かな食生活に寄与していきたいと考えている。このような取り組みを通じて甘酒を一過性のブームとして終わらせることなく、麴甘酒を伝統的甘味飲料として次世代に継承していくべく努力していきたい。さらには、世界へこの素晴らしい飲料を広めていきたい。

参考文献

- 1: 村上英也編著, 麴学, 日本醸造協会 (1986).
- 2: 寺島良案, 和漢三才図会 (現代語訳), 18巻, 平凡社 (1991).
- 3: 北本勝ひこ代表編集, 食と微生物の辞典, 朝倉書店 (2017).
- 4: Aso, K *et al.*, *Tohoku J. Agric. Res.*, 13, 257 (1962).
- 5: 四方ら, 醬研, 3, 105 (1977).
- 6: 築山ら, 醬研, 3, 205 (1977).
- 7: Oguro, Y *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.*, 124, 178 (2017).
- 8: Hamajima, H *et al.*, *SpringerPlus*, 5, 1321 (2016).
- 9: 第62回透析医学会学術集会抄録集, O-0314 (2017).
- 10: 第63回透析医学会学術集会抄録集, O-1401 (2018).
- 11: 日本食品科学工学会第65回大会講演集, 2Ep4 (2018).

12: 第70回日本生物工学会大会講演要旨集, 2Cp11 (2018).

Ingredients, functionality, and safety of *koji amazake*

Atsushi Kurahashi

(Hakkaisan CO., Ltd)

ご略歴

2004年 3月	静岡県立大学大学院 生活健康科学研究科修了
2004年 4月	株式会社雪国まいたけ入社
2009年 10月	東京家政大学委託研究員（-平成23年3月）
2012年 8月	同社主任研究員
2013年 4月	同社主務研究員
2013年 7月	東京家政大学客員研究員（-平成26年3月）
2014年 3月	東京家政大学大学院にて論文により学位取得（学術）
2014年 9月	八海醸造株式会社入社
2016年 4月	同社研究開発室長（-現在）

Trichoderma reesei による高効率バイオマス糖化酵素開発

五十嵐一暁

(花王株式会社 生物科学研究所)

非可食バイオマスからの第二世代エタノールやバイオリファイナリーの検討が世界的に進められているが、現在、その普及は足踏み状態と思われる。原料、前処理、糖化、発酵、後処理等、それぞれの製造過程にまだ多くの課題が残されており、特に糖化過程において、高性能で安価な酵素の供給が求められている。糸状菌 *Trichoderma reesei* は糖化酵素を菌体外に多量に分泌することから、糖化酵素の生産宿主として広く研究されてきた。我々は、NEDOprj「バイオマスイエネルギー製造の有用要素技術開発事業／バイオ燃料事業化に向けた革新的糖化酵素工業生産菌の創製と糖化酵素の生産技術開発」に参画し、糖化酵素の高機能化、工業用生産菌の構築、安価な大量生産技術の開発の3つについて検討を進めてきた。

(1) 糖化酵素の高機能化

サトウキビバガスは、ブラジル、インド、中国、タイなど世界中で賦存量が多い未利用資源である。しかしながら、バガスは、地域、種類、収穫時期、保存など、また酸処理やアルカリ処理などの前処理によってもその分解性が異なり、安定した糖化が困難な原料である。我々はアルカリ処理バガスを主な基質として、より高効率な糖化酵素開発を実施した。*T. reesei* の酵素製剤に対して相乗効果を示す酵素の探索及び改変を実施し、数々の候補酵素のなかで、*Penicillium* 属由来の新規キシラナーゼ F-1364¹⁾ が糖化を大きく促進することを見出した。本キシラナーゼは GH10 に属する新規酵素であり、C 末端側にセルロース吸着ドメイン CBM1 を有していた。酵素糖化には CBM1 を介したセルロースへの吸着が重要であり、アルカリ処理バガスのセルロース表面に存在するキシランを分解することによって、他のセルラーゼのアクセスを良好にし、糖化を促進しているものと思われた。

(2) 糖化酵素の工業用生産菌の構築

より高生産可能な変異株の取得を目指し、イオンビームを変異原として、高濃度グルコース存在下においてセルラーゼが生産可能な変異株を得た。本株のゲノム変異点解析の結果、Sre1 (コレステロール合成制御因子) の破壊がグルコースの消費及び生育に関与していることが明らかとなった。取得した変異株に対し *Aspergillus aculeatus* 由来 β -グルコシダーゼおよび上記キシラナーゼ F-1364 等を導入し、工業用生産菌を創製した。

(3) 糖化酵素の安価な大量生産技術の開発

培養検討によって、酵素生産性を 1.5 倍以上向上させることで生産目標を達成した。工業化への条件検討をラボスケールからパイロットスケール及び実機相当培養槽での生産を実施し、スケールアップに成功した。

引用文献

1: Shibata N., Suetsugu M., Kakeshita H., Igarashi K., Hagihara H., and Takimura Y., *Biotechnology for Biofuel*, 10, 278 (2017)

Development of Saccharifying Enzymes produced by *Trichoderma reesei*.

Kazuaki Igarashi

(Kao Corp. Biological Sci. Res.)

ご略歴

1988年 北里大学 薬学部 薬学研究科修了

1988年 花王株式会社 入社

2000年 岐阜大学大学院連合農学研究科 学位 農学博士

2011年 花王株式会社 生物科学研究所 上席主任研究員 グループリーダー

2018年 花王株式会社 生物科学研究所 主席研究員 グループリーダー

A Genome Scale Census of Pathogenicity Transcription Factors in the Major Mould Pathogen *Aspergillus fumigatus*

Takanori Furukawa, Norman van Rhijn, Panos Papastamoulis, Fabio Gsaller,
Magnus Rattray, Paul Bowyer, Michael Bromley, Elaine Bignell

Manchester Fungal Infection Group, Division of Infection, Immunity, and Respiratory Medicine, the University of Manchester, Manchester, M13 9NT, UK

Aspergillus fumigatus is, globally, the most important airborne fungal pathogen of humans that causes over 90% of all aspergillus related infections. However, our ability to diagnose and treat such infections remains critically challenged by a lack of molecular insight into the processes involved in pathogenesis of the fungus. It has been demonstrated that the virulence of *A. fumigatus* is multifactorial and several virulence-determining factors have been identified. Particularly, the ability of the fungus to respond to various host-imposed stresses has repeatedly been proven to be essential for pathogenicity. Our group has shown that *A. fumigatus* coordinately regulates transcription of multiple adaptation mechanisms to address the challenges posed by the mammalian host environment (1, 2), and therefore transcriptional regulation plays a critical role in establishing infection. However, amongst a genomic repertoire of transcription factors, only a few of them have been directly implicated in the pathogenicity of *A. fumigatus*.

We have carried out systematic phenotyping of a transcription factor knockout (TFKO) collection of *A. fumigatus* to define the genomic cohort of transcription factors required for pathogenicity. We have developed a liquid culture based high-throughput phenotyping pipeline and evaluated relative growth fitness of 484 TFKO mutants under various host-imposed stress conditions. Our study discovered a cohort of *A. fumigatus* transcription factors including the heterotrimeric CCAAT-binding complex (CBC) that govern responses to significant host-imposed stresses. In order to obtain further insight into the involvement of the CBC in the pathogenicity of *A. fumigatus*, we have investigated the role of this regulatory complex in global gene regulation. By applying a combination of chromatin immunoprecipitation sequencing (ChIP-seq) and RNA-seq analysis, we have revealed genome-wide binding profile of the CBC and identified the genes which are directly regulated by this complex. Importantly, our results suggest that the CBC acts as one of the master regulators of the transcription factors in *A. fumigatus*, affecting the transcription of many downstream target genes involved in highly diverse pathways.

References

- 1: McDonagh A, Fedorova N D, Crabtree J, Yu Y, Kim S, Chen D, Loss O, Cairns T, Goldman G, Armstrong-James D, Haynes K, Haas H, Schrettl M, May G, Nierman W C, Bignell E (2008). Sub-telomere directed gene expression during initiation of invasive aspergillosis. PLoS Pathog, 4: e1000154
- 2: Bertuzzi M, Schrettl M, Alcazar-Fuoli L, Cairns T C, Munoz A, Walker L A, Herbst S, Safari M, Cheverton A

M, Chen D, Liu H, Saijo S, Fedorova N D, Armstrong-James D, Munro C A, Read N D, Filler S G, Espeso E A, Nierman W C, Haas H, Bignell E M (2014). The pH-responsive PacC transcription factor of *Aspergillus fumigatus* governs epithelial entry and tissue invasion during pulmonary aspergillosis. *PLoS Pathog*, 10: e1004413

Activation of natural product gene clusters by microbial communication and synthetic biology: New avenues to drug discovery

Axel A. Brakhage

Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology (HKI) and Friedrich Schiller University Jena, Jena, Germany; email: axel.brakhage@hki-jena.de

Filamentous fungi produce numerous high-value natural products (NPs). The biosynthesis genes for NPs are normally clustered in the genome. Many of the gene clusters are silent under standard laboratory conditions and thus their products remain unknown. We found that some NP gene clusters in the fungus *Aspergillus nidulans* are activated by distinct bacteria, *i.e.*, *Streptomyces rapamycinicus* and its close relative *S. iranensis*. The bacteria are able to reprogram the fungal chromatin modification machinery leading to the activation of distinct NP gene clusters. Genome-wide chromatin immunoprecipitation (ChIP)-seq analyses uncovered the unique chromatin landscape in *A. nidulans* upon co-cultivation with the bacterium *S. rapamycinicus*. Deduced mechanistic studies identified the Myb-like transcription factor BasR as regulatory node for bacteria-triggered induction of NP gene clusters. The presence of *basR* in other fungal species allowed forecasting the inducibility of *ors*-like gene clusters by *S. rapamycinicus* in these fungi, and thus their effective interaction with activation of otherwise silent gene clusters with formation of potential infochemicals. In future, it might be possible to predict which microorganisms talk to each other based on their genetic inventory.

We also developed synthetic biology tools allowing the efficient expression of gene clusters. As an example, I will discuss recent work on the insecticidal meroterpenoids designated austinoids. We determined their biosynthesis in the fungus *Aspergillus calidoustus*. The genes involved in the biosynthesis of later austinoid products were characterized including an unusual noninteractive polyketide synthase. Its derived diketide product was loaded onto the austinoid backbone resulting in a new insecticidal derivative, calidodehydroaustin. By advanced targeted combinatorial engineering using polycistronic expression of selected genes, we rewired the austinoid pathway in *A. nidulans*, which then produced compounds of interest under industrially favored conditions. Our work shows that comparative analysis of genomes can be used not only to discover new gene clusters, but unearth the hidden potential of known metabolic pathways.

PNAS 2011; *Nature Rev Microbiol* 2013; *ACS Synth Biol* 2017; *ACS Chem Biol* 2017; *Curr Op Microbiol* 2018

Regulation of Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus*

Michael Bromley

Manchester Fungal Infection Group, Division of Infection, Immunity and Respiratory Medicine, School of Biological Sciences, Faculty of Biology, Medicine and Health, University of Manchester, Manchester Academic Health Science Centre, Core Technology Facility, Manchester, United Kingdom

Aspergillus fumigatus is the most important airborne mould pathogen and allergen worldwide. Estimates suggest that over 3 million people have invasive or chronic infections that lead to in excess of 600,000 deaths every year. Very few drugs are available to treat the various forms of aspergillosis and we rely predominantly on the azole class of agents. Resistance to the azoles is emerging. For individuals that are infected with a resistant isolate the mortality rate exceeds 80%. Therapy failure is in part attributed to delays in administering alternative therapies so methods to rapidly detect resistance are critical. While resistance in around 50% of clinical isolates has been linked to modification of the gene encoding the target of the azoles, *cyp51A*, our understanding of what leads to resistance in the remaining strains is lacking. We have undertaken a programme of work to identify transcriptional and post transcriptional regulators of azole resistance. We have discovered a cohort of transcription factors and kinases including the CCAAT-binding complex, Negative Cofactor 2 and Ssn3 that modulate azole tolerability. With a view to understanding which genes are directly regulated by these transcription factors, we have performed genome-wide protein-DNA interaction analysis using ChIP-seq. We have identified that these transcription factors bind the promoters of genes known to be associated with azole tolerance including *cyp51A* the drug transporter *cdr1B*. Our Chip-seq data provides evidence to suggest that these regulators bind the promoters of many genes however do not always modulate their expression. We are currently exploring the role of Ssn3 and a number of other kinases in the regulation of azole resistance.

Oral Session

O-1 (P-15)

Aspergillus fumigatus が産生する真菌型ガラクトマンナンのマンナン主鎖生合成酵素に寄与する 2 つのマンノース転移酵素の同定

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)

肺アスペルギルス症を引き起こす *Aspergillus fumigatus* の細胞壁に含まれ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糖鎖である。FTGM は、細胞壁の最表層に局在することから宿主への感染機構や宿主の免疫機構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マンノース (Man) 糖転移酵素の同定と機能解析を目的とした。まず、5 種の推定 α -1,2-Man 転移酵素遺伝子の破壊株を構築したところ、*cmsA*, *cmsB* と名付けた 2 種類の遺伝子の破壊株において著しい菌糸伸長の抑制、分子形成能の低下、異常な菌糸形態が観察された。そこで、 $\Delta cmsA$ 株および $\Delta cmsB$ 株より FTGM を抽出して ¹H-NMR 解析を行ったところ、マンナン主鎖が失われていることが明らかになった。次に、組換え CmsA による pNP-Man に対する Man 転移反応を検出したところ、酵素反応産物 A が生成した。酵素反応産物 A は、特異的 α -1,2-マンノシダーゼで消化された。また、CmsA は α -(1→2)-マンノビオース(M2)よりも α -(1→6)-M2 に対して、31 倍高い比活性を有していた。以上のことから、CmsA および CmsB は共にマンナン主鎖生合成に寄与し、特に CmsA は、マンナン主鎖構造中の α -(1→6)-M2 の非還元末端側の α -(1→2)-Man 残基を転移する酵素であることが明らかになった。

Identification of two mannosyltransferases contributing to biosynthesis of the fungal-type galactomannan α -core-mannan structure 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.)

O-2 (P-8)

糸状菌 *Aspergillus nidulans* の細胞壁多糖 α -1,3-グルカンの分子量は細胞壁中の局在と菌糸接着性に影響する

宮澤拳¹, 吉見啓², 山下雄章¹, 小泉亜未¹, 矢野成和³, 笠原紳⁴, 佐野元昭⁵, 阿部敬悦^{1,2} (¹東北大院農・生物産業創成, ²東北大・未来研, ³山形大院・工, ⁴宮城大・食産業, ⁵金沢工大・ゲノム研)

α -1,3-グルカン (AG) は糸状菌の主要な細胞壁多糖の一つである。我々は以前、モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* の二種の AG 合成酵素 (AGS) 遺伝子の機能解析を行い、AgsB が主要な AG 合成を担うことを明らかにした¹⁾。一方、AgsA は通常の生育条件では発現が微弱で、遺伝子破壊によっても顕著な表現型の変化は認められなかった。そこで、我々は一方の AGS 遺伝子の破壊株を親株として、もう一方の AGS 遺伝子を高発現した株を作製した (*agsA*^{OE} 株および *agsB*^{OE} 株)。その結果、液体振盪培養時に *agsA*^{OE} 株は *agsB*^{OE} 株に比べて菌糸密度の低い菌糸の塊を形成しながら生育した²⁾。本研究では、両高発現株間の表現型差をもたらす要因を解明することを目的とし、両株により合成される AG の生化学解析を行った。その結果、*agsA*^{OE} 株の AG の分子量は約 1,480 kDa で、*agsB*^{OE} 株の AG 分子量約 370 kDa に比べて約 4 倍大きいことが明らかとなった。また、両高発現株の細胞壁成分を染色し顕微鏡観察を行ったところ、*agsB*^{OE} 株や野生株では細胞壁外層に AG が存在するのに対し、*agsA*^{OE} 株の AG は細胞壁の比較的内層側に分布していた。以上のことから、*A. nidulans* の菌糸接着性は AG の分子量とその局在によって制御されていることが示唆された。また、AG の細胞壁中の分布様式は分子量によって異なることが示唆された。1) Yoshimi et al., *PLoS ONE*, (2013) 8:e54893; 2) 宮澤ら, 第 16 回糸状菌分子生物学コンファレンス要旨集, (2016) P-32

Molecular mass of α -1,3-glucan affects its localization and degree of hyphal aggregation in *Aspergillus nidulans*

Ken Miyazawa¹, Akira Yoshimi², Takaaki Yamashita¹, Ami Koizumi¹, Shigekazu Yano³, Shin Kasahara⁴, Motoaki Sano⁵, Keietsu Abe^{1,2}

(¹Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., ²NICHe, Tohoku Univ., ³Grad. Sch. Eng., Yamagata Univ., ⁴Sch. Food, Agric. & Environ. Sci., Miyagi Univ., ⁵Genome Biotechnol. Lab., Kanazawa Inst. Tech.)

O-3 (P-18)

菌糸ネットワークを介した糸状菌と細菌の相互作用の解析

久知良桃花¹, Gayan Abeysinghe¹, 榎尾俊介², 萩原大祐², 高谷直樹², 野村暢彦², 尾花望³, 竹下典男²

(¹筑波大院・生命環境, ²筑波大・生命環境系, ³筑波大・トランスボーダー医学医療研究センター)

微生物複合体の理解と制御のため、異種微生物間の相互作用についての研究が注目を集めている。環境中の主要な微生物である糸状菌と細菌の相互作用に関する知見を得るため、本研究では、糸状菌およびグラム陽性細菌のモデル生物である *Aspergillus nidulans* と *Bacillus subtilis* との相互作用を解析した。液体培養中でそれぞれ単独培養または共培養し、共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、共培養した際に *B. subtilis* が *A. nidulans* の菌糸近傍に多く凝集している様子が観察された。また、固体培地上で共培養を行い、蛍光顕微鏡で観察したところ *B. subtilis* が *A. nidulans* の菌糸に沿って移動する様子が観察され、菌糸の伸長に伴って、*B. subtilis* が生育空間を拡大していることが明らかとなった。*B. subtilis* のべん毛を欠損させた株を用いた実験では、そのような移動と増殖は観察されなかった。RNA-seq により、共培養とそれぞれの単独培養における遺伝子発現を比較した結果、チアミン生成に関与する遺伝子の発現が、顕著に変化していたため、*A. nidulans* のチアミン要求株と *B. subtilis* を共培養したところ、*A. nidulans* のチアミン要求株の生育阻害が *B. subtilis* により相補された。以上のことから、枯草菌がべん毛を用いて糸状菌の菌糸を利用して移動・増殖すること、また、チアミンを介した協調的な代謝により相互作用することが示された。現在、生態系での相互作用を検証するため、土団粒で共培養しその生育・相互作用をライブイメージングにより解析している。

Networks of fungal hyphae organize bacterial community

Momoka Kuchira¹, Gayan Abeysinghe¹, Shunsuke Masuo², Daisuke Hagiwara², Naoki Takaya², Nobuhiko Nomura², Nozomu Obana³, Norio Takeshita²

(¹Grad. Life Environ. Sci., ²Fac. Life Environ. Sci., ³TMRC Fac. Medicine., Univ. Tsukuba)

O-4 (P-53)

二次代謝を活性化する糸状菌間相互作用の探索

二宮章洋, 浦山俊一, 萩原大祐 (筑波大・生命環境)

【目的】糸状菌のゲノム中には、多数の未知化合物の生合成遺伝子群が存在することが明らかになりつつある。これらの生合成遺伝子は新たな医薬資源として期待されているが、その大部分は通常の培養条件下では発現しないため、「休眠遺伝子」と呼ばれる。休眠遺伝子の発現を促す有用な手段の1つとして共培養が挙げられる。例えば、糸状菌と放線菌の共培養によって糸状菌の二次代謝が活性化することが報告されている。このような共培養系における二次代謝活性化の作用機構の解明は、人為的に休眠遺伝子を強制発現する基盤技術の開発に繋がると期待される。そこで、本研究は、糸状菌間相互作用の分子レベルでの理解を指向し、二次代謝を活性化する糸状菌間相互作用の発見を目的とした。

【方法と結果】二次代謝に関する情報が豊富な4種の糸状菌 *Aspergillus fumigatus* (*Af*), *Aspergillus niger* (*Anig*), *Aspergillus nidulans* (*Anid*), *Aspergillus oryzae* (*Ao*) のうち、いずれか2種ずつを様々な条件下で共培養し、HPLCを用いて、共培養が二次代謝産物の生産に与える影響を調べた。その結果、*Af* と *Anid* をポテトデキストロース培地中で培養した際に、共培養特異的な二次代謝産物の生産が認められた。別府フラスコを用いて、透析膜を隔てて *Af* と *Anid* を培養したところ、当該化合物の高生産が認められなかったことから、当該化合物の高生産には *Af* と *Anid* の物理的な相互作用が必要であることが示唆された。

さらに、RNA-seq 解析をおこなったところ、*Af* と *Anid* のいずれにおいても、純粋培養時と比べて、共培養時の発現量が顕著に高い二次代謝産物の生合成遺伝子クラスターが見出された。

Search for fungal interaction that activates secondary metabolism

Akihiro Ninomiya, Shun-ichi Urayama, Daisuke Hagiwara

(Fac. of Life & Env., Univ. of Tsukuba)

O-5 (P-57)

Fungi 界に広がる多様なリボソームペプチド生合成因子

梅村舞子, Linh viet Dao (産総研・生物プロセス / 生体システムビッグデータ解析ラボ (CBBDOIL))

稲コウジ病原真菌 *Ustilaginoidea virens* が産生する二次代謝物質 ustiloxin は、化合物骨格構造が前駆体ペプチドとして遺伝子に直接書き込まれた環状のリボソームペプチドであり、糸状菌で初めての報告であった (Umemura et al., FGB, 68:23, 2014)。本化合物の前駆体ペプチドは小胞体への移行シグナルペプチドを含み、かつゴルジ体局在ペプチダーゼ Kex2 の認識サイトで高度に繰り返す特徴を持つ。この特徴等に基づき、これまで 20 種類の *Aspergillus* 属菌株ゲノム情報から 40 種類以上の同経路候補を見出し、そこから新たな環状ペプチド asperipin-2a を報告している (Nagano et al., FGB, 86:58, 2016)。

今回、本前駆体様遺伝子 (ust-RiPS 因子) の Fungi 界における分布と種類について知ることを目的として、Fungi 界に属する 857 株を対象により詳細な ust-RiPS 因子のゲノム探索を行った。その結果、本因子はカビ・キノコを問わずほぼすべての株に存在し、一株平均 3 個、多いものでは一株 29 個保有することが分かった。化合物の骨格構造を形成するコアペプチド配列を分類したところ、やや粗く見積もっても 1000 種類以上と多岐に亘り、本経路が Fungi 界に広がる多様なペプチド化合物生合成遺伝子資源であるとの見方を裏付けた。なおコアペプチドの分類は必ずしも株の系統分類とは一致しないため、生活圏に応じて獲得された可能性がある。また本因子のゲノム周辺構造を調べたところ、コアペプチド配列の特徴に応じて、環状化を含む修飾に関与すると考えられる遺伝子の分布に偏りがあった。これらの解析結果に基づき、現在、ust-RiPS 経路用異種発現システムを麹菌を宿主株として開発し、複数の同経路導入と化合物産生確認を行っている。

Wide variety of ustiloxin-type ribosomal peptide precursor-like genes in kingdom fungi

Maiko Umemura, Linh viet Dao

(Bioproduction Res. Inst. / CBBDOIL, AIST)

O-6 (P-66)

土壌糸状菌における Alternative oxidase の主要な呼吸系としての役割

宮崎つぐみ, 大泉太於, 中澤奈美, 高橋純子, 榎尾俊介, 高谷直樹 (筑波大・生命環境)

真核生物には、普遍的な呼吸酵素であるシトクロム *c* オキシダーゼ (Cytochrome *c* oxidase, COX) と COX の補助的な役割を持つと考えられているシアン耐性呼吸酵素 (Alternative oxidase, AOX) を介した 2 つの呼吸系が存在する。AOX は菌類や一部の植物が発現するが、その生理的意義の全容は未だ解明されていない。

液体培地に様々な土壌を添加して *Aspergillus nidulans* を培養したところ、細胞内のシアン耐性の呼吸 (AOX) 活性が上昇するとともに、成育が上昇することが見出された。この現象は腐植含量の高い土壌で顕著であり、土壌の代わりに土壌腐植の構成成分であるフミン酸 (Humic acid, HA) を添加した場合にも、同様であった。また、HA の添加によって、カタラーゼなどの ROS 消去系酵素の遺伝子発現が上昇し細胞内の活性酸素種 (ROS) の蓄積が低下していることを見出した。AOX が ROS 低発生型の呼吸系であることと考え合わせ、HA は ROS 消去系酵素の活性化と呼吸系の切換えを通して ROS の蓄積を低下させると考えられた。一方、トランスクリプトーム解析から、HA が糖新生を活性化させることが示唆された。糖新生に関わる遺伝子の転写因子をコードする *acuK* と *acuM* をそれぞれ欠損させた遺伝子破壊株では、*aodA* の転写の促進が見られなかったことから、HA は *AcuK* と *AcuM* を介して AOX の発現を活性化させることが示された。これらの結果は、土壌成分が糸状菌の代謝調節を行う初めての例である。また、他の 15 種の糸状菌においても HA による COX から AOX への呼吸系の切替えが観察された。これは、多くの糸状菌が、土壌中では AOX を補助的ではなく主要な呼吸系としていることを示唆する驚くべき結果である。

Predominant role of Alternative oxidase in soil fungal respiration

Tsugumi Miyazaki, Tao Oizumi, Nami Nakazawa, Junko Takahashi, Syunsuke Masuo, Naoki Takaya

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

O-7 (P-38)

Aspergillus oryzae と *Aspergillus nidulans* のエノラーゼ遺伝子における選択的転写開始点の異なる使用法はそれぞれのグルコース資化様式と適応する

井上大志, 新谷尚弘, 五味勝也 (東北大院・農)

オーソログ遺伝子における複数の転写開始点 (TSSs) の使用法の多様化は、真核生物の進化を遺伝子発現レベルで加速させる要因の一つと考えられている。しかし、真菌類においてその進化的意義を示す根拠は乏しい。我々は、麹菌 *Aspergillus oryzae* と *Aspergillus nidulans* 間で、解糖系酵素の一つであるエノラーゼの遺伝子 *enoA* / *acuN* における 2 つの TSSs の使用法が異なることを見出した。すなわち、グルコース (Glc) 培養条件下で *enoA* は開始コドン上流 36 nt (-36) 付近の TSS が -510 付近の TSS より優先的に選択されて高発現するのに対し、*acuN* は -19 ~ -60 付近の TSS よりも -440 付近の TSS が優先的に選択され、Glc による高い発現誘導は見られない。上記の異なる TSSs 使用の意義を考えるため、本研究では *A. oryzae* と *A. nidulans* の Glc 資化様式を比較した。*A. oryzae* RIB40 株と *A. nidulans* FGSCA4 株を 2 % Glc を単一炭素源とした液体最少培地で 24 ~ 102 h batch 培養し、6 h 毎の乾燥菌体重量と培養上清の Glc 濃度を測定して増殖期における増殖速度と Glc 消費速度、および最終的な Glc あたりの菌体重量を算出した。その結果、*A. oryzae* の増殖速度および Glc 消費速度は、*A. nidulans* よりそれぞれ 1.3, 3.0 倍高かった。一方、Glc あたりの菌体重量は、*A. oryzae* よりも *A. nidulans* の方が 1.5 倍高かった。解糖の亢進は短時間でのエネルギー獲得に有利な一方、有機酸の細胞内過剰蓄積に伴う菌体外流出等によってしばしばエネルギー獲得効率の低下を引き起こす。したがって、異なる TSSs 使用に起因する *enoA* / *acuN* 発現パターンの違いは、それぞれの Glc 資化様式に適応すると考えられた。今後は *enoA* 低発現麹菌株の解析から、*enoA* 高発現と Glc 資化様式の関連を調べる予定である。

Different alternative transcription start sites usage of enolase gene in between *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus nidulans* is adaptive to each phenotype of growth on glucose

Taishi Inoue, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi

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

O-8 (P-50)

麹菌の転写因子 F1bC の細胞内局在と翻訳後修飾における解析

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)

我々はこれまでに *Aspergillus nidulans* において分生子形成因子として見出された転写因子 F1bC が、麹菌において *glaB* や *pepA* をはじめとする多くの固体培養特異的に生産される酵素遺伝子の発現に関与することを明らかにしてきた。前回の本コンファレンスでは、GlaB の生産に浸透圧応答性 MAPK が関与していることを報告した。今回は、麹菌における F1bC の細胞内局在および翻訳後修飾 (PTM) について解析した結果を報告する。マルトースの有無で制御可能な *malP* プロモーターを用いて、F1bC-GFP を Δ *flbC*, Δ *flbC* Δ *mpkC* に導入し顕微鏡観察を行ったところ、どちらの株においても F1bC-GFP は核に局在し細胞質にも僅かに存在することが認められた。また F1bC の N 末端 279 アミノ酸を欠損させた F1bC(Δ *delN*F1bC-GFP) は大部分が核に存在したが、F1bC の C 末端領域に存在する NLS を含む Zinc finger motif を欠損させた F1bC(F1bC Δ *delC*-GFP) は核への移行が大幅に減少した。次に細胞内タンパク質を SDS-PAGE, Phos-tag PAGE に供しウエスタンブロットにより F1bC-GFP を検出したところ、F1bC-GFP および F1bC Δ *delC*-GFP は抗リン酸抗体によるバンド本数の増加とアルカリホスファターゼ (AP) 処理区においてバンド位置が下降したことから、F1bC はリン酸化により制御されていることが示された。一方で Δ *delN*F1bC-GFP では AP 処理でのバンド位置の変化や、Phos-tag PAGE においてもバンド本数の増減がなかったことから、F1bC は 1-278 番目までのアミノ酸においてリン酸化されていることが示唆された。また、 Δ *delN*F1bC-GFP のリン酸化は誘導後に低水分条件で 30 分間の空気暴露により脱リン酸化された。さらに F1bC が予想分子量の約 10 kDa 上方にバンドが現れたことからリン酸化以外の PTM についても現在解析している。また、F1bC が分生子形成・菌糸成長に及ぼす影響について解析した結果も併せて報告する予定である。

Analysis of the localization and post-transcriptional modulation of F1bC in *Aspergillus oryzae*.

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

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

O-9 (P-33)

RNA-sequencing による糸状菌の一酸化窒素応答の解析

萩原大祐^{1,2}, 二宮章洋¹, 浦山俊一¹, 高木博史³ (筑波大・生命環境,²千葉大・真菌セ,³奈良先端大・バイオサイエンス)

一酸化窒素 (NO) は、動植物や微生物で細胞内機能の調節に関与していることが知られている。特に、タンパク質の S-ニトロソ化やニトロ化を通して、情報伝達因子としての生理機能を果たすことが示されている。一方、NO はフリーラジカルであり、過剰な生成・蓄積は細胞毒性を示すため、適切な応答機構が備わっていると考えられるが、糸状菌においてこれらの詳細な機構は明らかにされていない。本研究では、糸状菌の NO 応答機構を解明するために、NO 供与体である S-nitroso N-acetylpenicillamine (SNAP) 存在下のトランスクリプトーム解析を行った。*Aspergillus fumigatus* を CD 培地で液体培養し、SNAP を添加後 1 時間に菌体を回収して RNA-sequencing 解析を行った。SNAP 非添加時に比べて、発現量が 4 倍以上上昇および減少した遺伝子は、それぞれ 66, 197 個見出された。中でも、シデロフォアの産生に関与する遺伝子群の発現低下が認められた。また、hexadecahydro-astechrom や fumisoquin/fumipyrrole の二次代謝生成遺伝子クラスター (*has, fsq/fmp*) の発現が上昇していることも明らかになった。これらの発現上昇は、異なる NO 供与体を用いても観察され、添加後 4 時間まで漸次的に増大した。一方、二次代謝のマスターレギュレータ *LaeA* が欠損した株においては、両クラスターの遺伝子は極めて低い発現量を示し、NO による発現応答は見られなかった。現在、NO 供与体の添加により誘導される当該クラスターに由来する物質の生産を確認中である。これらの解析から、NO が糸状菌の二次代謝を調節 (活性化) する生理機能を有している可能性が示唆された。

Elucidation of response to nitric oxide in filamentous fungi by RNA-sequencing analysis

Daisuke Hagiwara^{1,2}, Akihiro Ninomiya¹, Syun-ich Urayama¹, Hiroshi Takagi³

(¹Fac. of Life & Env., Univ. of Tsukuba, ²MMRC, Chiba Univ., ³Grad. Sch. Sci. & Tech., Nara Inst. of Sci. & Tech.)

O-10 (P-41)

白麹菌 *Aspergillus kawachii* における RNA 結合タンパク質 NrdA の機能解析

門岡千尋¹, 泉津弘佑², 浅井禎吾³, 奥津果優¹, 吉崎由美子¹, 高峯和則¹, 後藤正利⁴, 玉置尚徳¹, 二神泰基¹ (鹿児島大・農,²滋賀県立大・環境科学,³東京大院・総合文化,⁴佐賀大・農)

焼酎製造に用いられる白麹菌は、菌体外に多量のクエン酸を分泌生産する性質をもつ。本研究は、白麹菌を含むチャワントケ亜門の糸状菌においてクエン酸合成酵素遺伝子の upstream に保存された推定 RNA 結合タンパク質をコードする *nrdA* 遺伝子とクエン酸生産との関連性に着目し、その機能解析を目的とした。

まず、*nrdA* 破壊株の構築を試みたが、取得できなかったため、Tet-On システムを用いたコンディショナル発現株を構築した。この *Ptet-nrdA* 株は NrdA の発現誘導時にのみコロニーを形成したことから、白麹菌において *nrdA* は必須遺伝子であることが示唆された。*Ptet-nrdA* 株は過剰発現条件において、最小培地上で生育が遅延し、菌糸に茶色色素が沈着した。加えて、菌体量あたりのクエン酸生産量を測定した結果、野生株と比較して約 10% に低下した。また GFP-NrdA の局在解析の結果、GFP-NrdA は核に局在することが示唆された。次に NrdA と相互作用する RNA を同定するため、N 末端に S タグを付加した *Ptet-S-nrdA* 株を構築し、抗 S タグ抗体を用いた RIP (RNA immunoprecipitation) -Seq 解析と、S-NrdA の発現誘導時と非誘導時における RNA-Seq 解析を行った。その結果、NrdA の発現非誘導時において 2 倍以上発現量が上昇した 3329 遺伝子、および低下した 1875 遺伝子を同定した。さらに RIP-Seq により、NrdA と強く相互作用することが示唆された mRNA として 3474 種を同定した。これらの相互作用 RNA のうち 92% は、NrdA の発現非誘導時において発現量が 2 倍以上発現上昇した遺伝子に含まれたことから、NrdA と相互作用する RNA は分解が促進されることが示唆された。以上の結果より、NrdA は白麹菌において生育に必須の RNA 結合タンパク質であり、RNA 分解の制御を通してクエン酸生産や二次代謝などをグローバルに制御することが示唆された。

Characterization of putative RNA binding protein NrdA in the white koji fungus *Aspergillus kawachii*

Chihiro Kadooka¹, Kosuke Izumitsu², Teigo Asai³, Kayu Okutsu¹, Yumiko Yoshizaki¹, Kazunori Takamine¹, Masatoshi Goto⁴, Hisanori Tamaki¹, Taiki Futagami¹

(¹Fac. Agric., Kagoshima Univ., ²Grad. Sch. of Env. Sci., Univ. of Shiga Pref., ³Grad. Sch. Arts&Sci., Univ. of Tokyo., ⁴Fac. Agric., Saga Univ.)

O-11 (P-29)

麴菌由来界面活性タンパク質 hydrophobin RolA の液中における性質と挙動

西沢知華, 大沢千晶, 田中拓未, 七谷圭, 阿部敬悦 (東北大学院・農・生物産業創成)

hydrophobin は糸状菌の細胞壁表面に局在する界面活性蛋白質であり, 気中菌糸形成や固体高分子への菌糸接着など, 形態形成に深く関与することが知られている。我々は, 麴菌 *Aspergillus oryzae* の hydrophobin RolA がポリエステル表面に吸着し, ポリエステラーゼをポリエステル表面へ濃縮する現象を見出した¹⁾。この現象は, RolA が固体表面上で自己組織化構造を形成することで発現すると思われる。しかし, 一定の自己組織化構造を再現性よく形成させるためには, RolA の液中での安定化状態, 固体表面への RolA の吸着機構, RolA の自己組織化メカニズム等の基礎的な知見が未だ乏しい。そこで本研究では, 液中における RolA 分子の存在状態を解明することを目的とした。

Native-PAGE の結果, RolA は濃度条件には依存せず, 液中で主に四量体で存在することが明らかとなった。SDS-PAGE からは RolA の大部分が単量体であり, 一部が多量体を形成している結果が得られた。ここから, RolA は SDS で単量体へ解離するが, 一部は解離せずに会合していることが推察された。さらに, サイズ排除クロマトグラフィーの結果から, 高塩濃度条件下では RolA は主に二量体で存在していることが示唆された。また, ボルテックス処理することで RolA の自己組織化を促進した場合, Native-PAGE ではバンドが確認されなかったが, SDS-PAGE では単量体の存在が確認できた。すなわち, ボルテックス処理で形成された巨大な多量体中の一部の RolA 分子は, SDS で単量体へ解離する弱い会合状態にある可能性が推察された。以上から, RolA は液中において主に二量体または四量体として安定化しており, その会合は塩や SDS により比較的容易に解離する性質を持つことが示唆された。

1) Takahashi T., et al, *Mol Microbiol* (2005) 57: 1780

Properties and behavior of hydrophobin RolA of *Aspergillus oryzae* in the liquid condition.

