

The 19th Conference on

Fungal Genetics

and

Molecular Biology

第 19 回糸状菌分子生物学コンファレンス

2019 年 11 月 6 日 - 7 日

北海道大学 クラーク会館

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
発表演題および講演時間	5
シンポジウム講演要旨	19
口頭発表講演要旨	28
ポスター発表講演要旨	38
発表者索引	92
糸状菌分子生物学研究会会則	95
糸状菌分子生物学研究会運営委員名簿	96
糸状菌遺伝子研究会賛助会員	97

第 19 回糸状菌分子生物学コンファレンス

日時：2019年11月6日(水)-7日(木)

会場：北海道大学 クラーク会館

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6日(水)

11:00 -	受付	
12:00 - 12:05	開会の辞	(講堂)
12:05 - 14:05	口頭発表 (O-1~O-10)	(講堂)
14:05 - 14:20	休憩	
14:20 - 16:20	口頭発表 (O-11~O-20)	(講堂)
16:30 - 18:00	ポスター発表 (奇数)	
18:30 - 20:30	懇親会	(ホテルマイステイズ札幌アспен)

11月7日(木)

9:30 -	受付	
10:00 - 11:30	ポスター発表 (偶数)	
11:30 - 12:45	昼食	
12:45 - 14:15	シンポジウム (S-1~S-3)	(講堂)
14:15 - 14:30	休憩	
14:30 - 15:30	シンポジウム (S-4~S-5)	(講堂)
15:30 - 15:45	総会	(講堂)
15:45 - 16:05	表彰式	(講堂)
16:05 - 16:10	閉会の辞	(講堂)

会場案内図

シンポジウム会場：北海道大学クラーク会館

JR 札幌駅北口から北海道大学クラーク会館まで徒歩約 12 分

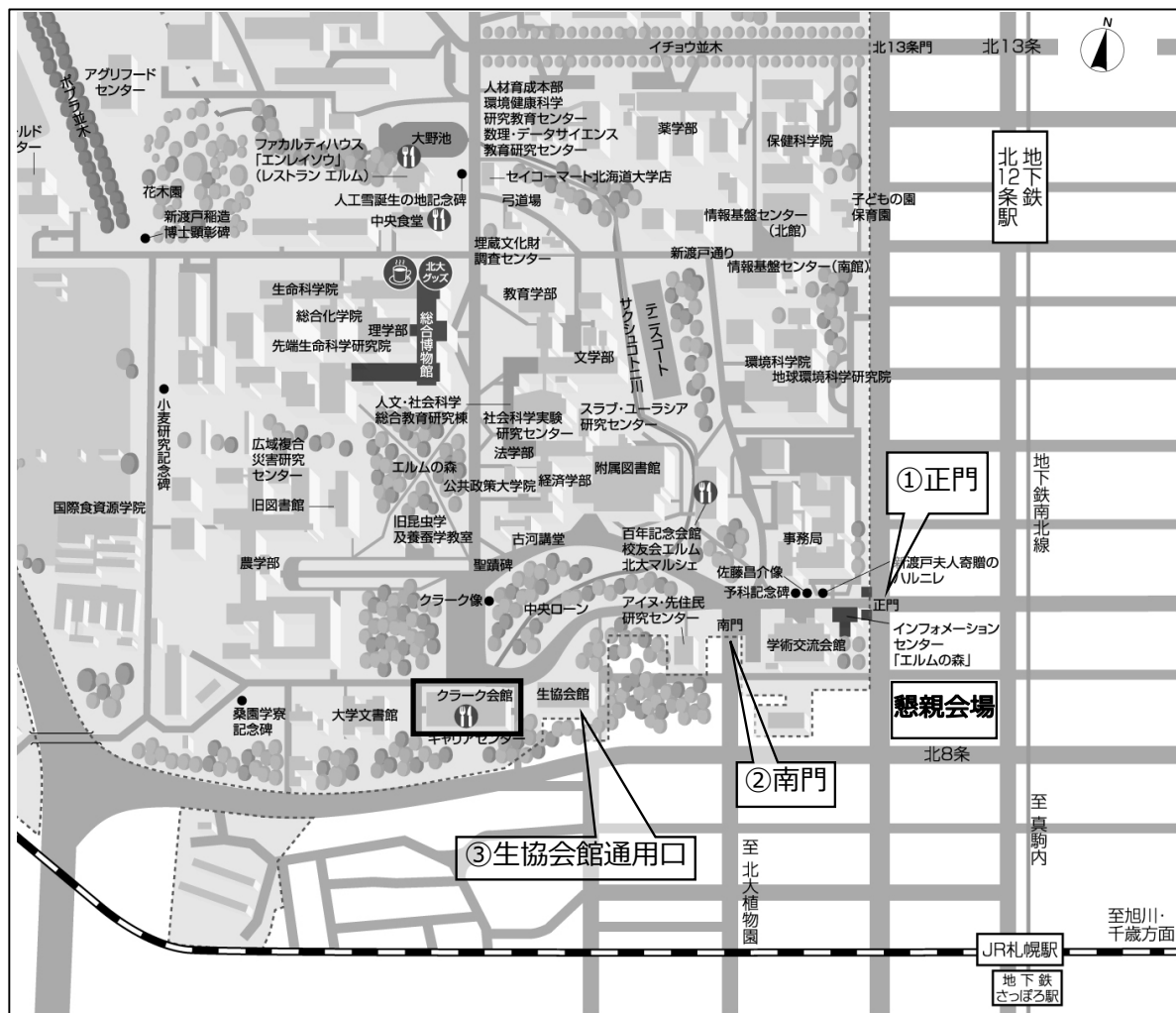
正門①，南門②あるいは生協会館通用口③からお入り下さい。

懇親会場：ホテルマイステイズ札幌アспен 2 階宴会場「アспен」

札幌市北区北 8 条西 4 丁目（JR 札幌駅北口から徒歩約 2 分）

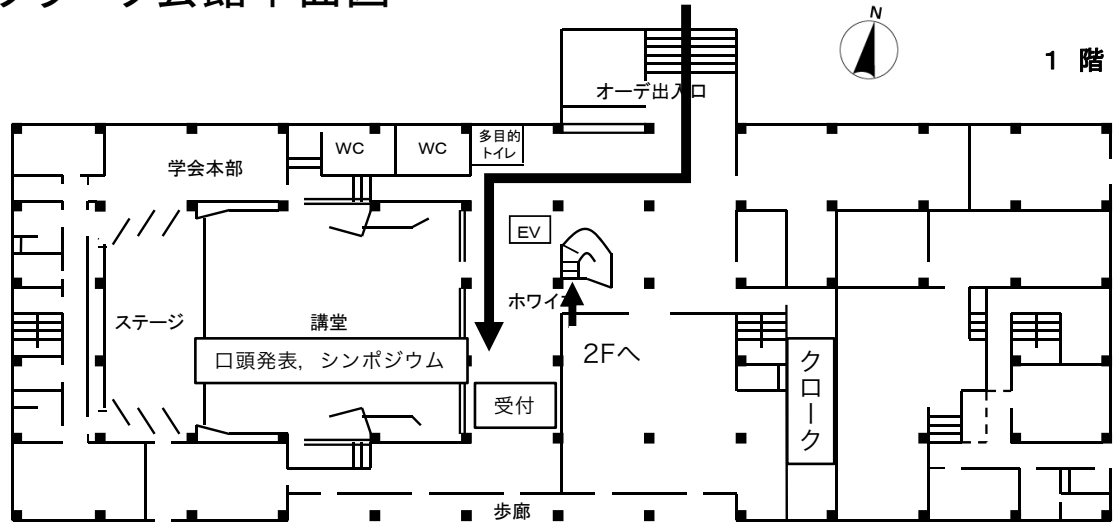
※近接するホテルマイステイズ札幌駅北口とは異なりますのでご注意ください。

北海道大学および周辺案内図

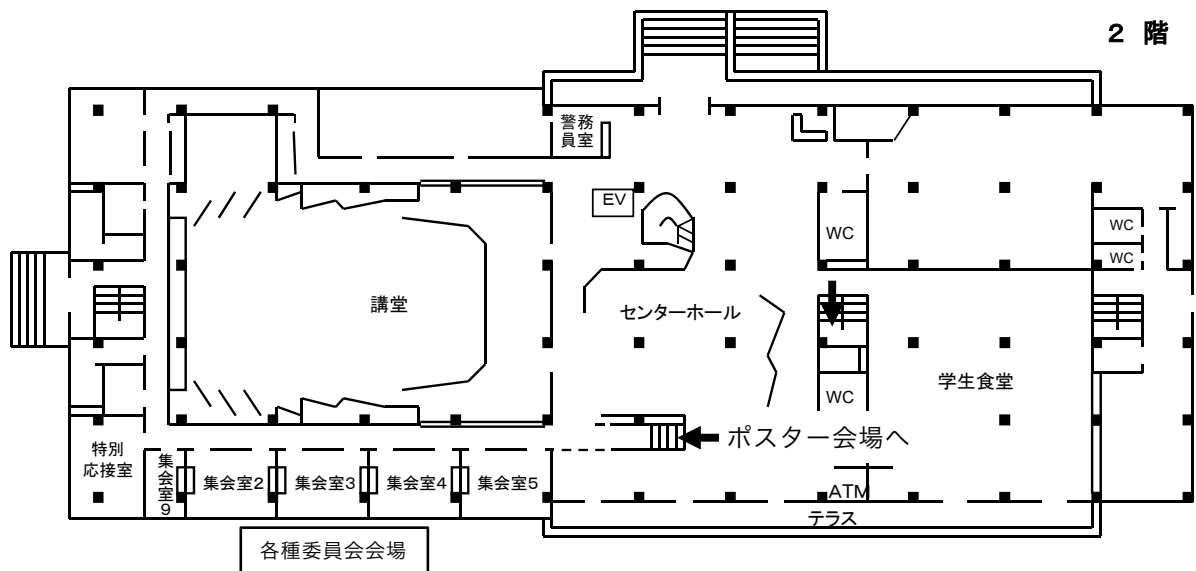


クラーク会館平面図

受付・講堂へ
1F (半地下)

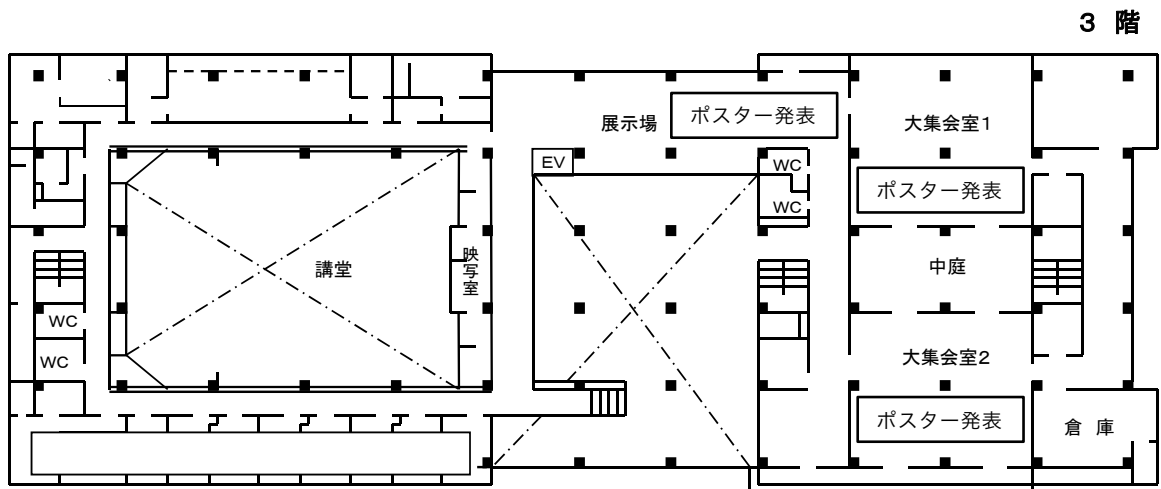


1 階



2 階

各種委員会会場



3 階

発表演題および講演時間

11月7日(木) 12:45 - 15:30

シンポジウム

「相利? 寄生? 競争? 糸状菌の複雑な共生生態」

〔座長：曾根 輝雄 (S-1,2,3), 中馬 いつみ (S-4,5)〕

12:45-13:15

- S-1 「菌根共生における養分交換の分子機構
- 植物の献身, 共生菌の傲 (おご) り -」

北海道大学大学院農学研究院

江沢 辰広

13:15-13:45

- S-2 「カビとバクテリアが協働で植物を育てる？」

茨城大学農学部

成澤 才彦

13:45-14:15

- S-3 「イネ科牧草に感染する糸状菌エンドファイトが共生菌として持つ
特殊な能力」

名古屋大学大学院生命農学研究科

竹本 大吾

14:15-14:30 休 憩

14:30-15:00

- S-4 「RNAゲノムを有するマイコウイルスが菌類に広く存在する理由は何か？」

東京農工大学大学院農学研究院

森山 裕充

15:00-15:30

- S-5 「アスペルギルス症起因菌の野外環境中における分布の謎に迫る」

日本大学薬学部

広瀬 大

口頭発表 (O-1~O-10) 11月6日(水) 12:05 - 14:05

[座長: 二神泰基(O-1,2), 國武絵美(O-3,4), 谷修治(O-5,6), 小玉紗代(O-7,8), 福田泰久(O-9,10)]

- 12:05 O-1 麹菌のグルコース依存的アミラーゼ生産抑制におけるグルコースキナーゼの関与
田中瑞己¹, 河原崎泰昌¹, 五味勝也² (1 静岡県・食栄, 2 東北大院・農)
- 12:17 O-2 土壌培養における *Aspergillus nidulans* の生態と土壌微生物叢との相互作用の解析
高田万里奈^{1,2}, 河内護之³, 大西康夫^{3,4}, 妹尾啓史^{3,4}, 清水公德², 浦山俊一^{1,5}, 萩原大祐^{1,5}
(1 筑波大・生命環境, 2 東理大・基礎工, 3 東大院・農生科, 4 東大・CRIIM, 5 筑波大・MiCS)
- 12:29 O-3 真正担子菌特異的な転写因子をコードする *gat1* 遺伝子の破壊株において転写抑制されるヒラタケのヒドロフォビン遺伝子 *poh2* は子実体発生に必須である
中沢威人, 竹中敦紀, 呉紅麗, 坂本正弘, 本田与一 (京大院・農)
- 12:41 O-4 白麹菌における *LaeA* によるクエン酸生産制御機構の解析
二神泰基^{1,2}, 門岡千尋^{1,2}, 中村恵理², 森一樹³, 奥津果優², 吉崎由美子^{1,2}, 高峯和則^{1,2}, 後藤正利^{1,4}, 玉置尚徳^{1,2} (1 鹿児島大・連農, 2 鹿児島大・農, 3 鹿児島高専・専攻科, 4 佐賀大・農)
- 12:53 O-5 青枯病菌の真菌寄生はクオラムセンシング機構によって制御される
松尾匠馬¹, 村井勇太¹, 曳地康史², 甲斐建次¹ (1 阪府大院・生命環境, 2 高知大・農)
- 13:05 O-6 ウリ類炭疽病菌の病原性に関する転写因子遺伝子 *CoCYS3* の機能解析
森瑞希, 小玉紗代, 久保康之 (京都府立大・生命環境)
- 13:17 O-7 Investigation of the relationships between the genetic diversity and the heterogeneity of adaptation pattern in *Aspergillus fumigatus*
Cai Bian¹, Yoko Kusuya¹, Daisuke Hagiwara², Akira Watanabe¹, Hiroki Takahashi^{1,3} (1 MMRC, Chiba Univ., 2 Life Env. Sci., Univ. Tsukuba, 3 MCRC, Chiba Univ.)
- 13:29 O-8 生態系における糸状菌・細菌の相互作用
工藤凱門, Gayan Dakshitha, 榊尾俊介, 高谷直樹, 竹下典男 (筑波大・生命環境系・MiCS)
- 13:41 O-9 白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* 由来のシトクロム P450 CYP505D ホモログの機能解析
森玲香, ワイズ里沙, 酒井杏匠, 志水元亨, 加藤雅士 (名城大・農)
- 13:53 O-10 *Talaromyces cellulolyticus* におけるセルラーゼ発現誘導機構の生産培養プロセスへの応用
矢萩大貴¹, 吉田エリカ¹, 深田寛朗¹, 十倉充範², 白田佳弘¹ (味の素(株)・¹バイオ・ファイン研究所, ²研究開発企画部)

口頭発表 (O-11~O-20) 11月6日(水) 14:20 – 16:20

[座長: 萩原大祐(O-11,12,13), 豊島快幸(O-14,15,16), 浦山俊一(O-17,18), 上地敬子(O-19,20)]

- 14:20 O-11 イネいもち病菌における nectriapyrone 類の生産誘導と生理機能解析
本山高幸, 野川俊彦, 長田裕之 (理研 CSRS・ケミカルバイオロジー)
- 14:32 O-12 分散型麹菌の物質高生産メカニズム解明へ向けたメタボローム解析
櫻川拓¹, 張斯来², 若井暁^{2,3}, 近藤明彦², 荻野千秋¹ (¹神戸大院・工, ²神戸大院・イノベ,
³海洋機構)
- 14:44 O-13 グルコース代謝に基づく菌糸先端の多種分子同時ラマン分光マッピング解析
安田充¹, 竹下典男², 重藤真介¹ (¹関西学院大・理工, ²筑波大・生命環境)
- 14:56 O-14 ホンシメジと宿主植物アカマツをモデルとした外生菌根菌の分子遺伝学的解析手法の確立
— 3種の MAP kinase および *LsATG8* 遺伝子の破壊および機能解析 —
前田和穂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・環
境, ²京大院・農)
- 15:08 O-15 *Acremonium egyptiacum* におけるアスコフラノン高生産株の育種
荒木康子¹, 淡川孝義², 松崎素道^{3,4}, 伊藤考太郎¹, 阿部郁朗², 北潔^{3,4} (¹キッコーマン(株),
²東大院・薬, ³東大院・医, ⁴長崎大・TMGH)
- 15:20 O-16 マイクロ流体デバイスを用いた糸状菌の菌糸における可塑性の解析
福田紗弓¹, 柳沢直樹², 高谷直樹¹, 佐藤良勝², 竹下典男¹ (¹筑波大院・生命環境・微生物
サステイナビリティ研究センター, ²名古屋大・ITbM)
- 15:32 O-17 黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* が生産する細胞壁多糖ニゲランの合成関連遺伝子の解析
上地敬子, 渡嘉敷直杏, 平良東紀, 水谷治 (琉球大・農)
- 15:44 O-18 麹菌における細胞外分泌多糖ガラクトサミノガラクトンによる菌糸凝集メカニズムの解析
宮澤拳¹, 吉見啓², 中島佑¹, 阿部敬悦^{1,2} (¹東北大院農・生物産業創成, ²東北大・未来研)
- 15:56 O-19 *Aspergillus nidulans* のゴルジ体に局在する機能未知な II 型膜タンパク質遺伝子破壊株ライブラ
リーの構築
甲斐万紀子¹, 守田湧貴², 千原由莉亜¹, 太田一良¹, 岡拓二¹ (¹崇城大院・工, ²崇城大・
生物生命)
- 16:08 O-20 イネいもち病菌における細胞外膜小胞の探索と性状解析
浦山俊一^{1,2}, 岩橋由佳¹, 榎尾俊介^{1,2}, 兼松周作¹, 森山裕充³, 高谷直樹^{1,2}, 野村暢彦^{1,2},
竹下典男^{1,2}, 豊福雅典^{1,2}, 萩原大祐^{1,2} (¹筑波大・生命環境, ²筑波大・MiCS, ³農工大・農)

ポスター発表 11月6日(水) 16:30 – 18:00 (奇数番号)

11月7日(木) 10:00 – 11:30 (偶数番号)

- P-1** マイクロ流体デバイスを用いた糸状菌の菌糸における可塑性の解析
福田紗弓¹, 柳沢直樹², 高谷直樹¹, 佐藤良勝², 竹下典男¹ (筑波大院・生命環境・微生物サステイナビリティ研究センター, ²名古屋大・ITbM)
- P-2** 泡盛中の香気物質組成に対する黒麹菌 *ppo* 遺伝子破壊の影響の解析
片岡涼輔¹, 渡邊泰祐^{1,2}, 林梨咲³, 山田修³, 荻原淳^{1,2} (日大院生資科・生資利用, ²日大生資科・生命化, ³酒総研)
- P-3** 黄麹菌 *Aspergillus oryzae* の分泌経路における SM タンパク質の機能解析
原爽太郎, 竹川薫, 樋口裕次郎 (九大院・生資環・生命機能)
- P-4** 黄麹菌 *Aspergillus oryzae* における N 型糖鎖欠損糖タンパク質分泌生産株の解析
李秋実, 竹川薫, 樋口裕次郎 (九大院・生資環・生命機能)
- P-5** *Pleurotus salmoneostramineus* NBRC31859 株由来, 子実体形成および非形成単核体の生活環における RNA Seq 解析
平山朋美¹, 福田泰久², 白坂憲章² (近畿大学・院農, ²近畿大学・農)
- P-6** Development of an effective method for genetic transformation of filamentous fungi using droplet-based microfluidic platform
Xuan Chinh Luu¹, Nobuyuki Honma², Yukina Kitahara¹, Yosuke Shida², Wataru Ogasawara^{1,2}
(¹Dept. of Science of Technology Innovation, Nagaoka Univ. of Technology, ²Dept. of Bioengineering, Nagaoka Univ. of Technology)
- P-7** 醤油醸造における麹菌グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (AoGdhB) の機能解析
豊島快幸, 松岡太郎, 渡部潤 (ヤマサ醤油)
- P-8** S-Adenosyl-L-methionine の麹菌発育促進効果
佐々木駿祐¹, 倉橋敦², 藤井力³, 金井宗良³, 石川雄樹¹, 大島敏明¹ (東京海洋大学大学院・食品栄養化学研究室, ²八海醸造(株)・研究開発室, ³酒類総合研究所)
- P-9** *Aspergillus nidulans* において *rseA/cpsA* の破壊は cell wall integrity (CWI) 経路と high osmolarity glycerol (HOG) 経路の活性化を引き起こす
小川真弘^{1,2}, 福田良一^{2,3}, 小山泰二¹, 堀内裕之^{2,3} (野田産研, ²東大院・農生科・応生工, ³東大・CRIIM)

- P-10** *Acromonium egyptiacum* におけるアスコフラノン高生産株の育種
 荒木康子¹, 淡川孝義², 松崎素道^{3,4}, 伊藤考太郎¹, 阿部郁朗², 北潔^{3,4} (¹キッコーマン (株),
²東大院・薬, ³東大院・医, ⁴長崎大・TMGH)
- P-11** 麹菌界面活性蛋白質ハイドロフォピン RoIA の自己組織化膜の可視化・解析
 寺内裕貴¹, 田中拓未¹, 三ツ石方也², 藪浩², 吉見啓³, 阿部敬悦^{1,3} (¹東北大院・農, ²東北大・多元研,
³東北大・未来研)
- P-12** ホンシメジと宿主植物アカマツをモデルとした外生菌根菌の分子遺伝学的解析手法の確立
 —3種のMAP kinase および *LsATG8* 遺伝子の破壊および機能解析—
 前田和穂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・環境,
²京大院・農)
- P-13** 遊離ジホモ- γ -リノレン酸生産麹菌株における伸長酵素遺伝子過剰発現化による生産向上
 玉野孝一^{1,2}, 上嶋実咲³, 安中優太³, 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-14** クエン酸生産糸状菌 *Aspergillus tubingensis* (*A. niger*) WU-2223L における CRISPR/Cas9 システムを用
 いた遺伝子ノックアウトおよびノックイン
 吉岡育哲, 脇本紗梨, 桐村光太郎 (早大・先進理工・応化)
- P-15** 黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* のエレクトロポレーション法による形質転換系の開発
 上元優¹, 玉井萌子², 渡嘉敷直杏³, 外山博英¹, 水谷治¹ (¹琉大院・農, ²琉大・農, ³鹿児島連大・
 農)
- P-16** ゲノム編集を利用した多重代謝改変による麹菌における異種天然物生産性の向上
 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・微
 生物連携機構, ³北大院・理)
- P-17** 麹菌 *Aspergillus oryzae* における新規ピリチアミン耐性マーカー遺伝子 *thiI* を用いた Genome co-editing
 戸所健彦, 坂東弘樹, 小高敦史, 堤浩子, 秦洋二, 石田博樹 (月桂冠・総研)
- P-18** 麹菌コロニーの相互増殖抑制に関わる遺伝子の探索
 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-19** 黄麹菌 *Aspergillus oryzae* における AoCdc48 の機能解析
 守田湧貴, 菊松風大, 竹川薫, 樋口裕次郎 (九大院・生資環・生命機能)