Haruka Nishizawa, Chiaki Osawa, Takumi Tanaka, Kei Nanatani, Keietsu Abe

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

O-12 (P-21)

アミノ酸配列だけではわからない糖質加水分解酵素の機能とそのシナジー

松沢智彦, 矢追克郎 (産総研・生物プロセス)

微生物は環境中に存在する多糖類 (例えば植物由来多糖類) を利用するために様々な糖質加水分解酵素等を生産している。糖質加水分解酵素はアミノ酸配列に基づいて分類され, 酵素学的・生化学的に機能同定されていないタンパク質も類似タンパク質の知見から, その機能の予測が行なわれている。近年, ゲノム解析技術の大きな進歩や, トランスクリプトーム解析・プロテオーム解析等のオミックス解析の普及により, 配列情報を基にしたタンパク質や遺伝子の機能予測, また, その機能予測を基にしたオミックスデータの解釈が行なわれている。

しかし, アミノ酸配列だけでは正確に酵素の機能を予測することは難しい。本発表では, アミノ酸配列からは予測できなかったユニークな機能を有する麴菌 *Aspergillus oryzae* 由来イソプリメベロース生成酵素及び本酵素と協調的に働く糖質加水分解酵素を見出したので発表する。イソプリメベロース生成酵素 (IpeA と命名) のアミノ酸配列は β -グルコシダーゼに類似しているが, その機能は β -グルコシダーゼとは大きく異なり, キシログルカンオリゴ糖 (植物の細胞壁や種子に含まれる多糖類に由来するオリゴ糖) の非還元末端からイソプリメベロース (α -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-D-glucopyranose) を遊離するユニークな酵素である。本酵素は厳密にイソプリメベロースユニットを認識して切断する。IpeA の基質特性試験及び結晶構造解析から, 本酵素の緻密な基質認識メカニズムを明らかにすることに成功した。また, キシログルカンオリゴ糖の分解において IpeA と協調的に働く糖質加水分解酵素を新たに見出したので発表する。

Characterization of novel glycosidases and synergetic effects of these glycosidases

Tomohiko Matsuzawa, Katsuro Yaoi

(AIST, BPRI)

O-13 (P-73)

コムギいもち病菌のエンバクに対する非病原性の分子解析

天藤陽香, 東夏希, 足助聡一郎, 土佐幸雄 (神戸大院・農)

コムギいもち病菌(以下コムギ菌)はエンバクに対して非親和性を示す。本研究では、コムギ菌のエンバクに対する非病原力遺伝子 *PAT1* のクローニングを試みた。コムギ菌 Br48 とエンバク菌 Br58 の F₁ に Br58 を戻し交雑して得た BC₁F₁ を用いて分離分析を行い、*PAT1* 完全連鎖マーカーを得た。これを用いてコムギ菌 Br48 の BAC ライブラリーをスクリーニングし、当該領域をカバーする 4 つの BAC クローンを得た。それぞれを Br58 のプロトプラストに形質転換し、エンバク品種 CW-491-4 と勝冠に接種した結果、3 つの BAC クローンを導入した形質転換体において、非病原性を示すものが得られた。このことから、*PAT1* はこれら BAC クローンの重複する領域 38kbp 内に存在することが示唆された。さらに、BAC クローンを導入した形質転換体を増やし、非病原性を示す形質転換体が保有する BAC 領域を精査した結果、その中に BAC クローンの 1 部分 18.3kb のみを持つものが含まれていた。さらに、バングラデシュで分離されたコムギ菌の RNA-seq のデータを用い、本領域 18.3kbp において発現している領域を調べ、サブクローニングと形質転換体の接種を行った。その結果、*PAT1* 座乗候補領域を 3.3kbp に絞り込むことができた。

Molecular analyses of the avirulence of *Triticum* isolates of *Pyricularia oryzae* against oat

Haruka Tendo, Natsuki Azuma, Soichiro Asuke, Yukio Tosa

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

O-14 (P-83)

全ゲノム比較手法に基づく殺菌剤 Tolnifanide 新規作用点の特定

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

私たちは新規殺菌剤の未知の作用点を同定するため、①耐性株を人為的に作出、②次世代ゲノムシーケンサーを用いて野生株と耐性株の全ゲノムを比較して耐性点を同定、③この薬剤耐性遺伝子を作用点の候補として実証実験を行う、というこれまでにない新しい手法を提案している。本研究では、作用点未知の新規殺菌剤 Tolnifanide に着目し、人為的に作出した耐性株と野生株を全ゲノム比較し、変異のある遺伝子を耐性点の候補として実証実験を行った。その結果、*Geranylgeranyl transferase* 遺伝子 *Ggt1* の C406Y 変異が Tolnifanide の耐性点であることが実証できた。

そこで、GGT1 タンパク質を作用点候補として実証実験を行った。Tolnifanide は選択毒性が高く、プレオスポラ目に属するトウモロコシごま葉枯病菌 (*Bipolaris maydis*) には卓効を示す一方で、ウリ類炭疽病菌 (*Colletotrichum orbiculare*) には効かない。これに注目し、Tolnifanide が効かない菌の *Ggt1* を効く菌の *Ggt1* で置換するだけで、効かない菌でも Tolnifanide が効くようになれば、GGT1 が作用点であることの証明ができると考えた。そこで、*C. orbiculare* が本来もつ *Ggt1* を *B. maydis* 由来の *Ggt1* と置換した株を作出した。*Ggt1* 置換型の *C. orbiculare* は Tolnifanide に高感受性を示した。この結果より、GGT1 が Tolnifanide の作用点であることが証明できた。これにより、GGT1 を殺菌剤の新たなドラッグターゲットとして見出した。

GGT1 は RHO 型 GTPase などのタンパク質に翻訳後修飾を行う酵素として知られている。出芽酵母の研究例では、RHO 型 GTPase の C 末端配列を -CaaL から -CaaM に置換するだけで、GGT1 が機能不全となっても致死とならないことが報告されている。そこで菌の生存に特に重要と考えられる 3 つの RHO 型 GTPase (RHO1, CDC42, RAC1) の C 末端を -CaaM に書き換えたベクターを構築し、*B. maydis* の野生株に導入した。その結果、遺伝子組換え株は Tolnifanide 耐性を示した。以上の結果より、Tolnifanide は新規ドラッグターゲットである GGT1 に作用し、下流の RHO 型 GTPase を攪乱することにより毒性を発揮することが明らかとなった。

Identification of the mode of action of Tolnifanide by whole genome comparison.

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.)

O-15 (P-75)

***TFVI* is preferentially expressed in plant infection phase and is required for full virulence of *Colletotrichum orbiculare* on cucurbit plants**

Ru Zhang, Yoshihiro Inoue, Masanori Kaido, Kazuyuki Mise, Yoshitaka Takano (Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

Colletotrichum orbiculare preferentially expresses a set of effectors during host plant infection. To gain further insights into the stage-specific expression of effectors in plant pathogenic fungi, we here focused on the transcription factors of *C. orbiculare* preferentially expressed at the pre-invasion stage on the host plant. Based on RNA sequencing data of *C. orbiculare* under various conditions, we selected 9 candidate genes and generated the knock-out mutants of *C. orbiculare* for each gene. The deletion of one candidate gene in *C. orbiculare* caused the reduction in virulence on both cucumber and melon but not on *Nicotiana benthamiana*. We named this gene *TFVI* (transcription factor for virulence 1). *TFVI* encodes a putative transcription factor containing the fungal Zn(II)₂-Cys₆ binuclear cluster domain. The phenotypes of the *tfv1Δ* mutants in vegetative growth, conidia production, and appressorium formation were similar to those of the wild-type strain. In contrast, the *tfv1Δ* mutants delayed appressorial invasion on cucumber in comparison with the wild-type strain. To investigate the regulatory role of *TFVI* in the expression of effector genes, we are going to perform comparative RNA sequencing analyses between the wild-type strain and the *tfv1Δ* mutant.

O-16 (P-82)

非病原性 *Fusarium oxysporum* W5 ゲノムはコア染色体でない領域を有する

齋藤大幹¹, 浅井秀太^{2,3}, 小寺俊丞⁴, 小松健^{1,4,5}, 有江力^{1,4,5} (¹農工大院・連農, ²JST さきがけ, ³理研 CSRS, ⁴農工大院・農, ⁵農工大・GIR)

子囊菌 *Fusarium oxysporum* のゲノムは、基本的に全ての菌株が共有し生育に必須な遺伝子が座乗するコア染色体と、エフェクター遺伝子をはじめとする病原性関連遺伝子等生育に必須でない遺伝子が座乗するアクセサリー染色体から成る。植物病原性菌株では、アクセサリー染色体の有無や構成によって宿主特異性分化等の種内多型が生じるとされるが、非病原性菌株でのアクセサリー染色体の解析例は見当たらない。生物防除資材等、一部の有用非病原性菌株に特有な能力がアクセサリー染色体上の遺伝子によって制御されている可能性を考えた。非病原性 *F. oxysporum* 菌株 W5 は、イネばか苗病やバナナパナマ病等に対する生物防除能を示す有用菌株である。PacBio RSII を用いた W5 の全ゲノム情報の解読の結果、1 SMRT Cell で、平均カバレッジ 68、コンティグ数 29、ゲノムサイズ 47 Mb と良好なゲノムデータを得た。また、NCBI 上のデータベースと比較したところ、トマト萎凋病菌 f. sp. *lycopersici* 4287 株 (以下 4287) のアクセサリー染色体である 3, 6, 14, 15 番染色体、及び、キュウリ根腐つる割病菌 f. sp. *radicis-cucumerinum* 016 株 (以下 016) のアクセサリー染色体である RC 染色体と相同な染色体 (領域) を、W5 が有していないことが示された。一方、W5 のコア染色体に相当するコンティグの内、いくつかの末端には、4287 や 016 との相同性が認められない領域が存在した。

The genome of non-pathogenic *Fusarium oxysporum* W5 contains non-core chromosomal region

Hiroki Saito¹, Shuta Asai^{2,3}, Shunsuke Kotera⁴, Ken Komatsu^{1,4,5}, Tsutomu Arie^{1,4,5}

(¹United Grad School of Agric, TUAT, ²PRESTO, JST, ³CSRS, RIKEN, ⁴Grad School of Agric, TUAT, ⁵GIR, TUAT)

O-17 (P-107)

ゲノム編集による麹菌 *Aspergillus oryzae* の異種二次代謝産物生産系の構築

齋藤直也¹, 片山琢也^{1,2}, 南篤志³, 及川英秋³, 丸山潤一^{1,2} (¹東大院・農生科・応生工, ²東大・CRIIM, ³北大院・理)

麹菌 *Aspergillus oryzae* は近年異種二次代謝産物生産の宿主として利用が進められている¹⁾。二次代謝産物の異種生産には少なくとも 4~6 個以上の生合成遺伝子の導入を必要とすることが多く、異種生産を行ったうえで生産性を向上させる遺伝子改変を行う場合、四重栄養要求性株 NSAR1 を用いる従来の系では選択マーカーの数による制約を受けるといった課題がある。一方、当研究室において *A. oryzae* における CRISPR/Cas9 システムを利用したゲノム編集技術が確立され、ゲノム編集プラスミドのリサイクリングにより標的遺伝子の破壊および標的染色体部位への遺伝子導入を無制限に繰り返すことが可能となった²⁾。本研究では、ゲノム編集を利用した *A. oryzae* における異種二次代謝産物の生産、およびその生産性の向上を目的とした。

異種二次代謝産物生産のモデルとして、7 つの生合成遺伝子によって合成される担子菌由来の抗生物質 pleuromutilin の生産を行った。遺伝子導入の標的部位として、分生子の色素合成に関与する *wA*, 硝酸窒化に必要な *niaD*, ウリジン/ウラシル生合成に必要な *pyrG* の各遺伝子を選択した。*A. oryzae* 野生株 RIB40 を宿主として段階的に形質転換を行い、各標的部位の欠失に由来する表現型を指標として株を選択することで、7 つの pleuromutilin 生合成遺伝子すべてが導入された株を取得した。得られた株の代謝物において、GC/MS 解析により pleuromutilin の生産が確認され、さらに抗菌活性も検出された。以上の結果から、ゲノム編集を利用した *A. oryzae* における異種二次代謝産物生産が可能となった。現在、生産株において代謝経路の遺伝子改変を行い、生産性の向上を試みている。

1)南ら, 日本醸造協会誌, Vol. 112, 592-597 (2017) 2)片山ら, 日本農芸化学会 2018 年度大会要旨集 4SY22-2

Construction of heterologous production of secondary metabolites in *Aspergillus oryzae* by genome editing

Naoya Saito¹, Takuya Katayama^{1,2}, Atsushi Minami³, Hideaki Oikawa³, Jun-ichi Maruyama^{1,2}

(¹Dept. of Biotechnol., ²CRIIM, The Univ. of Tokyo, ³Grad. Sch. Sci., Hokkaido Univ.)

O-18 (P-109)

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* における Cdc48 オルソログの有用物質生産性への関与

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】Cdc48 は, p97/Valosin-containing protein (VCP) の出芽酵母におけるホモログであり, プロテアソームによる分解経路 ER-associated degradation (ERAD)や, 核膜の再構築等, 様々な生理機構に関与しており, AAA (ATPases associated with diverse cellular activities) ATPase の 1 つとして盛んに研究が行われている。また, 国菌とされる黄麹菌 *Aspergillus oryzae* は, アミラーゼやコウジ酸といった有用な物質を大量に分泌生産することができるが, その際に黄麹菌における Cdc48 オルソログである AoCdc48 が関与するかについては明らかになっていない。我々はこれまでに, AoCdc48-EGFP が核に主に局在し, また *Aocdc48* の発現をチアミンの存在下で抑制する条件発現株を用いた解析により, *Aocdc48* が黄麹菌の生育に必須であることを示した。本研究では, AoCdc48 と黄麹菌に特徴的なアミラーゼやコウジ酸の有用物質生産との関係性について解析した。

【方法・結果】馬鈴薯デンプンを炭素源とした最小培地を用いて対照株と条件発現株を培養し, デンプンが分解されたときに形成される白濁領域や, ルゴール液染色のハロー形成によりアミラーゼ分泌について解析した。その結果, 両株においてアミラーゼ分泌が確認され, チアミン存在下で生育がほぼ確認できない条件発現株においてもアミラーゼ分泌を確認した。一方, 鉄を添加した KA 培地を用い, 赤い呈色によるコウジ酸分泌解析を行ったところ, 条件発現株では生育に比したコウジ酸分泌の遅延が見られ, またチアミン存在下ではコウジ酸の分泌は見られなかった。以上から, AoCdc48 が黄麹菌の有用物質生産に関与していることが示唆された。現在, *Aocdc48* 過剰発現株を作製するとともに, 有用物質生産についての解析を行っている。

Involvement of Cdc48 ortholog in productivity of valuable materials in *Aspergillus oryzae*

Futa Kikumatsu, Kaoru Takegawa, Yujiro Higuchi

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

O-19 (P-110)

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* における糖鎖欠損型分泌糖タンパク質生産

李秋実, 竹川薫, 樋口裕次郎 (九大院・生資環)

現在、バイオ医薬品の中には糖タンパク質が約7割を占め、生産量の確保が重要課題となっている。糖タンパク質バイオ医薬品の糖鎖構造は、その薬効に大きな影響を与えることが多く、糖鎖構造の均一性が求められている。均一な糖鎖構造を持つ糖タンパク質を化学酵素学的に調製する手法として、糖タンパク質をまず endo- β -*N*-acetylglucosaminidase 処理し、得られた GlcNAc タンパク質に均一な糖鎖を転移する方法がある。そこで、均一糖鎖構造を有する糖タンパク質を調製する前段階として、GlcNAc タンパク質を多量に調製することが必要となる。黄麹菌 *Aspergillus oryzae* は日本の“国菌”であり、その安全性や高いタンパク質分泌能力を持つため、異種タンパク質の生産宿主としてよく利用される。本研究では、黄麹菌を用いて GlcNAc タンパク質を大量に調製するために、AoGlycoDelete 株を作製した。黄麹菌のゴルジ体膜に存在するいくつかのタンパク質を選抜し、それらの膜貫通領域の C 末端側に *Hypocrea jecorina* 由来の endo-*N*-acetyl- β -D-glucosaminidase T (EndoT, 黄麹菌用にコドン最適化) を融合発現するプラスミドを作製し、形質転換により AoGlycoDelete 候補株を得た。それらを親株と共に 5×DPY 液体培地で 4 日間培養し、その培養上清を SDS-PAGE 後に CBB 染色した。その結果、EndoT 発現により N 型糖鎖を 1 つ有する α -アミラーゼのバンドサイズの減少が確認された。このバンドサイズの減少は、EndoCC 処理した α -アミラーゼのバンドサイズと同様であったことから、AoGlycoDelete 株により生産された糖タンパク質は GlcNAc タンパク質であると示唆された。現在、AoGlycoDelete 株の生育を含めた諸性質を調べるとともに、分泌生産された GlcNAc タンパク質を用いて糖転移反応を試みている。

Production of glyco-deleted glycoproteins in *Aspergillus oryzae*

Qiushi Li, Kaoru Takegawa, Yujiro Higuchi

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

O-20 (P-108)

セルラーゼ高生産糸状菌 *Trichoderma reesei* における推定トランセプター Crt1 の局在解析

北原雪菜¹, 吉澤和将², 谷口大樹², 古川隆紀², 志田洋介², 大隅正子³, 小笠原涉^{1,2} (¹長岡技科大院・技学イノベーション, ²長岡技科大院・生物, ³総合画像研究支援)

セルラーゼ高生産糸状菌 *Trichoderma reesei* は誘導基質(セルロースおよびその誘導体)の存在に応答し、多量のセルラーゼを生産する。この誘導的なセルラーゼの生産は、細胞外の可溶性誘導基質の細胞内への輸送が重要だと考えられている。そこで、当研究室では誘導基質の認識や輸送に関与する膜タンパク質に着目した研究を行っている。近年、*T. reesei* においてセルラーゼ遺伝子と同調的に高発現し、セルラーゼ生産に必須とされるトランスポーター Crt1 が見出された。その後の研究によって、Crt1 は誘導基質の菌体内への取り込みだけでなく、誘導基質の認識も行うトランセプターであると推測されている。*T. reesei* のセルラーゼ生産機構における Crt1 の重要性は示唆されているが、その詳細な機能は明らかとなっていない。具体的には①セルラーゼ遺伝子と同等の発現量の多さ、②局在性、③セルラーゼ生産シグナル伝達機構への関与、についての知見は乏しい。そこで、本研究では Crt1 の機能解析を目的とし、その局在性について検討した。

T. reesei のセルラーゼ生産条件下での Crt1 局在性を観察するため、GFP 融合型 Crt1 (Crt1cGFP) 発現株を構築し、菌体内における挙動を経時的に解析した。その結果、Crt1cGFP の蛍光は菌体表面および菌体内部に観察され、菌体内部の蛍光強度は菌体表面よりも約 4 倍高かった。共焦点顕微鏡、超解像顕微鏡および透過型電子顕微鏡を用いた解析により、それらの局在は細胞膜および小胞体であることが示唆された。さらに、タイムラプス観察では、細胞膜、小胞体の順に経時的な蛍光強度変化が観察された。以上の結果から、Crt1 は細胞膜および小胞体の 2 ヶ所に局在し、その局在性が変化する可能性が示唆された。

Subcellular localization of putative transceptor Crt1 in highly producing cellulase filamentous fungus, *Trichoderma reesei*

Yukina Kitahara¹, Kazumasa Yoshizawa², Daiki Taniguchi², Takanori Furukawa², Yosuke Shida², Masako Osumi³,

Wataru Ogasawara^{1,2}

(¹Dept. of Sci. of Tech. Innov., Nagaoka Univ. of Tech., ²Dept. of Bioeng., Nagaoka Univ. of Tech., ³IIRS)

Poster Session

P-1

酵母におけるミトコンドリアオートファジーの負の制御機構

古川健太郎, 神吉智丈 (新潟大院・医歯)

ミトコンドリアを選択的に分解するミトコンドリアオートファジー (マイトファジー) は、ミトコンドリアの量と品質管理に関わる重要な生理機能である。当研究室では、マイトファジー研究のモデル生物として出芽酵母を用い、これまでにマイトファジー特異的なレセプターであるミトコンドリア外膜タンパク質 Atg32 の同定、マイトファジーの生理的役割、カゼインキナーゼ 2 (CK2) による Atg32 のリン酸化を介したマイトファジー誘導、Sin3-Rpd3 複合体による Atg32 の発現制御などを報告してきた。しかしながら、CK2 は常に活性を持った状態で細胞内に大量に存在するにもかかわらず、Atg32 のリン酸化はマイトファジー誘導時のみ起こることから、通常条件下ではどのようにリン酸化が抑制されているのかは未解明であった。本コンファレンスでは、Atg32 の脱リン酸化を介してマイトファジーを負に制御する因子について報告する。
Furukawa *et al.*, *Cell Rep.*, 23: 3579-3590 (2018); Furukawa and Kanki, *Autophagy* (2018) in press

Negative regulatory mechanism of mitochondria autophagy in yeast

Kentaro Furukawa, Tomotake Kanki

(Niigata Univ. Grad. Sch. Med. Dent. Sci.)

P-2

イネいもち病菌におけるキチン脱アセチル化酵素を介した細胞分化誘導

黒木美沙, 志賀友理子, 前村知佳, 荒添貴之, 鎌倉高志 (東理大・応用生物)

植物病原糸状菌であるイネいもち病菌は感染の際に付着器を形成する。付着器の形成誘導に関与すると予想される Cbp1 はキチン脱アセチル化酵素 (CDA) と相同な領域をもっている。先行研究では Cbp1 の CDA 活性に着目した実験が行われ、Cbp1 が発芽管先端で発現し CDA 活性を発揮することが、付着器形成の誘導と同期している可能性が示された。しかし、CDA の基質であるキチンは細胞壁構成成分であることからシグナル伝達系との関与が考えづらく、付着器形成の誘導が起こるメカニズムが不明であった。

本研究では、CDA 活性が付着器形成の誘導を起こすしくみについて検証していきたい。CDA はキチンをキトサンに変換する酵素だが、その変換に伴い酢酸を遊離することがわかっている。そこでまず、この酢酸が付着器形成誘導に与える影響について検証した。酢酸は一般的に高い抗菌活性が知られていることから、広範な濃度域における影響を観察した。

また、真核生物は細胞内で酢酸をアセチル CoA に変換し、栄養枯渇状態ではこのアセチル CoA から糖新生を行うことが知られている。本菌においても付着器形成誘導時にグリオキシル酸経路を利用してアセチル CoA からの糖新生を行っている可能性が報告されている。野生株および *CBP1* 破壊株におけるグリオキシル酸経路構成因子の転写量の比較、さらに各遺伝子の付着器形成への関与についても検証した。

この研究により付着器形成誘導メカニズムの一端が明らかとなった。今後の解析により、真核生物のもつ CDA の新たな意義として幅広い生物種に应用できる知見となることが期待される。

How chitin deacetylase induces cell differentiation in *Pyricularia oryzae*?

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

(Appl. Biol. Sci., Tokyo Univ. of Sci.)

P-3

近接する麴菌コロニーが示す成長拒否反応の観察

浜中祐弥¹, 原佑介², 黒田裕樹^{1,2} (¹慶應大・環境情報, ²慶應大・政メ)

麴菌 *Aspergillus oryzae* を同一の寒天培地上の 2 か所以上に植菌・培養をした際、コロニーが一定の成長を遂げた段階から、互いのコロニーの成長速度が低下する現象が生じる。この同一の株間で生じる成長拒否反応が生じる様子を、植菌する位置を変化させることで観察した。まず、PD 培地上の 2 か所に 10, 20, 30 mm の 3 条件で距離をあけて RIB40 株を植菌・培養した際の 2 つのコロニーの成長速度の変化を比較した。その結果、2 つのコロニーの菌糸先端が物理的に接するよりもかなり前の段階から麴菌コロニーの成長速度が低下していることがわかった。また、成長速度の低下が生じる際の互いのコロニー間の距離は、植菌の条件によって変化することも判明した。さらに、菌糸同士の接触を確実に遮断するために、植菌した 2 か所の間にはセロファン紙を挟んで培養することも行った。この場合も、コロニーの成長速度抑制は直接菌糸が接するよりも有意に前の段階から生じていることが分かった。この拒否反応には物理的的刺激以外の要素が関与していると言える。

Observation of growth reject reaction showed by adjacent *Aspergillus oryzae* colonies

Yuya Hamanaka¹, Yusuke Hara², Hiroki Kuroda^{1,2}

(¹Faculty of Environment and Information Studies, Univ. Keio, ²Grad. Sch. of Media and Governance, Univ. Keio)

P-4

uvs-4 変異がマイトファジーおよび細胞壁合成に与える影響

齊藤智恵子, 木村さつき, 田中秀逸, 畠山晋 (埼玉大院・理工研)

アカパンカビの短寿命株のひとつである *uvs-4* (*ultraviolet sensitive-4*) 変異株は、菌糸成長を早期に終止する短寿命の表現型を示す。この変異株の菌糸内でミトコンドリアが過剰となることを見出されたことから、*uvs-4* 変異によって、オートファジーの一つであるマイトファジーが不全となることで、短寿命の表現型を示すことが予想された。本研究では、マイトファジー関連因子の一つである *Nat5* をノックアウトした株 (以下 *nat5*^{KO} 株) と *uvs-4* 変異株との表現型の比較を行い、アカパンカビにおける *uvs-4* 遺伝子の機能予測を試みた。

nat5^{KO} 株は伸長の停止と再開を繰り返す“stop-start”の菌糸成長の様式を示した。また、*uvs-4* 株ではミトコンドリア量が過剰であるのに対し、*nat5*^{KO} 株ではミトコンドリア量が過剰と正常の両方の菌糸が観察されたため、余剰なミトコンドリア量が菌糸成長の遅延に関係すると推察した。さらに、*uvs-4* 株と *nat5*^{KO} 株は、分生子を水に浸した際の生存率、および高濃度塩化ナトリウムに対して著しい生存率の低下が見られたことから、浸透圧ストレスに対する高感受性を今回明らかにした。カルコフルオールホワイトを用いて細胞壁を染色したところ、野生株では細胞壁の蛍光像が明瞭であったのに対し、*uvs-4* 株と *nat5*^{KO} 株は不明瞭であった。細胞壁合成酵素をコードする遺伝子欠損株においても、同様の観察像が得られたことから、これらの変異株では細胞壁の構成が不完全であると考えられる。

以上より、*uvs-4*, *nat5* 遺伝子はミトコンドリア淘汰と細胞壁合成経路に影響を与えることが示唆された。細胞内に機能不全のミトコンドリアの蓄積によって、生存に必要なエネルギーを産生できないため、細胞壁異常や、菌糸伸長の早期終止および“stop-start”の表現型を示したものと考察する。

Influence of the *uvs-4* mutation for mitophagy and cell wall synthesis

Chieko Saito, Satsuki Kimura, Shuuitsu Tanaka, Shin Hatakeyama

(Grad.sch.of sci. & Eng, Saitama Univ.)

P-5

アカパンカビの短寿命抑圧変異株の取得

鈴木千春エレナ, 齊藤智恵子, 田中秀逸, 畠山晋 (埼玉大・理工研)

アカパンカビの *nd* (*natural death*) 株は、温度感受性、菌糸成長の早期停止などの表現型を示す株として単離された。その原因遺伝子と考えられる *msh1* (*MutS homolog 1*) 遺伝子の欠損により、ミトコンドリア DNA に大規模な欠失を生じることなどから、*msh1* 遺伝子はミトコンドリア DNA の安定性に関与することで細胞寿命の維持に寄与すると予測される。本研究ではこの機構をさらに明らかにするため、*msh1* 株の短寿命を抑圧する変異株の取得を試みた。*nd* 株の分生子に炭素イオンビーム (200, 300 Gy) を照射したサンプルを、1 週間毎に植え継いだところ、非照射の *nd* 株では 7 代目までしか植え継ぎができなかったのに対して、300 Gy 照射サンプルでは 9 代目を越えて植え継ぐことができた。この短寿命が抑圧された復帰突然変異株 (以下 *nd^{sup}* 株) は、菌糸の成長期間が *nd* 株より 15 日長くなり、また *nd* 株に見られる MMS 感受性がなく、野生型と同程度となった。戻し交雑によって得られた子孫株のうち、*nd* 株の遺伝子型を示したものの交配型の分離比が 29:71 となったことから、復帰突然変異の原因遺伝子は交配型遺伝子や *msh1* 遺伝子と同じ第 I 連鎖群に属することが示された。また、子孫株のうち原因遺伝子にのみ変異を持つと考えられる株は、MMS 感受性が野生株ほどではないものの、*nd* 株より感受性でないことがわかった。

Attempt to acquisition a mutant which suppresses *natural death* phenotype of *Neurospora crassa*

Chiharu Elena Suzuki, Chieko Saito, Shuuitu Tanaka, Shin Hatakeyama

(Grad.sch.of sci & Eng, Saitama Univ.)

P-6

A Pezizomycotina-specific gelsolin-like protein regulates growth and septum formation

M. Abdulla Al Mamun¹, Takuya Katayama^{1,2}, Jun-ichi Maruyama^{1,2} (¹Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, ²CRIIM, The Univ. of Tokyo)

Proper regulation of actin cytoskeleton is vital for organisms by giving respective morphologies. In filamentous fungi, polarized hyphal growth and septum formation are main morphological characteristics, which is conferred by coordinated regulation of actin dynamics. Therefore, a unique spatial machineries of actin dynamics directing at the hyphal tip and septum would be present in filamentous fungi. However, the specific mechanism regulating actin dynamics has been insufficiently studied to explain about unique morphological features such as polarized hyphal growth and septum formation in filamentous fungi.

In this study using BLAST search in *Aspergillus oryzae*, we found a gelsolin-like protein (AO090005001233) that is only conserved in filamentous ascomycete (Pezizomycotina) but not in yeast. Gelsolin is an actin-modulating protein with severing activity. The gelsolin-like protein of *A. oryzae* consists of 1837 aa containing three gelsolin domains and a domain of unknown function (Pfam: D UF4045). Localization of the gelsolin-like protein was found at hyphal tip, a site of ongoing septation, and the septal pore upon hyphal wounding. Gene deletion caused moderate growth defect, abnormally larger interval of septa, and inability to prevent excessive cytoplasmic loss at the septal pore upon hyphal wounding. In further observation with actin marker Lifeact-GFP, deletion strain showed overaccumulation of actin at hyphal tip and failed to properly form the contractile actin ring typically seen during septation. Finally, it can be concluded that the gelsolin-like protein regulates the growth and septum formation, and maintains actin dynamics. Truncation analysis of individual domain in the gelsolin-like protein for function and localization will be presented.

P-7

麹菌 *Aspergillus oryzae* の不和合性における HET ドメイン遺伝子の機能解析

森法子¹, 片山琢也¹, 齊藤亮太², 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】糸状菌では一部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。一般に特定の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)をもつタンパク質をコードする遺伝子 (HET ドメイン遺伝子) が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、最近我々は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⁾。さらに、*A. oryzae* の互いに不和合である野生株 RIB40 と日本酒製造用株 RIB128 の 2 株間で配列多型な HET ドメイン遺伝子に着目し、異株発現により生育阻害を引き起こす遺伝子を探索してきた²⁾。本研究ではさらなる HET ドメイン遺伝子の異株発現による探索と、その生育阻害の原因となる配列多型の同定および不和合性との関連性の解明を目的とした。

【結果】これまで、RIB128 株由来の配列多型な HET ドメイン遺伝子を RIB40 株において異株発現させた結果、生育阻害を引き起こす AO090001000078 を見いだしている²⁾。この遺伝子について 2 株間の 9 か所のアミノ酸置換のうち 2 か所が生育阻害の原因であることを明らかにし、この 2 か所の変異は RIB40 株と不和合な他の実用株においても保存されていることが分かった。さらに、RIB40 株由来の HET ドメイン遺伝子についても RIB128 株で異株発現させた。その結果、RIB128 株由来の遺伝子の異株発現では変化が認められなかったが、RIB40 株由来の遺伝子の異株発現により強い生育阻害を示すものを新たに 2 つ見いだした。現在、これらの HET ドメイン遺伝子に関して、生育阻害の原因となる変異の同定および破壊株の取得による不和合性への関与の検討を行っている。

1) Okabe *et al.*, *Sci. Rep.*, (2018) 8:2922, 2) 森ら, 第 17 回糸状菌分子生物学コンファレンス P-36

Functional analysis of HET domain genes in heterokaryon incompatibility in *Aspergillus oryzae*

Noriko Mori¹, Takuya Katayama¹, Ryota Saito², Kazuhiro Iwashita², Jun-ichi Maruyama¹

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

P-8 (O-2)

糸状菌 *Aspergillus nidulans* の細胞壁多糖 α -1,3-グルカンの分子量は細胞壁中の局在と菌糸接着性に影響する

宮澤拳¹, 吉見啓², 山下雄章¹, 小泉亜未¹, 矢野成和³, 笠原紳⁴, 佐野元昭⁵, 阿部敬悦^{1,2} (¹東北大院農・生物産業創成, ²東北大・未来研, ³山形大院・工, ⁴宮城大・食産業, ⁵金沢工大・ゲノム研)

α -1,3-グルカン (AG) は糸状菌の主要な細胞壁多糖の一つである。我々は以前、モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* の二種の AG 合成酵素 (AGS) 遺伝子の機能解析を行い、AgsB が主要な AG 合成を担うことを明らかにした¹⁾。一方、AgsA は通常の生育条件では発現が微弱で、遺伝子破壊によっても顕著な表現型の変化は認められなかった。そこで、我々は一方の AGS 遺伝子の破壊株を親株として、もう一方の AGS 遺伝子を高発現した株を作製した (*agsA*^{OE} 株および *agsB*^{OE} 株)。その結果、液体振盪培養時に *agsA*^{OE} 株は *agsB*^{OE} 株に比べて菌糸密度の低い菌糸の塊を形成しながら生育した²⁾。本研究では、両高発現株間の表現型差をもたらす要因を解明することを目的とし、両株により合成される AG の生化学解析を行った。その結果、*agsA*^{OE} 株の AG の分子量は約 1,480 kDa で、*agsB*^{OE} 株の AG 分子量約 370 kDa に比べて約 4 倍大きいことが明らかとなった。また、両高発現株の細胞壁成分を染色し顕微鏡観察を行ったところ、*agsB*^{OE} 株や野生株では細胞壁外層に AG が存在するのに対し、*agsA*^{OE} 株の AG は細胞壁の比較的内層側に分布していた。以上のことから、*A. nidulans* の菌糸接着性は AG の分子量とその局在によって制御されていることが示唆された。また、AG の細胞壁中の分布様式は分子量によって異なることが示唆された。1) Yoshimi *et al.*, *PLoS ONE*, (2013) 8:e54893; 2) 宮澤ら, 第 16 回糸状菌分子生物学コンファレンス要旨集, (2016) P-32

Molecular mass of α -1,3-glucan affects its localization and degree of hyphal aggregation in *Aspergillus nidulans*

Ken Miyazawa¹, Akira Yoshimi², Takaaki Yamashita¹, Ami Koizumi¹, Shigekazu Yano³, Shin Kasahara⁴, Motoaki Sano⁵, Keietsu Abe^{1,2} (¹Grad. Sch. Agric Sci., Tohoku Univ., ²NICHe, Tohoku Univ., ³Grad. Sch. Eng., Yamagata Univ., ⁴Sch. Food, Agric. & Environ. Sci., Miyagi Univ., ⁵Genome Biotechnol. Lab., Kanazawa Inst. Tech.)

P-9

マイクロ流体デバイスを用いた糸状菌の菌糸の屈性と可塑性の解析

福田紗弓¹, 島宗悠太朗², 芹澤知子¹, 横川雅俊², Andrew Utada¹, 柳沢直樹³, 高谷直樹¹, 佐藤良勝³, 竹下典男¹ (¹筑波大・生命環境, ²数理物質系, ³名古屋大・ITbM)

糸状菌は外部シグナルに応答し、生長速度や方向を制御していることが明らかとなってきた。我々は、1細胞レベルでの外部シグナルへの応答による生長方向の制御（屈性）を解析するため、ある栄養源の有無の2種の溶液が隣り合うが、混ざらないようなマイクロ流体デバイスを設計し、そこに *Aspergillus nidulans* の菌糸を生育させ、蛍光ライブセルイメージングを行った。窒素源の有無の条件では、菌糸が窒素源のある側の流路に向かって生長した。一方、炭素源の有無の条件では、そのような顕著な応答は見られなかった。これにより、糸状菌は窒素源に応答し生長方向を制御していることが示唆された。また、菌糸細胞の膨圧と細胞壁の柔軟性・再構成のバランスが、菌糸生長に関わり、細胞の可塑性は、菌糸が土壌等の隙間や、動植物の細胞間に侵入し伸長する際に重要であると予想される。このような細胞の可塑性について解析するため、我々は、菌糸の直径より狭い幅（1 μm）の溝（長さ 50, 100 μm）のマイクロ流体デバイスを作製した。現在までに *A. nidulans*（菌糸直径 2~3 μm）、*A. oryzae*（菌糸直径 2~10 μm）、*Neurospora crassa*（菌糸直径 10 μm）を培養し、菌糸生長を経時的観察により解析している。*N. crassa* において、細い流路に入らないものや、通り抜けた後に脱極性を示し菌糸生長できないものが見られた。今後、これらの頻度や菌糸の伸長速度などを定量化する。

Chemotropism and plasticity in filamentous fungi analysed by microfluidic devices

Sayumi Fukuda¹, Yutaro Shimamune², Tomoko Serizawa¹, Masatoshi Yokokawa², Andrew Utada¹, Naoki Yanagisawa³, Naoki Takaya¹, Yoshikatsu Sato³, Norio Takeshita¹

(¹Uni Tsukuba, Life Enviro Sci, ²Pure Appl Sci, ³Nagoya Uni, ITbM)

P-10

糸状菌の先端生長におけるカルシウム情報伝達経路

芹澤知子, 榎尾俊介, 別役重之, 高谷直樹, 竹下典男 (筑波大・生命環境)

糸状菌の菌糸生長に必要となるタンパク質は、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。この過程において、菌糸先端部におけるアクチンケーブルの重合が中心的な役割を担っている。これまでに糸状菌 *Aspergillus nidulans* では Ca^{2+} の細胞内への一時的な流入により、アクチンの重合とエキソサイトーシスが周期的に制御され、段階的な細胞伸長が行われることが示されている (Takeshita et al., PNAS 2017)。アクチン重合、エキソサイトーシス、 Ca^{2+} 流入と菌糸伸長の相関関係を明らかにするため、それぞれに対する阻害剤を添加し解析を行った。また、先端生長への膨圧の関わりを調べるため、高浸透圧条件での解析を行った。さらに、先端生長における Ca^{2+} 流入に関わるタンパク質のはたらきを調べるため、calmodulin (CaM) と calmodulin-dependent protein kinase (CmkA, CmkB, CmkC) の機能解析を行っている。局在解析により、CaM が菌糸先端に蓄積し、CmkA-C は細胞質中に存在することが分かった。CaM 及び CmkA-C の標的を同定するために、GFP-trap と LC-MS/MS により相互作用するタンパク質の同定を行ったところ、アクチン細胞骨格、小胞輸送、タンパク質分解、シグナル伝達などに関連するいくつかのタンパク質が同定された。また、菌糸細胞内における Ca^{2+} シグナルの伝達を解析するため、赤外線レーザーによる点刺激を行う系を用いて観察を行っている。

Calcium signaling in tip growth of filamentous fungi

Tomoko Serizawa, Shunsuke Masuo, Shigeyuki Betsuyaku, Naoki Takaya, Norio Takeshita

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

P-11

イネいもち病菌におけるクロラムフェニコールの作用点の探索

田代綾子, 野坂亮仁, 樋口絵莉香, 荒添貴之, 鎌倉高志 (東理大院理工・応生)

イネいもち病菌の感染特異的器官である付着器形成は、一度の細胞分裂と細胞分化を経て形成される。これまでの研究から我々は、原核型リボソームをターゲットとする抗生物質クロラムフェニコールの添加によって、付着器形成が抑制されることを明らかにしている。このことから、イネいもち病菌においてクロラムフェニコールが結合するタンパク質は細胞分裂・細胞分化に関係している可能性が示唆される。本研究ではクロラムフェニコールに結合するタンパク質のスクリーニングおよびそのタンパク質が付着器形成に与える影響について調査した。

まず T7 ファージディスプレイ法によりイネいもち病菌のペプチドを提示させたファージを用い、自己組織・単分子膜化したクロラムフェニコールとの結合を Quartz Crystal Microbalance により確認した。これにより、クロラムフェニコールと結合すると推測される 123 の候補ペプチド断片を取得した。

これらの候補ペプチド断片のうち、イネいもち病菌のタンパク質とアミノ酸配列の類似が見られた 22 のペプチド断片を抽出した。それぞれのペプチド断片と類似性を示したタンパク質をコードする遺伝子を候補遺伝子とし、破壊株等の作出を行い付着器形成に与える影響について調査した。

現在、複数の候補遺伝子について、破壊株で付着器形成率の減少が確認され、これらの遺伝子コードするタンパク質が付着器形成に関わる可能性・クロラムフェニコールによる付着器形成阻害の原因である可能性が示唆された。

Screening targets of chloramphenicol in *Pyricularia oryzae*

Ayako Tashiro, Akihito Nozaka, Erika Higuchi, Takayuki Arazoe, Takashi Kamakura

(App. Bio. Sci., Tokyo Univ. of Sci.)

P-12

麹菌 *Aspergillus oryzae* 菌糸完全分散変異株の 5 L ジャー型発酵槽を用いた酵素生産性評価

古明地敬介¹, 宮澤拳¹, 吉見啓², 市川暉³, 佐野元昭⁴, 阿部敬悦^{1,2} (東北大院農・生物産業創成,² 東北大・未来研,³ 東北大・農学部,⁴ 金沢工大・ゲノム研)

糸状菌の液体培養では、菌糸同士が接着集合することで菌糸塊を形成し高密度培養できないことが課題である。我々は、産業用糸状菌の麹菌において、細胞壁多糖 α -1,3-glucan (AG) と細胞外分泌多糖ガラクトサミノガラクトン (GAG) を欠損させた AG-GAG 二重欠損株を造成し、本株の菌糸が培地中で完全分散することを見出した¹⁾。また、フラスコ培養において AG-GAG 二重欠損株が野生株に比べて高い酵素生産性を示すことを確認した¹⁾。本研究では、工業培養への応用に向けて、完全分散株の 5 L ジャー型発酵槽における酵素生産性を評価することを目的とした。麹菌の野生株および AG-GAG 二重欠損株にモデル酵素 CutL1 を高発現するベクターを導入し、ゲノム上の *niaD* locus に 1 コピー導入された株を選抜した。これらの株を 5 L ジャー型発酵槽で 30°C, 72 時間培養し、培養上清中に分泌された CutL1 量を定量した。その結果、AG-GAG 二重欠損株の酵素生産量は野生株比で約 2 倍に増加した。このことから、ジャー型発酵槽レベルにおいても、AG-GAG 二重欠損株は高い酵素生産性を示すことが明らかになった。また、野生株と AG-GAG 二重欠損株の培養後の培地液性に明確な違いが観察されたことから、E 型粘度計を用いて両株の培養液粘度を定量的に測定した。その結果、AG-GAG 二重欠損株の培養液粘度は野生株と比較して顕著に低下していた。以上のことから、AG-GAG 二重欠損株を用いると菌糸の完全分散化により培地の流体特性が変化し(培養液の低粘度化)、この特性が酵素生産性の向上に寄与したと考えられた。1) 阿部ら, PCT/JP2018/17474

Evaluation of enzyme productivity using 5 L jar fermenter in *Aspergillus oryzae* mutant that completely achieved hyphal dispersion.

Keisuke Komeiji¹, Ken Miyazawa¹, Akira Yoshimi², Hikaru Ichikawa³, Motoaki Sano⁴, Keietsu Abe^{1,2}

(¹Grad. Sch. Agric. Sci., ²NICHe, & ³Fac. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., ⁴Genome Biotechnol. Lab., KIT)

P-13

代謝シフトと ROS 生成による *Bipolaris maydis* の栄養生長抑制ならびに分生子形成促進

吉田裕史, 田中千尋 (京大院・農)

外界の栄養的条件は、ときに糸状菌類の形態形成パターンを大きく左右する。演者らはこれまでに、植物糖の一つである L-arabinose がシグナルとして作用し、トウモロコシごま葉枯病菌 *B. maydis* の栄養生長を抑制して分生子形成を促進することを明らかにしてきた。L-arabinose によるこの作用には、炭素源利用に関わる中心的代謝系の変動、すなわちヘキソースリン酸側路（ホスホグルコン酸経路、酸化了的ペントースリン酸経路；以下 HMP shunt）の亢進が関与することが示唆されている。今回、演者らは HMP shunt の亢進が同菌の形態分化促進を引き起こす仕組みについて、さらなる調査を行った。

HMP shunt は補酵素 NADPH の産生に寄与することが知られる。そこで、アラビノース存在下での同経路亢進は NADPH 供給の増加に寄与すると予想した。*B. maydis* 野生型株を種々条件で平板培養し、各種糖存在下でのストレス感受性を比較したところ、アラビノース存在下では menadione による生育阻害が助長されることが見出された。menadione は NADPH 依存的に酸化ストレスを生じさせる性質があることから、上記結果はアラビノース存在下で実際に NADPH 供給増加が生じていることを示唆するものと考えられた。次に、NADPH が補酵素として関与する細胞プロセスの一つとして、NADPH oxidase (Nox) による活性酸素種 (ROS) 生成に着目した。各種糖存在下での Nox 触媒サブユニット遺伝子群の発現量を比較したところ、それらはアラビノース存在下で特異的に発現増加する傾向を示した。Nox ないし ROS 生成はいくつかの菌類で形態分化の誘導に関与することが報告されている。当菌において ROS 生成による形態分化誘導が生ずるかどうかを調べるため、ROS 生成試薬として menadione の投与を行ったところ、培地の糖の種類を問わず、顕著な分生子形成誘導が観察された。HMP shunt 亢進と ROS 生成との協働について今後さらに検証を行ってみたい。

The induction of morphological differentiation through metabolic shift and ROS generation in *Bipolaris maydis*

Hiroshi Yoshida, Chihiro Tanaka

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

P-14

米麴におけるコウジカビの破精込みの蛍光イメージング解析

安井瑞稀¹, 高谷直樹¹, 丸山潤一², 竹下典男¹ (¹筑波大・生命環境系, ²東京大・応生工)

米麴へのコウジカビ菌糸の破精込みは清酒造りの品質管理において重要であるが、破精込みは麴カビ(種)、米(品種・精米歩合)、水分、湿度、温度などによって変化する。本研究では *Aspergillus oryzae* の破精込みを検出し制御することを目的とし、蛍光イメージングを中心に解析を行っている。精米歩合 50% または 90% の酒米(山田錦)または飯米(千代錦)に、GFP で核を標識した *A. oryzae* を生育させて作製した米麴を用いて観察した。その結果、精米歩合 90% より 50% の米でより多く菌糸が米粒中心に破精込んでいる様子が観察された。現在、SEM や X 線 CT による検証と、RNA-seq による遺伝子発現解析を行っている。また、*A. oryzae* の性質を特徴付ける機構を明らかにするため、まず固体培地での核の動態を解析した。培養時間などにより菌糸内の核の数に大きなばらつきが見られた。一方、このようなばらつきは、*A. nidulans* では見られなかった。現在、その原因を探索している。

Fluorescence imaging analysis of fungal mycelial growth in steamed rice

Mizuki Yasui¹, Naoki Takaya¹, Jun-ichi Maruyama², Norio Takeshita¹

(¹Faculty of Life and Environmental Sciences, Univ. of Tsukuba, ²Dept. of Biotechnol, The Univ. of Tokyo)

P-15 (O-1)

Aspergillus fumigatus が産生する真菌型ガラクトマンナンのマンナン主鎖生合成酵素に寄与する 2 つのマンノース転移酵素の同定

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)

肺アスペルギルス症を引き起こす *Aspergillus fumigatus* の細胞壁に含まれ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糖鎖である。FTGM は、細胞壁の最表層に局在することから宿主への感染機構や宿主の免疫機構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マンノース (Man) 糖転移酵素の同定と機能解析を目的とした。まず、5 種の推定 α -1,2-Man 転移酵素遺伝子の破壊株を構築したところ、*cmsA*, *cmsB* と名付けた 2 種類の遺伝子の破壊株において著しい菌糸伸長の抑制、分子形成能の低下、異常な菌糸形態が観察された。そこで、 $\Delta cmsA$ 株および $\Delta cmsB$ 株より FTGM を抽出して ¹H-NMR 解析を行ったところ、マンナン主鎖が失われていることが明らかになった。次に、組換え CmsA による pNP-Man に対する Man 転移反応を検出したところ、酵素反応産物 A が生成した。酵素反応産物 A は、特異的 α -1,2-マンノシダーゼで消化された。また、CmsA は α -(1→2)-マンノビオース (M2) よりも α -(1→6)-M2 に対して、31 倍高い比活性を有していた。以上のことから、CmsA および CmsB は共にマンナン主鎖生合成に寄与し、特に CmsA は、マンナン主鎖構造中の α -(1→6)-M2 の非還元末端側の α -(1→2)-Man 残基を転移する酵素であることが明らかになった。

Identification of two mannosyltransferases contributing to biosynthesis of the fungal-type galactomannan α -core-mannan structure 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-16

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) の解析

湯浅晶¹, 三谷隆宏¹, 菊間隆志², 吉田稔^{1,3,4}, 有岡学^{1,3} (¹東大院・農生科, ²立命館大・生命科, ³東大・微生物連携機構, ⁴理研)

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ヌクレオファジーが報告されている。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。我々は以前炭素源または窒素源枯渇条件がヌクレオファジーを誘導することを明らかにしたが、本研究では栄養源枯渇以外のヌクレオファジー誘導条件を探索した。また、現在ヒストン H2B-EGFP 融合タンパク質を用いたヌクレオファジーの評価系が確立されているが¹⁾、ヌクレオファジーによる核膜タンパク質の分解を確認する評価系の確立を目指した。*A. oryzae* を DPY 培地で 24 時間培養した後、変異原である MMS による処理を行ったところ、麹菌における *ATG8* オルソログである *Aoatg8* 依存的にヌクレオファジーが誘導された。MMS 濃度に応じてヒストン H2B の分解が亢進したことから、核 DNA の損傷によってヌクレオファジーが誘導されることが示唆された。次に核膜局在タンパク質 AoSrc1, AoHmg1 と EGFP の融合タンパク質を発現する株を用いたヌクレオファジーの評価系を検討した。各タンパク質は蛍光観察により核膜への局在が観察された。AoSrc1-EGFP 発現株を栄養源枯渇培地で培養したところ、ヒストン H2B を用いた場合と同様に AoSrc1-EGFP が分解された。現在、この分解が *Aoatg8* 依存的であるかを確認している。

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

Analysis of nucleophagy in *Aspergillus oryzae*

Aki Yuasa¹, Takahiro Mitani¹, Takashi Kikuma², Minoru Yoshida^{1,3,4}, Manabu Arioka^{1,3}

(¹ Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, ² Dept. of Biotechnol., Ritsumeikan Univ., ³ CRIIM, UTokyo, ⁴RIKEN)

P-17

糸状菌の真菌型ガラクトマンナン生合成に関与する新規ガラクトフラノース転移酵素の同定の試み

守田湧貴¹, 尾上拓哉², 太田一良¹, 岡拓二¹ (¹崇城大・生物生命, ²崇城大院・工)

Aspergillus 属糸状菌の細胞壁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。これまでの研究により我々の研究室では、FTGM の生合成に関与するマンノース糖転移酵素およびガラクトフラノース転移酵素の同定に成功している。しかし、 α -(1→2)-/ α -(1→6)-マンナン主鎖に β -ガラクトフラノースを転移する酵素は同定できていない。そこで、本研究ではゲノム情報から絞り込んだ機能未知 II 型膜タンパク質遺伝子の破壊株を構築し、表現型を観察することで、 α -(1→2)-/ α -(1→6)-マンナン主鎖に β -ガラクトフラノースを転移する酵素を同定することを試みた。糸状菌 *A. nidulans* の全タンパク質配列より膜貫通領域予測ツール (TMHMM) を用いて膜貫通領域(TM)を1つのものを選出したところ、692 個の遺伝子が得られた。そのうち推定触媒ドメイン(PCD)が細胞膜の内側にある遺伝子が 427 個であった。さらに、PCD が 250 アミノ酸以上であり、TM が N-末端側にある遺伝子を選出することで 296 個の II 型膜タンパク質遺伝子が得られた。FTGM は糸状菌にしか存在しないことから、出芽酵母のオルソログを除いたところ、231 個の遺伝子が残された。最後に、既に機能が同定されている遺伝子を除いたところ、113 個の遺伝子が機能未知 II 型膜タンパク質をコードしていることが明らかになった。次に、選抜した 113 個の機能未知 II 型タンパク質遺伝子全てに対して遺伝子破壊用 DNA 断片を調製した。現在、調製した遺伝子破壊用 DNA 断片を用いて遺伝子破壊株の取得を試みている。

Attempt of identification of novel galactofuranosyltransferases involved in biosynthesis of fungal-type galactomannans in filamentous fungi

Yuuki Morita¹, Takuya Onoue², Kazuyoshi Ohta¹, Takuji Oka¹

(¹Fac. Biotech. Life Sci., Sojo Univ., ²Grad. Sch. Eng., Sojo Univ.)

P-18 (O-3)

菌糸ネットワークを介した糸状菌と細菌の相互作用の解析

久知良桃花¹, Gayan Abeysinghe¹, 梶尾俊介², 萩原大祐², 高谷直樹², 野村暢彦², 尾花望³, 竹下典男²

(¹筑波大院・生命環境, ²筑波大・生命環境系, ³筑波大・トランスボーダー医学医療研究センター)

微生物複合体の理解と制御のため、異種微生物間の相互作用についての研究が注目を集めている。環境中の主要な微生物である糸状菌と細菌の相互作用に関する知見を得るため、本研究では、糸状菌およびグラム陽性細菌のモデル生物である *Aspergillus nidulans* と *Bacillus subtilis* との相互作用を解析した。液体培養中でそれぞれ単独培養または共培養し、共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、共培養した際に *B. subtilis* が *A. nidulans* の菌糸近傍に多く凝集している様子が観察された。また、固体培地上で共培養を行い、蛍光顕微鏡で観察したところ *B. subtilis* が *A. nidulans* の菌糸に沿って移動する様子が観察され、菌糸の伸長に伴って、*B. subtilis* が生育空間を拡大していることが明らかとなった。*B. subtilis* のべん毛を欠損させた株を用いた実験では、そのような移動と増殖は観察されなかった。RNA-seq により、共培養とそれぞれの単独培養における遺伝子発現を比較した結果、チアミン生合成に関与する遺伝子の発現が、顕著に変化していたため、*A. nidulans* のチアミン要求株と *B. subtilis* を共培養したところ、*A. nidulans* のチアミン要求株の生育阻害が *B. subtilis* により相補された。以上のことから、枯草菌がべん毛を用いて糸状菌の菌糸を利用して移動・増殖すること、また、チアミンを介した協調的な代謝により相互作用することが示された。現在、生態系での相互作用を検証するため、土団粒で共培養しその生育・相互作用をライブイメージングにより解析している。

Networks of fungal hyphae organize bacterial community

Momoka Kuchira¹, Gayan Abeysinghe¹, Shunsuke Masuo², Daisuke Hagiwara², Naoki Takaya², Nobuhiko Nomura²,

Nozomu Obana³, Norio Takeshita²

(¹Grad. Life Environ. Sci., ²Fac. Life Environ. Sci., ³TMRC Fac. Medicine., Univ. Tsukuba)

P-19

新規なガラクトフラノース転移酵素活性測定法を用いた GfsA および GfsC の機能解析

千原由莉亜, 尾上拓哉, 太田一良, 岡拓二 (崇城大院・工)

【目的】本研究室では, *Aspergillus fumigatus* の GfsA が 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。Gal_f 転移酵素の活性測定には, 糖供与体である UDP-Gal_fが必要不可欠である。しかし, UDP-Gal_f は試薬として販売されていないため入手することが困難である。UDP-Gal_fは変換酵素である UDP-ガラクトースムターゼ (GLF) によって UDP-ガラクトース(Gal_p)より生合成されるが, その平衡状態における量比は UDP-Gal_p: UDP-Gal_f = 95: 5 であり, 大きく UDP-Gal_pに傾いている。これまで, UDP-Gal_fを入手するには組換え GLF を用いて合成された僅かな UDP-Gal_fを精製する必要があるが, このことが Gal_f 転移酵素の活性測定を困難なものにしていた。そこで本研究では, 逐次反応系を用いることによる簡易な Gal_f 転移酵素活性の測定法の確立と GfsA および, そのパラログである GfsC の機能解析を目的とした。

【方法・結果】反応系に精製した組換え GLF, UDP-Gal_p, Mn²⁺, pNP-Gal_f および組換え GfsA もしくは組換え GfsC を混合することで逐次的な反応を行い, 反応産物を HPLC により分離検出した。その結果, GfsA および GfsC は, 最大で 4 つの Gal_f 残基を pNP-Gal_f に対して転移する活性を有していた。本方法を用いることで UDP-Gal_p から UDP-Gal_f への変換および UDP-Gal_f からの Gal_f 残基の転移反応が高効率に生じることが示された。また, GfsA および GfsC により生合成された Gal_f 糖鎖の構造は生体内の Gal_f 糖鎖構造と一致していた。以上のことから, GfsA および GfsC は, それぞれが独立して Gal_f 転移酵素活性を持っていることが明らかとなった。

Functional analysis of GfsA and GfsC using novel galactofuranosyltransferase assay.

Yuria Chihara, Takuya Onoue, Kazuyoshi Ohta, Takuji Oka

(Grad. Sch. Eng., Sojo Univ.)

P-20

オートファジーの誘導条件から見た担子菌 *Coprinopsis cinerea* の子実体形成の解析

今村友紀, 小川直紀, 麻田恭彦, 渡邊彰 (香川大・農)

オートファジーとは, 真核生物が保持するバルクな細胞内分解システムの一つであり, 栄養飢餓状態に応答するだけでなく, 分化および発生など, 近年, 様々な生命現象にも関与することが明らかとなってきている。一方, 担子菌 (担子菌キノコ) は菌糸体から子実体への顕著な形態変化機構を有しており, 特に子実体は生長した菌糸体に, 栄養飢餓, 温度, 光などの外的環境要因が付与することにより形成される。以上のことから, 当研究室では, モデル担子菌 *Coprinopsis cinerea* (ウシグソヒトヨタケ) を用いて, そのオートファジーの誘導条件と子実体形成の関連性について解析を進めてきた。まず, オートファジー誘導の有無は, オートファジー誘導時に液胞に運ばれるオートファゴソーム構成タンパク質 Atg8 (Cc.Atg8) と緑色蛍光タンパク質との融合タンパク質の局在解析から行った。その結果, 窒素源飢餓状態や糖源飢餓状態に加え, リン酸源飢餓状態でも, 緑色蛍光の液胞への蓄積が観察され, それらの条件でオートファジーが誘導されることが示唆された。次に, *C. cinerea* を, 生育に必要な栄養源が入った培地 (栄養培地) で十分に培養し, その後, 同じ栄養培地の他, オートファジーを誘導した窒素源飢餓培地, 糖源飢餓培地, そしてリン酸源飢餓培地へ移し替えた。その結果, 同じ栄養培地に移し替えた場合では子実体の形成は観察されなかったが, 窒素源飢餓状態および糖源飢餓状態では子実体が, そしてリン酸源飢餓状態では子実体原基と見られる構造体の形成が観察された。以上のことは, *C. cinerea* におけるオートファジーの誘導と子実体形成の深い関連性を示唆するものであり, 今後は, この関連性についてオートファジーの発現制御の面から解析を進める予定である。

Analysis of fruiting-body formation in basidiomycete *Coprinopsis cinerea* on the view of autophagy induction.

Yuki Imamura, Naoki Ogawa, Yasuhiko Asada, Akira Watanabe

(Fac. of Agr., Kagawa Univ.)

P-21 (O-12)

アミノ酸配列だけではわからない糖質加水分解酵素の機能とそのシナジー

松沢智彦, 矢追克郎 (産総研・生物プロセス)

微生物は環境中に存在する多糖類(例えば植物由来多糖類)を利用するために様々な糖質加水分解酵素等を生産している。糖質加水分解酵素はアミノ酸配列に基づいて分類され、酵素学的・生化学的に機能同定されていないタンパク質も類似タンパク質の知見から、その機能の予測が行なわれている。近年、ゲノム解析技術の大きな進歩や、トランスクリプトーム解析・プロテオーム解析等のオミックス解析の普及により、配列情報を基にしたタンパク質や遺伝子の機能予測、また、その機能予測を基にしたオミックスデータの解釈が行なわれている。

しかし、アミノ酸配列だけでは正確に酵素の機能を予測することは難しい。本発表では、アミノ酸配列からは予測できなかったユニークな機能を有する麹菌 *Aspergillus oryzae* 由来イソプリメベロース生成酵素及び本酵素と協調的に働く糖質加水分解酵素を見出したので発表する。イソプリメベロース生成酵素 (IpeA と命名) のアミノ酸配列は β -グルコシダーゼに類似しているが、その機能は β -グルコシダーゼとは大きく異なり、キシログルカンオリゴ糖(植物の細胞壁や種子に含まれる多糖類に由来するオリゴ糖)の非還元末端からイソプリメベロース(α -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-D-glucopyranose)を遊離するユニークな酵素である。本酵素は厳密にイソプリメベロースユニットを認識して切断する。IpeA の基質特性試験及び結晶構造解析から、本酵素の緻密な基質認識メカニズムを明らかにすることに成功した。また、キシログルカンオリゴ糖の分解において IpeA と協調的に働く糖質加水分解酵素を新たに見出したので発表する。

Characterization of novel glycosidases and synergetic effects of these glycosidases

Tomohiko Matsuzawa, Katsuro Yaoi

(AIST, BPRI)

P-22

ゲノムマイニングによって新たに見出した麹菌のキシラナーゼ(XynB)の酵素学的諸性質

渡部昭, 小幡公平, 笹嶋由佳, 氏家成隆, 新谷尚弘, 五味勝也 (東北大院農・生物産業創成)

【目的】我々は、セルロース系バイオマス高分解酵素の取得を目的に、麹菌(*Aspergillus oryzae*)ゲノム情報を元にゲノムマイニングの手法でこれまで未解析の新規セルラーゼ、ヘミセルラーゼの機能解明を行ってきており、作製したセルラーゼ遺伝子の網羅的高発現株から新規なエンドグルカナーゼ、 β -グルコシダーゼを精製しその酵素学的諸性質を報告してきた。今回は、セルラーゼに比べて報告例の少ないヘミセルラーゼのうち Glycoside Hydrolase Family 10(GH10)に属する新規キシラナーゼ(XynB)を新たに見出したのでその酵素学的諸性質について報告する。

【結果と考察】麹菌ゲノムデータベース(DOGAN: <http://www.bio.nite.go.jp/dogan/top>, AspGD:<http://www.aspgd.org/>)を用いて探索し、麹菌ゲノムDNAを鋳型としたPCR反応で目的DNA断片を増幅後、麹菌高発現用ベクター(pNGA142)に組み込み作製した推定キシラナーゼ遺伝子の網羅的高発現株から取得した新規キシラナーゼ(XynB)を、硫酸塩析、陰イオン交換クロマトグラフィーを用いて精製し酵素学的諸性質を調べた。XynBは主として硫酸50~65%沈殿画分に回収されたので、その後 Super-Q Toyopearl 650M 陰イオン交換カラムクロマトグラフィーに供することで精製した。精製した XynB は、SDS-PAGE による解析ではゲノム情報から推定される 35kDa の位置に単一バンドとして検出された。また、本酵素高発現株を用いた基質 AZCL-Xylan によるプレートアッセイでは、本酵素は同じ麹菌由来で既に報告のある GH10 に属する 2 つの酵素(XynF1, XynF3)と同等の活性を示した。この他の本酵素の諸性質を併せて報告する。

Purification and enzymatic characterization of a novel xylanase (XynB) from *Aspergillus oryzae*

Akira Watanabe, Kohei Obata, Yuka Sasajima, Seiryu Ujiie, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi

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

P-23

各種キチナーゼの糸状菌に対する植物生体防御機構における役割

平良東紀¹, 大沼貴之² (¹琉大・農, ²近畿大・農)

植物においてキチン分解酵素(キチナーゼ)は、糸状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、糸状菌の侵入・増殖を抑制する生体防御機構の一部を担ってい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。また、GH19 キチナーゼにおいてはループ領域の有無によって、全てのループを有する Loopful 型と一部のループを欠損した Loopless 型が存在する。GH18 キチナーゼにおいては、(β/α) 8 バレル構造のみから成るクラス III 型と、バレル構造の途中にインサクション領域があるクラス V 型が存在する。

本発表では、これら様々な構造を有する植物キチナーゼそれぞれの、生体防御機構における役割について、構造、基質分解特性、抗真菌活性およびキチンオリゴ等エリシターによる誘導性等の我々の研究成果に基づき、考察する。

Roles of various chitinases in plant defense system against filamentous fungi

Toki Taira¹, Takayuki Ohnuma²

(¹Dept. of Biosci. & Biotechnol., Univ. of Ryukyus, Dept. of Biosci., Kinki Univ.)

P-24

麹菌の酸性ホスファターゼ A 遺伝子の破壊および高発現が醤油醸造に及ぼす影響

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

【目的】醤油や料理酒などの液状醸造食品では時折、加工・流通・保存の過程でオリ(沈殿物や濁り)が発生し、問題となることがある。オリ原因物質のひとつであるフィチンは、大豆や米などの植物原料に存在するリン貯蔵物質で、通常は醸造中に分解されるが、残存するとフィチンオリの発生原因となりうる。これまでの *Aspergillus oryzae* 由来酸性ホスファターゼ (AoAph(s)) の解析から、フィチンオリの発生は、フィターゼ活性を有する AoAphA が十分働かない醸造条件に起因すると考えている。今回は、AoAphA の遺伝子破壊株および高発現株を用いて醤油小仕込試験を行い、AoAphA の活性の醤油への影響を調べた。

【方法・結果】遺伝子破壊株は *A. oryzae* KBN630 を親株とした Δ aphA 株を、遺伝子高発現株は KBN616 を親株とした Hi-AoAphA 株 (promoter : *taaG2* gene) を用い、それぞれの親株を対照として使用した。作製した醤油麹中のフィターゼ活性は、 Δ aphA 株では親株の 9% に低下し、Hi-AoAphA 株では親株の 1,000 倍に上昇した。フラスコに醤油麹と食塩水を加えて混合し、15°C で 1 か月消化させた後、醤油酵母を加え 30°C で 3 か月間発酵させて醤油を作製した。発酵の経過では、 Δ aphA 株の諸味は対照との差がほとんど見られなかったが、Hi-AoAphA 株の諸味は対照に比して、①酵母のガス発生が長期間持続した、②諸味の固形物の大きさが細かくなり沈みにくくなった、③色がより早い時期から濃くなった、という差が見られた。濾過後の生醤油の「色度、全窒素分、食塩分、アルコール分、直接還元糖分」を測定した結果、 Δ aphA 株の生醤油は対照と差がほとんど見られなかったが、Hi-AoAphA 株の生醤油は pH が高く、アルコールが低く、色度が濃くなった。生醤油を火入れ (80°C で加熱) したところ、 Δ aphA 株の醤油のみに、「火砕流のような綿状オリ」すなわちフィチンオリ発生に特徴的な現象が観察された。

Effect of *AoaphA* gene disruption and its overexpression in *Aspergillus oryzae* on *Shoyu* brewing

Shoko Yoshino-Yasuda, Natsuko Ono, Osamu Hasegawa, Hironobu Mano

(Food Res. Center, Aichi-Inst)

P-25

Aspergillus oryzae によるタンナーゼの高発現とその酵素学的諸性質

市川響太郎¹, 塩野義人¹, 新谷智子², 渡部昭², 神崎浩³, 五味勝也², 小関卓也¹ (¹山形大・農, ²東北大院・農, ³岡山大院・環境生命)

[背景・目的] 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し、茶飲料やワイン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利用されている。本研究では *Aspergillus oryzae* 由来タンナーゼ遺伝子 *AotanB* (AO090023000047) を高発現用 *glaA142* プロモーターの制御下で発現させ、その酵素を AoTanBO とし、諸性質を解析した。また、*Pichia pastoris* で以前発現させた *AotanB* を AoTanBP と名付け、異なる発現系から得られた AoTanB の比較を行った。

[方法・結果] AoTanBO は *AotanB* を形質転換した *A.oryzae* を、マルトースを含む液体培養で誘導し、発現させた。AoTanBP は *AotanB* を形質転換した *P.pastoris* GS115 株を、メタノールを含む液体培養で誘導し、発現させた。精製した酵素でのタンナーゼ活性は AoTanBO が AoTanBP よりも顕著に高かった。精製 AoTanBO は AoTanBP と同様に最適 pH6.0, 最適温度 30-35°C を示した。一方、AoTanBO は 60°C (>85%) まで安定で、40°C (>80%) までの AoTanBP との差異が見られた。精製 AoTanBO は SDS-PAGE において 80-100kDa 付近、一方 AoTanBP では 90-120kDa 付近にスミアなバンドを示したことから、両酵素は糖鎖付加様式が異なることが示唆された。そこで、非還元条件下で *N*-糖鎖を除去し、熱安定性への関与を調べたが、*N*-糖鎖の影響はないと考えられた。現在、タンパク質の構造にわずかな違いがあると推測し、解析を進めている。

High level expression of tannase-encoding gene *AotanB* in *Aspergillus oryzae* and characterization of the recombinant enzyme

Kyotaro Ichikawa¹, Yoshihito Shiono¹, Tomoko Shintani², Akira Watanabe², Hiroshi Kanzaki³, Katsuya Gomi², Takuya Koseki¹

(¹Fac. Agric., Yamagata Univ. ²Grad. Sch. Agric.Sci., Tohoku Univ. ³Grad. Sch. Environ. Life Sci., Okayama Univ.)

P-26

担子菌ヒラタケにおける *vp2*, *vp3* の破壊が、リグニン分解および他のリグニン分解酵素の転写発現に及ぼす影響

坂知奈美¹, 中沢威人¹, 山田美紗登², 西村裕志², 竹中敦紀¹, 渡辺隆司², 坂本正弘¹, 本田与一¹ (¹京大院・農, ²京大・生存研)

これまでに白色腐朽菌ヒラタケの野生株 PC9 をブナ木粉培地上で培養した際、主に発現しているリグニン分解酵素遺伝子は多機能型ペルオキシダーゼをコードする *vp2* と *vp3* であることが示された。本研究では、これらの遺伝子の破壊が、本菌のリグニン分解系にどのような影響を与えるか調査した。PC9 由来の *ku80* 破壊株である 20b 株を用いて *vp2* および *vp3* の単独および二重破壊株を作成した。ブナ木粉培地上で 18 および 28 日間培養した後、Klason 法および HSQC 解析によって、木粉培地中のリグニン減少量および化学結合組成変化を分析した。その結果、*vp2* 単独破壊株と *vp2*, *vp3* 二重破壊株を野生株と比較した際、いくつかの化学結合組成変化に違いがあったものの、量的なリグニンの減少には大きな変化は観察されなかった。一方、RNA-seq 解析の結果からは、二重破壊株においてマンガンペルオキシダーゼ *mnp1* の転写が著しく、*mnp2* および *mnp6* の転写も若干上昇していることが明らかとなった。以上の結果から、ヒラタケでは主要なリグニン分解酵素遺伝子が機能を喪失した際、その影響を補うような転写調節機構が存在することが示唆された。

Effects of *vp2* and/or *vp3* disruptions on lignin degradation system in white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*

Chinami Saka¹, Takehito Nakazawa¹, Misato Yamada², Hiroshi Nishimura², Atsuki Takenaka¹, Takashi Watanabe², Masahiro Sakamoto¹, Yoichi Honda¹

(¹Grad. Sch. Agr., Kyoto Univ., ²RISH, Kyoto Univ.)

P-27

白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* 由来のシトクロム P450 CYP505D6 の基質特異性に重要なアミノ酸残基の特定

ワイズ里沙, 酒井杏匠, 志水元亨, 加藤雅士 (名城大院・農)

白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* はゲノム中に 154 のシトクロム P450 (P450) 遺伝子を有しており, その中で class 3 に属する P450 と P450 レダクターゼの融合タンパク質が 7 種存在していた。これまで class 3 P450 の機能については, 枯草菌由来の P450BM3 (CYP102A1) や糸状菌 *Fuzarium oxysporum* の P450foxy (CYP505A1) について詳細に研究がなされ, 飽和脂肪酸の ω -1 ~ ω -3 位を水酸化することが明らかとなっている。本研究では *P. chrysosporium* 由来の class 3 P450 である CYP505D6 の機能解析を行った。CYP505D6 は 1-ドデカノールの ω -1 ~ ω -7 位, ラウリン酸の ω -1 ~ ω -6 位を水酸化した。CYP505D6 と CYP102A1 の配列を比較したところ, 活性部位の入り口付近に存在する Y51 が V であった。CYP505D6 の V51Y 変異型酵素では ω -4 ~ ω -6 位の水酸化産物が減少したことから, V51 が反応産物の位置選択性を広くすることに重要であった。さらに, CYP505D6 は芳香族化合物も水酸化し, 広い基質特異性を有していた。水酸化脂肪酸は生体内では生理活性物質およびシグナル物質として働いており, その広い基質特異性から CYP505D6 は様々な水酸化脂肪酸の合成に利用できると考えられる。

Substrate specificity of a self-sufficient cytochrome P450 CYP505D6 from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*

Lisa Wise, Kiyota Sakai, Motoyuki Shimizu, Masashi Kato

(Grad. Sch. Agric., Univ. of Meijo)

P-28

Aspergillus luchuensis 由来フェノール酸脱炭酸酵素の諸性質および誘導物質の探索

眞榮田麻友美¹, 渡嘉敷正司², 渡嘉敷みどり², 上地敬子³, 平良東紀^{1,3} (鹿大院・連農,²石川種麴店,³琉大・亜熱生資)

泡盛は米を原料として黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* を用いて製麹した麴を酵母によって発酵させ, 得られたモロミを蒸留し製造される沖縄の伝統的な蒸留酒である。泡盛古酒の特徴香バニリンは, 原料米のフェルラ酸 (FA) に由来し, 醸造中に FA の脱炭酸反応によって出来た 4-ビニルグアヤコール (4-VG) が貯蔵中に非酵素的酸化によって生成されたものである。醸造中の FA から 4-VG への変換は, 酵母または乳酸菌等のフェノール酸脱炭酸酵素 (PAD) によるものだと考えられてきた。一方, *A. luchuensis* のゲノム上に, 細菌類由来 PAD と相同性を有する配列が存在する。本研究では, *A. luchuensis* の PAD (AIPAD) 候補遺伝子を大腸菌で発現させ得られたリコンビナント AIPAD の諸性質を調べると共に, AIPAD の誘導物質の探索を行った。

リコンビナント AIPAD は FA を 4-VG に変換する十分な活性を示した。最適 pH は 5.7 付近, 最適温度は 40°C だった。誘導実験の結果, AIPAD 量は 1%米ぬか添加区で最も高く, 1 mM FA 添加区は 1/3 程度, 1%米粉および 2%グルコース添加区ではほとんど検出されなかった。また, AIPAD の誘導性が見られた米ぬかや FA に 1%グルコースを添加すると AIPAD の発現は著しく抑制された。米ぬか熱水抽出物を各種クロマトグラフィーに供した結果, 本誘導物質は分子量が小さく極性の高い物質であることが示唆された。活性画分の成分分析を行ったところ, グルコースを含む 2 糖が検出された。

Characterization and induction of phenolic acid decarboxylase from *Aspergillus luchuensis*

Mayumi Maeda¹, Masashi Tokashiki², Midori Tokashiki², Keiko Uechi³, Toki Taira^{1,3}

(¹Kagoshima Univ. United Gra. Sch. of Agr. Sci., ²Ishikawatanejojiten, ³Dept. of Biosci. & Biotechnol., Univ. of Ryukyus)

P-29 (O-11)

麴菌由来界面活性タンパク質 hydrophobin RolA の液中における性質と挙動

西沢知華, 大沢千晶, 田中拓未, 七谷圭, 阿部敬悦 (東北大学院・農・生物産業創成)

hydrophobin は糸状菌の細胞壁表面に局在する界面活性蛋白質であり, 気中菌糸形成や固体高分子への菌糸接着など, 形態形成に深く関与することが知られている。我々は, 麴菌 *Aspergillus oryzae* の hydrophobin RolA がポリエステル表面に吸着し, ポリエステラーゼをポリエステル表面へ濃縮する現象を見出した¹⁾。この現象は, RolA が固体表面上で自己組織化構造を形成することで発現すると思われる。しかし, 一定の自己組織化構造を再現性よく形成させるためには, RolA の液中での安定化状態, 固体表面への RolA の吸着機構, RolA の自己組織化メカニズム等の基礎的な知見が未だ乏しい。そこで本研究では, 液中における RolA 分子の存在状態を解明することを目的とした。

Native-PAGE の結果, RolA は濃度条件には依存せず, 液中で主に四量体で存在することが明らかとなった。SDS-PAGE からは RolA の大部分が単量体であり, 一部が多量体を形成している結果が得られた。ここから, RolA は SDS で単量体へ解離するが, 一部は解離せずに会合していることが推察された。さらに, サイズ排除クロマトグラフィーの結果から, 高塩濃度条件下では RolA は主に二量体で存在していることが示唆された。また, ボルテックス処理することで RolA の自己組織化を促進した場合, Native-PAGE ではバンドが確認されなかったが, SDS-PAGE では単量体の存在が確認できた。すなわち, ボルテックス処理で形成された巨大な多量体中の一部の RolA 分子は, SDS で単量体へ解離する弱い会合状態にある可能性が推察された。以上から, RolA は液中において主に二量体または四量体として安定化しており, その会合は塩や SDS により比較的容易に解離する性質を持つことが示唆された。

1) Takahashi T., et al, *Mol Microbiol* (2005) 57: 1780

Properties and behavior of hydrophobin RolA of *Aspergillus oryzae* in the liquid condition.

Haruka Nishizawa, Chiaki Osawa, Takumi Tanaka, Kei Nanatani, Keietsu Abe

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

P-30

マツタケゲノム上に存在する GH7, Cellobiohydrolase と相同性を示す遺伝子の機能解析

大沼広宜, 福田泰久, 白坂憲章 (近畿大・農)

【目的】木材中のセルロースを分解することが可能な木材腐朽菌において, セルロース分解の鍵となるのは, セルロースの非結晶領域からセロビオースを遊離する Cellobiohydrolase (CBH) であるとされている。一方, 木材と共生関係を持つとされる菌根形成菌のマツタケにおいては, セロビオースを単糖にする β -glucosidase 活性を示すものの, セルロースからセロビオースを遊離するための CBH 活性を示さず, セルロースをほとんど分解出来ないとされてきた。しかしながら, マツタケゲノム上には CBH と相同性を示す遺伝子が存在し, 多糖類での培養により相対発現量が増加することが明らかになっている。そこで本研究では, マツタケ NBRC 30605 株由来の CBH 様遺伝子 *TmCel7A* の機能解析を行うため *Pichia pastoris* による異種発現を試みると共に, セルロース分解への関与について検討した。

【方法・結果】マツタケ NBRC 30605 ゲノムライブラリーに *Phanerochaete chrysosporium* 由来 GH7 Cellulase (accession no. CAA82762) をリファレンスとして相同性検索を行ったところ, 65%の相同性を有する CBH 様遺伝子 (*TmCel7A*) が存在した。マツタケ培養菌糸体より *TmCel7A* の cDNA 断片を PCR クローニングにより取得し, *P. pastoris* X-33 株内で発現させた。*TmCel7A* は, セロテトラオース, セロペンタオース, セロヘキサオースに対して加水分解活性を有していたが, 微結晶性セルロースには加水分解活性を示さなかった。これは, *TmCel7A* が CBM ドメインを有していないことによるセルロース結合が出来ないことに起因することが推察された。現在, *TmCel7A* の詳細な諸性質について検討している。

Functional analysis of a Glycoside hydrolase family 7; Cellobiohydrolase gene from *Tricholoma matsutake*

Hiroki Onuma, Yasuhisa Fukuta, Norifumi Shirasaka

(Fac. Agr., Kindai Univ.)