- P-20** 麹菌における細胞外分泌多糖ガラクトサミノガラクトタンによる菌糸凝集メカニズムの解析
宮澤拳¹, 吉見啓², 中島佑¹, 阿部敬悦^{1,2} (¹東北大院農・生物産業創成, ²東北大・未来研)
- P-21** 黄麹菌 *Aspergillus oryzae* における初期エンドソーム動態と他の細胞小器官との関連性解析
高田歩未, 竹川薫, 樋口裕次郎 (九大院・生資環・生命機能)
- P-22** 植物への侵入に付着器のメラニン化を必須としない炭疽病菌の新規同定
工藤健央¹, 武末和穂¹, 入枝泰樹² (¹信大・農, ²信大・学院院農)
- P-23** 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 の機能解析
北原雪菜¹, 吉澤和将², 谷口大樹², 古川隆紀³, 志田洋介², 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マンチェスター大・感染)
- P-24** 黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* が生産する細胞壁多糖ニゲランの合成関連遺伝子の解析
上地敬子, 渡嘉敷直杏, 平良東紀, 水谷治 (琉球大・農)
- P-25** 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, 丸山潤一¹, 竹下典男¹ (¹筑波大・生命環境系・MiCS, ²東京大・応生工)
- P-26** Functional characterization of RGS domain-containing putative G protein-coupled receptors in *Aspergillus oryzae*
Dong Min Kim¹, Manabu Arioka^{1,2} (¹Dept. of Biotechnol., ²CRIIM, Univ. of Tokyo)
- P-27** 黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* における転写因子 AmyR の活性化機構の解析
橋本渉¹, 渡部昭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-28** イネいもち病菌における細胞外膜小胞の探索と性状解析
浦山俊一^{1,2}, 岩橋由佳¹, 梶尾俊介^{1,2}, 兼松周作¹, 森山裕充³, 高谷直樹^{1,2}, 野村暢彦^{1,2}, 竹下典男^{1,2}, 豊福雅典^{1,2}, 萩原大祐^{1,2} (¹筑波大・生命環境, ²筑波大・MiCS, ³農工大・農)
- P-29** *Aspergillus oryzae* における菌体内 metalloendopeptidase insulysin ホモログの局在解析
溝上哲哉, 鈴木遥, 吉永良平, 佐々木信光, 竹内道雄, 山形洋平 (農工大・応生化)
- P-30** *Aspergillus* 属菌における細胞外膜小胞の探索
岩橋由佳¹, 浦山俊一^{1,2}, 梶尾俊介^{1,2}, 兼松周作¹, 高谷直樹^{1,2}, 野村暢彦^{1,2}, 竹下典男^{1,2}, 豊福雅典^{1,2}, 萩原大祐^{1,2} (¹筑波大・生命環境, ²筑波大・MiCS)

- P-31 麹菌 *Aspergillus oryzae* におけるヌクレオファジーレセプター探索を目指した AoAtg8 相互作用タンパク質の単離**
高橋慶晃, 武田陽一, 菊間隆志 (立命館大・生命科学)
- P-32 *Aspergillus nidulans* のゴルジ体に局在する機能未知な II 型膜タンパク質遺伝子破壊株ライブラリーの構築**
甲斐万紀子¹, 守田湧貴², 千原由莉亜¹, 太田一良¹, 岡拓二¹ (¹崇城大院・工, ²崇城大・生物生命)
- P-33 イネいもち病菌におけるクロラムフェニコールの新規作用点の探索**
樋口絵莉香, 野坂亮仁, 田代綾子, 荒添貴之, 鎌倉高志 (東理大院・理工)
- P-34 イネいもち病菌 (*Pyricularia oryzae*) における交配型決定領域の機能解析**
喜多光徹¹, 内田百岳¹, 藤ヶ崎礼夏¹, 小西高裕¹, 寺岡徹², 有江力², 荒添貴之¹, 鎌倉高志¹
(¹東理大院・理工, ²農工大院・農)
- P-35 麹菌マルトース輸送体 MalP のエンドサイトーシスにはアレスチン様因子 CreD のユビキチン化が必要である**
藤田翔貴¹, 多田日菜子¹, 田中瑞己², 新谷尚弘¹, 五味勝也¹ (¹東北大院・農, ²静岡県立大・食栄)
- P-36 担子菌 *Coprinopsis cinerea* におけるオートファジー関連遺伝子 *Cc.atg8* 破壊株の構築**
今村友紀, 麻田恭彦, 渡邊彰 (香川大・農)
- P-37 麹菌 *Aspergillus oryzae* における菌核内の孢子様構造形成と有性生殖誘導の試み**
菅原由香¹, 片山琢也^{1,2}, 丸山潤一^{1,2} (¹東大院・農生科・応生工, ²東大・微生物連携機構)
- P-38 Study on scaffold candidates in the regulation of Fus3 MAPK cascade in *Aspergillus oryzae***
Yue Chen¹, Takuya Katayama^{1,2}, Ozgur Bayram³, Gerhard H. Braus⁴, Katsuhiko Kitamoto⁵, Jun-ichi Maruyama^{1,2} (¹Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, ²CRIIM, UTokyo, ³Dept. of Biol., Maynooth Univ., ⁴Dept. of Mol. Microbiol. Genet., Georg-August-University Goettingen, ⁵Nihon Pharmaceutical Univ.)
- P-39 Comprehensive localization-based screening with Pezizomycotina-specific proteins identified novel components regulating septal pore-mediated cell-to-cell communication**
M. Abdulla Al Mamun¹, Takuya Katayama¹, Wei Cao², Shugo Nakamura², Jun-ichi Maruyama¹ (¹Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, ²INIAD, Toyo Univ.)
- P-40 麹菌 *Aspergillus oryzae* 由来のトリグリセリドおよびステロールエステル加水分解能を有する油脂分解酵素の特徴づけ**
市川響太郎, 吉田彩花, 塩野義人, 小関卓也 (山形大・農)

- P-41 合成ペプチド HAP-01 を利用した新規な米麴の酸性プロテアーゼ活性測定法
大東功承¹, 山下伸雄¹, 津田修吾², 増田駿², 山内隆寛¹, 窪寺隆文¹, 吉矢拓², 広畑修二¹ (¹白鶴酒造, ²ペプチド研究所)
- P-42 *Talaromyces cellulolyticus* におけるセルラーゼ発現誘導機構の生産培養プロセスへの応用
矢萩大貴¹, 吉田エリカ¹, 深田寛朗¹, 十倉充範², 白田佳弘¹ (味の素(株)・¹バイオ・ファイン研究所, ²研究開発企画部)
- P-43 ケトシンターゼドメインによるかび毒テヌアゾン酸の環状骨格形成メカニズム
尹忠銖¹, 西本一希², 本山高幸¹, 日野智也², 永野真吾², 長田裕之¹ (¹理研 CSRS・ケミカルバイオロジー, ²鳥取大院・工・化学生物)
- P-44 麹菌 *Aspergillus oryzae* 由来ルチノシダーゼの基質選択性および効率的生産
廣田瑠花, 石川真衣, 川崎真由, 塩野義人, 小関卓也 (山形大・農)
- P-45 麹菌の GH1 に属するグルコース耐性能を有した新規 β -グルコシダーゼの酵素学的諸性質
渡部昭, 新谷尚弘, 五味勝也 (東北大院農・生物産業創成)
- P-46 逐次反応によるガラクトフラノース転移酵素活性測定法を用いた GfsA, GfsB および GfsC の機能解析
千原由莉亜¹, 田中大², 泉実³, 太田一良¹, 岡拓二¹ (¹崇城大院・工, ²東北医薬大・薬, ³岡山大・農)
- P-47 固体培地上において生産されるマツタケ由来 GH5 エンドグルカナーゼの諸性質の解明
大沼広宜, 福田泰久, 白坂憲章 (近畿大・農)
- P-48 硫黄制限条件下での白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* による塩素化芳香族化合物分解の活性化について
ワイズ里沙, 酒井杏匠, 志水元亨, 加藤雅士 (名城大院・農)
- P-49 白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* 由来のシトクロム P450 CYP505D ホモログの機能解析
森玲香, ワイズ里沙, 酒井杏匠, 志水元亨, 加藤雅士 (名城大・農)
- P-50 麹菌の細胞壁 α -1,3-グルカン生合成に関与する α -アミラーゼ AgtA の反応速度論解析
小泉亜未¹, 尾形慎², 矢野成和³, 宮澤拳¹, 吉見啓⁴, 佐野元昭⁵, 阿部敬悦^{1,4} (¹東北大院・農, ²福島高専・化学バイオ, ³山形大院・理工, ⁴東北大・NICHe, ⁵金沢工大・ゲノム研)

- P-51 土壌培養における *Aspergillus nidulans* の生態と土壌微生物叢との相互作用の解析**
 高田万里奈^{1,2}, 河内護之³, 大西康夫^{3,4}, 妹尾啓史^{3,4}, 清水公德², 浦山俊一^{1,5}, 萩原大祐^{1,5} (筑波大・生命環境,²東理大・基礎工,³東大院・農生科,⁴東大・CRIIM,⁵筑波大・MiCS)
- P-52 麹菌における小胞体ターゲティングに依存した分泌タンパク質 mRNA の品質管理**
 佐藤駿¹, 杉山優子¹, 田中瑞己², 五味勝也¹, 新谷尚弘¹ (東北大・農,²静岡県大・食栄)
- P-53 白麹菌における LaeA によるクエン酸生産制御機構の解析**
 二神泰基^{1,2}, 門岡千尋^{1,2}, 中村恵理², 森一樹³, 奥津果優², 吉崎由美子^{1,2}, 高峯和則^{1,2}, 後藤正利^{1,4}, 玉置尚徳^{1,2} (鹿児島大・連農,²鹿児島大・農,³鹿児島高専・専攻科,⁴佐賀大・農)
- P-54 麹菌のグルコース依存的アミラーゼ生産抑制におけるグルコースキナーゼの関与**
 田中瑞己¹, 河原崎泰昌¹, 五味勝也² (静岡県大・食栄,²東北大院・農)
- P-55 アカパンカビの COL-26/AmyR のソルボース耐性とアミラーゼ遺伝子の発現調節**
 平井献土, 佐竹諒子, 藤村真 (東洋大院・生命科)
- P-56 糸状菌の先端生長におけるカルシウム情報伝達経路の役割**
 芹澤知子, 榊尾俊介, 別役重行, 高谷直樹, 竹下典男 (筑波大院・生命環境・微生物サステイナビリティ研究センター)
- P-57 *Aspergillus aculeatus* SepM の形態形成および cell wall integrity 経路への関与**
 澤田和美, 津村亮輔, 炭谷順一, 谷修治, 川口剛司 (阪府大院・生環科)
- P-58 5' CAGE データに基づく *Aspergillus* 属真菌種間の解糖系酵素遺伝子群における転写開始点の比較解析**
 井上大志, 新谷尚弘, 五味勝也 (東北大院・農・生物産業創成)
- P-59 ウシグソヒトヨタケにおける子実体原基形成に必要な遺伝子の探索**
 坂本裕一¹, 佐藤志穂¹, 刑部敬史², 中沢威人³, 石井一夫⁴ (岩手生工研,²徳島大・生物資,³京大・院農,⁴久留米大)
- P-60 真正担子菌特異的な転写因子をコードする *gat1* 遺伝子の破壊株において転写抑制されるヒラタケのハイドロフォビン遺伝子 *poh2* は子実体発生に必須である**
 中沢威人, 竹中敦紀, 呉紅麗, 坂本正弘, 本田与一 (京大院・農)
- P-61 担子菌ヒラタケにおける *ccl1* 遺伝子破壊がヒストン修飾および転写発現に及ぼす影響**
 奥田希実¹, 中沢威人², 堀井雅人², 坂本正弘², 本田与一² (京大・農,²京大院・農)

- P-62 多重遺伝子破壊による黄麹菌 *Aspergillus oryzae* が有するヒドロフォービン遺伝子群の機能解析
近藤永治, 安藤裕人, 山川結, 中島春紫 (明治大院・農・農化)
- P-63 麹菌の共ゲノム編集法による有用二次代謝産物 (コウジ酸) の生産制御
弓場一輝^{1,2}, 織田健², 田崎三香子², 和田悠作³, 岩下和裕^{1,2} (¹広大院・先端研, ²酒総研, ³ファスマック (株))
- P-64 糸状菌 *Aspergillus nidulans* の NO 耐性に関わるシトクロム P450 の機能とその役割
鈴木康太, 榎尾俊介, 高谷直樹 (筑波大学・生命環境系・微生物サステイナビリティ研究センター)
- P-65 麹菌群の比較ゲノム解析
齋藤亮太, 織田健, 岩下和裕 ((独) 酒類総合研究所)
- P-66 非相同組み換え的遺伝子導入における同方向性ロングタンデムリピート構造の謎
若井暁^{1,2}, 張斯来², 荻野千秋³, 堤浩子⁴, 秦洋二⁴, 近藤明彦² (¹海洋機構, ²神戸大院・イノベ, ³神戸大院・工, ⁴月桂冠・総研)
- P-67 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・応生化)
- P-68 *Aspergillus nidulans* におけるヘミセルラーゼ遺伝子のカーボンカタボライト抑制機構
國武絵美¹, 木村哲哉¹, 小林哲夫² (¹三重大院・生資, ²名大院・生命農)
- P-69 黄麹菌 *Aspergillus oryzae* の転写因子 PrtR の解析
田中優花子, 西岡佐和子, 辻僚太郎, 山形洋平 (東京農工大院・応生化)
- P-70 *Bipolaris maydis* における赤色化合物合成遺伝子クラスターの活性化とコロニー赤色化について
竹山さわな, 陳帯娣, 吉田裕史, 田中千尋 (京大院・農)
- P-71 *Bipolaris maydis* における $\Delta pka1 \Delta pka2$ 致死性回避の原因遺伝子の探索
辻健也¹, 湯谷智¹, 泉津弘佑², 住田卓也¹, 北出雄生¹, 田中千尋¹ (¹京大院・農, ²滋賀県大院・環境)
- P-72 *Bipolaris maydis* の複数の遺伝子クラスターを活性化するクラスター外転写因子 Rpr1
陳帯娣, 竹山さわな, 二神加奈恵, 吉田裕史, 田中千尋 (京大院・農)
- P-73 *Aspergillus nidulans* における出芽酵母 Rgt1 類似因子のカーボンカタボライト抑制への関与
上條順也¹, 木村哲哉¹, 小林哲夫², 國武絵美¹ (¹三重大院・生資, ²名大院・生命農)

- P-74** 糸状菌 *Fusarium solani* D2 株から単離した脂肪酸水和酵素の機能解析
 阪本鷹行¹, 村川直美¹, 上野このみ¹, 安藤晃規², 岸野重信², 相馬悠希³, 和泉自泰³, 馬場健史³,
 小川順², 櫻谷英治¹ (¹徳島大・生物資源, ²京大院・農, ³九大・生医研)
- P-75** 水酸化脂肪酸生産性糸状菌 *Fusarium solani* D2 株の形質転換法の開発
 野口愛佳, 村川直美, 上野このみ, 阪本鷹行, 櫻谷英治 (徳島大・生物資源)
- P-76** イネいもち病菌における nectriapyrone 類の生産誘導と生理機能解析
 本山高幸, 野川俊彦, 長田裕之 (理研 CSRS・ケミカルバイオロジー)
- P-77** 分散型麹菌の物質高生産メカニズム解明へ向けたメタボローム解析
 櫻川拓¹, 張斯来², 若井暁^{2,3}, 近藤明彦², 萩野千秋¹ (¹神戸大院・工, ²神戸大院・イノベ, ³海
 洋機構)
- P-78** 油糧糸状菌 *Mortierella alpina* における perilipin 様タンパク質遺伝子の機能解析
 中村和弘¹, 東洗希¹, 阪本鷹行¹, 島田良美², 安藤晃規², 岸野重信², 相馬悠希³, 和泉自泰³, 馬
 場健史³, 小川順², 櫻谷英治¹ (¹徳島大・生物資源, ²京大院農・応用生命, ³九大・生医研)
- P-79** クエン酸生産糸状菌における遺伝子解析と代謝産物解析によるカビ毒非生産性の検証
 大越佳乃¹, 吉岡育哲¹, 中川博之², 桐村光太郎¹ (¹早大・先進理工・応化, ²農研機構・食品研究
 部門)
- P-80** フミン酸添加培養モデルが解明する糸状菌の土壌生態
 宮崎つぐみ, 大泉太於, 中澤奈美, 榊尾俊介, 高谷直樹 (筑波大・生命環境・微生物サステイナビ
 リティ研究センター)
- P-81** クエン酸生産糸状菌 *Aspergillus tubingensis* WU-2223L におけるミトコンドリア膜局在型クエン酸-2-
 オキソグルタル酸輸送体遺伝子の破壊
 郭宇歌, 吉岡育哲, 脇本紗梨, 桐村光太郎 (早大・先進理工・応化)
- P-82** グルコース代謝に基づく菌糸先端の多種分子同時ラマン分光マッピング解析
 安田充¹, 竹下典男², 重藤真介¹ (¹関西学院大・理工, ²筑波大・生命環境)
- P-83** Totivirus によるイネいもち病菌の物質産生の活性化
 二宮章洋¹, 浦山俊一^{1,2}, 藤晋一³, 森山裕充⁴, 萩原大祐^{1,2} (¹筑波大・生命環境, ²筑波大・MiCS,
³秋田県大・生物資源科学, ⁴農工大院・農)
- P-84** ウシグソヒトヨタケの傘形成に関わる Ich1 メチルトランスフェラーゼの基質探索
 村口元, 田村駿介 (秋田県立大・生物資源)

- P-85** 糸状菌 *Acremonium persicinum* におけるシデロフォア型抗真菌化合物 ASP2397 の生産機構の解析
 浅井良樹¹, 西村慎一^{1,2}, 平塚知成³, 河村優美³, 吉田稔^{1,2,3} (東大院農,²東大 CRIIM,³理研 CSRS)
- P-86** *Aspergillus terreus* のイタコン酸生産性に与える因子についての研究
 柿崎徹也¹, 南智之¹, 浜田勇和¹, 江場祐貴², 林大三², 吉川侑太郎², 金政真^{1,2} (中部大院・応生,²中部大・応生)
- P-87** *Aspergillus nidulans* の二次代謝とオルニチン代謝間における関連性解析
 門岡千尋^{1,2}, 浅井禎吾³, 森一樹⁴, 奥津果優², 吉崎由美子^{1,2}, 高峯和則^{1,2}, 後藤正利^{1,5},
 玉置尚徳^{1,2}, 二神泰基^{1,2} (鹿児島大・連農,²鹿児島大・農,³東京大・総合文化,⁴鹿児島高専・専攻科,⁵佐賀大・農)
- P-88** 糸状菌が生産する適合溶質に関する研究
 榎野準希¹, 村田紋奈¹, 山下暁史¹, 山口大輝¹, 佐藤龍一², 小島千怜², 土谷敬多郎², 堤内要^{1,2},
 金政真^{1,2} (中部大院・応生,²中部大・応生)
- P-89** 空間的・代謝的相互作用を介した細菌-糸状菌の新規相利共生戦略
 久知良桃花¹, Gayan Abeysinghe¹, 榎尾俊介^{2,3}, 萩原大祐^{2,3}, 高谷直樹^{2,3}, 野村暢彦^{2,3}, 尾花望^{3,4},
 竹下典男^{2,3} (筑波大院・生命環境,²筑波大・生命環境系,³筑波大学・微生物サステイナビリティ
 研究センター,⁴筑波大・トランスボーダー医学医療研究センター)
- P-90** イチゴ炭疽病菌に感染するピクトリウイルスの全塩基配列の解析
 岡田亮¹, 宮本拓也¹, 林可奈子¹, 小河原孝司¹, 森山裕充² (茨城農総セ・園研,²農工大・農)
- P-91** タンパク質合成阻害剤により生産誘導されるイネいもち病菌二次代謝産物の生理機能解析
 古山祐貴^{1,2}, 本山高幸², 鎌倉高志¹, 長田裕之² (東理大院・応用生物,²理研 CSRS・ケミカルバ
 イオロジー)
- P-92** シロイヌナズナ表皮葉緑体の移動は炭疽病菌の付着器侵入に対する抵抗性に関与する
 入枝泰樹¹, 高野義孝² (信大・大学院農,²京大・院農)
- P-93** FLDS 法によるヒト病原糸状菌に潜伏する RNA ウイルスの網羅的探索
 千葉悠斗¹, 浦山俊一^{2,3}, 矢口貴志⁴, 萩原大祐^{2,3,4} (筑波大院・生命環境,²筑波大・生命環境系,
³筑波大・MiCS,⁴千葉大・真菌セ)
- P-94** ウリ類炭疽病菌のアルギニン生合成遺伝子 *ARG5,6* は病原性と防御応答の回避に関与する
 前島孝年司, 藤井聡, 小玉紗代, 久保康之 (京府大院・生環)

P-95 生態系における糸状菌・細菌の相互作用

工藤凱門, Gayan Dakshitha, 梶尾俊介, 高谷直樹, 竹下典男 (筑波大・生命環境系・MiCS)

P-96 生立木が生産する生体防御物質に対する病原性木材腐朽菌の分解メカニズムの解析

松本壘¹, 堀千明¹, 宮本敏澄², 重富健吾², 佐野雄三², 大井俊彦¹, 松本謙一郎¹ (¹北大院工,
²北大院農)

P-97 Investigation of the relationships between the genetic diversity and the heterogeneity of adaptation pattern in *Aspergillus fumigatus*

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

P-98 ウリ類炭疽病菌のII型ホスファチジン酸ホスファターゼ *CoPAP2* は細胞壁ストレス応答および病原性に関与する

小玉紗代¹, 榎谷美衣奈¹, 竹山さわな¹, 豊田裕実¹, 西内巧², 久保康之¹ (¹京府大院・生環,
²金沢大・学際センター)

P-99 *Aspergillus fumigatus* 銅耐性株の取得とその特性解析

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)

P-100 ウリ類炭疽病菌の病原性に関与する転写因子遺伝子 *CoCYS3* の機能解析

森瑞希, 小玉紗代, 久保康之 (京都府立大・生命環境)

P-101 青枯病菌の真菌寄生はクオラムセンシング機構によって制御される

松尾匠馬¹, 村井勇太¹, 曳地康史², 甲斐建次¹ (¹阪府大院・生命環境, ²高知大・農)

P-102 白癬菌が生産する抗生物質の同定とその生合成遺伝子の解析

増田圭恭¹, 二宮章洋², 矢口貴志³, 浦山俊一^{2,4}, 萩原大祐^{2,4} (¹筑波大院・生命環境, ²筑波大・生命環境系,
³千葉大・真菌センター, ⁴筑波大学微生物サステイナビリティ研究センター)

P-103 トマト葉かび病菌の2種類の *SdhC* 変異 (T78I, N85K) と各種 SDHI 殺菌剤感受性

佐竹諒子¹, 平井献士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-104 卵菌 *Phytophthora infestans* RIO kinase-like 遺伝子の機能解析

谷修治¹, 西尾尚堯¹, 炭谷順一¹, Howard S. Judelson², 川口剛司¹ (¹阪府大院・生環科, ²UC Riverside, USA)

P-105 *Bipolaris maydis* における殺菌剤耐性関連因子 Prp24 の機能解析

下村未紀¹, 住田卓也¹, 泉津弘佑², 田中千尋¹ (¹京大院・農, ²滋賀県大・環)

P-106 3D Visualization of Conidial Mitochondria of *Pyricularia oryzae*

Muhammad Akhid Syib'li, Ayumi Abe, Teruo Sone (Graduate School of Agriculture, Hokkaido University)

P-107 Function of Regulatory Gene *LaeA* Ortholog in Appressorium Formation of rice blast fungus *Pyricularia oryzae*

Pradabrat Prajanket, Vu Thi Kim Chi, Jun Arai, Worawan Sorngkom, Ayumi Abe, Teruo Sone
(Graduate School of Agriculture, Hokkaido University)

P-108 新規殺菌剤ターゲットに関わるゲラニルゲラニル被修飾遺伝子群の探索および解析

重吉沙衣¹, 藤林悠希², 津國桃花², 宮川恒³, 田中千尋³, 入江俊一¹, 鈴木一実¹, 泉津弘佑¹
(¹滋賀県大院・環境, ²滋賀県大・環境, ³京大院・農)

Symposium

糸状菌分子生物学コンファレンス シンポジウム 「相利？寄生？競争？糸状菌の複雑な共生生態」

S-1

菌根共生における養分交換の分子機構

—植物の献身，共生菌の傲（おご）り—

江沢辰広

(北海道大学大学院農学研究院)