P-31

糸状菌分泌ペルオキシダーゼの探索と解析

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 (POD) は、過酸化水素を電子受容体として様々な基質の酸化を触媒する酵素であり、真菌の分泌型 POD には、自然界において植物バイオマスの変換および分解を媒介するものが多く知られる。これらの酵素は、芳香族化合物に対して強い酸化活性を有し、植物のリグニンおよび腐植の分解、紙パルプや色素の生物漂白への利用が期待されている。

我々は、真菌由来の新規の POD を見出すために、糸状菌 145 株を培養し、培養上清中に、過酸化水素の存在下で 2, 2'-アジノ-ビス (3-エチルベンゾチアズリン-6-スルホン酸) (ABTS) を酸化する活性を発現するものをスクリーニングした。その結果、高い POD 活性 ($> 5.0 \text{ nmol min}^{-1}\text{mL}^{-1}$) を示す *Lachnum palmae*, *Virgatospora echinofibrosa*, *Graphilbum pleomorphum* の 3 種の糸状菌株を得た。そのうち、*L. palmae* の培養上清は高い POD 活性を示し ($38.3 \text{ nmol min}^{-1}\text{mL}^{-1}$)、活性染色により単一のバンドが検出されたことから、一種の POD を分泌生産することが示された。2 L の培養上清から、限外ろ過および陰イオン交換カラムクロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー等を用いて POD を精製し、SDS-PAGE 上で 82 kDa の分子量を示す $136 \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ の POD が得られた。この活性は、pH4.5 で最大となり、熱処理 (100°C , 5 分間) で失活し、1 mM の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 %以上が阻害された。この酵素は ABTS 以外に TMB, ピロガロール, グアヤコールを基質とした ($> 1.0 \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$)。一方、*V. echinofibrosa* の培養上清は、過酸化水素の非存在下で $5.5 \text{ nmol min}^{-1}\text{mL}^{-1}$ の ABTS 酸化活性を示したことから、本菌が細胞外ラッカーゼを産生することが示された。

Screening and identification of fungal secretory peroxidases.

Yuka Kitamura, Shunsuke Masuo, Norio Takeshita, Naoki Takaya

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

P-32

麴菌のオリゴペプチドトランスポーターの同定とその遺伝子発現様式の解析

田中瑞己¹, 伊藤圭祐¹, 河原崎泰昌¹, 五味勝也² (¹静岡県大・食栄, ²東北大院・農)

麴菌の菌体外プロテアーゼ遺伝子の発現は、大豆ペプチドなどによって誘導されることが知られている。出芽酵母では、proton-dependent oligopeptide transporter (POT) である Ptr2p によってジ・トリペプチドが取り込まれる。一方、麴菌のゲノム配列中には Ptr2p と高い相同性を有するトランスポーター遺伝子が 15 個存在するが、機能は明らかとなっていない。本研究では、麴菌における複数のオリゴペプチドトランスポーターを同定し、それらの遺伝子発現解析を行った。

大豆ペプチド存在条件における発現を RT-PCR で調べた結果、3 個のトランスポーター遺伝子が強く発現していた。出芽酵母の ptr2 破壊株を用いた機能相補試験により、これらがジ・トリペプチド取り込み能を有していたことから、それぞれ PotA, PotB, PotC と命名した。定量 PCR 解析によりそれぞれの遺伝子の発現量を調べた結果、potA は最小培地を用いた前培養時にはほとんど発現しておらず、大豆ペプチド添加培地で培養することで約 35 倍に発現量が増加した。一方、potB と potC は前培養時にも一定の発現が見られ、大豆ペプチド添加培地で培養することで数倍にそれぞれ発現量が増加した。菌体外プロテアーゼ遺伝子の発現を制御する転写因子 (prtR) を破壊すると、potA と potB の発現量がコントロール株と比較して減少したのに対し、potC の発現量は減少しなかった。また、prtR を強制発現させると、大豆ペプチド非存在条件でも potA と potB の発現が強く誘導されたのに対し、potC の発現はコントロール株とほとんど変化しなかった。以上の結果から、麴菌の 3 個のオリゴペプチドトランスポーター遺伝子の発現は、それぞれ異なる制御機構によって発現が制御されていることが示唆された。

Identification of *Aspergillus oryzae* oligopeptide transporters and analysis of their gene expression patterns

Mizuki Tanaka¹, Keisuke Ito¹, Yasuaki Kawarasaki¹, Katsuya Gomi²

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

P-33 (O-9)

RNA-sequencing による糸状菌の一酸化窒素応答の解析

萩原大祐^{1,2}, 二宮章洋¹, 浦山俊一¹, 高木博史³ (筑波大・生命環境,²千葉大・真菌セ,³奈良先端大・バイオサイエンス)

一酸化窒素 (NO) は、動植物や微生物で細胞内機能の調節に関与していることが知られている。特に、タンパク質の S-ニトロソ化やニトロ化を通して、情報伝達因子としての生理機能を果たすことが示されている。一方、NO はフリーラジカルであり、過剰な生成・蓄積は細胞毒性を示すため、適切な応答機構が備わっていると考えられるが、糸状菌においてこれらの詳細な機構は明らかにされていない。本研究では、糸状菌の NO 応答機構を解明するために、NO 供与体である S-nitroso N-acetylpenicillamine (SNAP) 存在下のトランスクリプトーム解析を行った。*Aspergillus fumigatus* を CD 培地で液体培養し、SNAP を添加後 1 時間に菌体を回収して RNA-sequencing 解析を行った。SNAP 非添加時に比べて、発現量が 4 倍以上上昇および減少した遺伝子は、それぞれ 66, 197 個見出された。中でも、シデロフォアの産生に関与する遺伝子群の発現低下が認められた。また、hexadecydro-astechrom や fumisoquin/fumipyrrole の二次代謝生成遺伝子クラスター (*has, fsq/fmp*) の発現が上昇していることも明らかになった。これらの発現上昇は、異なる NO 供与体を用いても観察され、添加後 4 時間まで漸次的に増大した。一方、二次代謝のマスターレギュレータ *LaeA* が欠損した株においては、両クラスターの遺伝子は極めて低い発現量を示し、NO による発現応答は見られなかった。現在、NO 供与体の添加により誘導される当該クラスターに由来する物質の生産を確認中である。これらの解析から、NO が糸状菌の二次代謝を調節 (活性化) する生理機能を有している可能性が示唆された。

Elucidation of response to nitric oxide in filamentous fungi by RNA-sequencing analysis

Daisuke Hagiwara^{1,2}, Akihiro Ninomiya¹, Syun-ich Urayama¹, Hiroshi Takagi³

(¹Fac. of Life & Env., Univ. of Tsukuba, ²MMRC, Chiba Univ., ³Grad. Sch. Sci. & Tech., Nara Inst. of Sci. & Tech.)

P-34

青色光によるウシグソヒトヨタケの子実体発生誘導に関わる遺伝子の解析

坂本裕一¹, 佐藤志穂¹, 中沢威人², 村口元³, 石井一夫⁴, 刑部敬史⁵ (岩手生工研,²京大院・農,³秋田県立大,⁴久留米大,⁵徳島大)

ウシグソヒトヨタケは青色光照射により、低グルコース (0.2%) 条件で同調的な子実体発生を誘導することができる。これまでに青色光照射 1 時間後に 4 遺伝子 (*fas1, cfs1, cfs2, nod1*) の発現が上昇すること、およびそれらの遺伝子はグルコース濃度に依存しないことを明らかにしている。ゲノム編集によりそれらの遺伝子破壊を行い、表現型を解析した。その結果、*cfs1* のみ子実体発生誘導が抑制され、*cfs1* 以外の遺伝子破壊株は青色光照射により同調的な子実体発生が認められた。また、得られた子実体は野生株と同様の形態を示した。RNA-seq 解析により 1 時間後に発現が上昇する遺伝子の特定と発現パターンの解析を行った。その結果、青色光照射 1 時間後に、転写制御関連および脂質合成に関わる遺伝子群の発現上昇が認められた。転写制御に関わると考えられる遺伝子のうち、BTB/POZ ドメインを有する遺伝子および Fungal transcriptional regulatory protein は、子実体発生が抑制される高グルコース (1%) 条件では発現が抑制されていた。既知の青色光受容体 (*dst-1, dst-2, wc2*) が同調的な子実体発生誘導にも関わるかどうかを調べるために、ゲノム編集によりそれぞれの破壊株を作成した。その結果、それらのゲノム編集株は既報通り傘が開かない子実体の形態を示した。一方それらのゲノム編集株は青色光照射による同調的な子実体発生誘導は認められなかった。そこで、青色光照射 1 時間後の遺伝子発現を調べたところ、*fas1* および *cfs1* の発現誘導が認められなかった。以上のことから、既知の青色光受容体は青色光による子実体の同調的な発生誘導にも寄与している可能性が高いことが示唆された。

Identification of genes involved in fruiting body induction by blue light in *Coprinopsis cianrea*

Yuichi Sakamoto¹, Shiho Sato¹, Takehito Nakazawa², Hajime Muraguchi³, Kazuo Ishii⁴, Keishi Osakabe⁵

(¹IBRC, ²Kyoto Univ., ³Akita Pref. Univ., ⁴Kurume Univ., ⁵Tokushima Univ.)

P-35

麹菌の二次代謝系遺伝子の転写制御の迅速な解析

町田雅之, 石井智子, 佐野元昭 (金沢工業大学・ゲノム研)

麹菌の二次代謝系遺伝子の発現は、一般に低レベルに抑えられていることが知られているが、コウジ酸やペニシリンなどの遺伝子は培養条件の最適化によって発現することが報告されている。二次代謝系遺伝子の発現は、他の糸状菌種でも通常の培養条件では抑制されていることが多く、培養条件を変更して試したとしても、ゲノム上に存在する二次代謝系の10%程度しか発現させることしかできないとも言われている。このことは、二次代謝の研究や生理活性物質のスクリーニングの観点から大きな課題となっている。二次代謝系遺伝子の発現には様々な条件その組合せが関与しており、発現する条件を探し出すことが困難な場合が多い。そこで本研究では、様々な培養条件とその組合せを迅速に探索することによって、迅速・効率的に発現条件を見つけること、及び、様々な二次代謝系遺伝子の発現条件を比較解析することで、二次代謝系遺伝子の発現する可能性が高い培養条件とその組合せを推定することを目的として、新規なレポータ遺伝子系による迅速な発現制御の解析と、それを用いた代表的な二次代謝系遺伝子の発現制御の解析を行った。

麹菌ゲノム上の遺伝子より、コウジ酸、メバロン酸など、二次代謝系とその周辺の遺伝子を選択し、これらの遺伝子のプロモーター領域の下流に分泌性のルシフェラーゼを接続したDNA断片を作製した。この断片を麹菌のゲノム中に組込むことによって、上記遺伝子プロモーター制御下に、培地中にルシフェラーゼを発現する形質転換体を得た。*amyB* プロモーターをコントロールとした実験により、マルトースによる誘導性を明確に判別できることが確認された。また、*melB* プロモーターの解析では、小麦ふすままでの高い誘導が観察されると共に、低温での誘導が観察された。現在、*kojT* プロモーターによる解析なども進めている。

Rapid analysis of transcription regulation of secondary metabolism genes in *Aspergillus oryzae*

Masayuki Machida, Tomoko Ishii, Motoaki Sano

(Kanazawa Inst. of Technol. (KIT))

P-36

Trichoderma reesei の新規糖質加水分解酵素発現制御因子の同定

鈴木義之¹, 佐藤直美¹, 内山拓², 尾崎克也², 小林良則², 掛下大視³, 五十嵐一暁³, 田代康介⁴, 森一樹⁵, 油谷幸代⁵, 志田洋介¹, 小笠原渉¹ (¹長岡技科大院・技学イノベーション, ²JBA, ³花王, ⁴九大院・農, ⁵産総研)

【緒言】 効率的なバイオマス糖化には、各バイオマスの分解に適した酵素成分で構成される糖化酵素が必要である。数種類の酵素を個別に制御する因子「複数遺伝子制御因子」を介して簡便に酵素の生産比率を操作する手法が確立できれば、各バイオマスの分解に最適な菌株の構築が容易に行えると期待される。そこで本研究では、糸状菌 *Trichoderma reesei* に適合した Dry 解析技術「遺伝子ネットワーク解析」を開発し、活用することで糖質加水分解酵素群の生産比率を制御する因子を同定することを目的とした。

【方法と結果】 *T. reesei* の世界的標準株 QM9414, 高生産変異株 PC-3-7 およびそれらの転写調節因子変異株を種々の条件と栄養源で培養した菌体由来する 189 条件のマイクロアレイ解析と表現型解析の結果を元に、遺伝子ネットワーク解析を実施し、複数遺伝子制御因子として因子 1, 2, 3 を推定した。PC-3-7 をベースにこれら因子の遺伝子破壊株を構築し、そのオーム解析・酵素活性解析・糖化能解析を実施した。その結果、これら破壊株は複数の酵素生産比率が変化しているのに加え、因子 1 は培養初期のタンパク生産速度が 2 倍に達し、因子 2 と 3 については糖化能がそれぞれ 30% および 12% 向上していた。

Identification of novel regulatory factors of glycoside hydrolase expression from *Trichoderma reesei*.

Yoshiyuki Suzuki¹, Naomi Sato¹, Taku Uchiyama², Katsuya Ozaki², Yoshinori Kobayashi², Hiroshi Kakeshita³, Kazuaki Igarashi³, Kosuke Tashiro⁴, Kazuki Mori⁵, Sachiyo Aburatani⁵, Yosuke Shida¹, Wataru Ogasawara¹

(¹Dept. of Sci. of Tech. Innov., Nagaoka Univ. of Tech., ²JBA, ³Kao co., ⁴Dep. Biosci. and Biotech., Kyushu Univ.,

⁵AIST)

P-37

担子菌ヒラタケにおける多様なリグニン分解不全変異株の比較トランスクリプトーム解析

竹中敦紀, 中沢威人, 呉紅麗, 小寺里奈, 森本亮太, 坂本正弘, 本田与一 (京大院・農)

白色腐朽菌は、木質中のリグニンを効率的に分解することができる生物である。しかし、そのリグニン分解機構については、転写制御を含め不明な点が多い。当研究室の先行研究では、ヒラタケにおける順遺伝学的な解析により、転写レベルの制御に影響すると考えられる *wtr1*, *chd1*, *gat1*, *hirA*, 及びペルオキシソーム形成に必須な *pex1* の変異が、リグニン分解能力に欠陥を生じることが示された。本研究では、野生株とこれらのリグニン分解不全株との間で転写発現プロファイルを比較した結果を報告する。各株をブナ木粉培地上で13日間培養した後に抽出した全 RNA を用いて RNA-seq 解析を行ない、FPKM 値を比較した。全てのリグニン分解不全株において、当該培養条件において野生株で最も転写量が多い多機能型ペルオキシダーゼ遺伝子 *vp2* や複数の Copper Radical Oxygenase など、リグニン分解系に含まれると考えられる酵素遺伝子の転写量が顕著に低下していた。一方で、*wtr1* 遺伝子破壊株を除く全ての不全株において、 β グルカナーゼ (GH6, GH7) および溶解性多糖モノオキシゲナーゼ (LPMO, AA9) など、セルロース分解系に含まれると考えられる酵素遺伝子の転写量が顕著に上昇していることが示された。実際に、幾つかの不全株を用いて菌体外 CMC 分解活性を調査したところ、活性の上昇が示された。また主成分分析を通して、菌糸細胞壁外で低分子量蛋白質層を形成するハイドロフォビン及び Cerato-platanin をコードする遺伝子が、リグニン分解活性が最も低下している *gat1* 変異体において特徴的な転写変動を示したので、あわせて報告する。

Comparative transcriptome analysis among strains defective in wood lignin degradation in *Pleurotus ostreatus*

Atsuki Takenaka, Takehito Nakazawa, Hongli Wu, Rina Kodera, Ryota Morimoto, Masahiro Sakamoto, Yoichi Honda

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

P-38 (O-7)

Aspergillus oryzae と *Aspergillus nidulans* のエノラーゼ遺伝子における選択的転写開始点の異なる使用法はそれぞれのグルコース資化様式と適応する

井上大志, 新谷尚弘, 五味勝也 (東北大院・農)

オーソログ遺伝子における複数の転写開始点 (TSSs) の使用法の多様化は、真核生物の進化を遺伝子発現レベルで加速させる要因の一つと考えられている。しかし、真菌類においてその進化的意義を示す根拠は乏しい。我々は、麹菌 *Aspergillus oryzae* と *Aspergillus nidulans* 間で、解糖系酵素の一つであるエノラーゼの遺伝子 *enoA / acuN* における2つの TSSs の使用法が異なることを見出した。すなわち、グルコース (Glc) 培養条件下で *enoA* は開始コドン上流 36 nt (-36) 付近の TSS が-510 付近の TSS より優先的に選択されて高発現するのに対し、*acuN* は-19 ~ -60 付近の TSS よりも-440 付近の TSS が優先的に選択され、Glc による高い発現誘導は見られない。上記の異なる TSSs 使用の意義を考えるため、本研究では *A. oryzae* と *A. nidulans* の Glc 資化様式を比較した。*A. oryzae* RIB40 株と *A. nidulans* FGSCA4 株を 2 % Glc を単一炭素源とした液体最少培地で 24 ~ 102 h batch 培養し、6 h 毎の乾燥菌体重量と培養上清の Glc 濃度を測定して増殖期における増殖速度と Glc 消費速度、および最終的な Glc あたりの菌体重量を算出した。その結果、*A. oryzae* の増殖速度および Glc 消費速度は、*A. nidulans* よりそれぞれ 1.3, 3.0 倍高かった。一方、Glc あたりの菌体重量は、*A. oryzae* よりも *A. nidulans* の方が 1.5 倍高かった。解糖の亢進は短時間でのエネルギー獲得に有利な一方、有機酸の細胞内過剰蓄積に伴う菌体外流出等によってしばしばエネルギー獲得効率の低下を引き起こす。したがって、異なる TSSs 使用に起因する *enoA / acuN* 発現パターンの違いは、それぞれの Glc 資化様式に適応すると考えられた。今後は *enoA* 低発現麹菌株の解析から、*enoA* 高発現と Glc 資化様式の関連を調べる予定である。

Different alternative transcription start sites usage of enolase gene in between *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus nidulans* is adaptive to each phenotype of growth on glucose

Taishi Inoue, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi

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

P-39

ヒラタケのミトコンドリア DNA 変異体についての RNA sequencing 解析

太田早紀子^{1,2}, 三浦千裕¹, 奥田康仁³, 上中弘典¹, 松本晃幸¹ (¹鳥取大・農, ²九大院・生資環, ³(一財) 日本きのこセンター・菌茸研)

ミトコンドリア DNA(mtDNA)に生じた変異と担子菌類の子実体形成との関係についての報告はほとんど見当たらない。私達はヒラタケ(*Pleurotus ostreatus*)において、ミトコンドリアリボソーム大サブユニット内に生じた点変異に起因するクロラムフェニコール耐性変異体を取得し、その子実体が野生型子実体に比べ、傘の形状が漏斗型やラッパ型となり、傘の実質部分は厚みを帯びる形態異常を示すことを明らかにしている。本研究では、この現象に関わる遺伝子の探索を目的に、栄養菌糸体、幼子実体および成熟子実体の3発育ステージにおける野生型と変異型の遺伝子発現差をRNA sequencing (RNA-seq)によって解析した。

RNA-seq 解析の結果を比較したところ、形態異常が顕著であった成熟子実体で最も多い2,612遺伝子において有意な発現差が認められ、内1,817遺伝子の機能が推定された。これらについてKOGの機能カテゴリーに分類したところ、子実体の形態形成への関与が推察される cell wall/membrane/envelope biogenesis に真菌細胞壁構成多糖の合成・分解に関わる酵素遺伝子が20個含まれ、いずれも変異型で発現増加を認めた。特にキチナーゼ遺伝子が12個検出され、変異型の発現量は野生型の約2~4倍に増加した。この傾向は増加量の大きな3種類のキチナーゼ遺伝子について行ったRT-qPCRにおいても確認された。また成熟子実体菌傘実質部より粗酵素液を調製しキチナーゼ活性を測定したところ、比活性は野生型より2倍高く、遺伝子発現と酵素活性に相関がみられた。以上のことから、ヒラタケの mtDNA 変異体で認められた細胞壁構成多糖類、特にキチンの合成・分解に関わる遺伝子発現様式の変化は子実体の形態異常に深く関わっていると推察された。

RNA sequencing analysis for mitochondrial DNA mutant in *Pleurotus ostreatus*

Sakiko Ota^{1,2}, Chihiro Miura¹, Yasuhito Okuda³, Hironori Kaminaka¹, Teruyuki Matsumoto¹

(¹Fac. Agric., Tottori Univ., ²Grad. Sch. Biores. Bioenv., Kyushu Univ., ³Tottori Mycol. Inst.)

P-40

白麹菌 *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii* における Sirtuin D の機能解析

宮本葵¹, 門岡千尋¹, 奥津果優¹, 吉崎由美子¹, 高峯和則¹, 後藤正利², 玉置尚徳¹, 二神泰基¹ (¹鹿児島大・農, ²佐賀大・農)

白麹菌は主に焼酎製造に用いられる麹菌であり、クエン酸を高分泌生産する性質をもつ。NAD⁺依存的ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) であるサーチュインは、これまでモデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* や黄麹菌 *Aspergillus oryzae* において解析されてきたが、クエン酸高生産性の *Aspergillus* 属糸状菌で解析された報告がない。そこで、本研究では白麹菌における Sirtuin によるエピジェネティックな遺伝子発現制御と、麹としての重要な諸性質との関連性を解明することを目的とした。

まず、白麹菌において5つのサーチュイン遺伝子 *sirA*~*sirE* の破壊株を構築し、米麹を製造した。その結果、*sirD* 破壊株は麹あたりのクエン酸生産、 α -アミラーゼ活性、およびグルコアミラーゼ活性が低下した。一方、液体培地においては *sirD* 破壊株のクエン酸生産量に変化は見られなかったことから、SirDによるクエン酸生産の制御は固体培養に特異的である可能性が示唆された。次に、*sirD* 破壊株はカルコフルオロホワイト、コンゴレッドに対する感受性が上昇し、菌体あたりのGlcNAc量が野生株と比べて上昇した。次に、CAGE (Cap Analysis Gene Expression) によるトランスクリプトーム解析を行った結果、 Δ *sirD* 株は野生株と比較して、9808遺伝子中、1590遺伝子の発現が低下、1314遺伝子の発現が上昇した。発現が低下した遺伝子には耐酸性 α -アミラーゼ遺伝子が含まれ、発現が上昇した遺伝子にはキチン合成酵素遺伝子が含まれていた。以上の結果より、白麹菌において Sirtuin D がクエン酸生産や糖化酵素生産、細胞壁合成・維持に重要な役割をもつことが示唆された。

Functional analysis of Sirtuin D in the white koji fungus *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii*

Aoi Miyamoto¹, Chihiro Kadooka¹, Kayu Okutsu¹, Yumiko Yoshizaki¹, Kazunori Takamine¹, Masatoshi Goto², Hisanori Tamaki¹, Taiki Futagami¹

(¹Fac. Agric., Kagoshima Univ., ²Fac. Agric., Saga Univ.)

P-41 (O-10)

白麹菌 *Aspergillus kawachii* における RNA 結合タンパク質 NrdA の機能解析

門岡千尋¹, 泉津弘佑², 浅井禎吾³, 奥津果優¹, 吉崎由美子¹, 高峯和則¹, 後藤正利⁴, 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東京大院・総合文化, ⁴佐賀大・農)

焼酎製造に用いられる白麹菌は、菌体外に多量のクエン酸を分泌生産する性質をもつ。本研究は、白麹菌を含むチャワソクケヅメリの糸状菌においてクエン酸合成酵素遺伝子上流に保存された推定 RNA 結合タンパク質をコードする *nrdA* 遺伝子とクエン酸生産との関連性に着目し、その機能解析を目的とした。

まず、*nrdA* 破壊株の構築を試みたが、取得できなかったため、Tet-On システムを用いたコンディショナル発現株を構築した。この Ptet-*nrdA* 株は NrdA の発現誘導時にのみコロニーを形成したことから、白麹菌において *nrdA* は必須遺伝子であることが示唆された。Ptet-*nrdA* 株は過剰発現条件において、最小培地上で生育が遅延し、菌糸に茶色色素が沈着した。加えて、菌体量あたりのクエン酸生産量を測定した結果、野生株と比較して約 10%に低下した。また GFP-NrdA の局在解析の結果、GFP-NrdA は核に局在することが示唆された。次に NrdA と相互作用する RNA を同定するため、N 末端に S タグを付加した Ptet-S-*nrdA* 株を構築し、抗 S タグ抗体を用いた RIP (RNA immunoprecipitation) -Seq 解析と、S-NrdA の発現誘導時と非誘導時における RNA-Seq 解析を行った。その結果、NrdA の発現非誘導時において 2 倍以上発現量が上昇した 3329 遺伝子、および低下した 1875 遺伝子を同定した。さらに RIP-Seq により、NrdA と強く相互作用することが示唆された mRNA として 3474 種を同定した。これらの相互作用 RNA のうち 92%は、NrdA の発現非誘導時において発現量が 2 倍以上発現上昇した遺伝子に含まれたことから、NrdA と相互作用する RNA は分解が促進されることが示唆された。以上の結果より、NrdA は白麹菌において生育に必須の RNA 結合タンパク質であり、RNA 分解の制御を通してクエン酸生産や二次代謝などをグローバルに制御することが示唆された。

Characterization of putative RNA binding protein NrdA in the white koji fungus *Aspergillus kawachii*

Chihiro Kadooka¹, Kosuke Izumitsu², Teigo Asai³, Kayu Okutsu¹, Yumiko Yoshizaki¹, Kazunori Takamine¹, Masatoshi Goto⁴, Hisanori Tamaki¹, Taiki Futagami¹

(¹Fac. Agric., Kagoshima Univ., ²Grad. Sch. of Env. Sci., Univ. of Shiga Pref., ³Grad. Sch. Arts&Sci., Univ. of Tokyo., ⁴Fac. Agric., Saga Univ.)

P-42

アカパンカビのミトコンドリア電子伝達系複合体 I 変異株の QoI 感受性と *aod-1* 発現解析

堀内愛実, 高橋辰乃介, 田邊貴啓, 藤村真 (東洋大・生命)

アカパンカビのミトコンドリア電子伝達系複合体 I と III にはそれぞれバイパス酵素 (alternative NADH dehydrogenase (NDI-1, NDE-1, NDE-2, NDE-3) と alternative oxidase (AOD-1)) がある。複合体 III 阻害剤 (QoI 剤) は AOD-1 を誘導するため、野生株に顕著な抗菌活性を示さない。複合体 I 阻害剤 (METI 剤) も、ほとんど抗菌活性を示さないが、QoI 剤と混合すると相乗的な抗菌活性が認められる。この原因を解析するために、複合体 I の変異株を用いて検討した。その結果、METI 剤の標的因子 PSST を含め複合体 I の必須因子 (TYKY/nuo21.3c, S49/nuo49, S51/nuo51) の変異株は、野生株と同様の菌糸生育を示し、METI 非感受性であった。一方で、これらの株は QoI 剤に感受性を示し、METI 剤との混合効果は消失した。QoI 感受性は、複合体 III のバイパスである AOD-1 の誘導により影響されるため、*aod-1* 遺伝子の qPCR 解析を行った。野生株に METI 剤を処理すると QoI 剤の場合と同様に *aod-1* 遺伝子の発現が誘導された。また、*nuo49*, *nuo51* などの複合体 I の変異株は薬剤無処理ですでに *aod-1* 遺伝子が高発現していることが明らかになった。これらから、複合体 I の変異株の QoI 感受性は、*aod-1* 遺伝子の発現とは無関係であると考えられる。METI 剤と QoI 剤はそれぞれ単独ではバイパス酵素により各々の活性阻害が抗菌活性に現れないが、複合体 I と III の同時阻害ではエネルギー生産ができないため強い抗菌活性が現れると推定される。現在、複合体 I のバイパス酵素との関係について解析を行っている。

QoI-sensitivity and *aod-1* expression in mitochondrial complex I mutants of *N. crassa*.

Aimi Horiuchi, Shinnosuke Takahashi, Takahiro Tanabe, Makoto Fujimura

(Life Science, Toyo Univ.)

P-43

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

佐々木克仁, 久下貴紀, 山崎周平, 前田浩, 山形洋平 (東京農工大院・応生化)

【目的及び結果】黄麹菌 *Aspergillus oryzae* は古くから日本の醸造産業に用いられているカビの1種であり, 多様な種類の酵素を豊富に分泌する。*PepO* は, 麹菌が細胞外に最も多量に分泌しているペプチダーゼの1種であり, 醸造産業において利用価値が高い酵素である。我々の研究目的は未知である *pepO* 遺伝子における *cis*-element 及び, 転写制御因子の探索である。以前, 我々は *amylase* 三重破壊株を宿主とし, α -*amylase* を用いたレポーターアッセイを行った。その結果, 翻訳開始部位の上流 2,000 bp から上流 1,200 bp を欠損させた時に活性が減少し, この領域に *cis*-element が存在することが示唆された¹⁾。

【方法・結果】*cis*-element の絞り込みを行うため, ゲルシフトアッセイ (EMSA) により核タンパク質と DNA の結合を解析した。*cis*-element があると推測された領域の DNA 配列を約 50 bp ずつ複数作製し, EMSA を行ったところ, 上流 1,320 bp から 1,266 bp に *cis*-element があると示唆された。以前に行ったレポーターアッセイの結果と合わせて考えると, *cis*-element は ORF 上流 1,300 bp から 1,266 bp にあると推測された。この領域内に窒素代謝に関与する転写因子 *AreA* の結合配列が見られたが, 競合阻害試験により, 推測領域内の *AreA* 結合配列にはタンパク質は結合しないことが明らかとなった。

なお, 本研究の一部は (公財) 野田産研研究助成の支援並びに生研センター基礎推進事業の一環として行われたものである。

1) 久下貴紀ら 第 16 回糸状菌分子生物学コンファレンス要旨集 p.77 (2016)

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

Katsuto Sasaki, Takaki Kuge, Shuhei Yamazaki, Hiroshi Maeda, Youhei Yamagata

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

P-44

糸状菌 *Aspergillus nidulans* におけるマンナーゼ解酵素遺伝子群の転写因子 ManS の DNA 結合特性

玉城彰悟¹, 李諾¹, 國武絵美², 金丸京子¹, 木村真¹, 小林哲夫¹ (¹名大院生命農学・応用生命, ²三重大院生物資源・生物圏生命)

【目的】我々は, *Aspergillus nidulans* のマンナーゼ遺伝子の誘導に転写制御因子 *ClrB* と *ManS* が関与すること, 特に *ManS* が主要な働きを示すことを報告した。今回, *ManS* 機能の詳細解明のためプロモーター上の結合配列を再検証し, 生体内での活性評価を行った結果を報告する。

【方法と結果】*ManS* は CGGN₉CCG に結合することを報告したが, *manB*, *manC*, *man134A* は本配列を持たないため他にも結合部位があると考えられていた。そこで *manE* プロモーターの結合配列を EMSA により再検証した。その結果, 新たな結合配列として CGGN₁₆CCG が見出され, さらに *man134A* の CGGN₁₅CCG に結合することも示された。CGGN_{15/16}CCG は *manC* 以外のマンナーゼプロモーターに保存されていた。CGGN₉CCG と CGGN₁₆CCG の転写活性化能を評価するため, *ClrB* 破壊株を用いてレポーターアッセイを行った結果, これらは同程度の活性を持つ事が示された。

ManS と *ClrB* は競合して転写制御することが示されている。その原因は CGGN₉CCG に *ManS* と *ClrB* の両者が結合することにあると考えられていた。今回新たな配列が見出されたため, 本配列についても *ClrB* との競合を解析し, 併せて発表する予定である。

DNA binding properties of ManS, a transcription factor of mannanase genes in *Aspergillus nidulans*

Shogo Tamaki¹, Nuo Li¹, Emi Kunitake², Kyoko Kanamaru¹, Makoto Kimura¹, Tetsuo Kobayashi¹

(¹Grad. Sch. Applied Biosciences. Nagoya Univ., ²Grad. Sch. Bioresources. Mie Univ.)

P-45

黄麹菌における汎用性高発現プロモーター

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

地球温暖化や化石資源の枯渇を背景として、石油を原料としない生物由来、特に非可食バイオマス（バガスや稲わらなど）からの物質生産に近年注目が集まっている。これらの非可食バイオマスを利用するためには糖化反応が必要であり、糖化に関わるコストが実用化を妨げる要因の一つとなっている。そこで我々は、高い酵素生産能をもつ黄麹菌 (*Aspergillus oryzae*) を利用して、非可食バイオマスの糖化や発酵による効率的な物質生産を目指している。非可食バイオマスの分解には複数の酵素生産が必要であり、糖化酵素の他に有用物質生産の場合にも、複数の高発現プロモーターが必須となる。黄麹菌は非可食バイオマスの主要な糖類であるグルコースとキシロースを資化できるという優位性を持っていながら、既報の高発現プロモーターは特定条件での高活性に注目されてきたため汎用性の高さでの評価は出来ていなかった。

我々は、これまでに同調的発現挙動に注目し、既報の高発現プロモーターについて種々の培養条件での発現量を調べ、4つの高発現プロモーターを選抜している。本研究では、これらのプロモーターについてレポーターアッセイを行い、その挙動から各プロモーターの特徴と同時利用の可能性について考察した。その結果、グルコースとキシロースのどちらを基質とした場合にも高発現するプロモーターセットの存在が明らかとなった。これらを利用することで非可食バイオマスの効率的な分解や複雑な代謝経路を通る物質の生産も可能になると考えられる。

Versatile, high-expression promoters in *Aspergillus oryzae*

Shuhei Katayama¹, Silai Zhang², Satoshi Wakai², Hiroko Tsutsumi³, Yoji Hata³, Chiaki Ogino¹, Akihiko Kondo²

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

P-46

Trichoderma reesei における窒素源応答調節因子の機能解析

岡山大地, 平沢大樹, 志田洋介, 小笠原渉 (長岡技科大院・生物)

Trichoderma reesei は多量の細胞外タンパク質を生産・分泌する糸状菌であり、生産タンパク質のほとんどが木質系バイオマスを分解するセルラーゼやヘミセルラーゼである。セルラーゼの生産は環境因子に応答し、複数の転写調節因子によって厳密に制御されている。現在、*T. reesei* においては炭素源や pH に応答した転写制御が詳細に研究されているが、環境因子としての窒素がセルラーゼ生産に与える影響に関する研究は少ない。窒素源は微生物における生育およびタンパク質生産に大きく影響するため、多量のタンパク質を生産する *T. reesei* にとって、さらなる生産性向上のためには窒素利用を解析することが重要である。培地中の窒素源の取込みや異化は正の転写調節因子 AreA / Nit-2 (*Aspergillus / Neurospora*) が統括的に制御しており、真菌にとって環境中の窒素源の種類や濃度に適した窒素代謝をもたらしている。*T. reesei* もゲノム中にこの AreA と高い相同性をもつ遺伝子を保持しており、*T. reesei* の窒素利用やタンパク質生産にも深く関与していることが考えられる。本研究では、*T. reesei* において AreA と相同性の高いタンパク質を見出し、その遺伝子破壊株の生育やセルラーゼ生産能を評価することで *T. reesei* における窒素源応答性を解析した。

破壊株は生育の減少といくつかの窒素源の利用能の欠損をもたらした。結晶セルロースを炭素源とした培養では、特定の窒素源を用いた際に顕著なセルラーゼ生産の低下が観察された。破壊株のセルラーゼ生産の低下と対応して、セルラーゼ遺伝子やその転写活性化因子をコードする *xyl1* の発現が減少していた。AreA は窒素源の異化を活性化させる調節因子であるが、本研究の結果から、*T. reesei* における AreA は多くの窒素が必要であろうタンパク質（セルラーゼ）生産の活性化に働いていることが示唆された。

Analysis of the nitrogen-responsive transcription factor in filamentous fungus *Trichoderma reesei*

Daichi Okayama, Hiroki Hirasawa, Yosuke Shida, Wataru Ogasawara

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

P-47

Aspergillus aculeatus SepM のセルラーゼ誘導生産と cell wall integrity 経路への関与

澤田和美, 津村亮輔, 谷修治, 炭谷順一, 川口剛司 (阪府大院・生環科)

【目的】我々は, *Aspergillus aculeatus* におけるセルラーゼ遺伝子の発現の制御機構において, セルロースに応答したセルラーゼ遺伝子の発現を制御する因子として Septation initiation network component (SepM)を同定した。*A. aculeatus* SepM の機能を解明することを目的として, セルラーゼ関連遺伝子の発現, 形態形成, および cell wall integrity (CWI) 経路における SepM の機能を遺伝学的に解析した。【方法・結果】セルロースに応答した各種セルラーゼ遺伝子の発現量は, control 株と比べ *sepM* 破壊株 ($\Delta sepM$)は cellobiohydrolase II の発現のみが約 5%にまで減少した。隔壁形成能は, control 株と比べ $\Delta sepM$ は隔壁数が 16 h 培養で約 5%, 24 h 培養で約 40%まで減少した。胞子形成能は, control 株と比べ $\Delta sepM$ の胞子形成率が約 40%にまで低下した。また, コンゴレッド 20 mg/L を含む最小培地上での生育が Control 株と比べ $\Delta sepM$ は約 10%まで低下した。細胞壁構造が変化していることが推測されたため CWI 経路に関わる遺伝子の発現量を qRT-PCR により定量した。Control 株においてはコンゴレッドの添加量に関わらず CWI 関連遺伝子の発現量は変化しない一方で, $\Delta sepM$ ではコンゴレッド非存在下では有意に低下していた *agsA*, *chsA*, *rhoB* 遺伝子の発現は, コンゴレッド添加条件下で control 株と同程度発現していた。一方, $\Delta sepM$ におけるセルラーゼ遺伝子発現の減少は, コンゴレッド添加により回復しなかった。これらの結果より, *Aspergillus* において隔壁形成に関与している SepM が, セルロースに応答したセルラーゼ遺伝子の発現および CWI 経路の構成的な遺伝子発現に関与していることが示唆された。

Involvement in cellulose induction and cell wall integrity in *Aspergillus aculeatus* SepM

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

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

P-48

Aspergillus aculeatus の塩ストレス応答における SrpK の遺伝学的解析

小林夏実, 片山椋平, 谷修治, 炭谷順一, 川口剛司 (阪府大院・生環科)

【目的】*A. aculeatus* serine-arginine protein kinase like protein (SrpK) は, セルラーゼ遺伝子群の発現を正に制御する因子として同定された。炭素飢餓条件下あるいは資化しにくい炭素源のアビセル存在下で発現量が有意に増加することから, 炭素源が制限された条件下でセルラーゼ遺伝子発現を制御していると推測された。本研究では, SrpK の生理機能を多面的に解明する事を目的として, SrpK 野生株 (SrpK_{F1-418}), *srpK* 欠損株 ($\Delta srpK$), SrpK C-末端欠損株 (SrpK_{F1-327}) の各種ストレス条件下での機能を遺伝学的に解析した。【方法・結果】各株は, 異なる pH, 酸化ストレス, 浸透圧ストレス条件下において同様に生育した。1 M NaCl を添加した塩ストレス条件下において, $\Delta srpK$ 株, SrpK_{F1-418} 株共に 1 M NaCl 添加による生育への影響は観察されなかった。一方で, SrpK_{F1-327} 株では菌糸の多分岐化が観察され, 分生子形成数が SrpK_{F1-418} 株の 12%にまで低下した。これより SrpK の C 末端領域が SrpK の塩ストレス応答に重要な役割を担うことが示された。さらに, MM 液体培地で 24 時間培養した菌体を, 1 M NaCl を含む MM プレート上に乗せて 30°C で 3, 6, 9 時間培養し, 分生子形成に関わる遺伝子 *brlA*, *abaA*, *wetA*, *flbC*, *flbD* の発現量を qRT-PCR で定量した。その結果, *wetA* の発現量が SrpK_{F1-327} 株において有意に低下していた。これより, SrpK_{F1-327} 株における塩ストレス条件下での分生子形成能低下において, 少なくとも *wetA* 発現量の低下が原因の一端になっていることが示唆された。セルロースに応答したセルラーゼ遺伝子発現量は, $\Delta srpK$ 株, SrpK_{F1-327} 共に同様に低下していたことから, 今後セルロース応答と塩ストレス応答における SrpK の機能ドメイン解析を進める計画である。

Genetic analysis of SrpK in Salt stress response in *Aspergillus aculeatus*

Natsumi Kobayashi, Ryohei Katayama, Shuji Tani, Jun-ichi Sumitani, Takashi Kawaguchi

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

P-49

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* におけるペプチダーゼ遺伝子の転写に窒素源が与える影響

白石敦士, 前田浩, 山形洋平 (東京農工大院・応用生)

【背景と目的】黄麹菌 *Aspergillus oryzae* は、硝酸イオンやアミノ酸など様々な窒素源を利用して生育することができる。菌体外に分泌されるジペプチジルペプチダーゼをコードする遺伝子 *dppB* の転写がタンパク質基質によって誘導され、無機窒素源の添加で抑制されることなどから、周囲の窒素源の状況に応答してペプチダーゼ遺伝子の転写が制御されている可能性が示唆された¹⁾。そこで *A. oryzae* における窒素源に対するペプチダーゼ遺伝子の転写応答制御機構を解明することが本研究の目的である。

【方法と結果】*A. oryzae* RIB40 株を硝酸ナトリウムを窒素源として 48 時間培養した後、窒素源を切り替えて 4 時間培養した。切り替え後の窒素源として硝酸ナトリウム、硫酸アンモニウムなどの無機化合物、各種アミノ酸、牛血清アルブミンや大豆タンパクなどのタンパク質、をそれぞれ用いた。この条件下でペプチダーゼ遺伝子の転写量を定量 PCR によって調べたところ、L-ロイシンを窒素源とした場合に変動するもの、L-ヒスチジンを窒素源とした場合に変動するもの、牛血清アルブミンを窒素源とした場合に変動するものなど、ペプチダーゼ遺伝子をグルーピングできることが明らかとなった。しかし、窒素代謝に関与する転写因子をコードする *areA* の転写量についても調べたところ、L-ロイシンを窒素源とした場合でのみ上昇していた。これらの結果から、L-ロイシン以外の窒素源で転写変動がみられたペプチダーゼは *AreA* 以外の転写因子により調節されている可能性が示唆された。

本研究の一部は (公財) 野田産研研究助成の支援によって実施したものである。

1) Maeda H, *et al.*, *App. Microbiol. Biotech.*, **100** (11), 4947-4958 (2016)

Effect of nitrogen source on peptidase gene transcription in *Aspergillus oryzae*

Atsushi Shiraisi, Hiroshi Maeda, Youhei Yamagata

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

P-50 (O-8)

麹菌の転写因子 FlbC の細胞内局在と翻訳後修飾における解析

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)

我々はこれまでに *Aspergillus nidulans* において分生子形成因子として見出された転写因子 FlbC が、麹菌において *glaB* や *pepA* をはじめとする多くの固体培養特異的に生産される酵素遺伝子の発現に関与することを明らかにしてきた。前回の本コンファレンスでは、*GlaB* の生産に浸透圧応答性 MAPK が関与していることを報告した。今回は、麹菌における FlbC の細胞内局在および翻訳後修飾 (PTM) について解析した結果を報告する。マルトースの有無で制御可能な *malP* プロモーターを用いて、FlbC-GFP を $\Delta flbC$, $\Delta flbC \Delta mpkC$ に導入し顕微鏡観察を行ったところ、どちらの株においても FlbC-GFP は核に局在し細胞質にも僅かに存在することが認められた。また FlbC の N 末端 279 アミノ酸を欠損させた FlbC(_{delN}FlbC-GFP) は大部分が核に存在したが、FlbC の C 末端領域に存在する NLS を含む Zinc finger motif を欠損させた FlbC(FlbC_{delC}-GFP) は核への移行が大幅に減少した。次に細胞内タンパク質を SDS-PAGE, Phos-tag PAGE に供しウエスタンブロットにより FlbC-GFP を検出したところ、FlbC-GFP および FlbC_{delC}-GFP は抗リン酸抗体によるバンド本数の増加とアルカリホスファターゼ (AP) 処理区においてバンド位置が下降したことから、FlbC はリン酸化により制御されていることが示された。一方で _{delN}FlbC-GFP では AP 処理でのバンド位置の変化や、Phos-tag PAGE においてもバンド本数の増減がなかったことから、FlbC は 1-278 番目までのアミノ酸においてリン酸化されていることが示唆された。また、_{delN}FlbC-GFP のリン酸化は誘導後に低水分条件で 30 分間の空気暴露により脱リン酸化された。さらに FlbC が予想分子量の約 10 kDa 上方にバンドが現れたことからリン酸化以外の PTM についても現在解析している。また、FlbC が分生子形成・菌糸成長に及ぼす影響について解析した結果も併せて報告する予定である。

Analysis of the localization and post-transcriptional modulation of FlbC in *Aspergillus oryzae*.

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

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

P-51

黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* における 2 種類の α -アミラーゼの発現制御機構解析

橋本渉¹, 荒井啓¹, 水谷治², 山田修³, 新谷尚弘¹, 五味勝也¹ (¹東北大院・農, ²琉球大・農, ³酒総研)

黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* は泡盛をはじめとするわが国の伝統的な焼酎醸造に用いられる産業微生物であり、非耐酸性 α -アミラーゼ遺伝子 *amyA* と固体培養特異的に発現する耐酸性 α -アミラーゼ遺伝子 *asaA* を有する。アミラーゼ遺伝子の発現制御機構は麹菌 *Aspergillus oryzae* において解析が進んでおり、アミラーゼ遺伝子の発現を正に制御する転写因子 AmyR や負に制御する転写因子 CreA, マルトース資化クラスター内の転写因子 MalR などの関与が知られている。黒麹菌では麹菌とは異なるアミラーゼ生産性を示すが、その遺伝子発現制御機構についてはほとんど解明されていない。そこで、本研究ではアミラーゼ遺伝子を直接制御する AmyR と CreA の 2 つの転写因子に着目し、黒麹菌における 2 種類の α -アミラーゼの発現制御機構について解析を行うことで、アスペルギルス属菌におけるアミラーゼ生産制御機構の多様性の解明を目的とした。*amyR*, *creA* の破壊株において小麦ふすまを基質とした固体培養条件下で培養し、アミラーゼ活性を測定した結果、AsaA の活性は *amyR* 破壊株において活性が著しく減少し、*creA* 破壊株では活性が増加した。一方で AmyA の活性はどちらの破壊株においても大きな影響は見られなかった。さらに同条件下でノーザンブロット解析を行った結果、活性測定と同様の傾向を示したことから、AmyA は AsaA とは異なり、AmyR とは別の未知の転写因子によって制御されていることが示唆された。また、種々の炭素源を用いた液体培養では、AmyA を主体とするアミラーゼが構成的に生産されていることが示唆された。現在は麹菌において二次代謝産物やアミラーゼ生産に関わると報告されているヒストン脱アセチル化酵素であるサーチュインタンパク質のアミラーゼ遺伝子発現への関与について解析するとともに、AmyA の転写因子同定や MalR ホモログの機能解析を進めている。

Expression analysis of two different types of α -amylase genes in the black koji-mold *Aspergillus luchuensis*

Wataru Hashimoto¹, Hiraku Arai¹, Osamu Mizutani², Osamu Yamada³, Takahiro Shintani¹, Katsuya Gomi¹

(¹Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., ²Fac. Agric., Ryukyu Univ., ³Natl. Res. Inst. Brew.)

P-52

トウモロコシごま葉枯病菌 (*Bipolaris maydis*) の多面的変異株 UD10 のポリオキシシン耐性メカニズム解明

陳帯娣, 二神加奈恵, 田中千尋 (京大院・農)

トウモロコシごま葉枯病菌 (*Bipolaris maydis*) では、殺菌剤ポリオキシシンに耐性を示し、赤色の菌叢呈色をする多相変異株, *pol2* 株, *pol5* 株が得られている。ゲノム配列比較により原因遺伝子 *pol2* ならびに *pol5* の野生型はそれぞれヘム合成酵素 HMBS, FECH をコードすることが明らかになっている。今回、これら突然変異株と同様にポリオキシシン耐性で赤色菌叢を形成する未解析株 UD10 について遺伝解析を行った。UD10 株と *pol2* 株あるいは *pol5* 株との交配の結果、組み替え型子孫が得られ、UD10 株の耐性遺伝子は *pol2* 株ならびに *pol5* 株とは異なることが判明した。また、*POL2*, *POL5* がヘム合成系に関与する遺伝子であることから、ヘム合成系の他の遺伝子上の突然変異が UD10 株の表現型変化に関与する可能性が考えられた。そこで、*B. maydis* のヘム合成に関わる全遺伝子の変異の有無を UD10 株で調査した。その結果、有意な変異は認められなかった。一方、*pol2* 株および *pol5* 株の赤色化ならびにアントラキノン類の蓄積には、それらの色素合成に関わる *PKS21*, *PKS19* の発現量増加が関与していることが明らかとなっている。そこで、UD10 株においてもこれら遺伝子の発現量を調べた。その結果、UD10 株でも *PKS21* ならびに *PKS19* の発現量増加が認められた。以上の結果より、UD10 株の多相変異は *pol2* ならびに *pol5* とは異なる新規突然変異遺伝子によって支配されているが、赤色化等の形質は既知変異株同様のメカニズムによって起こっている可能性が示唆された。現在、遺伝子比較手法を用いて UD10 株の耐性遺伝子同定を進めている。

Elucidation of polyoxin-resistance mechanism of pleiotropic mutant UD10 of *Bipolaris maydis*

Daidi Chen, Kanae Futagami, Chihiro Tanaka

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

P-53 (O-4)

二次代謝を活性化する糸状菌間相互作用の探索

二宮章洋, 浦山俊一, 萩原大祐 (筑波大・生命環境)

【目的】糸状菌のゲノム中には、多数の未知化合物の生合成遺伝子群が存在することが明らかになりつつある。これらの生合成遺伝子は新たな医薬資源として期待されているが、その大部分は通常の培養条件下では発現しないため、「休眠遺伝子」と呼ばれる。休眠遺伝子の発現を促す有用な手段の1つとして共培養が挙げられる。例えば、糸状菌と放線菌の共培養によって糸状菌の二次代謝が活性化することが報告されている。このような共培養系における二次代謝活性化の作用機構の解明は、人為的に休眠遺伝子を強制発現する基盤技術の開発に繋がると期待される。そこで、本研究は、糸状菌間相互作用の分子レベルでの理解を指向し、二次代謝を活性化する糸状菌間相互作用の発見を目的とした。

【方法と結果】二次代謝に関する情報が豊富な4種の糸状菌 *Aspergillus fumigatus* (*Af*), *Aspergillus niger* (*Anig*), *Aspergillus nidulans* (*Anid*), *Aspergillus oryzae* (*Ao*) のうち、いずれか2種ずつを様々な条件下で共培養し、HPLCを用いて、共培養が二次代謝産物の生産に与える影響を調べた。その結果、*Af*と*Anid*をポテトデキストロース培地中で培養した際に、共培養特異的な二次代謝産物の生産が認められた。別府フラスコを用いて、透析膜を隔てて*Af*と*Anid*を培養したところ、当該化合物の高生産が認められなかったことから、当該化合物の高生産には*Af*と*Anid*の物理的な相互作用が必要であることが示唆された。

さらに、RNA-seq解析をおこなったところ、*Af*と*Anid*のいずれにおいても、純粋培養時と比べて、共培養時の発現量が顕著に高い二次代謝産物の生合成遺伝子クラスターが見出された。

Search for fungal interaction that activates secondary metabolism

Akihiro Ninomiya, Shun-ichi Urayama, Daisuke Hagiwara

(Fac. of Life & Env., Univ. of Tsukuba)

P-54

乳酸生産麹菌のピルビン酸ミトコンドリアキャリアタンパク質欠損における代謝変動

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)

乳酸は解糖系の終点であるピルビン酸から生産される。ピルビン酸は、TCA回路、エタノールやアミノ酸生産への分岐点となるので、乳酸の効率的な生産のためにはピルビン酸代謝を意識した代謝改変が必要である。これまでに、我々は、牛 (*Bos taurus*) 由来 lactate dehydrogenase をコードする遺伝子 (*bldh*) を導入し、エタノール生合成経路での pyruvate decarboxylase をコードする遺伝子を破壊し、ピルビン酸の TCA 回路への流れを抑制するためにミトコンドリア・ピルビン酸キャリアタンパク質 (MPC) を欠損させた乳酸高生産性黄麹菌の創成に成功している (張ら, 日本農芸化学会 2018)。

特に、BtLDH-*ApdcA* を宿主株として *mpcA* を欠損させた場合、乳酸の生産が 1.6 倍向上した一方で、ピルビン酸が培地中に 20 倍以上分泌生産されていた。また、*mpcA* 欠損株の増殖が著しく低下したことに對して、グルコースの取り込みが非常に速くなっていることが確認された。このことから *mpcA* 欠損により菌体内の代謝が大きく変化していると考えられる。そこで、本発表ではこれらの株を乳酸発酵条件で 48 h 培養し、LC-MS/MS を用いたメタボローム解析の結果と代謝経路の重要な酵素をコードする遺伝子の発現を定量 PCR で調べた結果について報告する。

Effect of deficient for mitochondrial pyruvate carrier protein on metabolism in lactate producing *Aspergillus oryzae*

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

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

P-55

デカリン合成酵素遺伝子置換による非天然型天然物誘導体の創出

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

[4+2]環化付加反応 (Diels-Alder 反応) は, 有機合成化学では炭素骨格構築における最重要反応の 1 つである。近年, 天然物の生合成経路において本反応を触媒する酵素が相次いで発見されている。*Fusarium* 属糸状菌の生産する equisetin (**1**) の生合成経路における, 立体選択的デカリン形成を担う Fsa2 もその 1 つである。本酵素ファミリーの特徴である反応の立体選択性の理解のため, Fsa2 ホモログの収集と機能解析を進めてきた。これまで, **1** と鏡像異性体の関係にある類縁化合物 phomasetin (**2**) の生合成遺伝子クラスターを同定し, そこに含まれる *fsa2* ホモログである *phm7* の **2** の生合成における役割を明らかにした。本研究では, 遺伝子置換実験を行うことで, 本酵素の反応における機能解明, ならびに新規誘導体の創出を目指した。

遺伝子置換株の作製は, *phm7* 全長を強制発現用プロモーターと連結した *fsa2* に置換することで行った。得られた形質転換株 ($\Delta phm7::P_{ief1}-fsa2$) の代謝物を LC/ESI-MS により分析したところ, 新たな化合物 **3** の生産が検出された。その構造を NMR 解析および質量分析により決定したところ, **2** の生合成中間体であるデメチル体のジアステレオマーであった。比旋光度および ECD スペクトルの比較から, **3** の絶対立体配置を決定したところ, Phm7 の作用によって生成する **2** とは反転した, **1** 型のデカリン骨格を有する構造であることが明らかとなった。この機能獲得型変異株の結果は, 環化付加反応において生じる 4 カ所すべての不斉点の立体配置が Fsa2 ファミリーによって制御されていることを明確に示しており, 本実験を通して, 非天然型デカリン構造を有する **2** の新規誘導体の創出に成功した。

Creation of natural product derivatives with unnatural configuration by replacing decalin synthase genes

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

(RIKEN CSRS)

P-56

菌寄生菌 *Dicyma pulvinata* と麴菌 *Aspergillus oryzae* が分泌する sporogen-AO1 の生合成遺伝子クラスターの構造と機能

西大海¹, 須志田浩稔¹, 東佑実子¹, 中川博之^{2,3}, 飯田祐一郎¹ (¹農研機構・野花研, ²農研機構・食品研, ³農研機構・高度解析センター)

Aspergillus oryzae は, 孢子形成誘導因子としてセスキテルペン化合物である sporogen-AO1 を分泌する。植物病原糸状菌などに寄生する糸状菌 *Dicyma pulvinata* も, 全く同じ化学構造の抗菌性物質を産生することが報告されている。そこで *D. pulvinata* における sporogen-AO1 の機能と起源を解析するために, 入手可能な 6 菌株の *D. pulvinata* での sporogen-AO1 産生性を LC-MS/MS で解析し, 最も分泌量の多かった 414-3 株のドラフトゲノムを解析した。sporogen AO-1 の構造から生合成に必須である aristolochene 合成酵素遺伝子 (*DpAri1*) を同定し, その破壊株が sporogen-AO1 の産生能を完全に失うことを明らかにした。また, *DpAri1* の隣接領域には 3 つのチトクローム P450 とアルコール脱水素酵素をコードする遺伝子が座乗しており, sporogen-AO1 の合成に関わることが予想される遺伝子群がクラスターを形成していることが明らかとなった。周辺に座乗するトランスポーター, 膜貫通タンパク質, エステラーゼなどの遺伝子も含めた領域は, *A. oryzae/A. flavus* の菌株に高く保存されていたが, 他の *Aspergillus* 属菌や *Dicyma* 属に近縁な糸状菌ゲノムからは見いだされなかった。

Structural and functional analysis of the gene cluster involved in biosynthesis of the sesquiterpene sporogen-AO1 in *Dicyma pulvinata* and *Aspergillus oryzae*

Oumi Nishi¹, Hirotooshi Sushida¹, Yumiko Higashi¹, Hiroyuki Nakagawa^{2,3}, Yuichiro Iida¹

(NARO)

P-57 (O-5)

Fungi 界に広がる多様なリボソームペプチド生合成因子

梅村舞子, Linh viet Dao (産総研・生物プロセス / 生体システムビッグデータ解析ラボ (CBB-D-OIL))

稲コウジ病病原真菌 *Ustilaginoidea virens* が産生する二次代謝物質 *ustiloxin* は、化合物骨格構造が前駆体ペプチドとして遺伝子に直接書き込まれた環状のリボソームペプチドであり、糸状菌で初めての報告であった (Umamura et al., FGB, 68:23, 2014)。本化合物の前駆体ペプチドは小胞体への移行シグナルペプチドを含み、かつゴルジ体局在ペプチダーゼ *Kex2* の認識サイトで高度に繰り返す特徴を持つ。この特徴等に基づき、これまで 20 種類の *Aspergillus* 属菌株ゲノム情報から 40 種類以上の同経路候補を見出し、そこから新たな環状ペプチド *asperipin-2a* を報告している (Nagano et al., FGB, 86:58, 2016)。

今回、本前駆体様遺伝子 (*ust-RiPS* 因子) の Fungi 界における分布と種類について知ることを目的として、Fungi 界に属する 857 株を対象により詳細な *ust-RiPS* 因子のゲノム探索を行った。その結果、本因子はカビ・キノコを問わずほぼすべての株に存在し、一株平均 3 個、多いものでは一株 29 個保有することが分かった。化合物の骨格構造を形成するコアペプチド配列を分類したところ、やや粗く見積もっても 1000 種類以上と多岐に亘り、本経路が Fungi 界に広がる多様なペプチド化合物生合成遺伝子資源であるとの見方を裏付けた。なおコアペプチドの分類は必ずしも株の系統分類とは一致しないため、生活圏に応じて獲得された可能性がある。また本因子のゲノム周辺構造を調べたところ、コアペプチド配列の特徴に応じて、環状化を含む修飾に関与すると考えられる遺伝子の分布に偏りがあった。これらの解析結果に基づき、現在、*ust-RiPS* 経路用異種発現システムを麹菌を宿主株として開発し、複数の同経路導入と化合物産生確認を行っている。

Wide variety of ustiloxin-type ribosomal peptide precursor-like genes in kingdom fungi

Maiko Umamura, Linh viet Dao

(Bioproduction Res. Inst. / CBB-D-OIL, AIST)

P-58

糸状菌脂肪族マクロライド化合物のポストゲノム型天然物探索

森下陽平, 浅井禎吾 (東大院・総合文化)

糸状菌のゲノム上には二次代謝物生合成遺伝子クラスターが膨大に存在しているが、研究室で汎用される培養条件下ではほとんどが未利用状態にある。それらの中には、自然界の特定環境下では利用されているものもあると予想される。すなわち、これら未利用生合成遺伝子がつくり出す天然物の探索は、新規天然物の獲得だけでなく、それらを介した自然現象の解明にも繋がると期待される。そこで当研究室では、麹菌異種発現系を利用して、未利用生合成遺伝子にコードされる天然物の探索に取り組んでいる。

公開ゲノムデータベースおよび独自に取得したゲノム情報をもとに、ポリケタイド合成酵素 (PKS) を指標としてゲノムマイニングを行ったところ、異なる属の菌のゲノム上に高還元型 PKS (HR-PKS) とチオエステラーゼ (TE) を有する機能未知の遺伝子クラスターが数多く見出された。これらの中に、*breferdins* の推定生合成遺伝子クラスターが含まれていたことから、脂肪族マクロライド天然物の生合成遺伝子と予想された。しかし、実験的な証明はなく、またこれまで報告されている化合物より遺伝子の多様性が勝っている。そこで、脂肪族マクロライド骨格の生合成システムの解明と新規天然物の探索を目的として研究に着手した。ケムシから分離した *Arthrinium phaeospermum* のゲノム上に見出した HR-PKS と TE を汎用宿主である麹菌に導入し、その形質転換株の代謝物の HPLC 分析を行った。その結果、導入遺伝子由来の化合物の生産が確認され、単離・構造決定によりこれまで糸状菌からは報告例の全くない 34 員環ポリエンマクロライド天然物であることを明らかにした。また、マクロライド構造の生合成には HR-PKS と TE の両方が必要であることを初めて実証した。他の菌の相同クラスターについても麹菌で異種発現することで、多様な構造の脂肪族マクロライドの生産に成功している。

Discovery of Fungal Aliphatic Macrolide Natural Products by Post-genomic Strategy

Yohei Morishita, Teigo Asai

(Grad. Sch. Arts & Sci., Univ. of Tokyo)

P-59

Pyrrolizilactone の生合成機構の解析

廣澤早香^{1,2}, 加藤直樹¹, 衣笠清美¹, 高橋俊二¹, 長田裕之^{1,2} (¹理研・CSRS, ²埼大院・理工)

Pyrrolizilactone は、未同定糸状菌 RKB3564 株が生産する二次代謝産物であり、ポリケチド合成酵素 (PKS) —非リボソームペプチド合成酵素 (NRPS) ハイブリッド酵素によって生合成される。プロテアソームのトリプシン様活性を選択的に阻害するというユニークな生物活性を示すことから、新規抗がん剤としての可能性が示唆されている。また、デカリン骨格に 3 環性の pyrrolizidinone 環が融合した特徴的な化学構造を有しており、その生合成経路にも興味を持たれる。そこで本研究では、pyrrolizilactone の生合成機構の解明を目的とした。

生産菌のドラフトゲノム解読を行い、PKS-NRPS ハイブリッド酵素遺伝子を含む生合成遺伝子 (*pzl*) クラスターを見出した。本クラスターの pyrrolizilactone 生合成への関与を確かめるに当たり、本クラスターに含まれる 2 遺伝子、*pzl5*, *pzl6* (それぞれ short-chain dehydrogenase/reductase, α -ケトグルタル酸依存性 dioxygenase をコード) に着目した。両遺伝子が、isoleucine から NRPS モジュールの基質となる 3-methylproline への変換に関与していると予想し、大腸菌発現系を用いた *in vivo* 変換実験、ならびに組換え酵素を用いた *in vitro* 反応実験による検証を行った。*pzl5* と *pzl6* を共発現させた大腸菌培養液の代謝物分析より、3-methylproline と *m/z* が一致するシグナルが検出された。また、精製した組換え Pzl6 と isoleucine との反応産物の分析から、基質である isoleucine の消費と、それに伴う水酸化物の生成が認められた。これらの結果から、*pzl5* および *pzl6* の 3-methylproline 生合成への関与、さらには両遺伝子を含む *pzl* クラスターが生産菌 RKB3564 株において pyrrolizilactone 生合成を担うことが強く示唆された。現在は、変換産物とその中間体の構造同定を進めるとともに、反応機構の解析に取り組んでいる。

Analysis of pyrrolizilactone biosynthesis

Sayaka Hirosawa^{1,2}, Naoki Kato¹, Kiyomi Kinugasa¹, Shunji Takahashi¹, Hiroyuki Osada^{1,2}

(¹RIKEN CSRS, Grad. Sch. Sci. Eng., ²Saitama Univ.)

P-60

Aspergillus fischeri ジテルペノイドピロン生合成遺伝子クラスターの機能解析

新木翔之¹, 塚田健人^{1,2}, 浅井禎吾¹ (¹東大院・総合文化, ²東北大院・薬)

ジテルペノイドピロン類 (DP 類) はジテルペンとピロン (ポリケタイド) のハイブリッド経路で合成されるメロテルペノイドの一種であり、これまでに多様な生物活性を持つ化合物が報告されている。その代表的な例として、*Acremonium* 属菌などから単離された抗がん活性を持つ sesquicillin 類などが存在する。当研究室では、麹菌 *Aspergillus oryzae* 異種発現系を用いて糸状菌 DP 類の生合成経路を解明し、また、それらを利用した新規 DP 類の創生を目的として研究を行っている。

Aspergillus fischeri の有性世代である *Neosartorya fischeri* からは sartorypyrone A と aszonapyrone A の環化様式が異なる 2 種類の DP 類の生産が報告されており、2 つの DP 類生合成遺伝子クラスターの存在が示唆された¹。そこで、ゲノム情報が公開されている *A. fischeri* についてゲノムマイニングを行ったところ、6 つの生合成遺伝子 (NR-PKS, テルペン環化酵素, FMO, GGPP 合成酵素, プレニル基転移酵素, アセチル基転移酵素) からなる 1 つの DP 類推定生合成遺伝子クラスターを見出した。そこで、まず、このクラスターを麹菌で再構築し、得られた形質転換株を培養し、生成物を単離した。生成物の構造決定を行ったところ、本クラスターが sartorypyrone A の生合成遺伝子クラスターであることを初めて明らかにした。一方、aszonapyrone A の生合成に関わるクラスターは存在しなかった。それぞれの化学構造に基づき推定生合成を考えると、sartorypyrone A と aszonapyrone A はテルペン環化酵素が機能する直前まで共通の経路であることが予想される。そこで、テルペン環化酵素について詳細な解析を行ったところ、クラスターを形成せず単独で存在する機能未知の推定テルペン環化酵素を発見した。現在、この環化酵素について詳細な解析を行っている。

参考文献：1) Eamvijarn, A.; Gomes, N.M.; Dethoup, T.; Buaruang, J.; Manoch, L.; Silva, A.; Pedro, M.; Marini, I.; Roussis, V.; Kijjoa, A. *Tetrahedron* **2013**, *69*, 8583–8591.

Biosynthetic study of diterpenoid pyrone biosynthetic gene cluster in *Aspergillus fischeri*

Shono Shinki¹, Kento Tsukada^{1,2}, Teigo Asai¹

(¹Dept. Life Sciences, Grad. Sci. Arts and Sciences, The University of Tokyo, ²Grad. Sci. Pharmaceutical Sciences, Tohoku Univ.)

P-61

糸状菌未利用 Type III PKS クラスターに着目するポストゲノム型天然物探索

金子秋穂, 浅井禎吾 (東大院・総合文化)

糸状菌のゲノム上には膨大な機能未知二次代謝物生合成遺伝子クラスターが存在する。当研究室では「ゲノムマイニング」と「麹菌異種発現系」を組み合わせた「ポストゲノム型天然物探索」の手法を用いて未利用遺伝子クラスターが作り出す新規天然物の獲得を目指している。

当研究室で所有するオケラから分離した *Penicillium soppi* のドラフトゲノム解析を行ったところ、HR-PKS (高還元型ポリケタイド合成酵素), Type III PKS (III 型ポリケタイド合成酵素) および P450 からなるクラスターを見出した。さらに、他の糸状菌のゲノム上にも HR-PKS と Type III PKS を含む遺伝子クラスターを複数見出した。これまでに知られている糸状菌 Type III PKS は内因性脂肪酸 CoA を基質として受け入れ、アルキルピロンやアルキルレゾルシノールを生合成することが知られている¹。一方で、今回見出したクラスターでは、HR-PKS で作られるポリケタイド鎖を受け入れてレゾルシノールあるいはピロンを形成することが予想される。HR-PKS は多様なポリケタイド鎖を生合成することが知られているので、これらのクラスターから多様な Type III PKS 由来の新規天然物を獲得することが期待される。そこで、*Penicillium soppi* の HR-PKS と Type III PKS の遺伝子を麹菌異種宿主内で発現させたところ、特徴的なトリエン構造を有するポリケタイド鎖を持つ新規アルキルレゾルシノールの獲得に成功した。現在、さらに P450 を追加した株を作成し、代謝物の解析を行っている。また、他の糸状菌の相同クラスターについても探索を進めている。

参考文献：1) Hashimoto, M.; Nonaka, T.; Fujii, I. *Nat. Prod. Rep.* **2014**, 31, 1306.

Post-genomic approach for discovering natural products utilizing Type III PKS gene cluster distributed fungi

Akiho Kaneko, Teigo Asai

(Dept. Life Sciences, Grad. Sci. Arts and Sciences, The University of Tokyo)

P-62

白麹菌 *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii* の推定クエン酸輸送体 CitT の機能解析

中村恵理¹, 門岡千尋¹, 奥津果優¹, 吉崎由美子¹, 高峯和則¹, 後藤正利², 玉置尚徳¹, 二神泰基¹ (鹿児島大・農,²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排出する特徴をもつ。本研究は、細胞質から菌体外へのクエン酸排出に関与する輸送体の同定と機能解明を目的として行った。

最近、白麹菌の類縁菌である *Aspergillus niger* において、細胞質膜局在型クエン酸輸送体の有力な候補として *citT* 遺伝子が報告された。白麹菌のゲノムにも *citT* 遺伝子のホモログが存在したため、解析対象とした。まず、*citT* 破壊株を構築して表現型を解析したところ、最小培地において *citT* の破壊による生育への影響は見られなかった。次に、菌体量あたりのクエン酸生産量を比較したところ、*citT* の破壊により野生株の約 1% に低下した。一方、クエン酸を高分泌しない黄麹菌のゲノムにおいても *citT* ホモログは 2 つ存在するが、いずれも発現レベルが低いことが示唆された。そこで、黄麹菌において *amyB* プロモーターの制御下で白麹菌の CitT を高発現する株を構築し、pH 指示薬であるメチルレッド入りの培地で培養したところ、コロニーの周りに赤いハローが形成されことから、CitT の高発現により何らかの酸が菌体外へ排出されたことが示唆された。以上の結果より、CitT は白麹菌のクエン酸高生産機構に関与しており、また CitT の高発現によって、他の糸状菌の有機酸生産性を変化させることが可能であることが示唆された。現在、黄麹菌における有機酸生産性の詳細と白麹菌の CitT の精製、およびクエン酸輸送活性測定系の構築を行っている。

Functional analysis of putative citrate exporter CitT in *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii*

Eri Nakamura¹, Chihiro Kadooka¹, Kayu Okutsu¹, Yumiko Yoshizaki¹, Kazunori Takamine¹, Masatoshi Goto², Hisanori Tamaki¹, Taiki Futagami¹

(¹Fac. Agric., Kagoshima Univ., ²Fac. Agric., Saga Univ.)

P-63

麴菌異種発現系を用いた *Aspergillus* 属由来の新規マクロライドの探索

伊藤芽衣^{1,2}, 森下陽平¹, 清水公德², 浅井禎吾¹ (¹東大院・総合文化, ²東理大・生物工)

当研究室では、糸状菌のゲノム上に存在する未利用生合成遺伝子を資源とした麴菌異種発現系を基盤とするポストゲノム型天然物探索を実践している。最近、様々な糸状菌のゲノム上に、マクロライド天然物を生合成すると期待される highly reducing polyketide synthase (HR-PKS) と単独遺伝子として存在する Thioesterase を含む機能未知な生合成遺伝子クラスターを見出している。本研究では、*Aspergillus* 属のゲノム上に見出した HR-PKS と TE を含む未利用生合成遺伝子クラスターに着目し、新規天然物の探索を目指した。

ゲノムマイニングにより *A. nidulans*, *A. kawachii* および *A. fischeri* のゲノム上に HR-PKS と TE を含むクラスターを見出した。*A. kawachii* と *A. fischeri* のクラスターは高度に保存されており、それぞれ同一の天然物を与えることが予想された。いずれの生合成遺伝子クラスターも HR-PKS と TE に加え、P450 などの修飾酵素遺伝子を有していたが、HR-PKS と TE で骨格構造が形成されると仮定して、まず、それぞれ HR-PKS と TE を *A. oryzae* で異種発現した。その結果、*A. kawachii* の HR-PKS と TE を導入した形質転換株では、導入遺伝子由来の化合物の生産が確認された。単離構造決定により、新規 24 員環マクロライドが生合成されることを明らかにした。なお、*A. fischeri* の生合成遺伝子を導入した株でも同じ化合物の生産が認められた。一方、*A. nidulans* の HR-PKS と TE を導入した株では導入遺伝子由来の生成物は確認されなかった。続いて、*A. kawachii* および *A. fischeri* のクラスターで生産される化合物を取得するため、同クラスター内に存在する P450 および GPI ethanolamine phosphate transferase と相同性を示す遺伝子を追加した。得られた株の生産物を LC-MS 解析したところ、2 つの水酸化とホスホエタノールアミンが付加した化合物の生産が確認された。現在、詳細な解析を行っている。

Discovery of novel macrolides from cryptic biosynthetic gene clusters with HR-PKS and TE in *Aspergillus* fungi

Mei Ito^{1,2}, Yohei Morishita¹, Shimizu Kiminori², Teigo Asai¹

(¹Dept. Life Sciences, Grad. Sci. Arts and Sciences, The University of Tokyo, ² Dept. Biol. Sci. Technol., Tokyo Univ. Sci)

P-64

ウリ炭疽病菌の特異なポリケタイド合成酵素遺伝子クラスターの生合成産物の解明

岡崎裕亮, 浅井禎吾 (東大院・総合文化)

ポリケタイド化合物は糸状菌が生産する二次代謝物の中でもメジャーであり、lovastatin をはじめとして有用な生物活性を持つものも数多く存在する。これらの化合物の生合成を担うポリケタイド合成酵素 (PKS) はそれぞれの機能ドメインの構成により分類されてきた。しかし、近年、膨大な遺伝子情報が蓄積されるにつれ、これまで良く研究が行われてきた PKS とは異なる特殊なドメイン構造を有する PKS が数多く発見された。その中で、C 末端に carnitine acyltransferase (CAT) と相同性を持つドメインを有する PKS-CAT は、自身で生合成したポリケタイド鎖を他のアルコールに転位してエステル結合を形成することが一例示された¹のみで、どのような天然物の生合成に関わっているのかは明らかにされていない。そこで、本研究では、麴菌異種発現系を用いて、PKS-CAT を含む遺伝子クラスターが生合成する天然物を探索することを目的とした。

ゲノムマイニングを行い、公開データベースおよび独自の遺伝子資源に様々な PKS-CAT を含むクラスターを見出した。まず、ウリ炭疽病菌 *Colletotrichum orbiculare* の PKS-CAT クラスターに着目した。このクラスターは、NR-PKS、糖転位酵素や PKS-CAT を含む 6 遺伝子からなるクラスターであった。PKS-CAT は生合成の後半に天然物をアシル修飾すると仮定して、最後に導入することとした。まず、NR-PKS、脱炭酸酵素、P450 を麴菌で異種発現させたところ、導入遺伝子由来の化合物の生産を確認し、詳細な解析中ではあるが、6-methylbenzene-1,2,4-triol であることが推定された。現在、段階的に生合成遺伝子を導入した形質転換株を作製し、それぞれの代謝物の解析を行っている。

参考文献 1. L. Hang, M. C. Tang, C. J. B. Harvey, C. G. Page, J. Li, Y.S. Hung, N. Liu, M. E. Hillenmeyer, Y. Tang, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, 56, 1–6.

Discovery of natural products biosynthesized by unusual PKS containing cluster in *Colletotrichum orbiculare*

Yusuke Okazaki, Teigo Asai

(Dept. Life Sciences, Grad. Sci. Arts and Sciences, The Univ. of Tokyo)

P-65

Aspergillus nidulans の sirtuin アイソザイムは一次代謝及び二次代謝を制御する

小田倉里佳, 伊藤英里子, 竹下典男, 榎尾俊介, 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である。糸状菌 *Aspergillus nidulans* は 5 つの sirtuin をコードする遺伝子を有する。我々は, このうちの 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スチンおよびペニシリン 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ことが明らかとなっている。

本菌の他の sirtuin タンパク質をコードする AN1782 (*sirC*) および AN11873 (*sirD*) に対応する組換えタンパク質を作製し, これらがヒストン H4 の Lys 16 とヒストン H3 の Lys 9 および Lys 18 のアセチル化修飾を脱アセチル化する sirtuin 活性を有することが示された。*sirC* および *sirD* の遺伝子破壊株では, ヒストン H3 の Lys 9, Lys 18 および Lys 56 のアセチル化レベルが野生株のそれらよりも増加していたことから, 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機能を持つことが明らかとなった。また, これらの遺伝子破壊株では, 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。以上の結果から, SirC および SirD がヒストンの脱アセチル化を介して AUS, デヒドロ AUS, ST の生合成を抑制していると考えられた。

Aspergillus nidulans sirtuin isozymes regulate primary and secondary metabolism.

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

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

P-66 (O-6)

土壌糸状菌における Alternative oxidase の主要な呼吸系としての役割

宮崎つぐみ, 大泉太於, 中澤奈美, 高橋純子, 榎尾俊介, 高谷直樹 (筑波大・生命環境)

真核生物には, 普遍的な呼吸酵素であるシトクロム *c* オキシダーゼ (Cytochrome *c* oxidase, COX) と COX の補助的な役割を持つと考えられているシアン耐性呼吸酵素 (Alternative oxidase, AOX) を介した 2 つの呼吸系が存在する。AOX は菌類や一部の植物が発現するが, その生理的意義の全容は未だ解明されていない。

液体培地に様々な土壌を添加して *Aspergillus nidulans* を培養したところ, 細胞内のシアン耐性の呼吸 (AOX) 活性が上昇するとともに, 成育が上昇することが見出された。この現象は腐植含量の高い土壌で顕著であり, 土壌の代わりに土壌腐植の構成成分であるフミン酸 (Humic acid, HA) を添加した場合にも, 同様であった。また, HA の添加によって, カタラーゼなどの ROS 消去系酵素の遺伝子発現が上昇し細胞内の活性酸素種 (ROS) の蓄積が低下していることを見出した。AOX が ROS 低発生型の呼吸系であることと考え合わせ, HA は ROS 消去系酵素の活性化と呼吸系の切換えを通して ROS の蓄積を低下させると考えられた。一方, トランスクリプトーム解析から, HA が糖新生を活性化させることが示唆された。糖新生に関わる遺伝子の転写因子をコードする *acuK* と *acuM* をそれぞれ欠損させた遺伝子破壊株では, *aodA* の転写の促進が見られなかったことから, HA は *AcuK* と *AcuM* を介して AOX の発現を活性化させることが示された。これらの結果は, 土壌成分が糸状菌の代謝調節を行う初めての例である。また, 他の 15 種の糸状菌においても HA による COX から AOX への呼吸系の切替えが観察された。これは, 多くの糸状菌が, 土壌中では AOX を補助的ではなく主要な呼吸系としていることを示唆する驚くべき結果である。

Predominant role of Alternative oxidase in soil fungal respiration

Tsugumi Miyazaki, Tao Oizumi, Nami Nakazawa, Junko Takahashi, Syunsuke Masuo, Naoki Takaya

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

P-67

ポリオキシシン耐性株のアントラキノン類合成に関与する遺伝子の同定と発現解析

陳帯娣, 竹山さわな, 十一浩典, 宮下正弘, 宮川恒, 田中千尋 (京大院・農)

Bipolaris maydis のポリオキシシン耐性 (*Pol2*) 株は, 薬剤耐性に加えて, 赤褐色の菌叢呈色, emodin などアントラキノン類の蓄積を示す。本研究では, 特にアントラキノン類蓄積に着目し, 詳細の解明を目指した。*A. nidulans* の monodictyphenone 合成に関与する Mdp クラスター遺伝子 *MdpG* の相同遺伝子 *Pks19* は, *Pol2* 依存的に発現増加する (第 16 回糸状菌分子生物学コンファレンス)。今回, 既知の emodin, chrysophanol, ω -hydroxyemodin に加え, 新たに endocrocin, endocrocin anthrone の 2 つのアントラキノン類が *Pol2* 株にて蓄積することを見出した。また, $\Delta Pks19$ 株においてこれら 5 つの化合物が消失し, *Pks19* がアントラキノン類合成に深く関与することが示唆された。さらに, アントラキノン類の生合成系を明らかにするため, *Pks19* 近傍の推定二次代謝物関連遺伝子について遺伝子破壊株を作出し, 代謝物評価を行った。その結果, EthD domain をもつ *Emd3*, thioesterase domain をもつ *Emd11* について, 遺伝子破壊により上記 5 化合物が消失した。このことから, *Emd3*, *Emd11* は本菌のアントラキノン類合成に必須であることが示唆された。また, polyhydroxyanthracene reductase をコードする *Emd6* の遺伝子破壊株では chrysophanol の消失が認められた。一方, *Pks19* 近傍のその他複数の推定二次代謝物修飾酵素遺伝子はアントラキノン類合成に顕著な影響を示さなかった。次に, これらの遺伝子の発現パターンを調べた。その結果, *Emd11* は *Pol2* 依存的な発現増加を示したのに対し, *Emd3* については *Pol2* 依存的な発現増加を示さなかった。従って, *Pol2* 株におけるアントラキノン類の蓄積は, *Pks19* ならびに *Emd11* の特異的発現によって引き起こされることが明らかとなった。

Identification and expression study of genes involved in the anthraquinone synthesis of polyoxin-resistant strains of *Bipolaris maydis*

Daidi Chen, Sawana Takeyama, Hironori Juichi, Masahiro Miyashita, Hisashi Miyagawa, Chihiro Tanaka
(Grad. Sch of Agriculture, Kyoto Univ.)