4億年前のデボン紀，海から陸上への進出を始めた植物は，頑強な根を持っていなかったため，先に陸域環境に適応していた菌類に養水分供給を頼る選択をした。この菌類の利用＝共生に成功した植物こそ，現在の陸上植物の祖先であり，約75%の陸上植物が今でもこの共生関係を維持している。この根と菌類との共生体を菌根といい，共生相手の菌類をアーバスキュラー菌根菌 (= arbuscular mycorrhizal fungi, AM 菌)と呼ぶ。AM 菌は植物にミネラル，特にリン酸 (Pi) を供給する機能を持つが，4億年に及ぶ植物との共進化の末，この菌はゲノムから脂肪酸の生合成酵素遺伝子群を失い，脂質供給を全面的に植物に依存するようになった。AM 菌を頼って上陸に成功した植物と共生菌との関係は，今や逆転してしまっただけに見える。AM 菌は根が近づくと感染し，根の中と土壤中に菌糸ネットワークを展開する。土壤中の菌糸は H⁺および Na⁺型 Pi 輸送体 PHO84 および PHO89 を介してリン酸 (Pi) を吸収すると，VTC 複合体によりポリリン酸として液胞に濃縮することで大過剰の Pi を細胞内に蓄積できる。ポリリン酸は宿主の蒸散により駆動される菌糸内の水流により根の中に形成された樹枝状体（高次に分岐した菌糸端）まで輸送されると，再び Pi に加水分解されて液胞膜 Pi 輸送体 PHO91 を介して細胞質に，さらに Pi 排出輸送体 SYG1 を介してゴルジ小胞内へ濃縮され，最終的にエキソサイトーシス経路で樹枝状体外に放出される。樹枝状体を取り囲む植物の原形質膜上には，菌から放出された Pi を吸収することに特化した菌根特異的 Pi 輸送体 PT4 が配置されている。樹枝状体を内包する細胞では AM 菌からの Pi 供給に応答して，菌根特異的な脂質生合成・排出経路を担う遺伝子群の発現が誘導されることから，PT4 を介した Pi 吸収が脂質生合成のシグナルとして機能している可能性が考えられる。一方，AM 菌の SYG1 や植物の PT4 をロックダウンして AM 菌から植物への Pi 移行を阻害すると，樹枝状体の形成異常（菌根形成不全）が生じることから，少なくとも分子生物学的には，"No P, no carbon (リンがなければ炭素は渡さない)"システムが成立している＝共生をコントロールしているのは植物側であると言える。ところが，生態学的には少し異なる関係性が伺える。植物の中には，菌根形成すると Pi 吸収に関わる炭素コストのほとんどを AM 菌に振り向け，自根からの Pi 吸収を停止させてしまうため，見かけの生長促進効果が観察されないものがある。土壤に Pi が過剰に存在する場合は，自根で Pi を吸収した方が炭素コストは低いが，植物は菌根形成を完全に拒絶しないため，菌根維持の炭素コストが Pi 供給の利益を上回って生長が抑制されることが多い。さらに，AM 菌の中には Pi 供給能が低いにも関わらず炭素消費量が過剰な cheater (詐欺師) が存在する事実

も考えると、菌根共生は必ずしも **fair trade** で成り立っているわけではなさそうである。見返りや効率にとらわれずに共生菌に投資する植物と、そこにつけ込む AM 菌。あるいは、見かけ（人間目線）の利益では測れない事情があるのか。局所的な分子制御システムが分かっても、進化的な背景を含め、個体全体を制御するシステムに対する理解がまだ不十分である。

カビと細菌が協働で植物を育てる？

成澤才彦
(茨城大学農学部)

植物の根からは、糖、アミノ酸、さらにビタミン類等の栄養物が分泌されるため、それらを求めて多くの微生物が集まる。集まった微生物は、植物から栄養物の提供を受ける見返りとして、土壌中の窒素やリン酸等を植物に供給し、相互に利益を得る共生関係を築いている。特に低温、貧栄養、乾燥等、植物にとって環境条件が悪い場所においては、ほとんどの植物が菌類との共生関係無しでは生育できないとまで考えられている。

当研究室では、植物の根内に共生する菌類である根部エンドファイトDSEの活用に注目し、これらを植物に定着させることで、植物に病害抑制や高温耐性等が付与され、土壌中の重金属等の浄化効果を向上させるなど様々な機能が付加できることを明らかにしてきた。さらに近年は、これら菌類と内外生する細菌類の相互作用に注目している。例えば、屋久島起源の*Veronaeopsis simplex* Y34に植物への環境ストレス耐性効果が確認され、同ストレス耐性付与には、細菌の存在が重要であることが示された。これら細菌の中で主要な*Rhizobium pusense* Y9は、*V. simplex* Y34との共接種時において同菌と共に再分離され、同細菌は、Y34を介して、植物根部に内生する能力を得たことも明らかになった。そこで、トマトを供試して*R. pusense* Y9と近縁である*Rhizobium* sp. AR70Dを*V. simplex* Y34に共培養接種したところ、対照区よりもDSEの定着率が20%増加した。一方、*R. pusense* Y9と系統的に離れている*Rhizobium* sp. G-Rでは定着率は増加しなかった。

また、内生細菌は、今までに3門4亜門7綱21目36科41属約73種148系統の菌類より報告されており、その中でも、普遍的な土壌菌として知られている*Mortierella*属菌を含むケカビ門菌類での報告が多い。そこで、この*Mortierella*属菌を対象とし、その内生する細菌を制御することで腐生菌を植物共生菌に変え、作物生産への利用を検討することを試みている。植物生育を促進する*Burkholderiaceae*-related endobacteria (BRE) が内生する*Mortierella humilis* S2株を選抜した。次に、抗生物質処理により同BRE除去株(S2BF2)を作成し、トマトに接種した結果、生育不良や葉の褐変などを示すことが認められた。さらに、他の*M. humilis*および近縁の菌株でも同現象が普遍的に認められるのかを明らかにするため、宿主菌類とBREを組み合わせ、トマトへの接種試験を行った。その結果、*M. humilis*および近縁種のBRE保有株はトマトの生育を促進する傾向があることが示された。さらに、BRE非保有株を接種したトマトでは枯死した個体が認められた。以上より、トマトの生育に悪影響を及ぼさないためには、内生細菌の存在が重要であることが確認された。

生物間における共生関係は今までに多くの生物種で見出され、互いの生存・繁殖に不可欠である。菌類と細菌も相互に様々な影響を及ぼし合っていると考えられ、菌類-細菌を複合系として捉え、その生理、生態を理解することは極めて重要である。当研究グループでは、菌類体内あるいは体外には普遍的に細菌が存在しており、相互依存の関係にあるとの仮説を提唱している。本シンポジウムでは、我々が菌類として認識していた生物が、いわば菌類と細菌の共生体であるという、今までの菌学の概念を覆し、新たな生物共生系の存在に関して議論する。

イネ科牧草に感染する糸状菌エンドファイトが共生菌として持つ特殊な能力

竹本大吾

(名古屋大学大学院生命農学研究科)

植物体内で共生的に生活している糸状菌や細菌などはエンドファイトと総称されている。*Epichloë* 属エンドファイトはイネ科牧草/芝草の細胞間隙で生育し、共生関係を確立する糸状菌エンドファイトであり、宿主植物内で種々の生理活性物質を生成することで動物や昆虫による捕食の抑制、耐乾性、耐病性などの効果をもたらすことが知られている (1)。1980年代に *Epichloë* 属エンドファイトに感染したイネ科牧草を摂食した牛や羊が中毒症状を示すことが北米やニュージーランドで問題となり、*Epichloë* 属エンドファイトが広く認知されるようになった。中毒症状が問題となる一方で、エンドファイトの感染により芝草や牧草の害虫、病原菌に対する抵抗性が向上することから、マイコトキシンを生産しないが害虫の摂食を抑制する菌株が選抜され、アメリカやニュージーランドの牧草に広く導入されている。

1) *Epichloë* 属エンドファイトが植物中で生産する植物を守る生理活性物質

Epichloë 属エンドファイトが生成する生理活性物質として、動物に毒性を示すロリトレム B やエルゴバリン、昆虫に毒性や忌避作用を示すロリン、ペラミンなどが知られている (図 1)。これらの物質はエンドファイトが宿主植物に感染している時に特異的に合成されるが、その生合成遺伝子群の発現は、クロマチン構造変化を伴う機構などを介して感染時に誘導される (2)。これらのエンドファイトが生産する生理活性物質には菌株間で多様性が認められるが、*Epichloë* 属エンドファイトのゲノムにはトランスポゾン由来の反復配列が多数見出され、エンドファイトの進化の過程で、植物に有益な生理活性物質の獲得が有利になるという選択圧があったことが示唆されている (3)。

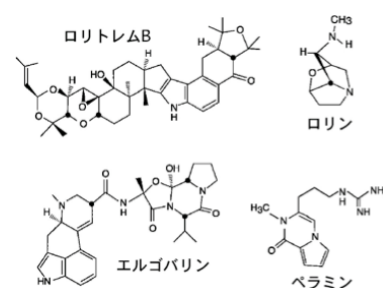


図 1. *Epichloë* 属エンドファイトが生産する主な生理活性物質

2) *Epichloë* 属エンドファイトが植物へ共生的に感染するための機構

Epichloë 属エンドファイトは宿主植物に共生的 (無病徴) に感染する。これまでに単離された共生に異常を示すエンドファイト変異株は大きく分けて 3 つのタイプがあり、これらの解析から *Epichloë* 属エンドファイトが共生的に感染するために持つ機構が明らかになってきた。共生変異株の 1 つ目のタイプは、植物内で過剰に菌糸が増えて宿主植物の生育を阻害する、つまり病原菌化する変異株群である (*noxA*, *proA* 破壊株など) (4-6)。これら変異株では植物内での菌糸間の融合を介したネットワーク形成が阻害され、菌糸のバイオマスの制御が適切に行われない。2 つ目のタイプは、感染した菌糸が植物内で断片化し、植物体の基部にしか感染できない変異株である (*cdc42* 破壊株など) (7)。通常、糸状菌は菌糸の先端を伸ばすことで伸長するが、宿主植物内が節間を伸ばす際に、内部にいるエンドファイトも菌糸の中間を伸ばすことが知られている (8)。菌糸が植物内で断片化する変異株は菌糸の中間を伸ばす機能が欠損していると考えられる。3 つ目のタイプは、植物に感染できないか感染効率が著しく低下する変異株である (*mpkB*, *ste12* 変異株など)。感染

効率が低下する変異株では接種部位で植物の抵抗反応が誘導されることが報告されている。また、植物に感染したエンドファイト細胞壁のキチンが、植物の抵抗性を誘導する活性の低いキトサンに変換されることも示唆されている。以上のように、*Epichloë* 属エンドファイトは、a) 菌糸間の細胞融合を介したネットワーク形成による菌糸のバイオマスの制御、b) 菌糸中間伸長による植物と同調した生育、c) 植物の抵抗性応答の抑制および回避、という3つの機構を介して共生的な感染を確立していると考えられる (図2)。

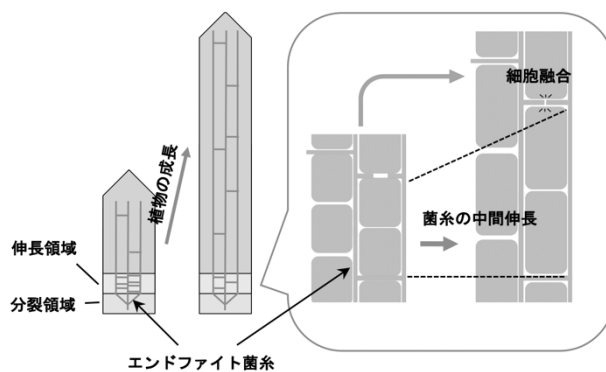


図2. 宿主植物内での *Epichloë* 属エンドファイトの菌糸生育

3) *Epichloë* 属エンドファイトの特殊な進化機構

Epichloë 属エンドファイトのうち、有性生殖能を持たない不完全菌 (かつての *Neotyphodium* 属菌) エンドファイトは、生産する生理活性物質の生産能に菌株間で著しい多様性が認められ、有性生殖能をもつ *Epichloë* 属と比較してゲノムサイズが極端に大きい場合が多い。また不完全菌エンドファイトでは、子のう菌が通常1コピーしか持たない遺伝子を複数持つことから、多くの *Neotyphodium* 属菌が *Epichloë* 属菌の Hybrid (種間雑種) であることが示唆されている (9)。*Epichloë* 属エンドファイトの核を GFP 標識して貧栄養培地で生育させたところ、隣り合った菌糸が融合し、融合部位を介して核が移行し、移行した先で核が融合することが観察された (図3)。このような現象は擬似有性生殖として、*Aspergillus* 属菌を始め菌類では古くから知られている。*Epichloë* 属エンドファイトの同種間および異種間の細胞融合の観察をしたところ、驚いたことに *Epichloë* 属では異種間においても細胞融合が観察された。この疑似有性生殖を介して人工的に Hybrid 菌株を作出したところ、同じ2つの親株から作出した Hybrid 菌株間で、生育速度、コロニー形態、抗菌活性などの性質に多様性が見られた。また、1つの Hybrid 菌株では孢子サイズが親株と比較して著しく大きくなっていった。これら Hybrid 菌株の染色体構成を調査したところ、複数の Hybrid 菌株において、親株には見られないサイズの染色体が現れているものや親株に挿入したベクター断片が異なる染色体上に受け継がれているものが認められ、孢子が大きくなった Hybrid 菌株では染色体数が倍加していた。このように、エンドファイトでは擬似有性生殖様の現象により、ランダムでダイナミックなゲノム再構築が起こっていることが示唆された。以上の結果は、*Epichloë* 属エンドファイトでは、擬似有性生殖様の現象が異種間での遺伝情報の交換を促し、遺伝的多様性を高める機構として機能している可能性を示している。