P-68

ウリ類炭疽病菌の病原性因子 CoNpc2 は細胞内ステロール輸送と付着器貫穿に関与する

梶河直起, 小玉紗代, 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の細胞周期制御に関与する GTPase CoTem1 の相互作用因子として CoNpc2 を同定し, CoNpc2 が本菌の病原性に関与することを報告した。また, *conpc2* 破壊株は有傷キュウリ葉では野生株と同様に病原性を保持しており, 宿主表皮の貫穿に寄与することを示唆している。今回, CoNpc2 の付着器貫入時の形態形成への関与を検討するため, キュウリ葉上における付着器貫入孔周辺のアクチン集積を観察した。その結果, 野生株と比較して *conpc2* 破壊株では明瞭な貫入孔が減少し, 貫入孔周辺のアクチン集積は野生株よりも弱い傾向が見られた。このことから, CoNpc2 は付着器貫穿糸形成に関与することが示唆された。また, 本菌の病原性に関与する分泌性メタロプロテアーゼ CoMep1 の局在を観察したところ, 野生株では付着器貫入孔直下にリング状シグナルが観察された一方で, *conpc2* 破壊株では貫入孔周辺にシグナルの拡散が見られた。よって, CoNpc2 が CoMep1 の輸送または蓄積に寄与する可能性が示唆された。出芽酵母 Npc2 は細胞内ステロール輸送に関与することから, ステロール染色試薬 Filipin を用いて付着器形成過程における *conpc2* 破壊株の細胞内ステロール蓄積を観察した。その結果, 野生株と比較して胞子細胞内の液胞に過剰なステロール蓄積が見られた。以上の結果から, 本菌の付着器貫穿糸形成および病原性には CoNpc2 が関与するステロール輸送が必要である可能性が示唆された。

The virulence factor CoNpc2 is involved in intracellular sterol transport and appressorium penetration of *Colletotrichum orbiculare*

Naoki Kajikawa, Sayo Kodama, Fumi Fukada, Yasuyuki Kubo
(Grad. Sch. of Life & Env. Sci., Kyoto Pref. Univ.)

P-69

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², 矢口貴志¹, 高橋弘喜^{1,3} (¹千葉大・真菌センター, ²筑波大・生命環境系, ³千葉大・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胞子が観察された。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。さらに真菌センターで保有している多くの臨床分離株を用いて、銅に対する感受性を調べたところ、株間において感受性の強さに違いが見られた。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 Hagiwara², Takashi Yaguchi¹, Hiroki Takahashi^{1,3}
(¹MMRC, Chiba Univ., ²Life Env. Sci. Tsukuba Univ., ³MCRC, Chiba Univ.)

P-70

炭疽病菌に対するシロイヌナズナの付着器侵入抵抗性と表皮葉緑体の動的変化

入枝泰樹^{1,2}, 高野義孝³, 塩見大輔² (¹信大・学術院農, ²立教大・理, ³京大院・農)

炭疽病菌 (*Colletotrichum* 属菌) は感染器官である付着器を介して植物細胞に侵入し、壊死斑を形成する病原糸状菌である。本属菌は多様な植物に感染するが、特定の宿主植物に対して感染能を有する菌 (適応型菌) は限られており、大多数の菌 (不適応型菌) は植物の抵抗反応により感染を阻害される (非宿主抵抗性)。我々は、不適応型炭疽病菌の付着器侵入に反応してシロイヌナズナの小さな表皮葉緑体が表層側へ出現する動的現象 (葉緑体応答) を発見している。また、炭疽病菌の付着器を介さない侵入 (HTE) に対する侵入抵抗性が低下した *pen2* 変異体では、不適応型菌の付着器侵入に対する葉緑体応答がより顕著に誘導されることも分かっている。しかし、*PEN2* の付着器侵入抵抗性への寄与および葉緑体応答の植物免疫への関与については不明であった。今回、典型的な付着器侵入を行う不適応型炭疽病菌を用いた解析から、*PEN2* が炭疽病菌の付着器侵入抵抗性に重要であること、そして、葉緑体応答が *PEN2* 関連免疫を含む侵入抵抗性より下層で起こることが示唆された。また、表皮細胞における葉緑体応答は、葉肉細胞の巨大な葉緑体が示す光定位運動の制御因子 *CHUP1* により負の制御を受けていることが明らかになった。さらに、*chup1* 変異もしくは *CHUP1* 過剰発現により表皮細胞の葉緑体応答を欠損させた *pen2* 植物では不適応型炭疽病菌に対する付着器侵入抵抗性がより低下していた。以上より、シロイヌナズナの表皮細胞では、葉緑体の動的な変化が不適応型炭疽病菌の付着器を介した侵入に対する抵抗性に寄与していると推定された。

Arabidopsis resistance against appressorium-mediated invasion by *Colletotrichum* and dynamics of epidermal chloroplasts

Hiroki Irieda^{1,2}, Yoshitaka Takano³, Daisuke Shiomi²

(¹Acad. Assembly, Inst. Agric., Shinshu Univ., ²Dept. Life Sci., Rikkyo Univ., ³Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

P-71

比較ゲノム・トランスクリプトーム解析によるウリ類炭疽病菌の強病原性関連因子の探索

井上喜博¹, Pamela Gan², 白須賢², 鳴坂義弘³, 高野義孝¹ (¹京大院・農, ²理研 CSRS, ³岡山生物研)

ウリ類炭疽病菌 3 菌株 (104-T, RSCO-09-1-2, MAFF306518) のウリ科作物に対する病原性試験により, 他の 2 菌株に比べて強病原性を示す RSCO-09-1-2 株 (以下 09 株) を同定している。今回新たにウリ類炭疽病菌 10 菌株を農業生物資源ジーンバンクより入手し, ウリ科作物に対する病原性試験を行ったところ, この中の 3 菌株が 09 株と同程度の強病原性を示した。このことから, 強病原性が 09 株特異的な現象ではないことが示唆された。続いて, 09 株を含む強病原性株 3 菌株と 104-T 株を含む中程度の病原性株 2 菌株を選抜し, これらの菌株のキュウリへの感染行動を観察したところ, 強病原性株では共通して中程度病原性株よりも早いタイミング (接種 2 日後) で侵入菌糸の形成が観察され, その侵入率も高かった。現在これら 5 菌株について全ゲノムシーケンス解析およびキュウリ接種 1 日後におけるトランスクリプトーム解析を行い, 菌株間の比較により強病原性株に共通する因子の探索を行っている。

Searches on factors involved in hypervirulence of *Colletotrichum orbiculare* through comparative genomics and transcriptomics

Yoshihiro Inoue¹, Pamela Gan², Ken Shirasu², Yoshihiro Narusaka³, Yoshitaka Takano¹

(¹Grad. Sch. Agri., Kyoto Univ., ²RIKEN CSRS, ³RIBS Okayama)

P-72

植物病原糸状菌における細胞外分泌多糖ガラクトサミノガラクトサンの機能解析

吉見啓¹, 泉津弘佑², 宮澤拳³, 鈴木一実², 阿部敬悦^{1,3} (¹東北大・NICHe, ²滋賀県大院・環境, ³東北大院農・生物産業創成)

我々は以前より, モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* において細胞壁 α -1,3-グルカン (AG) の機能解析を進めてきた [Yoshimi *et al.*, *PLOS ONE* 2013, 8(1): e54893]。本過程において, AG 欠損株を液体培養すると菌糸が培地中に均一分散し, AG は菌糸接着因子として機能することを明らかにした。また, 麹菌 *A. oryzae* では, AG だけでなく細胞外分泌多糖ガラクトサミノガラクトサン (GAG) が第 2 の菌糸接着因子として機能し, AG と GAG を同時に欠損した株は高密度培養菌への好適性を示すことが明らかになっている (PCT/JP2018/17474)。ところで, *Aspergillus* 属菌において GAG の生合成遺伝子群はクラスターを形成している。また, 糸状菌ゲノム情報の比較解析によると, GAG 生合成遺伝子クラスターは分類群をまたいで保存されていることが明らかになりつつある [Lee *et al.*, *mBio* 7(2): e00252-16, 2016]。一方, ヒト感染性の *A. fumigatus* において GAG と病原性との関わりが報告されているものの, 他の糸状菌における GAG の機能はほとんど明らかにされていない。本研究では, 植物病原糸状菌 (トウモロコシごま葉枯病菌および灰色かび病菌) における GAG 欠損株の表現型を解析することにより, 糸状菌一般における GAG の機能, 特に菌糸接着機能と病原性との関連についての知見を得ることを目的とした。まず, 両菌において GAG 欠損株を造成し, 液体培養における培養性状を解析した。その結果, 両菌の GAG 欠損株はともに培地中で菌糸が分散する傾向を示した。また, 本培養条件では AG が発現していなかったことから, 両菌における菌糸凝集には GAG が単独で関与していることが示唆された。現在, 両菌における GAG と病原性との関連を解析中である。

Functional analysis of the extracellular polysaccharide galactosaminogalactan in plant pathogenic fungi.

Akira Yoshimi¹, Kousuke Izumitsu², Ken Miyazawa³, Kazumi Suzuki², Keietsu Abe^{1,3}

(¹NICHe, Tohoku Univ., ²Grad. Sch. of Env. Sci., Univ. of Shiga prefecture, ³Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ.)

P-73 (O-13)

コムギいもち病菌のエンバクに対する非病原性の分子解析

天藤陽香, 東夏希, 足助聡一郎, 土佐幸雄 (神戸大院・農)

コムギいもち病菌(以下コムギ菌)はエンバクに対して非親和性を示す。本研究では, コムギ菌のエンバクに対する非病原力遺伝子 *PATI* のクローニングを試みた。コムギ菌 Br48 とエンバク菌 Br58 の F₁ に Br58 を戻し交雑して得た BC₁F₁ を用いて分離分析を行い, *PATI* 完全連鎖マーカーを得た。これを用いてコムギ菌 Br48 の BAC ライブラリーをスクリーニングし, 当該領域をカバーする 4 つの BAC クローンを得た。それぞれを Br58 のプロトプラストに形質転換し, エンバク品種 CW-491-4 と勝冠に接種した結果, 3 つの BAC クローンを導入した形質転換体において, 非病原性を示すものが得られた。このことから, *PATI* はこれら BAC クローンの重複する領域 38kbp 内に存在することが示唆された。さらに, BAC クローンを導入した形質転換体を増やし, 非病原性を示す形質転換体が保有する BAC 領域を精査した結果, その中に BAC クローンの 1 部分 18.3kb のみを持つものが含まれていた。さらに, バングラデシュで分離されたコムギ菌の RNA-seq のデータを用い, 本領域 18.3kbp において発現している領域を調べ, サブクローニングと形質転換体の接種を行った。その結果, *PATI* 座乗候補領域を 3.3kbp に絞り込むことができた。

Molecular analyses of the avirulence of *Triticum* isolates of *Pyricularia oryzae* against oat

Haruka Tendo, Natsuki Azuma, Soichiro Asuke, Yukio Tosa

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

P-74

Investigation of the *in vivo* evolution of *Aspergillus fumigatus*

Cai Bian¹, Yoko Kusuya¹, Daisuke Hagiwara², Akira Watanabe¹, Hiroki Takahashi^{1,3} (¹MMRC, Chiba Univ., ²Life Env. Sci., Tsukuba Univ., ³MCRC, Chiba Univ)

Aspergillus fumigatus is a major cause of invasive fungal infection in human being. It is supposed that *A. fumigatus* has been exposed to numerous environmental stresses in human's lung during infection. We previously investigated clinical strains isolated from eleven patients, and confirmed the phenotypic changes such as antifungal resistance, cell wall integrity, oxidative tolerance, and hypoxic fitness. Here, in order to understand how the changes are genetically controlled, we sequenced the whole genomes of these strains, and developed the analysis pipeline for identifying the genetic variations, i.e. SNPs and INDELS. For one of a strain set consisting of five strains spanning a range from 38 to 56 months' infection time, 11, 20, 30, and 33 SNPs were identified respectively, indicating a SNP number increment over time. We will also analyze the possible associations between these phenotypic changes and genomic variations in detail. Our study is expected to contribute to the characterization of the evolutionary trajectory of *A. fumigatus* during infection.

P-75 (O-15)

***TFVI* is preferentially expressed in plant infection phase and is required for full virulence of *Colletotrichum orbiculare* on cucurbit plants**

Ru Zhang, Yoshihiro Inoue, Masanori Kaido, Kazuyuki Mise, Yoshitaka Takano (Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

Colletotrichum orbiculare preferentially expresses a set of effectors during host plant infection. To gain further insights into the stage-specific expression of effectors in plant pathogenic fungi, we here focused on the transcription factors of *C. orbiculare* preferentially expressed at the pre-invasion stage on the host plant. Based on RNA sequencing data of *C. orbiculare* under various conditions, we selected 9 candidate genes and generated the knock-out mutants of *C. orbiculare* for each gene. The deletion of one candidate gene in *C. orbiculare* caused the reduction in virulence on both cucumber and melon but not on *Nicotiana benthamiana*. We named this gene *TFVI* (transcription factor for virulence 1). *TFVI* encodes a putative transcription factor containing the fungal Zn(II)₂-Cys₆ binuclear cluster domain. The phenotypes of the *tfv1Δ* mutants in vegetative growth, conidia production, and appressorium formation were similar to those of the wild-type strain. In contrast, the *tfv1Δ* mutants delayed appressorial invasion on cucumber in comparison with the wild-type strain. To investigate the regulatory role of *TFVI* in the expression of effector genes, we are going to perform comparative RNA sequencing analyses between the wild-type strain and the *tfv1Δ* mutant.

P-76

ウリ類炭疽病菌の Lipid Phosphate Phosphatase 遺伝子 *CoPAP2* の機能解析

榎谷美衣奈, 竹山さわな, 豊田裕実, 小玉紗代, 久保康之 (京都府立大・生命環境)

本研究では、ウリ類炭疽病菌の病原性欠損株のスクリーニングを行い、変異株 No.523 の変異遺伝子として typeII phosphatidate phosphatase(pap2)domain protein をコードする遺伝子 *CoPAP2* を同定した。出芽酵母において PAP2 ドメインを持つ *LPPI*, *DPP1* は、ジアシルグリセロールピロリン酸、ホスファチジン酸を脱リン酸化し、ジアシルグリセロールを生産する膜貫通タンパクである。キュウリ子葉を用いて $\Delta copap2$ の病原性評価を行った結果、 $\Delta copap2$ は野生株と比較して病原性が低下した。また、キュウリ子葉上において $\Delta copap2$ は野生株と同様に正常な付着器を形成したが、侵入菌糸形成率は低下した。一方、セルロース膜上では $\Delta copap2$ は野生株と同程度の侵入菌糸形成率を示した。そこで、熱処理キュウリ子葉を用いて宿主の防御応答の関与を検討したところ、 $\Delta copap2$ は無処理子葉と比較して熱処理に対して病原性の回復を示した。また、有傷子葉上では $\Delta copap2$ は野生株と比較して病原性が低下した。以上より、*CoPAP2* は宿主植物の防御応答の回避に関与し、宿主内での侵入菌糸伸展を可能とすることで、本菌の病原性に寄与している可能性が示唆された。

Functional analysis of *CoPAP2*, a Lipid Phosphate Phosphatase of *Colletotrichum orbiculare*.

Miina Sakakiya, Sawana Takeyama, Yuumi Toyoda, Sayo Kodama, Yasuyuki Kubo

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

P-77

ウリ類炭疽病菌の宿主特異性に関する研究：アルファルファ炭疽病菌との比較解析

小川泰生¹, 井上喜博¹, Pamela Gan², 海道真典¹, 三瀬和之¹, 鳴坂義弘³, 白須賢², 高野義孝¹ (¹京大院・農, ²理研 CSRS, ³岡山生物研)

ウリ類炭疽病菌 (*Colletotrichum orbiculare*, 以下 *Co*) とアルファルファ炭疽病菌 (*C. trifolii*, 以下 *Ct*) は、ともに *Orbiculare* クレードに属する近縁な関係であるにもかかわらず、その宿主特異性には明確な差異が見られる。しかし、その分子的背景は不明である。今回、*Ct* を *Co* の宿主であるキュウリに接種し、その感染行動を調査した。その結果、*Ct* はキュウリ上でメラニン化した付着器を形成する一方、侵入菌糸の形成は阻止されていた。これより、*Ct* は *Co* とは異なりキュウリの侵入抵抗性を抑制できないと推察された。続いてキュウリの侵入抵抗性を抑制する *Co* の因子の探索を目的として、*Co* 104-T 株と *Ct* MAFF305078 株のゲノム上に予測された遺伝子セットについて OrthoFinder を用いた比較を実施し、*Ct* の遺伝子とのオーソログ関係が予測されない *Co* の遺伝子を選抜した。当該選抜遺伝子について、*Ct* ゲノムシーケンズリードをマッピングし、そのカバー率を調べることで、*Co* 104-T 株に存在し、*Ct* MAFF305078 株に存在しない 372 の遺伝子が見出された。さらに *Co* 4 菌株と *Ct* 1 菌株のゲノム解析を新たにおこない、その情報をもとに、*Ct* 2 菌株には存在せず、*Co* 5 菌株に共通して存在する 354 個の遺伝子を選抜した。現在、*Co* 5 菌株の宿主感染時のトランスクリプトーム解析による候補遺伝子の更なる絞り込み、および候補遺伝子の機能解析に着手している。

Studies on host specificity of *Colletotrichum orbiculare*: Comparative analysis with *C. trifolii*

Taiki Ogawa¹, Yoshihiro Inoue¹, Pamela Gan², Masanori Kaido¹, Kazuyuki Mise¹, Yoshihiro Narusaka³, Ken Shirasu², Yoshitaka Takano¹

(¹Grad. Sch. Agri., Kyoto Univ., ²RIKEN CSRS, ³RIBS Okayama)

P-78

LysM ドメイン多連結体および LysM ドメイン多連結体融合キチナーゼの抗真菌活性

高島智也^{1,2}, 上地敬子², 平良東紀^{1,2} (¹鹿大院・連農, ²琉大・農)

植物由来キチナーゼの役割は、植物病原菌の 8 割を占める糸状性真菌の細胞壁キチンを加水分解することによってその侵入と増殖を防ぐ生体防御機能であると考えられている。リュウキュウイノモトソウ由来キチナーゼ (PrChiA) はキチン結合性の糖質結合モジュール family 50 に属する lysin motif (LysM) ドメイン 2 つと糖質加水分解酵素 family 18 に分類される触媒ドメインがリンカーを介して連結された構造をもち、強い抗真菌活性を示す。PrChiA より LysM ドメインを 1 つ削ると抗真菌活性が低下し、触媒ドメイン単独では抗真菌活性を示さないことから、PrChiA の抗真菌活性の発揮には LysM ドメインの寄与が大きいことが分かっている。そこで LysM ドメインを利用したキチナーゼの抗真菌活性の強化を試みた。

まず、PrChiA の N 末端より 2 番目の LysM ドメインを複数連結した多連結体を作製した。α-キチンナノファイバーを用いた結合実験から、LysM ドメイン単体と比較して多連結体はキチンに強く結合することがわかった。LysM ドメイン多連結体はキチナーゼ活性を持たないにも関わらず、*Trichoderma viride* に対する抗真菌活性を示した。また、顕微鏡観察において、LysM ドメイン多連結体を作用させた菌糸は、その先端のみから溶菌していることが観察された。

次に、LysM ドメイン多連結体を PrChiA の触媒ドメインに融合させた LysM ドメイン多連結体融合キチナーゼを作製した。*T. viride* に対する抗真菌活性を測定した結果、LysM ドメイン多連結体融合キチナーゼは野生型酵素と比べて高い抗真菌活性を示すことがわかった。また顕微鏡観察から野生型酵素および LysM ドメイン多連結体融合キチナーゼは菌糸の先端だけでなく、菌糸の側壁における溶菌が見られた。

Antifungal activities of LysM domain multimers and their fusion chitinases

Tomoya Takashima^{1,2}, Keiko Uechi², Toki Taira^{1,2}

(¹Kagoshima Univ. United Gra. Sch. of Agr. Sci., ²Dept. of Biosci. & Biotechnol., Univ. of the Ryukyus)

P-79

イネ科植物に感染する *Epichloë* 属菌の異種間での菌糸融合の観察および擬似有性生殖による Hybrid 菌株の作出

三浦里佳, 磯部仁美, 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)

子囊菌門, 麦角菌科に属する *Epichloë/Neotyphodium* 属菌は, イネ科植物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。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, 子囊菌が 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, ライグラスに感染する *E. festucae* の 2 種類の菌株を用いた人工的な擬似有性生殖によって染色体数が増加した hybrid 株が得られている。今回, *E. festucae* とヤマカモジグサから分離した *E. sylvatica* を対峙培養し, その相互作用の解析を行った。その結果, *E. festucae* と *E. sylvatica* の菌糸融合が観察され, 両菌が擬似有性生殖様の現象を起こす可能性が示された。そこで, 異なる薬剤耐性マーカーを持つ *E. festucae* と *E. sylvatica* の貧栄養培地上での対峙培養を行なったところ, 両菌の hybrid 株が得られた。この結果から, *Epichloë* 属菌では異種間の擬似有性生殖によって遺伝的に多様な不完全菌が出現している可能性が示された。

Observation of hyphal cell fusion between *Epichloë festucae* and *E. sylvestris* and production of their hybrid strains via parasexual reproduction.

Rika Miura, Hitomi Isobe, Ikuo Sato, Sotaro Chiba, Kazuhito Kawakita, Aiko Tanaka, Daigo Takemoto

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

P-80

コスモス炭疽病菌の付着器を介した植物侵入にメラニン化は必須ではない

武末和穂¹, 入枝泰樹² (¹信大・農, ²信大・大学院農)

植物病原糸状菌である炭疽病菌 (*Colletotrichum* 属菌) は, イネもち病菌と同様に付着器を形成して植物細胞に侵入する。本過程では付着器のメラニン化が膨圧の発生に寄与するとされ, 実際にメラニン合成阻害剤がこれら病原糸状菌に対する有効性の高い農薬として使用されている。一方で, トウモロコシ炭疽病菌における付着器内部の膨圧発生にメラニン化は必要ないと報告されているが, 本菌のメラニン合成欠損株は植物細胞への侵入能を欠く。これらの先行研究は, 炭疽病菌の付着器を介した植物侵入におけるメラニン化の必須性を強く示しており, クワ炭疽病菌で見られる付着器を介さない菌糸先端侵入 (HTE) にメラニン合成阻害剤が実効性をもたないことも本定説と矛盾しない。今回, 我々は, コスモス炭疽病菌が典型的な付着器形成を示す一方で, 植物への侵入に付着器のメラニン化を必須としないことを報告する。本菌はメラニン合成阻害剤であるカルプロパミドの存在下においてもコスモスに壊死斑を形成した。また, 当研究室では, 本菌がシロイヌナズナの *pen2* 変異体に侵入して壊死斑を形成できることを見出しているが, *pen2* 植物上ではカルプロパミドによりメラニン化が阻害された付着器からも侵入菌糸の進展がみられ, 壊死斑が形成された。以上の結果は, カルプロパミドの添加により宿主侵入および壊死斑形成が強く阻害されるウリ類炭疽病菌やアブラナ科炭疽病菌の場合と大きく異なる。炭疽病菌の付着器を介した植物侵入にメラニン化が必須であるという定説と相反するため, 現在, コスモス炭疽病菌の性質について解析を行っている。

Appressorial melanization is not essential for plant invasion by cosmos anthracnose fungus *Colletotrichum fioriniae*

Kazuho Takesue¹, Hiroki Irieda²

(¹Fac. Agric., Shinshu Univ., ²Acad. Assembly, Inst. Agric., Shinshu Univ.)

P-81

イネいもち病菌の RNA サイレncing 関連遺伝子の MoCV1-A 感染への影響

高野翔¹, 木口歌菜², 高崎恵利花³, 有江力¹, 森山裕充¹, 大里修一^{2,3}, 小松健¹ (¹農工大院・農, ²明治大院・農, ³明治大・農)

マイコウイルスは多くの菌類に感染していることが報告されているが、その大多数は宿主菌に病徴を示さない。イネいもち病菌 (*Magnaporthe oryzae*) に感染する二本鎖 RNA ウイルス MoCV1-A (*Magnaporthe oryzae* chrysovirus 1 strain A) は、分離された宿主菌株 S-0412-II 1a の病原性を低下させる効果が報告されている一方で、イネいもち病菌 P2 株に再導入しても菌糸生育への影響は認められない。本研究では、イネいもち病菌 P2 株において RNA サイレncing がウイルスの感染抑制に関与していると想定、これを検証することを目的とした。CRISPR-Cas9 を用い、P2 株の RNA サイレncing 関連遺伝子のうち、2 種類の Dicer と 3 種類の Argonaute の破壊株を作製した。破壊株の菌糸生育を調べたところ、MoDicer2 破壊株 (Δ MDL2) および MoArgonaute3 破壊株 (Δ AGL3) では P2 株と比較して菌糸生育が若干低下した。さらに MoDicer1 破壊株 (Δ MDL1), MoDicer2 破壊株 (Δ MDL2) のイネ (品種日本晴) に対する病原性を観察したところ変化はなかった。これらの 5 株の RNA サイレncing 関連遺伝子破壊株に対して、MoCV1-A が持続感染する S-0412-II 1a 株をドナーとして対峙培養によるウイルス感染を試みた。その結果、 Δ AGL3 と Δ MDL2 の 2 破壊株で、菌糸融合による MoCV1-A の感染が確認された。MoCV1-A が感染した 2 破壊株の菌糸生育を観察したところ、 Δ AGL3 では変化が認められなかったが、 Δ MDL2 では顕著に菌糸生育が低下した。このことより、P2 株において MDL2 が RNA サイレncing によるマイコウイルス病徴の抑制に関与することが示唆された。

Influence of RNA silencing-related genes in rice blast fungus on MoCV1-A infection.

Sho Takano¹, Kana Kiguchi², Erika Takasaki³, Tsutomu Arie¹, Hiromitsu Moriyama¹, Shuichi Ohsato^{2,3}, Ken Komatsu¹, (¹Grad School of Agric, TUAT, ²Grad School of Agric, Meiji Univ., ³School of Agric, Meiji Univ.)

P-82 (O-16)

非病原性 *Fusarium oxysporum* W5 ゲノムはコア染色体でない領域を有する

齊藤大幹¹, 浅井秀太^{2,3}, 小寺俊丞⁴, 小松健^{1,4,5}, 有江力^{1,4,5} (¹農工大院・連農, ²JST さきがけ, ³理研 CSRS, ⁴農工大院・農, ⁵農工大・GIR)

子嚢菌 *Fusarium oxysporum* のゲノムは、基本的に全ての菌株が共有し生育に必須な遺伝子が座乗するコア染色体と、エフェクター遺伝子をはじめとする病原性関連遺伝子等生育に必須でない遺伝子が座乗するアクセサリ染色体から成る。植物病原性菌株では、アクセサリ染色体の有無や構成によって宿主特異性分化等の種内多型が生じるとされるが、非病原性菌株でのアクセサリ染色体の解析例は見当たらない。生物防除資材等、一部の有用非病原性菌株に特有な能力がアクセサリ染色体上の遺伝子によって制御されている可能性を考えた。非病原性 *F. oxysporum* 菌株 W5 は、イネばか苗病やバナナパナマ病等に対する生物防除能を示す有用菌株である。PacBio RSII を用いた W5 の全ゲノム情報の解読の結果、1 SMRT Cell で、平均カバレッジ 68, コンティグ数 29, ゲノムサイズ 47 Mb と良好なゲノムデータを得た。また、NCBI 上のデータベースと比較したところ、トマト萎凋病菌 f. sp. *lycopersici* 4287 株 (以下 4287) のアクセサリ染色体である 3, 6, 14, 15 番染色体、及び、キュウリ根腐つる割病菌 f. sp. *radicis-cucumerinum* 016 株 (以下 016) のアクセサリ染色体である RC 染色体と相同な染色体 (領域) を、W5 が有していないことが示された。一方、W5 のコア染色体に相当するコンティグの内、いくつかの末端には、4287 や 016 との相同性が認められない領域が存在した。

The genome of non-pathogenic *Fusarium oxysporum* W5 contains non-core chromosomal region

Hiroki Saito¹, Shuta Asai^{2,3}, Shunsuke Kotera⁴, Ken Komatsu^{1,4,5}, Tsutomu Arie^{1,4,5}

(¹United Grad School of Agric, TUAT, ²PRESTO, JST, ³CSRS, RIKEN, ⁴Grad School of Agric, TUAT, ⁵GIR, TUAT)

P-83 (O-14)

全ゲノム比較手法に基づく殺菌剤 Tolnifanide 新規作用点の特定

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

私たちは新規殺菌剤の未知の作用点を同定するため, ①耐性株を人為的に作出, ②次世代ゲノムシーケンサーを用いて野生株と耐性株の全ゲノムを比較して耐性点を同定, ③この薬剤耐性遺伝子を作用点の候補として実証実験を行う, というこれまでにない新しい手法を提案している。本研究では, 作用点未知の新規殺菌剤 Tolnifanide に着目し, 人為的に作出した耐性株と野生株を全ゲノム比較し, 変異のある遺伝子を耐性点の候補として実証実験を行った。その結果, *Geranylgeranyl transferase* 遺伝子 *Ggt1* の C406Y 変異が Tolnifanide の耐性点であることが実証できた。

そこで, GGT1 タンパク質を作用点候補として実証実験を行った。Tolnifanide は選択毒性が高く, プレオスポラ目に属するトウモロコシごま葉枯病菌 (*Bipolaris maydis*) には卓効を示す一方で, ウリ類炭疽病菌 (*Colletotrichum orbiculare*) には効かない。これに注目し, Tolnifanide が効かない菌の *Ggt1* を効く菌の *Ggt1* で置換するだけで, 効かない菌でも Tolnifanide が効くようになれば, GGT1 が作用点であることの証明ができると考えた。そこで, *C. orbiculare* が本来もつ *Ggt1* を *B. maydis* 由来の *Ggt1* と置換した株を作出した。*Ggt1* 置換型の *C. orbiculare* は Tolnifanide に高感受性を示した。この結果より, GGT1 が Tolnifanide の作用点であることが証明できた。これにより, GGT1 を殺菌剤の新たなドラッグターゲットとして見出した。

GGT1 は RHO 型 GTPase などのタンパク質に翻訳後修飾を行う酵素として知られている。出芽酵母の研究例では, RHO 型 GTPase の C 末端配列を -CaaL から -CaaM に置換するだけで, GGT1 が機能不全となっても致死とならないことが報告されている。そこで菌の生存に特に重要と考えられる3つの RHO 型 GTPase (RHO1, CDC42, RAC1) の C 末端を -CaaM に書き換えたベクターを構築し, *B. maydis* の野生株に導入した。その結果, 遺伝子組換え株は Tolnifanide 耐性を示した。以上の結果より, Tolnifanide は新規ドラッグターゲットである GGT1 に作用し, 下流の RHO 型 GTPase を攪乱することにより毒性を発揮することが明らかとなった。

Identification of the mode of action of Tolnifanide by whole genome comparison.

Sae Shige-yoshi¹, 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-84

トマト葉かび病菌のベンズイミダゾール剤と SDHI 剤に対する耐性変異の同定とパイロシーケンシング法による診断系の構築

佐竹諒子¹, 渡辺秀樹², 藤村真¹ (¹東洋大院・生命科, ²岐阜農技セ)

植物病原菌の殺菌剤耐性問題は, 開発剤の多様化に伴い複雑化している。我々は, 多様化する耐性菌の分布を解析するために, 従来の PCR 法に替わる耐性変異検出法としてパイロシーケンシング法の構築をすすめている。本研究では, トマト葉かび病菌 *Cladosporium fulvum* (syn. *Passalora fulva*) に着目した。トマトの重要病害である本病害の防除には, ベンズイミダゾール(BZ)剤, DMI 剤, QoI 剤, SDHI 剤などの殺菌剤が使用されているが, BZ 剤と QoI 剤を除き, 耐性変異が十分に解析されていない。今回は, 岐阜県から分離した菌株を用いて, BZ 剤と SDHI 剤の耐性変異の探索と診断系の構築を行った。BZ 剤の耐性変異は, 多くの病原菌で beta-tubulin の E198A/K/V, F200Y であることから, この領域の配列解析をするパイロシーケンシング法を構築した。その結果, 岐阜県分離の BZ 耐性変異株は全て E198K 変異であることが明らかになった。SDHI 剤については, 各種病原菌で報告されている SdhB(コハク酸脱水素酵素サブユニット B)の3か所(P225Y, N230I, H272Y/R)の変異を検出できるパイロシーケンシング法を構築した。しかし, 少なくとも, 岐阜分離株の SDHI 耐性株は, *SdhB* 遺伝子に変異が認められなかった。ただし, 一部の病原菌で変異が報告されている *SdhC* 遺伝子内に SNP が存在することが確認された。現在, この SNP が耐性変異を担うかの確認を行っている。パイロシーケンシング法は, 混合 DNA から耐性菌 DNA の比率を概算することもできることから, 耐性変異を網羅できる診断系ができれば, 耐性菌の分布解析に貢献できると期待している。

Pyrosequencing assays for detection of benzimidazole- and SDHI-resistance mutations in *Cladosporium fulvum*

Ryoko Satake¹, Hideki Watanabe², Makoto Fujimura¹

(¹Life Sciences, Univ. of Toyo, ²Gifu Prefectural Agricultural Technology Center)

P-85

外生菌根菌ホンシメジにおける2種のMAP kinaseの遺伝子破壊および機能解析

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

マツタケ, ホンシメジ, トリユフなどの外生菌根菌は宿主植物の根と共生し, 森林生態系において重要な役割を果たしている。外生菌根は植物・微生物相互作用の興味深い研究モデルと考えられるが, 我々の知る限り, 外生菌根菌において遺伝子破壊 (Targeted gene disruption) の成功例はこれまでになく, 分子遺伝学的な観点からはほとんど研究がすすんでいない。本研究では, アカマツ (*Pinus densiflora*) と共生する外生菌根菌ホンシメジ (*Lyophyllum shimeji*) をモデルとして, 外生菌根菌で初めて遺伝子破壊法を確立した。まず最初に AtMT 法を用いて, 非相同性組換え修復に関わる *KU80* 遺伝子の破壊を試みた。その結果, 363 株の形質転換体 (ハイグロマイシン耐性株) が得られ, そのうち1株が遺伝子破壊株であった。

次に, この *KU80* 遺伝子破壊株を親株として, 菌根共生に重要な役割を持つことが予測される2種のMAP kinase 遺伝子 (*LsKSSI*, *LsMPK1*) の破壊を行った。その結果, *LsKSSI* で7株, *LsMPK1* で4株の遺伝子破壊株を得ることが出来た。遺伝子破壊効率は, 野生株を親株にした場合には0.3% (1/363) であったのに対し, *KU80* 破壊株を親株とした場合では90%以上 (11/12) となり, 飛躍的な上昇が認められた。*LsKss1* 破壊株, *LsMpk1* 破壊株のどちらも, 気中菌糸の形成が著しく少なく, 親株とコロニー形態の違いが認められた。現在, 宿主植物アカマツと各破壊株の菌根共生試験をすすめており, 現在までに, 少なくとも *LsKSSI* が外生菌根共生に重要な役割をもつことが強く示唆されている。これらの詳細な結果についても発表したい。

Disruption of MAP kinase genes, *LsKSSI* and *LsMPK1*, in the ectomycorrhizal fungi *Lyophyllum shimeji*.

Kazuho Maeda¹, Yukari Matsunaga¹, Yuki Hirose¹, Sae Shigeyoshi¹, Chihiro Tanaka², Toshikazu Irie¹, Kazumi Suzuki¹, Kosuke Izumitsu¹

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

P-86

トウモロコシごま葉枯病菌におけるNADPH オキシダーゼ遺伝子群の機能解析

竹村綾乃, 奥谷美季, 入江俊一, 鈴木一実, 泉津弘佑 (滋賀県立大院・環境)

NADPH オキシダーゼは, 活性酸素を生成する酵素である。菌類では菌糸融合や病原性などに関与するといわれているが, その機能は未だ詳細に解明されていない。そこで本研究では, トウモロコシごま葉枯病菌のNADPH オキシダーゼ遺伝子 *Nox1*, *Nox2*, *Nox3*, それらの制御因子と考えられる *NoxR*, また *Nox1* および *Nox2* と各々複合体を形成するといわれている *Pls1*, *Pro41* に注目し, 各遺伝子破壊株を作出し機能解析をおこなった。*Nox1* 遺伝子破壊株は白色のコロニーを形成し, 菌糸体のメラニン化に関与することが示唆された。また, 交配試験において子嚢殻を形成できなかったことから, *Nox1* 遺伝子は交配過程の初期段階で子嚢殻の形成を制御することが示唆された。*Nox1* 遺伝子と似た機能を保有すると考えられている *Pro41* 遺伝子についても調査を進めたところ, 菌糸体のメラニン化と子嚢殻形成に関与することが示唆された。*Nox2* 破壊株は無傷葉で病斑を形成せず, 有傷葉で病斑を形成した。また, 付着器から植物体内に侵入菌糸を伸ばさず, 植物表面上で二次菌糸を形成していた。このことから *Nox2* 遺伝子は貫穿糸形成能力に関与することが示唆された。*Pls1* 破壊株は *Nox2* 破壊株と同様に病原性が認められず, 宿主葉への侵入能力が欠損していた。*Nox3* 破壊株はこれまでの実験で特出した機能が見つからず, 現在も機能解析を進めている。*NoxR* 破壊株は, *Nox2* 破壊株と同様に病原性が認められず, 宿主葉への侵入能力を欠損した。また, 交配試験において, *Nox1* 破壊株と同様に子嚢殻を形成できなかった。このことから *NoxR* 遺伝子は *Nox1* と *Nox2* を制御することが示唆された。

Functional analysis of the NADPH oxidase genes in *Bipolaris maydis*

Ayano Takemura, Huki Okutani, Toshikazu Irie, Kazumi Suzuki, Kosuke Izumitsu

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

P-87

イネ科植物の共生糸状菌 *Epichloë festucae* の細胞融合と共生確立に関与する RasB 活性化因子 Cdc25 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・農)

Epichloë festucae はイネ科牧草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。当研究室では、共生能を失った変異体の解析により共生確立に関与する遺伝子の探索を行なっている。これまでに、感染により植物の矮化を起こすヘテロ三量体 G タンパク質 α サブユニット *gpa* 破壊株や植物への全体的感染能が低下する MAP キナーゼ *mak2* 破壊株などを得ているが、いずれの変異株も培地上での菌糸融合能を失っており、菌糸融合と共生確立には密接な関係があると推定している。菌糸融合欠損株のスクリーニングから、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、*mak2* 破壊株と同様に植物組織内で菌糸が断片化して植物全身への感染を確立できず、*Cdc25* と *Mak2* は植物生長に同調した菌糸伸長に必要な因子であることが示された。*Cdc25* と相互作用する RasB の恒常活性型を *cdc25* 破壊株に発現したところ、菌糸融合能および共生能が回復した。一方、*mak2* 及び *gpa* 破壊株に恒常活性型 RasB を発現した場合は、表現型の回復は認められなかった。以上の結果から、*Cdc25* により活性化した RasB は、G α A や *Mak2* とは独立して、あるいは情報伝達の下流で、菌糸融合や共生確立を制御していることが示唆された。

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-88

灰色かび病菌 *Botrytis cinerea* が植物由来の抗菌物質の解毒時に発現する遺伝子群の RNAseq 解析

黒柳輝彦¹, 小鹿一¹, 鈴木孝征², 佐藤育男¹, 千葉壮太郎¹, 川北一人¹, 竹本大吾¹ (¹名大院・生農, ²中部大・応生)

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。広範な植物種に対して病原性を示す多犯性病原菌である灰色かび病菌 *Botrytis cinerea* は、様々な植物の産生する多様な構造のファイトアレキシンを解毒代謝することが知られている。今回、ジャガイモやトマトの産生するリシチン、ピーマンやタバコ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) の存在下で発現が変動する *B. cinerea* 遺伝子を RNA seq により比較解析した。その結果、構造的に極めて類似しているリシチンとカプシジオール存在下で発現が上昇する遺伝子のパターンが大きく異なっていた。これまでに、プラスミド挿入変異法により植物への病原性が低下した *B. cinerea* 変異株を 5 株単離しているが、そのうち 3 株ではリシチンの代謝能が低下する一方で、カプシジオール代謝能は野生株と同等であった。これらの結果から、*B. cinerea* が 2 種のセスキテルペノイドを異なる方法で解毒化していることが示唆された。一方、構造的に類似性の低いリシチンとレスベラトロール存在下での遺伝子発現パターンが類似していた。以上の結果から、*B. cinerea* は異なるファイトアレキシンを認識し、その解毒化に関与する遺伝子群を活性化している可能性が示された。

RNAseq analysis of *Botrytis cinerea* genes during the detoxification of different phytoalexins.

Teruhiko Kuroyanagi¹, Makoto Ojika¹, Takamasa Suzuki², Ikuo Sato¹, Sotaro Chiba¹, Kazuhito Kawakita¹, Daigo Takemoto¹
(¹ Grad. Sch. Bioagr. Sci., Nagoya Univ., ² Coll. Biosci. Biotech., Chubu Univ.)

P-89

トウモロコシごま葉枯病菌の子嚢胞子形成における 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)

真核生物の細胞内では物質は膜に包まれて輸送されており, この小胞を介したオルガネラや細胞膜のやり取りはメンブレントラフィックと総称される。この機構において重要な役割をもつ複合体が *exocyst* である。*Exocyst* は小胞と細胞膜の融合を仲介し, 膜に小胞を繫留する役割を果たしており, 出芽酵母をモデルとして菌類の形態形成に關与することが明らかにされてきた。演者らはこれまでにトウモロコシごま葉枯病菌 (*Bipolaris maydis*) において, *exocyst* 構成因子の一つ, Exo70 が病原性および形態形成に關与することを報告した (第 17 回糸状菌分子生物学コンファレンス)。今回我々は, 子嚢胞子形成における Exo70 の關与について解析を行った。まず, Exo70 遺伝子破壊株と野生株を用いて交配試験を行った。子孫解析の結果, 野生型と破壊型が 1:1 に分離せず, 破壊型の子孫株が約 10%程度しか得られなかった。この分離比の異常性の原因を調査するため Exo70::mCherry 株と Exo70 フランキンク領域に GFP を挿入した株を作出し, これらの株を交配, 子嚢胞子形成過程を調査した。この結果, 1 子嚢内における子嚢胞子数の減少が確認され, Exo70 破壊型子嚢胞子は野生型子嚢胞子と比べ高頻度でアポーションしていた。また, 野生型子嚢胞子も野生株同士の交配の場合よりもアポーションの割合が増加していた。この結果から, 子嚢胞子形成には十分な Exo70 の量が重要であるということが示唆された。そこで, 本菌の Exo70 遺伝子を野生株に導入し, Exo70 遺伝子をタンデムに重複化した株を作製した。本株と破壊株を交配したが, 胞子数の正常化には至らなかった。現在, 新たに Tef プロモーターを用いた Exo70 過剰発現株を作出し, 破壊株との交配試験を行っている。

Functional analysis of Exo70 in ascospore development of *Bipolaris maydis*

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

(Grad. School of Agriculture, Kyoto Univ.)

P-90

エンドウ萎凋病菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* が持つピサチン脱メチル化酵素遺伝子とその周辺領域のゲノム解析

小寺俊丞¹, 浅井秀太^{2,3}, 齊藤大幹⁴, 小松健^{1,4,5}, 有江力^{1,4,5} (1 農工大院・農, 2 JST さきがけ, 3 理研 CSRS, 4 農工大院・連農, 5 農工大・GIR)

植物病原性子嚢菌 *Fusarium oxysporum* には, 宿主植物の範囲に基づく多数の分化型 (forma specialis, f. sp.) が存在する。それぞれの分化型に特徴的なエフェクター遺伝子は, 生育に必須でない遺伝子で構成されるアクセサリー染色体に座乗することが示唆されてきた。エンドウ萎凋病菌 *F. oxysporum* f. sp. *pisi* (Fop) は, エンドウ (*Pisum sativum*) に黄化や萎凋などの病徴を顕す。一方, エンドウは, 病原菌の侵入に対抗して, 抗菌性二次代謝産物 (ファイトアレキシン) であるピサチン (pisatin) を産生する。エンドウ根腐病菌 *Nectria haematococca* では, ピサチン脱メチル化酵素 (PDA; AAC01762) によってピサチンを無毒化することで感染を成立させることが知られている。

日本各地で分離された *F. oxysporum* 菌株を解析したところ, Fop のみが PDA 遺伝子 (PDA) を保持した。PacBio RSII を用いた Fop (Fop9) 株の全ゲノム情報の解読の結果, 1 SMRT Cell で, 120 contig からなる 61.3 Mb のゲノムアセンブリを得た。NCBI 上のデータベースの, トマト萎凋病菌 f. sp. *lycopersici* 4287 株やキュウリ根腐つる割病菌 f. sp. *radicis-cucumerinum* 016 株のゲノムとの比較から PDA の Fop9 ゲノム上の位置を推定した。その結果, Fop9 の PDA ホモログが菌株特異的なアクセサリー染色体に座乗すること, および, PDA の周辺領域にはトランスポゾン様配列やトランスポザーゼ様配列が存在することを見出した。

Genomic analysis of Pisatin demethylase gene and its flanking region of *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*

Shunsuke Kotera¹, Shuta Asai^{2,3}, Hiroki Saito⁴, Ken Komatsu^{1,4,5}, Tsutomu Arie^{1,4,5}

(¹Grad School of Agric, TUAT, ²PRESTO, JST, ³CSRS, RIKEN, ⁴United Grad School of Agric, TUAT, ⁵GIR, TUAT)

P-91

Cre-loxP を利用した糸状菌からの標的遺伝子領域クローニング法

木下浩, Nguyen Nhu Ha Vy, 仁平卓也, 木谷茂 (阪大・生物学国際交流セ)

近年のゲノム解析は、様々な有用二次代謝物質を生産する糸状菌が、予想よりも遥かに多くの二次代謝物質合成遺伝子を有することを明らかにした。しかし、これらの遺伝子発現は菌の生育環境に強く依存するため、有効利用されていないのが現状である。菌の生育環境に依存しない遺伝子発現を達成するには、異種微生物を宿主とした生産系が挙げられる。酵母や大腸菌を宿主とした場合、発現様式の違いから、cDNA 化やプロモーター置換、前駆体供給能の向上などの解決が求められる。

一方、糸状菌を発現宿主とする場合、上記の問題を考慮する必要はない。我々は、遺伝子工学的手法が確立されている麴菌を宿主とし、コスミドを利用した二次代謝物質合成遺伝子発現法を確立した(参考文献)。しかし、必要な領域を含むコスミドの選抜に労力を必要とすること、また巨大遺伝子クラスターを獲得できないことが問題であった。

本研究では、遺伝子組換え技術 Cre-loxP により、切り取られた領域が環状化する現象に着目し、二次代謝物質合成遺伝子クラスターをクローニングすることを試みた。まず、loxP 配列を標的遺伝子クラスターの両端に同方向にて導入し、Cre 酵素を *in vitro* にて反応させた。次に、得られた環状 DNA を用いて、大腸菌を形質転換した結果、46kb の標的遺伝子クラスターの単離に成功した。確立したこの方法は、より広範囲の遺伝子領域をクローニングできることから、未知二次代謝物質合成遺伝子の解析、または、その有効利用に繋がると期待される。

The rapid method to clone a target genetic region from fungal genome by using Cre-loxP technology.

Hiroshi Kinoshita, Nguyen Nhu Ha Vy, Takuya Nihira, Shigeru Kitani

(ICBiotech, Osaka Univ.)

P-92

カーボンカタボライト抑制関連遺伝子破壊株を用いた米麴の特性

村上直之, 小高敦史, 松村憲吾, 秦洋二 (月桂冠・総研)

【背景・目的】麴菌 *Aspergillus oryzae* は固体培養において高い酵素生産性を示し、醸造産業において重要な役割を担っている。清酒醸造においてはアミラーゼ系酵素が重要であるが、カーボンカタボライト抑制 (CCR) 機構によりグルコース存在下で生産が抑制されることが知られている。これまでに、CCR 関連遺伝子である *creA* 遺伝子や *creA*, *creB* 両遺伝子を破壊することで、グルコース存在下でも α -アミラーゼの生産量が顕著に高くなることが報告されている¹⁾。清酒醸造分野における応用が期待されるため、本発表では CCR 関連遺伝子破壊株を用いたときの米麴の特性を評価したので報告する。

【方法と結果】製麴には CCR 関連遺伝子破壊株 ($\Delta creA$, $\Delta creB$, $\Delta creA\Delta creB$) および対照株を使用した。白米は精米歩合 70% の白米 50 g を使用し、分生子を約 5×10^5 conidia/g 白米となるように種付け、35°C で相対湿度 50~90% で製麴した。酵素活性はキッコーマンバイオケミファ社製のキットおよび国税庁所定分析法で測定した。対照株と比べ CCR 関連遺伝子破壊株全てで α -アミラーゼ活性の上昇が確認されたほか、グルコアミラーゼ活性の上昇も見られた。また、酸性カルボキシペプチダーゼ (ACP) の活性は $\Delta creA$ や $\Delta creA\Delta creB$ で対照株と比較し大きく低下していた。吟醸酒造りでは雑味であるアミノ酸の生成を極力抑えるため、ACP 活性が低い種麴が好まれることから、*creA* 破壊株や *creA*, *creB* 両破壊株は吟醸酒造りに適している可能性が示唆された。その他の米麴の特性についても紹介する予定である。

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

Characteristics of rice koji using koji mold strains lacking the genes involved in carbon catabolite repression

Naoyuki Murakami, Atsushi Kotaka, Kengo Matsumura, Yoji Hata

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

P-93

新規糸状菌細胞壁溶解酵素剤の開発

木田真理衣¹, 山田浩之¹, 坪井宏和¹, 幸田明生¹, 矢野成和², 坊垣隆之¹ (¹大関・総研, ²山形大院・工)

【目的】 *Aspergillus* 属をはじめとする糸状菌に遺伝子を導入する際、多くの場合プロトプラスト-PEG 法が用いられる。プロトプラストの調製には、糸状菌細胞壁の主要構成成分であるキチンや β -1,3-グルカンを分解する、キチナーゼや β -1,3-グルカナーゼを含む細胞壁溶解酵素が使用されている。当社では *A. oryzae* などの糸状菌のプロトプラスト調製用酵素剤として Yatalase を販売している。しかし Yatalase 単独では溶解できない糸状菌も多く存在し、その場合は複数の酵素剤を組み合わせることでプロトプラストを調製する必要がある。そこで我々は Yatalase の溶菌スペクトル拡大のため、 α -1,3-glucanase 活性を付与した Yatalase を新たに調製し、数種の *Aspergillus* 属糸状菌に対するプロトプラスト形成効率を調べた。

【結果】 Yatalase 単独では溶解できない *A. luchuensis*, *A. niger*, *A. kawachii*, *A. aculeatus* についてプロトプラスト化を行ったところ、 α -1,3-glucanase 活性を付与することでプロトプラストを取得することができた。また培養条件がプロトプラスト化効率に及ぼす影響について検討した。その結果、*A. luchuensis*, *A. niger*, *A. kawachii* は pH 7 の DP 培地で培養することで、pH 未調整の DP 培地 (pH 5~6 付近) と比べ 4~5 倍プロトプラスト化効率が上昇した。当社保有菌株 *A. luchuensis* NS41 のプロトプラストを上記手法で取得し、これを用いて形質転換を実施したところ、効率良く形質転換体を得ることができた。

Development of a new fungal cell lytic enzyme cocktail

Marii Kida¹, Hiroyuki Yamada¹, Hirokazu Tsuboi¹, Akio Koda¹, Shigekazu Yano², Takayuki Bogaki¹

(¹Gen. Res. Lab., Ozeki Corp., ²Dept. of Biochem. Eng., Grad. Sch. Yamagata Univ.)

P-94

Aspergillus niger における亜リン酸脱水素酵素の形質転換用マーカーとしての使用

明星裕美, 各務清美, 榎理恵, 寺本寛, 松井知子 (ノボザイムズ ジャパン (株))

【目的】 *Aspergillus* 属菌は産業用酵素の生産菌として有用な微生物である。本菌を用いた酵素生産菌の作製や遺伝子工学的研究を行う上で、複数遺伝子の導入は不可欠であり、そのためには形質転換用マーカーが多種類ある事が望ましい。麹菌は亜リン酸を取り込むことは出来るが、リン酸へ変換する酵素が存在しないためこれをリン酸代謝に利用することが出来ない。一方で、いくつかのバクテリアにおいては、亜リン酸脱水素酵素を利用した亜リン酸からのリン酸代謝が可能であり、*Pseudomonas stutzeri* WM88 の亜リン酸脱水素酵素 (*ptxD*) もそのひとつである。そこで、*ptxD* が *Aspergillus niger* 株形質転換用マーカーとして利用可能か検証を行った。

【結果】 酵素 A 遺伝子を導入した *A. niger* 形質転換株の選抜を、亜リン酸およびアセトアミドを唯一のリン源および窒素源とする培地を用いて行った。その結果、1. アセトアミド代謝マーカーのみ、および 2. *ptxD* のみ、を用いた形質転換株の生育は認められなかったが、3. 両マーカーを用いた形質転換株は生育が確認された。3については酵素 B 遺伝子導入についても同様の検証を行った。さらに得られた形質転換株について、正しい位置に酵素遺伝子とマーカー遺伝子が組み込まれている事を確認することで形質転換効率を算出した。これらの結果、*ptxD* をマーカーに用いた形質転換は他のマーカーを用いた形質転換とほぼ変わらない効率で起こることが示され、新たなマーカーとして使用可能であることが示唆された。

Phosphite Dehydrogenase as a New Marker for *Aspergillus niger*

Hiromi Akeboshi, Kiyomi Kagami, Rie Maki, Hiroshi Teramoto, Tomoko Matsui

(Novozymes Japan Ltd)

P-95

ゲノム編集を用いた麹菌実用株の褐変性に寄与するチロシナーゼ遺伝子の同定

片山琢也^{1,2}, 白石洋平³, 和久豊³, 丸山潤一^{1,2} (¹東大院・農生科・応生工, ²東大・CRIIM, ³ビオック)

醸造産業では数多くの麹菌実用株が用いられるが、実用株の遺伝子改変は容易ではなく、株間の性質の違いを遺伝学的に解析するのは困難であった。最近、我々は麹菌でのゲノム編集技術及びゲノム編集プラスミドのリサイクリング法を確立し、実用株における効率的な多重変異株、多重破壊株の取得を可能とした¹⁾。

麹菌の生産するチロシナーゼは醸造産物の品質に深く関与しており、例えば清酒醸造では米麹や酒粕の褐変という問題の原因となる。これまでに *melO*, *melB*, *melD* の3つのチロシナーゼ遺伝子が同定されており、そのうち *melB* は褐変性に寄与することが報告されているが²⁾、他のチロシナーゼ遺伝子の褐変性への寄与は不明である。本研究では、ゲノム編集技術を用いて複数の実用株から各チロシナーゼ遺伝子の変異株、破壊株を取得し、それぞれの遺伝子の褐変性への関与や実用株間での寄与の違いについて検討した。

清酒用実用株3株と味噌用実用株(KBN943株)にゲノム編集プラスミドを導入し *melB* 変異株を取得したところ、*melB* 変異により清酒用実用株の褐変性はほとんど失われたが、KBN943株の褐変性は完全には消失しなかった。次に、プラスミドリサイクリングにより KBN943*melB* 変異株から *melO* 及び *melD* との二重変異株を取得したところ、*melBmelD* 二重変異株では褐変性が完全に消失した。さらに、ゲノム編集プラスミドとドナープラスミドの同時導入により作製した各チロシナーゼ遺伝子の単独及び二重破壊株を用いた解析でも、変異株における結果が支持された。以上の結果から、*melB* に加えて *melD* が褐変性に寄与することが示され、さらにチロシナーゼ遺伝子の褐変性への寄与が株によって異なることが明らかとなった。

- 1) 片山ら, 日本農芸化学会大会要旨集 4SY22-2 (2018)
- 2) 白石ら, 日本生物工学会大会要旨集 3P-053 (2013)

Identification of tyrosinase genes causing koji browning in *Aspergillus oryzae* industrial strains by genome editing

Takuya Katayama^{1,2}, Yohei Shiraishi³, Yutaka Wagu³, Jun-ichi Maruyama^{1,2}

(¹Dept. of Biotechnol., ²CRIIM, The Univ. of Tokyo, ³Bio'c)

P-96

黒麹菌糖質分解酵素高生産変異株の取得法と芋焼酎醸造特性について

富本和也¹, 柿菌ダララット², 韓錦順², 長船行雄², 向井伸彦² (¹酒総研・醸造微生物, ²酒総研・醸造技術)

黒麹菌 (*Aspergillus luchuensis*) は製麹条件下で様々な糖質分解酵素を分泌し、それらは焼酎・泡盛醸造において原料の液化・糖化に大きな影響を与える。同酵素高生産変異株は発酵速度の向上・醸造期間の短縮が見込まれることから、実用株として有用であると考えられる。そこで、*A. luchuensis* NBRC4314 (RIB2604) をUV照射により変異誘導し、セロビオース単一炭素源下においてグルコースアナログ 2-deoxy-D-glucose 耐性を示す変異株を取得した。それらの変異株16株中14株は破精回りが悪く、麹重量当たりのクエン酸生産量も低い(親株比: ~0.4倍)ものの、糖質分解酵素活性は大幅に上昇していた(α -アミラーゼ: 親株比~2.5-4倍, グルコアミラーゼ: 同~1.5-2.5倍, β -グルコシダーゼ: 同~3-5倍)。特定の変異株を用いて芋焼酎小仕込み試験を行ったところ、一次醪及び二次醪初期発酵速度の向上が確認された。一方、各変異株はスクロース・フルクトース・酢酸・オレイン酸の各資化能は親株とほぼ同等であったが、グルコース資化能が顕著に低かった。小仕込み試験で用いた変異株について原因変異解析を試みたところ、グルコキナーゼ遺伝子 *glkA* 中の Q300K 変異が同定され、同変異を人為的に導入した株は変異株に類似の表現型を示すことが明らかになった。本変異株には、芋焼酎醸造において発酵期間短縮が期待でき、またこの変異株取得法は工業的酵素生産にも応用可能性があると考えられた。

Isolation method of glycolytic enzymes-high producing mutants of black koji mold and its characteristics on sweet potato shochu making

Kazuya Tomimoto¹, Dararat Kakizono², Jinshun Han², Yukio Osafune², Nobuhiko Mukai²

(¹Brew. Microbiol. Div., NRIB, ²Brew. Technol. Div., NRIB)

P-97

マルチコピー遺伝子導入黄麹菌のゲノム構造解析

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)

黄麹菌の遺伝子組み換えで染色体上に遺伝子を導入する方法としては、シングルベクター法とコトランスフォーメン法の二つが可能である。この時、シングルベクター法では、染色体上のマーカー遺伝子部位とのシングルクロスオーバーによる相同組換えが基本となりシングルコピーでの導入となるが、コトランスフォーメーションでは非相同組み換えによりマルチコピーで染色体上に導入される。しかしながら、その導入部位等についてはあまり注目されてこなかった。我々は、現在までに、複数の遺伝子組換え麹菌をコトランスフォーメーションにより構築し、その過程で導入遺伝子断片の末端配列に依存したコピー数多形性やハウスキーピング遺伝子の破壊によると思われる形質転換効率の低下等を明らかにしている。本研究では、これまでに作出したこれらの遺伝子組換え麹菌のゲノム解析を実施し、遺伝子の導入部位や導入形態といったゲノム構造レベルでの解析を実施することとした。ゲノム解析には、タンデムリピート等の解析に強いロングリード解析が可能なナノポアシーケンサを使用した。現在までに、三種セルラーゼ遺伝子を導入した二菌株について解析を終えている。全長 10.3 kb の三種セルラーゼ遺伝子をタンデムに連結させたカセットを導入した NS1-3 株では、第 7 染色体上に約 53 kb の長さで導入されていた。一方、三種類のセルラーゼ遺伝子をバラバラにして導入した NSPID1-8 株では、第 8 染色体に導入されていた。導入断片の特異的な構造等の詳細については発表の中で紹介する。導入構造は想定していたものとは大きく異なっており、その導入メカニズムの解明は麹菌ゲノム改変分野において新しい知見をもたらすかもしれない。

Analysis of genome structure in multi-copy cellulase genes-integrated *Aspergillus oryzae* strains

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

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

P-98

新規麹菌ポリケタイドの同定と生合成経路の解析

菅英一郎^{1,2}, 勝山陽平^{1,3}, 丸山潤一^{1,3}, 小山泰二², 大西康夫^{1,3} (¹東大院・農生科・応生工, ²野田産研, ³東大・微生物連携機構)

【背景・目的】我々はこれまでに、植物ポリケタイド・クルクミンの生産をモデルとして、麹菌 *Aspergillus oryzae* を用いた異種ポリケタイド生産系の開発に取り組んできた。この研究において、麹菌の内在性のポリケタイド合成酵素 (PKS) は異種発現した PKS と基質 (マロニル CoA) を競合する可能性があるため、*A. oryzae* RIB40 の RNA-seq 解析のデータを基に発現量の多い PKS 遺伝子の欠失を順次行い、最大で 8 個の PKS 遺伝子の多重欠失株を作製してきた。麹菌ゲノムには 27 個の PKS 遺伝子がアノテーションされているが、機能が同定されている遺伝子は 4 つのみであり、新規ポリケタイドの合成を担う PKS が多数存在すると考えられる。そこで、本研究では、PKS 遺伝子欠失株と親株の代謝産物を比較することによって、麹菌内在性ポリケタイドを見出し、その構造を決定するとともに、その生合成経路について解析することを目的とした。

【方法・結果】天然物生合成遺伝子クラスター予測プログラム (SMURF) により予測された iterative type I PKS 遺伝子 (AO090102000166) を含む遺伝子クラスター (AO166-169) の欠失株をループアウト欠失法により作製した。本遺伝子クラスター欠失株と親株を CYA 液体培地 50 ml で 30℃, 6 日間培養し代謝産物を HPLC で解析したところ、AO166-169 欠失によって消失する化合物ピークが見られた。親株の培養液から本化合物を精製し NMR 解析を行ったところ、単環式ポリケタイド化合物 2-hydroxy-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)propan-1-one であることが明らかになった。本化合物は植物代謝産物として報告されているが、微生物の代謝産物としての報告はなかった。一方、本遺伝子クラスター周辺の遺伝子も含めて、本化合物の生産に関与する遺伝子を、遺伝子クラスター欠失株への相補実験や個々の遺伝子破壊により調べた。その結果、本化合物の生合成には、PKS (AO166) 以外に、AMP 結合ドメインを有する AO165 と lipocalin-like ドメインを有する AO167 が必要であることが明らかになった。現在、各タンパク質の機能を *in vitro* で解析している。

Analysis of polyketide biosynthesis in *Aspergillus oryzae*

Eiichiro Kan^{1,2}, Yohei Katsuyama^{1,3}, Jun-ichi Maruyama^{1,3}, Yasuji Koyama², Yasuo Ohnishi^{1,3}

(¹Dept. of Biotech., Grad. Sch. of Life Sci., Univ. of Tokyo, ²Noda Ins. Sci. Res., ³CRIM)

P-99

ナノポアシーケンサーを用いた麹菌 *Aspergillus oryzae* RIB40 のゲノム配列決定

西澤明人¹, 弓場一輝², 織田健³, 齊藤亮太³, 岩下和裕^{2,3}, 上村泰央¹ (¹株式会社ジーンベイ, ²広大先端研, ³酒類総合研究所)

近年の一分子ロングリードシーケンシング技術の進歩により、真核生物の新規ゲノム配列が安価かつ短期間で解読できるようになってきた。Oxford Nanopore Technologies 社のナノポアシーケンサーは、ポリマー製の膜上に配置されたナノポアと呼ばれる膜タンパク質を通過する一本鎖 DNA を、電流変化により配列決定することができる全く新しい原理のシーケンサーである。麹菌は、我が国の伝統的醸造産業で広く利用されてきた国菌であり、2005年12月に野性株である *Aspergillus oryzae* RIB40 株の8つの染色体からなるゲノム配列が解読された。しかし、公開されている最新のリファレンス配列においても、合計18箇所約800 kbpにも及ぶ配列未解読のギャップ領域などが残存したままで、完全長の解読には至っていない。

我々は最新のナノポアシーケンサーを用いて、RIB40 株のゲノム配列決定を試みた。RIB40 株より抽出した DNA よりライブラリーを調製し、R9.4 フローセルを用いて MinION 上で48時間のランを行った。その結果、総塩基長8.3 Gbp のパスフィルターリードが得られ、その平均リード長は8.1 kbp, 最大リード長は99 kbp であった。さらに *de novo* アセンブル解析した結果、総塩基長37.8 Mbp に及ぶ8本のコンティグが得られ、既存のリファレンスゲノム配列と比較したところ、全ての染色体についてその全長に対応する1本のコンティグが得られていることが確認できた。本発表では、この新しいシーケンサーによる RIB40 株のゲノム配列の精度について、いくつかの観点で評価を行なったので、その結果を報告する。

Whole genome sequencing and assembly of *Aspergillus oryzae* RIB40 using nanopore sequencing technology.

Akito Nishizawa¹, Kazuki Yumiba², Ken Oda³, Ryota Saitou³, Kazuhiro Iwashita^{2,3}, Yasuo Uemura¹

(¹GeneBay, Inc., ²AdSM Hiroshima Univ., ³NRIB)

P-100

麹菌の不飽和化酵素遺伝子の過剰発現化による遊離ジホモ- γ -リノレン酸の生産向上

玉野孝一^{1,2}, 伊藤あやの³, 安中優太³, 三浦愛¹, 菅英一郎⁴, 小山泰二⁴, 田村具博^{1,2} (¹産総研・生物プロセス研究部門, ²産総研・CBBD-OIL, ³北海道ハイテク専門学校, ⁴野田産業科学研究所)

微生物の生産する遊離脂肪酸 (FFA) やその誘導体には、医薬品・健康補助食品やその原料として有用なものがある。そこで、FFA の高生産化と機能改良を、物質生産に優れた麹菌 *Aspergillus oryzae* を代謝工学的に改変することで、取り組んできた。これまでの研究で、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。さらに *faaA* 破壊株で、リノール酸からアラキドン酸への変換に働く3種類の遺伝子をモルティエラ菌から単離して異種発現させた ARA1 株を構築した。この ARA1 株は、アラキドン酸の一反応前の生合成物質であるジホモ- γ -リノレン酸 (DGLA) まで、遊離型で生産できることを明らかとした。そこで今回は、ARA1 株の遊離 DGLA 生産を向上させるため、生合成の中間反応であるステアリン酸からリノール酸への変換に働く麹菌本来の不飽和化酵素の強化に取り組んだ。

麹菌ゲノムには、10種類の不飽和化酵素遺伝子の存在が予測されている。これらの一部はステアリン酸からオレイン酸への変換に働く $\Delta 9$ -不飽和化酵素、残りはオレイン酸からリノール酸への変換に働く $\Delta 12$ -不飽和化酵素をコードしている。しかし、この10個の中でどれが $\Delta 9$ 型でどれが $\Delta 12$ 型なのか解明されていない。さらに、それぞれの型において、最も機能している不飽和化酵素遺伝子はどれであるのかも、不明である。そこで、ARA1 株よりこれらの不飽和化酵素遺伝子を個別に過剰発現させた10株を構築し、遊離脂肪酸組成を解析した。その結果、10株中の1株で $\Delta 12$ -不飽和化酵素反応が促進され、遊離 DGLA 生産量が向上した。

Increased production of free dihomono- γ -linolenic acid by overexpression of desaturase genes in *Aspergillus oryzae*

Koichi Tamano^{1,2}, Ayano Itoh³, Yuta Yasunaka³, Ai Miura¹, Eiichiro Kan⁴, Yasuji Koyama⁴, Tomohiro Tamura^{1,2}

(¹BPRI, AIST, ²CBBD-OIL, AIST, ³Hokkaido High-Tech. Col., ⁴Noda Inst. Sci. Res.)

P-101

黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* の全ゲノム情報を用いた比較解析

塚原正俊¹, 阿部峻之¹, 東春奈¹, 外山博英², 水谷治², 山田修³ (¹(株)バイオジェット, ²琉球大農,
³酒類総合研究所)

黒麹菌は、沖縄県の伝統的酒類である「泡盛」の醸造に用いられてきた微生物で、黄麹菌と共に国菌として認定されている。黒麹菌は近年、複数の遺伝子配列を対象とした系統解析により独立した種であることが確認され、*Aspergillus luchuensis* として再定義された。一方、沖縄県での一般的な泡盛醸造では異なる黒麹菌株を混合した複菌麹が用いられ、個々の株が異なる特性を有することが経験的に知られると共に、それぞれの株の特性を効果的に活用している。そこで本研究では全ゲノム情報を用いて *A. luchuensis* の詳細な種内の系統解析を可能とする手法の検討を行った。

解析対象の菌株として、琉球大学に保存されている沖縄由来の株（酒造所あるいは自然環境から採取）および公共機関・研究所の供託菌株を用いた。各株のゲノム情報を次世代シーケンサー Miseq により取得し、*A. luchuensis* NBRC4314 をリファレンス配列とした比較により得られた変異情報を用いて系統解析を行った。その結果、解析に供した黒アスペルギルス全体は、大きく3つの群 *A. luchuensis*, *A. tubingensis*, *A. niger* に分かれた。さらに、今回の手法によりそれぞれの種間の詳細な距離や種内の相互関係など新たに詳細な情報が得られた。*A. luchuensis* の種内の系統解析結果から、*A. luchuensis* は大別して2グループに分かれること、および分子進化学的な解析からこれらのグループの分岐は数百年前と推定され、泡盛醸造の期間でこれらの分化が起こったと推定された。今回用いた系統解析手法は詳細な種内系統解析に有用な手法と考えられた。

Comparative genome analysis of *Aspergillus luchuensis*

Masatoshi Tsukahara¹, Takayuki Abe¹, Haruna Azuma¹, Hirohide Toyama², Osamu Mizutani², Osamu Yamada³
(¹Biojet Co. Ltd., ²Univ. Ryukyu, ³NRIB)

P-102

セルフクローニングによるバイオマス分解酵素高生産麹菌の造成

笹嶋由佳, 太田夏野子, 新谷智子, 渡部昭, 新谷尚弘, 五味勝也 (東北大・農・遺伝子情報システム学)

麹菌 *Aspergillus oryzae* は、木質系バイオマスを分解するキシラナーゼやセルラーゼなどの酵素を生産するため、木質系バイオマスからのバイオエタノール生産に利用可能である。一般に固体培養の方が液体培養に比べ酵素の生産性が高く、大規模化を考えると優れているが、固体培養は比較的開放系での培養となるため、遺伝子組換え法で造成された株の使用には規制が多い。そこで本研究では、セルフクローニングの手法を用いることで、異種の遺伝子が組み込まれていないバイオマス分解酵素高生産麹菌の造成を試みた。

麹菌由来の *XlnR* や *ManR* などのバイオマス分解酵素生産に関わる転写因子の配列を PCR により増幅し、麹菌の α -アミラーゼ遺伝子 (*amyR*) プロモーターに連結して、麹菌由来の選択マーカーとともに麹菌宿主株に導入した。その結果、得られた形質転換体のうち、*xlnR* と *manR* が両方導入された株でキシラナーゼ活性が野生株の5倍以上高くなり、セルラーゼ活性も野生株より向上した。このことから、セルフクローニング法によってバイオマス分解酵素高生産株の造成が可能であることが示された。現在は、*amyR* プロモーター活性やバイオマス分解酵素の生産がグルコースによるカタボライト抑制を受けることから、グルコース抑制制御因子のひとつである *CreA* を置換破壊した株をセルフクローニングで造成し、その解析およびこの株を宿主にした転写因子高発現株の造成を進めている。

Enhanced production of biomass-degrading enzymes from *Aspergillus oryzae* by a self-cloning method.

Yuka Sasajima, Kanoko Ohta, Tomoko Shintani, Akira Watanabe, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi
(Fac. Agric., Tohoku Univ.)

P-103

黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* における 1-octen-3-ol 生合成遺伝子 *ppo* の解析

片岡涼輔¹, 植松千暁², 長谷川泰子², 水谷治^{3,4}, 山田修⁴, 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, ³琉大農・亜熱生資, ⁴酒総研)

【背景・目的】泡盛に含まれる代表的な香気物質の 1 つとして 1-octen-3-ol が知られている。本化合物は *Aspergillus* 属糸状菌による生成が報告されており、泡盛に含まれる 1-octen-3-ol は泡盛醸造に用いられる黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* によって生産されていると考えられる。しかし、1-octen-3-ol の生成に対する黒麹菌の直接的な関与を示す報告はほとんどなく、その生合成経路は明らかではない。本研究では、黒麹菌において 1-octen-3-ol 生合成への関与が予想される脂肪酸オキシゲナーゼ *ppo* 遺伝子破壊株を構築し、1-octen-3-ol 生産性に対する遺伝子破壊の影響を調べた。

【方法・結果】*A. luchuensis* のゲノムデータベース上に、*Aspergillus nidulans* で同定されている *ppoA*, *ppoC* 遺伝子と相同性が高い遺伝子を見出した。ハイグロマイシン耐性遺伝子を選択マーカーとしてプロトプラスト-PEG 法による形質転換を実施し、得られた形質転換体についてゲノム DNA を鋳型とする PCR を行うことにより、各遺伝子の破壊を確認した。各遺伝子破壊株を用いて調製した麹について、SPME-GCMS 分析を行った結果、*ppoC* 破壊株で製麹した麹における 1-octen-3-ol 量は、親株の麹と比較して明らかに低下していた。したがって、本菌の *ppoC* は 1-octen-3-ol 生合成に関与していることが示された。

Analysis of 1-octen-3-ol biosynthetic gene *ppo* in *Aspergillus luchuensis*

Ryousuke Kataoka¹, Chiaki Uematsu², Taiko Hasegawa², Osamu Mizutani^{3,4}, Osamu Yamada⁴, Taisuke Watanabe^{1,2}, Jun Ogihara^{1,2} (¹Dept. Biores. Util. Sci., Grad. Sch. Biores. Sci., Nihon Univ., ²Dept. Chem. Life Sci., Nihon Univ., ³Dept. of Biosci. & Biotechnol., Univ. of Ryukyus, ⁴NRIB)

P-104

Phleomycin 耐性を指標にした黒麹菌 Δ *agsE* の形質転換

渡嘉敷直杏¹, 水谷治^{1,2}, 山田修³, 外山博英^{1,2} (¹鹿児島連大・農, ²琉球大院・農, ³酒総研)

麹菌の形質転換体のセレクションには、強い薬剤耐性から使用できる抗生物質が限定されており、一般的には栄養要求性を指標に目的形質転換体を得ている。黒麹菌における形質転換体のセレクションも同様であり、これまでに、ハイグロマイシン耐性遺伝子、ピリチアミン耐性遺伝子といったマーカー遺伝子を用いて、 Δ *ligD::ptrA*, Δ *agsE::hph* (Δ *agsE* 株) が造成された。黒麹菌 *agsE* は α -1,3-glucan 合成酵素をコードしており、その欠失は、野生型では難しいプロトプラスト調製を黄麹菌と同等の操作で簡便に行う事ができ、糸状菌で一般的に用いられるプロトプラスト-PEG 法による形質転換を可能にする。一方で、 Δ *agsE* 株はピリチアミン耐性遺伝子やハイグロマイシン耐性遺伝子といったマーカーを既に使用しているため、他の遺伝子操作用途でこれらのマーカーを利用する事が出来なかった。そこで本研究では、新たな薬剤耐性遺伝子マーカーとして Bleomycin 耐性遺伝子 (*ble*) の検討を行ったので報告する。

Streptoalloteichus hindustanus 由来の *ble* 遺伝子は二本鎖切断を引き起こす薬物 (Bleomycin や Phleomycin) に対しての抵抗性を獲得できるタンパク質をコードしている。この遺伝子をマーカー遺伝子として用いながら、 Δ *agsE* 株のゲノム上に対して *agsE* の相補を目的とする形質転換を行った。Phleomycin を添加した培地上でセレクションを行い、生育する黒麹菌の株を単離すると目的部位で相同組換えが行われていることが確認でき、 Δ *agsE* 株でのセレクションに用いる事ができた。また、この形質転換で *agsE* が相補された株は、プロトプラストが Yatalase 単独で得られない野生株タイプに戻ったことが確認された。

Transformation of *Aspergillus luchuensis* Δ *agsE* strain using Phleomycin

Jikian Tokashiki¹, Osamu Mizutani^{1,2}, Osamu Yamada³, Hirohide Yamada^{1,2}

(¹Grad. Sch. Agric., Kagoshima Univ., ²Grad. Agric., Univ. Ryukyus, ³NRIB)

P-105

***Paenibacillus alginolyticus* 由来 α -1,3-グルカナーゼの担子菌類プロトプラスト形成への影響**

佐藤 魁¹, 鍋谷 海², 福田 泰久¹, 白坂 憲章¹ (¹近大院・農応生化, ²近大・農応生化)

担子菌には、商業的価値の高い種が多数存在しているが、多くの遺伝子は機能が解明されていない。遺伝子機能解析の手法として一般的に用いる遺伝子欠損株の作成では、効率的なプロトプラスト形成が重要とされる。しかしながら、担子菌の細胞壁は、水溶性 β -グルカンを含む外層、アルカリ可溶性 α -1,3-グルカンを有する第2層、およびキチン細毛繊維を包埋した β -1,3 および β -1,6 結合を有する高度に分岐したアルカリ不溶性のグルカンである内部層の3層からなり、その構造の複雑さからセルラーゼまたはキチナーゼを主成分とした細胞壁分解酵素では、種によりプロトプラスト化が困難なものも存在する。一方、スエヒロタケ (*Schizophyllum commune*) において *Bacillus circulans* KA-304 株由来 α -1,3-グルカナーゼを用いることで、プロトプラスト形成率が上昇したという報告[1]がある。そこで本研究では、*Paenibacillus alginolyticus* 由来 α -1,3-グルカナーゼが様々な担子菌におけるプロトプラスト形成への影響を検証した。活性試験の基質として、*Streptococcus mutans* 由来グルコシルトランスフェラーゼ B によって作成した mutan (α -1,3-グルカン) を使用した。

[1] Shigekazu Yano et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**, 1754-1763, 2006

Effect of α -1,3-Glucanase from *Paenibacillus alginolyticus* for protoplast formation of Basidiomycetous fungi.

kaito Satou¹, Kai Nabetani², Yasuhisa Fukuta¹, Norifumi Shirasaka¹

(¹Grad. Sch. Agri., Kindai Univ., ²Agri., Kindai Univ.)