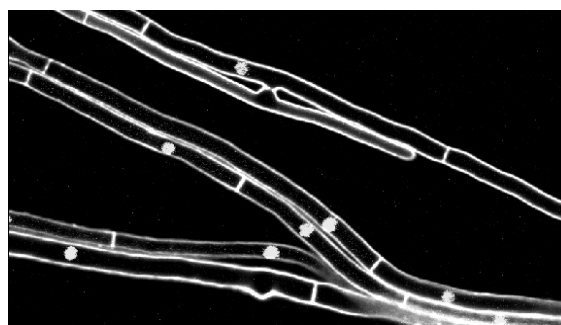


図3. エンドファイトの菌糸融合と核融合の観察

引用文献

1. Scott *et al.* *Curr Opin Microbiol* 4: 393–398 (2001)
2. Chujo *et al.* *Fungal Genet Biol* 125: 71-83 (2019)

3. Schardl *et al.* PLoS Genet 9: e1003323 (2013)
4. Tanaka *et al.* Plant Cell 18: 1052–1066 (2006)
5. Takemoto *et al.* Proc Natl Acad Sci USA 108: 2861–2866 (2011)
6. Tanaka *et al.* Mol Microbiol 90: 551–568 (2013)
7. Kayano *et al.* PLoS Pathog 14: e1006840 (2018)
8. Christensen *et al.* Fungal Genet Biol 45: 84–93 (2008)
9. Kuldau *et al.* Mycologia 91: 776-782 (1999)

RNA ゲノムを有するマイコウイルスが菌類に広く存在する理由は何か？

森山裕充

(東京農工大学大学院農学研究院)

菌類に感染するマイコウイルスは、1960年頃にマッシュルーム(*Agaricus bisporus*)やアオカビ(*Penicillium chrysogenum*)で発見され、その後1960年代後半には発酵産業界においては酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)にキラー現象を付与するRNAウイルス(発見当初はRNAプラスミドと称された)として発見され、発酵生産時のコンタミ防止にも利用されてきた。1970年代以降はイネいもち病菌(*Magnaporthe oryzae*)、エンバクビクトリア葉枯病菌(*Helminthosporium victorie*)を始め数多の植物病原菌から発見され、クリ胴枯れ病菌(*Cryphonectria parasitica*)では病原力を抑制する弱毒化ウイルスとして周知された。1990年代以降にはヒト病原性真菌 *Aspergillus fumigatus* からも発見されている。最近、担子菌門、子囊菌門だけでなく、ツボカビ門やケカビ目やクサレカビ目(接合菌門)においても、同属のマイコウイルスが門の壁を越えて存在することが分かってきた。菌類以外においても1970年代後半から1980年代にかけて、種々の健全な農作物(大根、ニンジン、ホウレンソウ、アルファルファ、ピーマン、大麦、イネなど)や沿岸に自生する海草のアマモ、大型緑藻類のオルガネラや、卵菌類に属する疫病菌にもマイコウイルスと同様な2本鎖RNAの存在が国内外の植物ウイルス学者の間で報告されており、その一部は種子伝染性潜伏ウイルスと称された。人畜共通感染症分野においても、1980年代後半から住血原虫(リユーシュマニア、ジアルジアなど)で報告があり、最近ではマイコウイルス感染により原虫の病原力が激化することも報じられている。

菌類の感染因子であるマイコウイルスは、発見当初は2本鎖RNAゲノムである事が多かった。その理由としてマイコウイルス由来の2本鎖RNAは、宿主細胞内において比較的安定で抽出・精製、検出が簡便であることが挙げられる。1本鎖RNAゲノムのウイルスは、その複製中間体として2本鎖RNAの形状を呈するのも要因と考えられる。近年ではプラス鎖RNAウイルスも多く報じられるようになり、マイナス鎖RNAウイルスも数例の報告がある。しかし、不思議なことに2本鎖DNAをゲノムとするマイコウイルスは未だに報告が無い。一方で、1994年にパン酵母において窒素代謝制御因子(URE2)や、翻訳終始因子(SUP35)の変異で生じる非メンデル遺伝現象がプリオン(Protein only)に因ることがR.B. Wickner博士により発見され、その後モデル糸状菌 *Podospora anserina* においてもヘテロカリオン不和合性を齎す遺伝因子[Het-s]はプリオンであることが証明され、プリオンも菌類の新たな感染因子として定義された。

私達の研究グループでは、2本鎖RNAの簡便な精製方法を利用して植物病原菌から複数の新種マイコウイルスを発見し、国際ウイルス分類委員会(ICTV)に提唱してきた。植物病原菌にマイコウイルスが感染すると、宿主菌の病原性を弱めたり(弱毒化現象)、逆に強めたり(強毒化現象)する性質が付与されることがある。私達はマイコウイルス由来のタンパク質が宿主菌に及ぼす影響について調べることを目的として、モデル真核生物であるパン酵母の異種遺伝子発現系を利用し、細胞の生育や寿命に与える影響について解析した。その結果、酵母細胞に生育阻害能を付与したり、逆に酵母細胞に延命効果や生育促進能を付与し得るタンパク質成分の存在を見出した。一方、卵菌類に属する疫病菌(クロミスタ界)とイネ、ピーマンなど多くの健全農作物(植物界)と、2つ生物界での持続感染

が知られているマイコウイルス（エンドルナウイルス科）は、宿主菌の殺菌剤、宿主植物の除草剤に対する感受性を変化させ得ることが分かってきた。これら菌類を含む下等真核生物や植物界に広く存在し、時として宿主生物のエピジェネティック現象に関与するマイコウイルスについて紹介したい。

アスペルギルス症起因菌の野外環境中における分布の謎に迫る

広瀬大

(日本大学薬学部)

ヒトに寄生・定着し、組織内に侵入して感染を引き起こす病原真菌の多くの種の主たる生活場所はヒト体内や体表ではなく野外環境である。免疫不全患者における高い致死率や抗真菌薬耐性の点で臨床現場において脅威であり続けていアスペルギルス症を引き起こす *Aspergillus* 属もその例に漏れない。それにも関わらず、ヒトに病原性を示す本属菌種の野外環境中における多様性や分布・生態に関する情報は限られているのが現状である。このような状況を打破したく、アスペルギルス症起因菌の野外環境における分布パターンを解き明かす研究を進めてきた。

ある生物種が地球上のどこに分布しているかという情報は、その種に関する基礎的かつ重要な情報である。地理的な空間スケールでの分布（地理的分布）は環境要因や歴史的要因、生物的要因などが複雑に関係し形成される。地理的分布のパターンや分布の形成プロセスを解き明かし、その生物種がなぜそこにいるのかという疑問を生物学的に解き明かす生物地理学という学問分野がある。生物地理学の歴史は古く、主に大型の動植物においては地理的分布のパターンが明らかになっている種は多い。近年では、ある生物種がどのようにその地理的分布を変化させてきたかを、客観性の高い遺伝情報を基に解き明かす生物系統地理学とよばれる生物地理学から派生した分野の研究が盛んに行われている。このような生物地理学的視点で病原真菌をすることは、孢子による分散プロセスや分布の拡大プロセスの理解に繋がるのが期待され、予防医学的観点において重要な一つの切り口だと考えられる。

しかし、真菌、特に大型の子実体を形成しない菌種の生物地理学的研究が盛んに行われてきたかという点と残念ながらそうではないように思える。その理由として、真菌は菌糸体あるいは酵母として生活している微生物であり、自然環境下において特定の種における分布の有無を肉眼で確認することが一般的に難しいことが挙げられる。さらに、隠蔽種の存在など、分類学的に不安定な種や、生活環や核の挙動など生物学的な基本情報が不明な種が多く存在する現状も理由として挙げられる。それらのため、地理的分布のような広域的な分布に関する情報が大型の動植物に比べ極端に少なく、地理的分布にみられるパターンさえ明らかにされていない種が多いのが現状である。この現状は分類学的研究が進んでいる *Aspergillus* 属の多くの種においても同様である。

演者はアスペルギルス症起因菌のうち主に *Aspergillus* 属 *Fumigati* 節を対象とし、日本国内の主に野外環境における種多様性の把握、各種の地理的分布にみられるパターンの解明、集団形成プロセスの推定に関する研究を行ってきた。本講演ではこれらの研究成果を中心に紹介したいと思う。

Oral Session

O-1 (P-54)

麹菌のグルコース依存的アミラーゼ生産抑制におけるグルコースキナーゼの関与

田中瑞己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)

麹菌のアミラーゼ遺伝子の発現はマルトースによって誘導されるが、グルコースが存在するとカーボンカタボライト抑制によって抑制される。我々はこれまでに、グルコースが存在すると細胞膜上のマルトーストランスポーター(MalP)が液胞に輸送されて分解されるとともに、カーボンカタボライト抑制を制御する転写因子 CreA が核内に留まって安定化することを明らかとしてきた(Hiramoto et al. 2015; Tanaka et al. 2018)。出芽酵母においては、ヘキソキナーゼがカーボンカタボライト抑制を制御する転写因子 Mig1 の核局在に重要であることが報告されている。本研究では、麹菌におけるグルコースキナーゼのカーボンカタボライト抑制制御への関与について調べた。

麹菌においてヘキソキナーゼ HxkA とグルコキナーゼ GlkA の遺伝子破壊株を作成した結果、いずれの破壊株もグルコースを添加したデンプン培地で野生株よりも明瞭なハローを形成し、glkA 破壊株はより大きなハローを形成した。タグを付加した CreA の細胞内存在量を比較した結果、glkA 破壊株ではグルコース培地に移した場合の CreA 量が野生株と比較して著しく減少した。さらに、グルコース添加後の GFP 融合 MalP の分解を調べた結果、glkA 破壊株では GFP-MalP の分解が著しく抑制された。また、MalP の液胞への輸送に関与する CreD は、グルコース添加後に速やかに脱リン酸化されることが明らかとなっているが(Tanaka et al. 2017)、glkA 破壊株では CreD の脱リン酸化が抑制された。一方、hxkA 破壊株では、細胞内 CreA 量、GFP-MalP の分解、CreD の脱リン酸化のいずれも野生株と大きな違いは見られなかった。以上の結果から、麹菌におけるグルコース依存的アミラーゼ生産抑制においては、GlkA が重要な役割を果たしていることが示唆された。

Involvement of glucosekinase in glucose-dependent repression of amylase production in *Aspergillus oryzae*.

Mizuki Tanaka¹, Yasuaki Kawarasaki¹, Katsuya Gomi²

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

O-2 (P-51)

土壌培養における *Aspergillus nidulans* の生態と土壌微生物叢との相互作用の解析

高田万里奈^{1,2}, 河内護之³, 大西康夫^{3,4}, 妹尾啓史^{3,4}, 清水公德², 浦山俊一^{1,5}, 萩原大祐^{1,5} (¹ 筑波大・生命環境, ² 東理大・基礎工, ³ 東大院・農生科, ⁴ 東大・CRIIM, ⁵ 筑波大・MiCS)

微生物は自然環境中では液体培地や寒天培地のような物性的に均一な環境に遭遇することはあり得ず、微生物本来の生理生態を理解するには、より複雑な培養系における評価が必要である。そこで本研究では、土壌生態系の主要な構成微生物である糸状菌を対象に、実験室で運用可能な閉鎖的土壌培養系を確立し、土壌における生態の理解を目指した。野外で採取した土壌を用いて *Aspergillus nidulans* を培養し、着生する孢子数の計測と菌体 DNA の定量を行なったところ、滅菌土壌では 5-7 日目に最大の孢子数を示す一方、DNA 量は 1 日目が最大となり、それ以降は減少した。この結果から、土壌表面で孢子を著量着生するが、土壌内部では著しい生育菌体の減少が起こっていることが示唆された。一方、非滅菌土壌では総じて菌体量が少なく、土着の微生物等による拮抗作用が考えられた。続いて、滅菌土壌培養 7 日目の *A. nidulans* 菌体から RNA を抽出し、網羅的な遺伝子発現解析を行なった。非土壌培養(液体、寒天培養)との比較により、土壌特異的に発現する一群の遺伝子の存在を明らかにした。また、キチナーゼ等の自己溶菌に関連する遺伝子群が高発現しており、土壌内部で自己溶菌が進んでいる可能性が示唆された。

非滅菌土壌において、*A. nidulans* が土壌微生物叢に与える影響を評価するために 16S rDNA アンプリコンシーケンスにより土壌マイクロバイオーム解析を行なった。その結果、*A. nidulans* の存在に依存して増減する複数の OTU が示された。土壌における糸状菌と細菌の相互作用機構について現在詳細な解析を進めている。

Study of *Aspergillus nidulans* in soil culture and interaction with soil microbiome

Marina Takata^{1,2}, Moriyuki Kawauchi³, Yasuo Ohnishi^{3,4}, Keishi Senoo^{3,4}, Kiminori Shimizu², Shunichi Urayama^{1,5}, Daisuke Hagiwara^{1,5}

(¹Life Env. Sci., Univ. of Tsukuba, ²Dept. Biol. Sci. Technol., Tokyo Univ. Sci., ³Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., Univ. of Tokyo, ⁴CRIIM, Univ. of Tokyo, ⁵MiCS, Univ. of Tsukuba)

O-3 (P-60)

真正担子菌特異的な転写因子をコードする *gat1* 遺伝子の破壊株において転写抑制されるヒラタケのヒドロフォビン遺伝子 *poh2* は子実体発生に必須である

中沢威人, 竹中敦紀, 呉紅麗, 坂本正弘, 本田与一 (京大院・農)

担子菌の一部の種は、有性生殖の過程で、菌類の中では比較的巨大な子実体を形成する。しかし、その分子機構はほとんど明らかとなっていない。我々は最近、白色腐朽菌ヒラタケにおいて、GATA 転写因子をコードする *gat1* 遺伝子の変異が、ブナ木粉中のリグニン分解能の顕著な低下ならびに子実体発生不全を、それぞれ遺伝的優性に引き起こすことを報告した (Nakazawa *et al.*, 2019 Fungal Biol.)。本研究では、ヒラタケにおいて、*gat1* 変異による子実体発生不全の原因を明らかにすることを目的として行なった。野生型ダイカリオン株 (PC9×PC15) を、50 ml 瓶に詰めたブナ木粉培地 (小麦ふすま 6.0% w/w 含有) で培養した後、低温処理を行い子実体の発生を誘導した。RNA-seq 解析を行い、原基が観察されない誘導後 2 日目の段階において、誘導前よりも顕著 (FPKM 値で 10 倍以上) に転写産物の蓄積量が増加する遺伝子を選抜した。この中からさらに、シャーレに敷き詰めたブナ木粉培地 (小麦ふすま 1.3% w/w 含有) 上で 13 日間培養した *gat1* 破壊株 (モノカリオン) において、親株である 20b よりも顕著に転写産物の蓄積量が低い遺伝子を絞り込んだ。該当した 6 種類の遺伝子の中に、ヒドロフォビンをコードする *poh2* 遺伝子 (Ásgeirsdóttir *et al.* 1998 Microbiology) が含まれていた。この *poh2* 遺伝子の転写産物の蓄積量は、通常の子実体発生誘導後の $\Delta gat1 \times gat1^+$ ダイカリオン株 (子実体発生しない) でも顕著に少なかった (野生株の 1/300 以下)。次に *poh2* 遺伝子の破壊株を作成し、PC15 と交配させた。得られた $\Delta poh2 \times poh2^+$ ダイカリオン株からは、子実体が発生した。一方、交雑によって作成した $\Delta poh2 \times \Delta poh2$ の 3 株全てからは、子実体は発生しなかった。以上の結果は、*poh2* 遺伝子の転写不活性化が、*gat1* 変異による子実体発生不全の原因の一つであることを示唆する。

The hydrophobin gene *poh2* downregulated in $\Delta gat1$ strains is essential for fruiting in *Pleurotus ostreatus*

Takehito Nakazawa, Atsuki Takenaka, Hongli Wu, Masahiro Sakamoto, Yoichi Honda

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

O-4 (P-53)

白麹菌における *LaeA* によるクエン酸生産制御機構の解析

二神泰基^{1,2}, 門岡千尋^{1,2}, 中村恵理², 森一樹³, 奥津果優², 吉崎由美子^{1,2}, 高峯和則^{1,2}, 後藤正利^{1,4}, 玉置尚徳^{1,2} (1鹿児島大・連農, 2鹿児島大・農, 3鹿児島高専・専攻科, 4佐賀大・農)

白麹菌 *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii* はクエン酸を高生産する能力をもつ。糸状菌において、推定メチルトランスフェラーゼ *LaeA* は二次代謝や分化に関わる制御因子として知られている。本研究は、白麹菌のクエン酸高生産に *LaeA* が関与することが示唆されたため、その制御機構を解明することを目的とした。

白麹菌の *laeA* 破壊株のクエン酸生産量は、コントロール株の約 0.03 倍に低下した。そこで、*laeA* 破壊により発現変動した遺伝子を Cap Analysis Gene Expression により解析した。その結果、*laeA* 破壊により推定細胞膜局在クエン酸トランスポーターをコードする *cexA* の発現がコントロール株の約 0.01 倍に低下したことが示唆された。この結果から、*laeA* 破壊によるクエン酸生産能の低下の原因は、*cexA* の発現低下によると推察し、*laeA* 破壊株において恒常的に働く *gpdA* のプロモーターで *cexA* を強制発現させた。その結果、*laeA* 破壊株のクエン酸生産能はコントロール株と同程度まで回復し、仮説が支持された。*LaeA* は、ヒストンのメチル化修飾を介した遺伝子発現調節に関わると推定されている。そこで、抗メチル化ヒストン抗体を用いた ChIP-qPCR 解析を行った。その結果、*laeA* 破壊株の *cexA* プロモーター領域はユークロマチン状態の指標となるヒストン H3K4me3 占有率が減少し、ヘテロクロマチン状態の指標となるヒストン H3K9me3 占有率が増加したことが示唆された。以上の結果より、*LaeA* は *cexA* プロモーターのクロマチン構造を開閉することにより *cexA* の遺伝子発現を調整し、クエン酸生産を制御することが示唆された。

Analysis of regulatory mechanism of the citric acid production by *LaeA* in *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii*

Taiki Futagami^{1,2}, Chihiro Kadooka^{1,2}, Eri Nakamura², Kazuki Mori³, Kayu Okutsu², Yumiko Yoshizaki^{1,2}, Kazunori Takamine^{1,2}, Masatoshi Goto^{1,4}, Hisanori Tamaki^{1,2}

(¹Unit. Grad. Sch. Agric. Sci. Kagoshima Univ., ²Fac. Agric., Kagoshima Univ., ³Nat. Inst. Tech. Kagoshima Col., ⁴Fac. Agric., Saga Univ.)

O-5 (P-101)

青枯病菌の真菌寄生はクオラムセンシング機構によって制御される

松尾匠馬¹, 村井勇太¹, 曳地康史², 甲斐建次¹ (¹ 阪府大院・生命環境, ² 高知大・農)

植物病原細菌として有名な青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum*) は, *Fusarium* 属と *Aspergillus* 属の真菌に対して厚壁胞子を誘導し, その胞子内に寄生する。我々は, 青枯病菌が産生するリポペプチド *ralstonin* 類を単離・構造決定し, それらが真菌の厚壁胞子誘導因子であることを明らかにしている。また, 青枯病菌のナス科植物に対する病原性は, 菌密度に依存した遺伝子調節機構であるクオラムセンシング (QS) により制御されている。そこで, 青枯病菌の真菌寄生においても, QS 機構が重要な役割を担うという仮説を立て, 本研究ではこの仮説の検証を行った。

はじめに, 青枯病菌に GFP 発現ベクターを導入し, 真菌寄生率を評価できるアッセイ系を構築した。本法を用いれば, 誘導された厚壁胞子内の GFP 蛍光で寄生の有無と定量的な寄生率の算出が可能であることが分かった。続いて, 同定した *ralstonin* 類が唯一の厚壁胞子誘導因子がどうかを調べるため, 生合成遺伝子 *rmyA* の欠損株 ($\Delta rmyA$) を作製した。 $\Delta rmyA$ と *F. oxysporum* を寒天培地上で対峙培養したところ, 厚壁胞子の誘導は起こらず, 真菌寄生も確認できなかった。ここに, 精製した *ralstonin* を添加すると, 厚壁胞子誘導と真菌寄生が回復した。続いて, QS シグナル分子合成酵素遺伝子 *phcB* の欠損株 ($\Delta phcB$) と *F. oxysporum* を対峙培養したところ, 厚壁胞子形成と真菌寄生のいずれも起こらなかった。*Ralstonin* 類の産生は, QS に制御されている。そこで, *ralstonin* 類を本実験系に処理したところ, *F. oxysporum* の厚壁胞子は誘導されたが, 寄生の回復は観察されなかった。つまり, QS によって制御される *ralstonin* 類以外の因子も, 青枯病菌の真菌寄生に必須であることが示唆された。以上の結果より, 青枯病菌が真菌に寄生する過程においても, 植物感染時と同様, QS 機構が重要な役割を担うことを世界で初めて明らかにした。

Quorum sensing-dependent invasion of *Ralstonia solanacearum* into *Fusarium oxysporum* chlamydospores

Shoma Matsuo¹, Yuta Murai¹, Yasufumi Hikichi², Kenji Kai¹

(¹Osaka Prefecture University, ²Kochi University)

O-6 (P-100)

ウリ類炭疽病菌の病原性に関与する転写因子遺伝子 *CoCYS3* の機能解析

森瑞希, 小玉紗代, 久保康之 (京都府立大・生命環境)

植物病原糸状菌においていくつかの転写因子は, 宿主への感染行動に関わる遺伝子の発現を制御することによって, 宿主への感染に重要な役割を果たしているが, 病原性に関与する転写因子の機能解析は十分ではない。本研究では, ウリ科植物に壊死病斑を引き起こすウリ類炭疽病菌において病原性に関与する新規転写因子を探索するために, 病原性欠損変異株 PDM-13 の変異遺伝子として regulatory protein cystathionine gamma-lyase3 をコードする *CoCYS3* を同定した。*CoCYS3* には, Basic leucine zipper (bZIP) ドメインが保存されており, *Neurospora crassa* において硫黄代謝酵素の転写制御に関与する *Cys-3* と相同性を示した。*CoCYS3* 破壊株を作出し, キュウリ子葉上において接種試験を行った結果, $\Delta cocys3$ は野生株と比較して侵入菌糸形成率が低下し, 病斑をほとんど形成しなかった。さらに, *CoCYS3* が付着器形成に関与するのかが検討するために, セルロース膜上での付着器侵入を観察した結果, $\Delta cocys3$ は付着器形成率, 侵入菌糸形成率および侵入菌糸長が野生株と比較して低下した。以上の結果から, *CoCYS3* はウリ類炭疽病菌の病原性および侵入器官の形態形成に関与することが示唆された。

Functional analysis of a transcription factor gene *CoCYS3* involved in pathogenicity of *Colletotrichum orbiculare*.

Mizuki Mori, Sayo Kodama, Yasuyuki Kubo

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

O-7 (P-97)

Investigation of the relationships between the genetic diversity and the heterogeneity of adaptation pattern in *Aspergillus fumigatus*

Cai Bian¹, Yoko Kusuya¹, Daisuke Hagiwara², Akira Watanabe¹, Hiroki Takahashi^{1,3}

(¹MMRC, Chiba Univ., ²Life Env. Sci., Univ. Tsukuba, ³MCRC, Chiba Univ.)