P-106

白色腐朽菌ヒラタケにおける *gat1* 遺伝子変異は、優性的にリグニン分解活性を低下させる

森本 亮太, 中沢 威人, 小寺 里奈, 坂本 正弘, 本田 与一 (京大院・農)

白色腐朽菌は、単独で木質中のリグニンを効率的に無機化できるが、その詳細な機構については不明な点が多い。本研究では、リグニン分解に必要な新奇因子の同定を目的として、リグニン分解活性と相関する色素 (RBBR) 脱色能力およびブナ木粉中のリグニン分解活性が顕著に低下した、白色腐朽菌ヒラタケ野生株 PC9 由来の UV 突然変異体 UVRM22 を作成し、原因変異遺伝子を同定したことについて報告する。まず、PC9 と交配可能な野生株 PC15 と当該変異体を交配させた二核菌糸を作成したところ、UVRM22 と同様に RBBR 脱色不全が確認されたことから、UVRM22 が有する変異は優性的であることが示唆された。加えて、この二核菌糸ではブナ木粉培地上での子実体形成不全も確認された。次にゲノムリシーケンス解析を行った結果、当該変異体では、真正担子菌で保存されている推定上の Zn finger 転写因子をコードする *gat1* 遺伝子 (Ohm et al. 2011 Mol. Microbiol.) に、Zinc finger モチーフ内にミスセンス (S233F) が生じていることが明らかになった (*gat1-1* 変異)。この結果を踏まえて、PC9 株への *gat1-1* 変異遺伝子の導入および 20b 株 (PC9 由来 ku80 破壊株) を用いた *gat1* 破壊実験を行なったところ、*gat1-1* 変異および *gat1* 欠損が、ブナ木粉培地上でのリグニン分解能力および子実体発生開始を優性的に不全化させることが明らかとなった。さらに、RNA-seq 解析を通じて *gat1* 破壊が転写に与える影響を調査したところ、先行研究で得ていた他のリグニン分解不全株と比較して、リグニン分解酵素遺伝子全般の転写発現がより顕著に減少していることが明らかとなった。

Dominant effects of *gat1* mutations on the ligninolytic activity of *Pleurotus ostyreatus*

Ryota Morimoto, Takehito Nakazawa, Rina Kodera, Masahiro Sakamoto, Yoichi Honda

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

P-107 (O-17)

ゲノム編集による麹菌 *Aspergillus oryzae* の異種二次代謝産物生産系の構築

齋藤直也¹, 片山琢也^{1,2}, 南篤志³, 及川英秋³, 丸山潤一^{1,2} (¹東大院・農生科・応生工, ²東大・CRIIM, ³北大院・理)

麹菌 *Aspergillus oryzae* は近年異種二次代謝産物生産の宿主として利用が進められている¹⁾。二次代謝産物の異種生産には少なくとも 4~6 個以上の生合成遺伝子の導入を必要とすることが多く、異種生産を行ったうえで生産性を向上させる遺伝子改変を行う場合、四重栄養要求性株 NSAR1 を用いる従来の系では選択マーカーの数による制約を受けるといった課題がある。一方、当研究室において *A. oryzae* における CRISPR/Cas9 システムを利用したゲノム編集技術が確立され、ゲノム編集プラスミドのリサイクリングにより標的遺伝子の破壊および標的染色体部位への遺伝子導入を無制限に繰り返すことが可能となった²⁾。本研究では、ゲノム編集を利用した *A. oryzae* における異種二次代謝産物の生産、およびその生産性の向上を目的とした。

異種二次代謝産物生産のモデルとして、7 つの生合成遺伝子によって合成される担子菌由来の抗生物質 pleuromutilin の生産を行った。遺伝子導入の標的部位として、分生子の色素合成に関与する *wA*, 硝酸資化に必要な *niaD*, ウリジン/ウラシル生合成に必要な *pyrG* の各遺伝子を選択した。*A. oryzae* 野生株 RIB40 を宿主として段階的に形質転換を行い、各標的部位の欠失に由来する表現型を指標として株を選択することで、7 つの pleuromutilin 生合成遺伝子すべてが導入された株を取得した。得られた株の代謝物において、GC/MS 解析により pleuromutilin の生産が確認され、さらに抗菌活性も検出された。以上の結果から、ゲノム編集を利用した *A. oryzae* における異種二次代謝産物生産が可能となった。現在、生産株において代謝経路の遺伝子改変を行い、生産性の向上を試みている。

1) 南ら, 日本醸造協会誌, Vol. 112, 592-597 (2017) 2) 片山ら, 日本農芸化学会 2018 年度大会要旨集 4SY22-2

Construction of heterologous production of secondary metabolites in *Aspergillus oryzae* by genome editing

Naoya Saito¹, Takuya Katayama^{1,2}, Atsushi Minami³, Hideaki Oikawa³, Jun-ichi Maruyama^{1,2}

(¹Dept. of Biotechnol., ²CRIIM, The Univ. of Tokyo, ³Grad. Sch. Sci., Hokkaido Univ.)

P-108 (O-20)

セルラーゼ高生産糸状菌 *Trichoderma reesei* における推定トランセプター Crt1 の局在解析

北原雪菜¹, 吉澤和将², 谷口大樹², 古川隆紀², 志田洋介², 大隅正子³, 小笠原渉^{1,2} (¹長岡技科大院・技学イノベーション, ²長岡技科大院・生物, ³総合画像研究支援)

セルラーゼ高生産糸状菌 *Trichoderma reesei* は誘導基質(セルロースおよびその誘導体)の存在に応答し、多量のセルラーゼを生産する。この誘導的なセルラーゼの生産は、細胞外の可溶性誘導基質の細胞内への輸送が重要だと考えられている。そこで、当研究室では誘導基質の認識や輸送に関与する膜タンパク質に着目した研究を行っている。近年、*T. reesei* においてセルラーゼ遺伝子と同調的に高発現し、セルラーゼ生産に必須とされるトランスポーター Crt1 が見出された。その後の研究によって、Crt1 は誘導基質の菌体内への取り込みだけではなく、誘導基質の認識も行うトランセプターであると推測されている。*T. reesei* のセルラーゼ生産機構における Crt1 の重要性は示唆されているが、その詳細な機能は明らかとなっていない。具体的には①セルラーゼ遺伝子と同等の発現量の多さ、②局在性、③セルラーゼ生産シグナル伝達機構への関与、についての知見は乏しい。そこで、本研究では Crt1 の機能解析を目的とし、その局在性について検討した。

T. reesei のセルラーゼ生産条件下での Crt1 局在性を観察するため、GFP 融合型 Crt1 (Crt1cGFP) 発現株を構築し、菌体内における挙動を経時的に解析した。その結果、Crt1cGFP の蛍光は菌体表面および菌体内部に観察され、菌体内部の蛍光強度は菌体表面よりも約 4 倍高かった。共焦点顕微鏡、超解像顕微鏡および透過型電子顕微鏡を用いた解析により、それらの局在は細胞膜および小胞体であることが示唆された。さらに、タイムラプス観察では、細胞膜、小胞体の順に経時的な蛍光強度変化が観察された。以上の結果から、Crt1 は細胞膜および小胞体の 2 ヶ所に局在し、その局在性が変化する可能性が示唆された。

Subcellular localization of putative transceptor Crt1 in highly producing cellulase filamentous fungus, *Trichoderma reesei*

Yukina Kitahara¹, Kazumasa Yoshizawa², Daiki Taniguchi², Takanori Furukawa², Yosuke Shida², Masako Osumi³,

Wataru Ogasawara^{1,2}

(¹Dept. of Sci. of Tech. Innov., Nagaoka Univ. of Tech., ²Dept. of Bioeng., Nagaoka Univ. of Tech., ³IIRS)

P-109 (O-18)

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* における Cdc48 オルソログの有用物質生産性への関与

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】Cdc48 は, p97/Valosin-containing protein (VCP) の出芽酵母におけるホモログであり, プロテアソームによる分解経路 ER-associated degradation (ERAD)や, 核膜の再構築等, 様々な生理機構に関与しており, AAA (ATPases associated with diverse cellular activities) ATPase の 1 つとして盛んに研究が行われている。また, 国菌とされる黄麹菌 *Aspergillus oryzae* は, アミラーゼやコウジ酸といった有用な物質を大量に分泌生産することができるが, その際に黄麹菌における Cdc48 オルソログである AoCdc48 が関与するかについては明らかになっていない。我々はこれまでに, AoCdc48-EGFP が核に主に局在し, また *Aocdc48* の発現をチアミンの存在下で抑制する条件発現株を用いた解析により, *Aocdc48* が黄麹菌の生育に必須であることを示した。本研究では, AoCdc48 と黄麹菌に特徴的なアミラーゼやコウジ酸の有用物質生産との関係性について解析した。

【方法・結果】馬鈴薯デンプンを炭素源とした最小培地を用いて対照株と条件発現株を培養し, デンプンが分解されたときに形成される白濁領域や, ルゴール液染色のハロー形成によりアミラーゼ分泌について解析した。その結果, 両株においてアミラーゼ分泌が確認され, チアミン存在下で生育がほぼ確認できない条件発現株においてもアミラーゼ分泌を確認した。一方, 鉄を添加した KA 培地を用い, 赤い呈色によるコウジ酸分泌解析を行ったところ, 条件発現株では生育に比したコウジ酸分泌の遅延が見られ, またチアミン存在下ではコウジ酸の分泌は見られなかった。以上から, AoCdc48 が黄麹菌の有用物質生産に関与していることが示唆された。現在, *Aocdc48* 過剰発現株を作製するとともに, 有用物質生産についての解析を行っている。

Involvement of Cdc48 ortholog in productivity of valuable materials in *Aspergillus oryzae*

Futa Kikumatsu, Kaoru Takegawa, Yujiro Higuchi

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

P-110 (O-19)

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* における糖鎖欠損型分泌糖タンパク質生産

李秋実, 竹川薫, 樋口裕次郎 (九大院・生資環)

現在, バイオ医薬品の中には糖タンパク質が約 7 割を占め, 生産量の確保が重要課題となっている。糖タンパク質バイオ医薬品の糖鎖構造は, その薬効に大きな影響を与えることが多く, 糖鎖構造の均一性が求められる。均一な糖鎖構造を持つ糖タンパク質を化学酵素学的に調製する手法として, 糖タンパク質をまず endo- β -*N*-acetylglucosaminidase 処理し, 得られた GlcNAc タンパク質に均一な糖鎖を転移する方法がある。そこで, 均一糖鎖構造を有する糖タンパク質を調製する前段階として, GlcNAc タンパク質を多量に調製することが必要となる。黄麹菌 *Aspergillus oryzae* は日本の“国菌”であり, その安全性や高いタンパク質分泌能力を持つため, 異種タンパク質の生産宿主としてよく利用される。本研究では, 黄麹菌を用いて GlcNAc タンパク質を大量に調製するために, AoGlycoDelete 株を作製した。黄麹菌のゴルジ体膜に存在するいくつかのタンパク質を選抜し, それらの膜貫通領域の C 末端側に *Hypocrea jecorina* 由来の endo-*N*-acetyl- β -D-glucosaminidase T (EndoT, 黄麹菌用にコドン最適化) を融合発現するプラスミドを作製し, 形質転換により AoGlycoDelete 候補株を得た。それらを親株と共に 5×DPY 液体培地で 4 日間培養し, その培養上清を SDS-PAGE 後に CBB 染色した。その結果, EndoT 発現により N 型糖鎖を 1 つ有する α -アミラーゼのバンドサイズの減少が確認された。このバンドサイズの減少は, EndoCC 処理した α -アミラーゼのバンドサイズと同様であったことから, AoGlycoDelete 株により生産された糖タンパク質は GlcNAc タンパク質であると示唆された。現在, AoGlycoDelete 株の生育を含めた諸性質を調べるとともに, 分泌生産された GlcNAc タンパク質を用いて糖転移反応を試みている。

Production of glyco-deleted glycoproteins in *Aspergillus oryzae*

Qiushi Li, Kaoru Takegawa, Yujiro Higuchi

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

P-111

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* における有用物質生産に関与する 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の過程において, Sec1/Munc18 (SM) タンパク質は, soluble N-ethylmaleimide sensitive factor (NSF) attachment protein receptor (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 Sec1p, Sly1p それぞれの過剰発現株において, 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 *Aspergillus oryzae* 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これまで無かった。

我々は, 出芽酵母 Sec1p, Sly1p の黄麹菌におけるオルソログ AoSec1, AoSly1 の過剰発現株, 条件発現株を作製し, 表現型解析及び分泌タンパク質生産に及ぼす影響の解析を行ってきた。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。そこで本研究ではさらに, 黄麹菌において SM タンパク質が二次代謝産物を含む有用物質生産に及ぼす影響について解析した。

AoSec1, AoSly1 の過剰発現株と条件発現株それぞれにおいて, 二次代謝産物であるコウジ酸生産をプレートアッセイにて解析したところ, 対照株と比較して過剰発現株では生産量に変化は見られなかった。一方, 条件発現株では *Aosly1* 発現抑制条件下において, 生育阻害と併せてコウジ酸分泌の阻害が観察された。以上から, AoSec1 は二次代謝産物生産には関与せず, AoSly1 は生育及び二次代謝産物生産に必須であることが示唆された。現在, *Aosec1* 破壊株の作製を行うとともに, 異種タンパク質分泌生産に与える影響を解析するため, 仔牛由来キモシン発現株においてキモシン分泌生産量の解析も進めている。

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-112

Aspergillus itaconicus の *cad* 遺伝子の同定と白麹菌のイタコン酸生産能の獲得

野中咲希¹, 久保真紀¹, 二神泰基², 高下秀春³, 小林元太¹, 後藤正利¹ (¹佐賀大・農, ²鹿児島大・農, ³三和酒類 (株))

Aspergillus itaconicus は工業原料として利用されるイタコン酸を生産するが生育が悪い。イタコン酸は cis-アコニット酸脱炭酸酵素 (Cad) の作用によって合成される。本研究は, 未同定の *A. itaconicus* の *cad* 遺伝子を同定し, これを白麹菌に導入することによりイタコン酸生産能を新たに獲得した白麹菌の開発を目指した。

まず, *A. itaconicus* NBRC 4336 株のドラフトゲノム配列中に, *A. terreus* NIH 2624 株の *cad* 遺伝子に相同な配列 *cadA1* および *cadA2* を見出した。両遺伝子を大腸菌で発現させた。発現タンパク質の可溶化に成功した CadA1 タンパク質の活性を調べたところ, Cad の活性が認められた。*A. itaconicus* の *cad* 遺伝子を sC マーカーを保有する tetON 発現ベクターに挿入した。*A. kawachii* *argB*⁻ 株および *argB*⁺ 株を宿主として *cad* 発現ベクターを用いて形質転換した。*cadA1*, *cadA2* 遺伝子を保持する *A. kawachii* 形質転換体を複数取得した。これを *cad* 発現誘導物質であるドキシサイクリン存在下で有機酸生産用液体培地を用いて培養して, イタコン酸生産量を測定した。*cadA2* 導入株ではイタコン酸生産は認められなかった。最もイタコン酸を生産した *cadA1* 導入株は, 培養 6 日間で 0.25 g/l のイタコン酸を生産した。また, α 化米を用いた固体培養においてもイタコン酸の生産が認められた。

Identification of the *cad* gene of *Aspergillus itaconicus* and acquisition of the ability to produce itaconic acid in *Aspergillus kawachii*

Saki Nonaka¹, Maki Kubo¹, Taiki Futagami², Hideharu Takashita³, Genta Kobayashi¹, Masatoshi Goto¹

(¹Fac. Agric., Saga Univ., ²Fac. Agric., Kagoshima Univ., ³Sanwa Shurui Co. Ltd.)

P-113

担子菌ヒラタケにおける *xyn10* 及び *xyn11* ファミリーの破壊が、稲わらの細胞壁構成成分の分解に及ぼす影響の解析

湯村直樹, 中沢威人, 呉紅麗, 坂本正弘, 本田与一 (京大院・農)

イネの細胞壁において、キシラン側鎖のアラビノースとリグニンの間には、フェルラ酸などを介した架橋結合の存在が報告されている。本研究では、ヒラタケにおいて、主要なキシランナーゼだと考えられる3種類のGH10及び2種類のGH11をコードする遺伝子 (*xyn10a,b,c* 及び *xyn11a,b*) の破壊が、稲わらの細胞壁成分の分解へ与える影響について調査した結果について報告する。まず、標準株として20bf3株を、稲わら培地上で13日間培養し、全RNAを抽出した。RNAseq及び定量PCRによる転写解析の結果、*xyn11a* の転写量が、*xyn10* 及び *xyn11* 遺伝子ファミリー全体の転写量の大部分を占めることが推測された。*xyn10a,b,c* 及び *xyn11a,b* の単独破壊株及び二重破壊株に加え、これらの株の交雑により三重遺伝子破壊株を作成し、稲わら培地上で28日間培養した後、培地中の各細胞壁成分の残存量を測定した。その結果、転写解析において高い転写量を示した *xyn11a* の単独破壊株では、キシラン及びリグニンの分解量は減少していなかったが、*xyn10a*, *xyn10b*, *xyn11a* 三重破壊株において、キシラン分解量の減少に加えて、リグニンの分解量も減少していることが明らかになった。これらの結果について、各遺伝子破壊株をブナ木粉培地上で培養した場合の結果と比較しつつ議論を進める。

Effects of disruption of *xyn10* and *xyn11* gene families on degradation of cell wall components of rice straw in basidiomycete *Pleurotus ostreatus*

Naoki Yumura, Takehito Nakazawa, Wu Hongli, Masahiro Sakamoto, Yoichi Honda

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

P-114

麴菌 hydrophobin RolA – cutinase CutL1 間の相互作用における RolA N 末端側領域の寄与

佐藤一¹, 田中拓未¹, 寺内裕貴¹, 高橋徹², 七谷圭¹, 吉見啓², 阿部敬悦^{1,2} (¹東北大院・農・生物産業創成, ²東北大・未来研)

麴菌 *Aspergillus oryzae* は生分解性プラスチック polybutylene succinate-co-adipate (PBSA) を分解し、その際 hydrophobin RolA と PBSA 分解酵素 cutinase CutL1 を共発現する。¹⁾ hydrophobin は糸状菌に特有の両親媒性タンパク質で、PBSA に吸着した RolA は CutL1 と相互作用し、PBSA 表面に CutL1 を濃縮して分解を促進する。我々は以前の研究で、RolA の N 末端側領域に存在する正電荷残基と CutL1 分子表面に存在する負電荷残基が協奏的に作用するイオンの相互作用が、RolA-CutL1 間の相互作用に重要であることを見出した。また、高橋らによってモデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* の hydrophobin RodA も CutL1 とイオンの相互作用することが見出された。²⁾ しかし、同研究において RodA-CutL1 間の結合解離定数は、RolA-CutL1 間との値と比べ約40倍大きく、相互作用が弱いことが示された。結合解離定数に大きな差を生じた要因には、hydrophobin N 末端側領域の二次構造やアミノ酸配列に加え、hydrophobin 自身の高次構造の関与が考えられた。本研究では、RolA・RodA 間で N 末端側領域を入れ替えたキメラを作製し、相互作用に hydrophobin 側のどの領域・アミノ酸配列が重要かを検証した。

1) Takahashi T., et al. *Mol. Microbiol.* 57:1780–1798 (2005) 2) Takahashi T., et al. *Mol. Microbiol.* 96:14–27 (2015)

Analysis of the contribution of the N-terminal region of hydrophobin RolA in the interaction with cutinase CutL1.

Hajime Sato¹, Takumi Tanaka¹, Yuki Terauchi¹, Toru Takahashi², Kei Nanatani¹, Akira Yoshimi², Keietsu Abe^{1,2}

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

P-115

米糠を用いた(2S)-3-(2-selenoxo-2,3-dihydro-1H-imidazol-4-yl)-2-(trimethylazaniumyl)propanoate の生合成

湯山珠莉, 石川雄樹, 大島敏明 (東京海洋大院・食機能)

(2S)-3-(2-selenoxo-2,3-dihydro-1H-imidazol-4-yl)-2-(trimethylazaniumyl)propanoate (セレノネイン, ESeH) は 2010 年にマグロの血液から単離されたセレン化合物である。ESeH 中に含まれるセレン原子は、胃腸障害や神経障害を誘起する有害性をもつ一方、セレン欠乏症の予防、抗酸化物質として医薬品などへの応用が期待される。本研究は、*Aspergillus oryzae* がエルゴチオネイン (ESH) の生合成経路を有することに着目し、遺伝子組み換えによる形質変換をせずに ESeH を生産することを目的とした。

0.5 mM セレノシステイン溶液を加えた殺菌済み米糠に清酒用種麴を接種し、25°C で 5 日間培養した。米糠の表面に形成された胞子をふるいにかけて分離した。ESeH を 0.1%メルカプトエタノール添加 70%エタノールで抽出したのち、吸着カラムクロマトグラフィーにより部分精製し、逆相 UPLC-TOF/MS 分析に供した。分画にあたりエタノール溶液、メタノール溶液、蒸留水を用いて濃度勾配溶出を行った。また、ESeH は溶液中で不安定であることから 0.1%メルカプトエタノール添加 0.1%ギ酸溶液を溶解液とした。

逆相 UPLC-TOF/MS により、ESeH 天然同位体の二量体分子イオンに帰属するイオンスペクトルを確認できた。以上より、*A. oryzae* は米糠培地に添加したセレノシステインから ESeH を生合成することが確認された。さらに、ESeH の単量体も確認されたことから、麴菌においては ESeH 還元型単量体と酸化型二量体が共存するものと推測された。

Biosynthesis of (2S)-2-(trimethylaminio)-3-[2-(hydroseleno)-1H-imidazole-5-yl] propanoic acid anion on rice bran medium

Shuri Yuyama, Yuki Ishikawa, Toshiaki Oshima

(Food Sci. & Tech., Grad. School of Tokyo Univ. Marine Sci. & Tech.)

P-116

CRISPR/Cas9 系を用いたイネいもち病菌における標的遺伝子ノックダウン法の確立

平岡輪子, 林平, 荒添貴之, 鎌倉高志 (東理大院理工・応生科)

CRISPR/Cas9 システムは簡便かつ迅速に実行できるゲノム編集技術として、多くの生物種において確立されつつある RNA 誘導型人工ヌクレアーゼである。Cas9 は RuvC ドメインと HNH ドメインを有し、それぞれがガイド RNA によって誘導された標的 DNA を一本鎖ずつ切断することで二本鎖切断を誘導する。そのため二つのドメインに変異を導入した dead Cas9 (dCas9) はヌクレアーゼ活性を失った標的 DNA 結合タンパクとして利用することができる。バクテリアにおいては dCas9 を標的遺伝子またはその上流領域に結合させることで転写を抑制する CRISPR interference (CRISPRi) 法が開発されているが、糸状菌における CRISPRi を用いたノックダウン法は確立されていない。本研究では、植物病原糸状菌であるイネいもち病菌を用いて、CRISPRi によるノックダウン系の検証と最適化を試みた。今回、標的とした推定カルシウムイオンチャネル構成因子 *ehs1* はその発現量とカルシウムキレート剤である EGTA 下における菌糸の生育速度に相関性があることから、生育検定による簡便なノックダウン効果の評価が可能である。CRISPR/dCas9 の導入により EGTA 下において有意に生育遅延が見られた形質転換株を選抜し、付着器形成時の mRNA 発現量を確認したところ野生株に比べ発現量が約 9 割減少していることを確認した。このことから、イネいもち病菌において CRISPRi を用いたノックダウン法は有効であることが示され、複数遺伝子を標的としたマルチノックダウン法や遺伝子発現誘導系、染色体イメージング等の基盤技術となることが期待される。

Development of programmable gene knockdown method using CRISPR/Cas9 system in the rice blast fungus

Wako Hiraoka, Taira Hayashi, Takayuki Arazoe, Takashi Kamakura

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

P-117

***Aspergillus oryzae* 由来のハイドロフォービン HypD の超親水性 C 末端領域の機能解析**

天貝拓海¹, 寺島可那子², 関公一郎², 石倉幹大¹, 中野宏軌¹, 中島春紫^{1,2} (¹明治大院・農・農化, ²明治大・農・農化)

ハイドロフォービンは、糸状菌や担子菌が分泌する両親媒性のタンパク質であり、強い自己集合能により菌体表面に撥水性を付与する。これまでに黄麹菌 *Aspergillus oryzae* から、*hypA*~*hypI* の9つのハイドロフォービン遺伝子を単離している。HypA~Iのアミノ酸配列の相同性は低く、8つの特徴的なCys残基を除き、共通の保存領域は確認されていない。*hypD* 遺伝子は培地の浸透圧が高い時に発現することを観察しているが、HypDのC末端には93アミノ酸の非常に親水的な領域が存在する。この超親水性領域は既存のタンパク質との機能的な相同性が見出されていない。本研究ではHypDのC末端領域の機能解析を試みた。

まずC末端領域を欠失したHypD(Δ C)の作製を行った。HypD全長については、*enoA*プロモーターを用いることにより高生産が可能だが、HypD(Δ C)は生産されなかった。続いて、物性・機能解析が最も進んでいるHypAのC末端にHypDのC末端領域を連結したが、この融合体も生産されなかった。以上より、この超親水性C末端領域は、HypD特異的に構造の安定性に関与していることが示唆された。現在はHypDのC末端領域が負の荷電性アミノ酸に富むことに着目し、生産および安定性との関連性を検討している。

Functional analysis of super hydrophilic C-terminal domain of Hydrophobin HypD from *Aspergillus oryzae*

Takumi Amagai¹, Kanako Terashima², Kouichirou Seki², Kandai Ishikura¹, Hiroki Nakano¹, Harushi Nakajima^{1,2}

(¹Grad. Sch. Agric. Chem., Univ. of Meiji, ²Dept. of Agric. Chem., Univ. of Meiji)

発表者索引

A

Akira Watanabe.....77
 Andrew Utada45
 Axel A. Brakhage....30

C

Cai Bian75, 77

D

Daidi Chen66, 74
 Daisuke Hagiwara...77

E

Elaine Bignell.....27

F

Fabio Gsaller.....27

G

Gayan Abeyasinghe .32,
 49

H

Hiroki Takahashi77
 Hongli Wu.....59, 97

J

Jinshun Han.....88
 Jun-ichi Maruyama .43

K

Kazuyuki Mise..38, 78

L

Linh viet Dao33, 69

M

M. Abdulla Al Mamun
43
 Magnus Rattray27
 Masanori Kaido.38, 78
 Michael Bromley ...27,
 29

N

Nguyen Nhu Ha Vy.86
 Norman van Rhijn...27
 Nuo Li.....62

P

Pamela Gan76, 79
 Panos Papastamoulis
27
 Paul Bowyer.....27

R

Ru Zhang.....38, 78

S

Silai Zhang.....63, 67

T

Takanori Furukawa .27
 Takuya Katayama....43

Y

Yoko Kusuya.....77
 Yoshihiro Inoue.38, 78
 Yoshitaka Takano ...38,
 78

あ

明星裕美.....87
 浅井秀太.....38, 81, 85
 浅井禎吾...35, 61, 69,
 70, 71, 72
 麻田恭彦.....50
 足助聡一郎.....37, 77
 東夏希.....37, 77
 東春奈.....91
 油谷幸代.....58
 阿部敬悦...31, 36, 44,
 46, 55, 76, 97
 阿部峻之.....91
 天貝拓海.....99
 荒井啓.....34, 65, 66

荒添貴之.....41, 46, 98
 有江力.....38, 81, 85
 有岡学.....48

い

飯田祐一郎.....68
 五十嵐一暁.....58
 石井一夫.....57
 石井智子.....58
 石川雄樹.....98
 石倉幹大.....99
 泉津弘佑...35, 37, 61,
 76, 82, 83
 磯部仁美.....80
 市川響太郎.....53
 市川暉.....46
 伊藤あやの.....90
 伊藤英里子.....73
 伊藤圭祐.....56
 伊藤芽衣.....72
 稲垣茉莉子.....84
 井上大志.....34, 59
 井上喜博.....76, 79
 今村友紀.....50
 入枝泰樹.....75, 80
 入江俊一...37, 82, 83
 岩下和裕.....44, 90

う

上地敬子.....54, 79
 植松千暁.....92
 上村泰央.....90
 氏家成隆.....51
 内山拓.....58
 梅村舞子.....33, 69
 浦山俊一...32, 35, 57,
 67

お

及川英秋.....39, 94
 大泉太於.....33, 73
 大里修一.....81

大沢千晶.....36, 55
 大島敏明.....98
 大隅正子.....40, 94
 太田一良...31, 48, 49,
 50

太田夏野子.....91
 太田早紀子.....60
 大西康夫.....89
 大沼貴之.....52
 大沼広宜.....55
 岡崎裕亮.....72
 小笠原渉...40, 58, 63,
 94

岡拓二...31, 48, 49, 50
 岡山大地.....63
 小川泰生.....79
 小川直紀.....50
 荻野千秋...63, 67, 89
 荻原淳.....92
 奥谷芙季.....83
 奥田康仁.....60
 奥津果優...35, 60, 61,
 71

岡村文音.....84
 刑部敬史.....57
 尾崎克也.....58
 長田裕之.....68, 70
 長船行雄.....88
 小鹿一.....84
 小田倉里佳.....73
 織田健.....90
 尾上拓哉...31, 48, 49,
 50

小野奈津子.....52
 小幡公平.....51
 尾花望.....32, 49

か

海道真典.....79
 各務清美.....87
 柿菌ダララット...88
 掛下大視.....58

- 笠原紳.....31, 44
 梶河直起.....74
 片岡涼輔.....92
 片山周平.....63
 片山琢也...39, 44, 88,
 94
 片山椋平.....64
 勝山陽平.....89
 加藤直樹.....68, 70
 加藤雅士.....54
 門岡千尋...35, 60, 61,
 71
 金丸京子.....62
 金子秋穂.....71
 鎌倉高志...41, 46, 98
 上中弘典.....60
 神谷昇汰.....84
 榎野友香.....84
 川北一人.....80, 84
 川口剛司.....64
 河原崎泰昌.....56
 菅英一郎.....89, 90
 神吉智丈.....41
 神崎浩.....53
 き
 木口歌菜.....81
 菊間隆志.....48
 菊松風大.....39, 95
 北出雄生.....85
 木谷茂.....86
 北原雪菜.....40, 94
 木田真理衣.....87
 北村優佳.....56
 衣笠清美.....68, 70
 木下浩.....86
 木村さつき.....42
 木村真.....62
 く
 久下貴紀.....62
 楠屋陽子.....75
 久知良桃花...32, 49
 國武絵美.....62
 久保真紀.....96
 久保康之.....74, 78
 倉橋敦.....22
 黒木美沙.....41
 黒田裕樹.....42
 黒柳輝彦.....84
 こ
 呉紅麗.....59, 97
 小泉亜未.....31, 44
 幸田明生.....87
 小関卓也.....53
 小高敦史.....86
 小玉紗代.....74, 78
 小寺俊丞...38, 81, 85
 小寺里奈.....59, 93
 後藤正利...31, 35, 48,
 60, 61, 71, 96
 小林元太.....96
 小林哲夫.....62
 小林夏実.....64
 小林良則.....58
 小松健.....38, 81, 85
 五味勝也...20, 34, 51,
 53, 56, 59, 65, 66,
 91
 古明地敬介.....46
 小山泰二.....89, 90
 近藤昭彦...63, 67, 89
 さ
 齊藤智恵子...42, 43
 齋藤直也.....39, 94
 齊藤大幹...38, 81, 85
 齊藤亮太.....44, 90
 酒井杏匠.....54
 榊谷美衣奈.....78
 坂知奈美.....53
 坂本正弘...53, 59, 93,
 97
 坂本裕一.....57
 佐々木克仁.....62
 笹嶋由佳.....51, 91
 佐竹諒子.....82
 佐藤育男.....80, 84
 佐藤魁.....93
 佐藤志穂.....57
 佐藤直美.....58
 佐藤一.....97
 佐藤良勝.....45
 佐野元昭...31, 44, 46,
 58
 澤田和美.....64
 し
 塩野義人.....53
 塩見大輔.....75
 志賀友理子.....41
 重吉沙衣...37, 82, 83
 志田洋介...40, 58, 63,
 94
 柴田信之.....31, 48
 島宗悠太朗.....45
 清水公德.....72
 志水元亨.....54
 十一浩典.....74
 白石敦士.....65
 白石洋平.....88
 白坂憲章.....55, 93
 白須賢.....76, 79
 新木翔之.....70
 新谷尚弘...34, 51, 59,
 65, 66, 91
 新谷智子.....53, 91
 す
 須志田浩稔.....68
 鈴木一実...37, 76, 82,
 83
 鈴木孝征.....84
 鈴木千春エレナ.43
 鈴木義之.....58
 住田卓也.....85
 炭谷順一.....64
 せ
 関公一郎.....99
 芹澤知子.....45
 た
 平良東紀...52, 54, 79
 高木博史.....35, 57
 高崎恵利花.....81
 高下秀春.....96
 高島智也.....79
 高野翔.....81
 高野義孝...75, 76, 79
 高橋純子.....33, 73
 高橋俊二.....68, 70
 高橋辰乃介.....61
 高橋徹.....97
 高橋弘喜.....75
 高峯和則...35, 60, 61,
 71
 高谷直樹...32, 33, 45,
 47, 49, 56, 73
 竹川薫...39, 40, 95, 96
 竹下典男...32, 45, 47,
 49, 56, 73
 武末和穂.....80
 竹中敦紀.....53, 59
 竹村綾乃.....83
 竹本大吾.....80, 84
 竹山さわな...74, 78
 田代綾子.....46
 田代康介.....58
 田中愛子.....80, 84
 田中秀逸.....42, 43
 田中拓未...36, 55, 97
 田中千尋...37, 47, 66,
 74, 82, 83, 85
 田中瑞己...34, 56, 65
 田中大.....31, 48
 田邊貴啓.....61
 谷口大樹.....40, 94
 谷修治.....64
 玉城彰悟.....62
 玉置尚徳...35, 60, 61,
 71
 玉野孝一.....90
 田村具博.....90

ち	西沢知華.....36, 55	古川健太郎.....41	む
千葉壮太郎.....80, 84	西村裕志.....53	古川隆紀.....27, 40, 94	向井伸彦.....88
千原由莉亜.....50	二宮章洋.....32, 35, 57,	へ	村上直之.....86
張斯来.....63, 67	67	別役重之.....45	村口元.....57
陳帯娣.....66, 74	仁平卓也.....86	辺彩.....75	も
つ	の	ほ	森一樹.....58
塚田健人.....70	野川俊彦.....68	坊垣隆之.....87	森下陽平.....69, 72
塚原正俊.....91	野坂亮仁.....46	堀内愛実.....61	守田湧貴.....49
辻健也.....85	野中咲希.....96	本田与一.....53, 59, 93,	森法子.....44
堤浩子.....63, 67, 89	野村暢彦.....32, 49	97	森本亮太.....59, 93
坪井宏和.....87	は	ま	森山裕充.....81
津村亮輔.....64	萩原大祐.....32, 35, 49,	前田和穂.....83	や
て	57, 67, 75	前田浩.....62, 65	矢追克郎.....36, 51
寺内裕貴.....97	橋本渉.....66	眞榮田麻友美.....54	矢口貴志.....75
寺島可那子.....99	長谷川撰.....52	前村知佳.....41	安井瑞稀.....47
寺本寛.....87	長谷川泰子.....92	榎理恵.....87	安田（吉野）庄子.....52
天藤陽香.....37, 77	畠山晋.....42, 43	榊尾俊介.....32, 33, 45,	安中優太.....90
と	秦洋二.....63, 67, 86, 89	49, 56, 73	柳沢直樹.....45
渡嘉敷直杏.....92	浜中祐弥.....42	町田雅之.....58	矢野成和.....31, 44, 87
渡嘉敷正司.....54	林平.....98	松井知子.....87	山形洋平.....62, 65
渡嘉敷みどり.....54	原爽太郎.....96	松沢智彦.....36, 51	山崎周平.....62
土佐幸雄.....37, 77	原佑介.....42	松永有佳理.....83	山下雄章.....31, 44
冨本和也.....88	韓錦順.....88	松村憲吾.....86	山田修.....66, 91, 92
外山博英.....91, 92	ひ	松本晃幸.....60	山田浩之.....87
豊田裕実.....78	東佑実子.....68	間野博信.....52	山田美紗登.....53
な	樋口絵莉香.....46	丸山潤一.....39, 44, 47,	ゆ
中川博之.....68	樋口裕次郎.....39, 40, 95,	88, 89, 94	湯浅晶.....48
中沢威人.....53, 57, 59,	96	み	弓場一輝.....90
93, 97	平岡輪子.....98	三浦愛.....90	湯村直樹.....97
中澤奈美.....33, 73	平沢大樹.....63	三浦千裕.....60	湯山珠莉.....98
中島春紫.....99	廣澤早香.....70	三浦里佳.....80	よ
中野宏軌.....99	広瀬優樹.....83	水谷治.....66, 91, 92	横川雅俊.....45
中村恵理.....71	ふ	三瀬和之.....79	吉崎由美子.....35, 60, 61,
七谷圭.....36, 55, 97	深田史美.....74	三谷隆宏.....48	71
鍋谷海.....93	福田紗弓.....45	南篤志.....39, 94	吉澤和将.....40, 94
鳴坂義弘.....76, 79	福田泰久.....55, 93	宮川恒.....37, 74, 82	吉田裕史.....47, 85
に	藤村真.....61, 82	宮崎つぐみ.....33, 73	吉田稔.....48
西大海.....68	二神加奈恵.....66	宮澤拳.....31, 44, 46, 76	吉見啓.....31, 44, 46, 76,
西澤明人.....90	二神泰基.....35, 60, 61,	宮下正弘.....74	97
	71, 96	宮本葵.....60	吉村緑.....34, 65

り	わ	和久豊.....88	渡邊泰祐.....92
李秋実.....40, 95	ワイズ里沙.....54	渡部昭.....51, 53, 91	渡辺隆司.....53
李諾.....62	若井暁.....63, 67, 89	渡邊彰.....50	渡辺秀樹.....82

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。
 1. 研究会及び総会の開催。
 2. 会報の発行。
 3. 関連研究団体との協力事業。
 4. 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。

附則

本会則は、平成 28 年 11 月 18 日から発効する。

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 渉 (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
(第18回大会シンポジウム担当) 東北大学大学院 農学研究院
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
マルコメ株式会社
Meiji Seika ファルマ株式会社
名糖産業株式会社
盛田株式会社
ヤマサ醤油株式会社

第 18 回糸状菌分子生物学コンファレンス要旨集

平成 30 年 10 月 22 日 印刷

平成 30 年 10 月 22 日 発行

発行者

糸状菌分子生物学研究会

編集者

小笠原 渉

〒940-2188 新潟県長岡市上富岡町 1603-1

長岡技術科学大学工学研究院