Aspergillus fumigatus is a major cause of invasive fungal infection in human being. It is considered that the adaptation ability of *A. fumigatus* could be involved in the pathogenicity. We previously investigated clinical strains isolated from eleven patients, and confirmed the phenotypic changes during the infection such as antifungal resistance and cell wall integrity. Interestingly, 40% and 60% of the isolates showed higher and lower tolerance to cell wall stress, respectively, compared with the previously isolated strain, which suggested that the adaptation trajectory during infection was heterogeneous. Also, we didn't find conserved genetic variants like SNPs raised during the infection among strains investigated. Here the phylogenetic analysis based on the whole genome SNPs was performed to address the relationships between the genomic background and adaptation patterns of the strains. Our study is expected to contribute to the characterization and genetic mechanism of the adaptation of *A. fumigatus* in human lung.

O-8 (P-95)

生態系における糸状菌・細菌の相互作用

工藤凱門, Gayan Dakshitha, 梶尾俊介, 高谷直樹, 竹下典男 (筑波大・生命環境系・MiCS)

多種多様な微生物は、様々な環境に普遍的に存在し、生態系サービスや農業などにおいて重要な役割を果たしている。土壌中において糸状菌と細菌は主要な微生物であり、相互に影響を与えながらその機能を発揮していることが明らかになっている。土壌のように水分の限られた環境中では、糸状菌の菌糸の上を細菌が移動し、菌糸は細菌の道として利用されることが知られている (Fungal highway)。糸状菌・細菌間の相互作用を解明することは、これら生態系での役割の理解とこれらの利用制御に繋がる。本研究は、生態系における糸状菌と細菌の相互作用とその役割を明らかにすることを目的とする。まず、土壌に生存することが知られる糸状菌 40 種と細菌 30 種を選抜し、それぞれの組み合わせの共培養を解析することで、糸状菌・細菌の相互作用における親和性の違いや多様性を検討した。表現型の特徴的な組み合わせについては、質量分析により産生物質の違いを解析している。また、環境土壌サンプルから、糸状菌の菌糸上を細菌が移動しているものをスクリーニングした。現在までに、8 組の糸状菌・細菌の組み合わせを得ており、そのうち 4 組では共培養により糸状菌の生長が促進された。このうち 1 組はチアミンを介した相利共生が予想され、残りの 3 組はチアミン以外の物質を介して糸状菌の生長を促進していることが示唆された。今後、トランスクリプトーム解析と質量分析解析により、両者の相互作用に関わる物質を探索する。

Fungal-bacterial interactions in ecosystems

Gamon Kudo, Gayan Dakshitha, Shunsuke Masuo, Naoki Takaya, Norio Takeshita

(MiCS, Univ. of Tsukuba)

O-9 (P-49)

白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* 由来のシトクロム P450 CYP505D ホモログの機能解析

森玲香, ワイズ里沙, 酒井杏匠, 志水元亨, 加藤雅士 (名城大・農)

白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* は芳香族高分子であるリグニンの分解能を有するが、その詳細は未だ明らかとなっていない。これまでに *P. chrysosporium* 由来のシトクロム P450 (以下 P450 と略記する) が芳香族化合物を含めた様々な化合物を水酸化することが報告されている。*P. chrysosporium* のゲノム中には 154 種の P450 遺伝子がコードされており、この中で class 3 に属する P450 / P450 レダクターゼ融合タンパク質遺伝子は 7 つ (CYP505D1 ~ CYP505D7) 存在する。本研究では、この class 3 P450 の機能を解析した。class 3 P450 の機能については枯草菌由来の P450BM-3 (CYP102A1) や糸状菌 *Fusarium oxysporum* 由来の P450foxy (CYP505A1) について詳細に研究がなされており、飽和脂肪酸の ω -1 ~ ω -3 位を水酸化することが明らかになっている。昨年、我々は、CYP505D6 がラウリン酸の ω -1 ~ ω -6 位と脂肪酸アルコールである 1-ドデカノールの ω -1 ~ ω -7 位、さらにナフタレンとナフトールを水酸化することを明らかにした¹⁾。また、反応産物の広い位置選択性と基質特異性には、CYP505D6 の活性部位の入り口付近に存在する V51 が重要であることも証明した。現在、CYP505D6 以外の CYP505D ホモログについてリコンビナントタンパク質を調製し、それらの機能を解析している。

¹⁾Sakai K *et al.* Appl Environ Microbiol 84 (2018) e01091-18

Biochemical characterization of a self-sufficient cytochrome P450 CYP505D homologs from the white-rot fungus

Phanerochaete chrysosporium

Reini Mori, Lisa Wise, Kiyota Sakai, Motoyuki Shimizu, Masashi Kato

(Fac. of Agric, Univ. of Meijo)

O-10 (P-42)

Talaromyces cellulolyticus におけるセルラーゼ発現誘導機構の生産培養プロセスへの応用

矢萩大貴¹, 吉田エリカ¹, 深田寛朗¹, 十倉充範², 白田佳弘¹ (味の素(株)・¹バイオ・ファイン研究所,
²研究開発企画部)

【緒言】非可食バイオマスからセルラーゼによって生成される糖類は、食資源と競合しない発酵主原料として期待されている。しかし、セルラーゼの製造コストが高いことが、実用化の課題の一つとなっており、より効率的なセルラーゼの生産技術が求められている。そこで、我々は有望なセルラーゼ生産糸状菌である *Talaromyces cellulolyticus* のセルラーゼ遺伝子の発現誘導機構を解析し、その知見を菌株改良および培養プロセス構築に応用することとした。

【結果・考察】細胞内に局在する β -glucosidase をコードする *bgl1A* は、破壊株ではセルラーゼ発現が著しく低下する一方で、セルラーゼ発現を大幅に増加させる有効変異型の存在が見いだされ、*T. cellulolyticus* のセルラーゼ発現の中核となる因子であることが示された。また、この *Bgl1A* が cellobiose から糖転移反応によって生成する gentiobiose は *T. cellulolyticus* のセルラーゼ発現を極めて高く誘導することが明らかになった。*Bgl1A* の有効変異型は、加水分解活性の低下を示したことから、細胞内での gentiobiose の分解を抑制するものと考えられた。我々は酵素反応による gentiobiose の自製化のプロセスを構築した。そして、*T. cellulolyticus* の *bgl1A* の欠失株に対して gentiobiose を添加する培養プロセスにおいて、高いセルラーゼ生産性を確認したので報告する。

Application of cellulase induction mechanism to production process in *Talaromyces cellulolyticus*.

Daiki Yahagi¹, Erika Yoshida¹, Hiroaki Fukada¹, Mitsunori Tokura², Yoshihiro Usuda¹

(¹Research Institute for Bioscience Products & Fine Chemicals, ²R&D Planning Dept., Ajinomoto Co., Inc.)

O-11 (P-76)

イネいもち病菌における nectriapyrone 類の生産誘導と生理機能解析

本山高幸, 野川俊彦, 長田裕之 (理研 CSRS・ケミカルバイオロジー)

イネいもち病菌 *Pyricularia oryzae* のゲノム中には約 50 個の二次代謝遺伝子クラスターがあるが、生産物が報告されているのはメラニン、テヌアゾン酸、及びピリクロール類のみであった。我々は、二成分情報伝達系を攪乱し、nectriapyrone (1) 及び水酸化類縁体である nectriapyrone D/gulypyrone B (2) の生産誘導を引き起こし、生合成遺伝子クラスターを同定することに成功している。1 は、エンドファイト (植物内生菌) や植物病原菌を主とした様々な糸状菌が生産する化合物であるが、その生理作用は不明である。今回、nectriapyrone 類の生理機能を明らかにするため、生合成遺伝子の破壊株と大量発現株を用いた解析を行った。

nectriapyrone 類の生合成遺伝子クラスターは *NEC1* (polyketide synthase gene) と *NEC2* (*O*-methyltransferase gene) からなる。*NEC1* の大量発現株では生合成中間体 3 が蓄積し、*NEC1* と *NEC2* の大量発現株では 1-3 に加えて 4-6 の大量生産が認められた。4-6 を精製し、構造決定したところ、4 と 5 は既知の類縁化合物であり、6 は新規類縁化合物 (zaepyron) であることが明らかになった。興味深いことに、2 及び 4-6 の生合成に関与する酸化酵素遺伝子は遺伝子クラスター内には存在しなかった。*Δnec1* 株のイネへの病原性の低下は認められず、nectriapyrone 類は感染には必要とされないことが示唆された。一方、nectriapyrone 類の構造は放線菌 (*Streptomyces* spp.) が生産する自己生育阻害物質 germicidin 類と構造が類似している。そこで、放線菌に対する活性を評価したところ、*NEC1* と *NEC2* の大量発現株は、*Streptomyces griseus* に対して生育阻害活性と色素生産阻害活性を示した。本阻害活性について 1-6 の関与を評価したところ、1 が活性を示した。1 が微生物間相互作用に関与し、2 及び 4-6 は不活性化された化合物であることが示唆された。

Induced production and physiological function analysis of the nectriapyrones in the rice blast fungus

Takayuki Motoyama, Toshihiko Nogawa, Hiroyuki Osada

(RIKEN CSRS, Chemical Biology)

O-12 (P-77)

分散型麹菌の物質高生産メカニズム解明へ向けたメタボローム解析

櫻川拓¹, 張斯来², 若井暁^{2,3}, 近藤明彦², 荻野千秋¹ (¹神戸大院・工, ²神戸大院・イノベ, ³海洋機構)

液体培養時、麹菌は菌糸同士が接着することで菌糸塊を形成し物質生産性が低下する。先行研究において、細胞壁を構成する菌糸接着因子合成遺伝子の破壊により菌糸同士が接着しない分散型麹菌が開発されており、分散型麹菌は液体培養において酵素生産量と菌体増殖量が増加することが報告されている。本研究では、従来株と分散株を用いて代謝解析を実施し、酵素生産性や生育特性の差の理解を目指している。酵素生産のモデルタンパク質として麹菌で分泌生産実績のあるセルラーゼ (CBHI) を選択した。遺伝子組換えにはプロトプラスト PEG 法を用い、従来株と分散株に CBHI 生産能を持たせた株を作製した。GPY 培地で 4 日間培養した結果、従来株に比べて分散株では、乾燥菌体重量が 1.5 倍、CBHI 活性は 10 倍以上となったが、CBHI 生産株では非発現株よりも少ない傾向にあった。さらに培養液のグルコース消費は従来株では 3~4 日かかっていたが、分散株では 2 日であった。次に、培養 24 時間後の菌体内の代謝産物を LC-MS/MS を用いて解析した。解糖系や TCA 回路の多くの中間代謝産物の蓄積量は分散株の方が従来株よりも少なく、代謝経路における淀みの解消が示唆された。一方で、CBHI 発現株と非発現株に明確な差はなかった。この代謝解析の結果は、分散株が従来株よりも早くグルコースを消費する培養特性と一致する。したがって、従来株では代謝の淀みが恒常的に発生しており、分散株では代謝の淀みが解消されて、スムーズにエネルギー代謝が進み、菌体量や酵素生産量の増加に繋がったと考えられる。本結果より、分散型麹菌は酵素生産だけでなく、有機酸等の物質生産においても有用なホストとなることが期待される。

Metabolomic analysis using wild type and hyphae-dispersed type of *Aspergillus oryzae* strains

Taku Sakuragawa¹, Silai Zhang², Satoshi Wakai^{2,3}, Akihiko Kondo², Chiaki Ogino¹

(¹Chem Engi, Univ. of Kobe, ²Inov, Univ. of Kobe, ³JAMSTEC)

O-13 (P-82)

グルコース代謝に基づく菌糸先端の多種分子同時ラマン分光マッピング解析

安田充¹, 竹下典男², 重藤真介¹ (¹関西学院大・理工, ²筑波大・生命環境)

糸状菌 *Aspergillus nidulans* はグルコースなどの炭素源を栄養として菌糸の先端を生長させる。この生長機構をグルコース代謝の観点から調べるため、本研究ではタンパク質や脂質など様々な細胞内分子の分子構造情報をもたらすラマン分光法を利用する。さらに、安定同位体標識法を併用することにより、菌糸を破壊することなく、代謝情報に基づいた先端生長機構の新たな知見の獲得が期待される。そこで、本研究では安定同位体として D (重水素) または ¹³C で標識したグルコースの代謝に基づく菌糸先端の多種分子同時ラマン分光マッピング解析を試みた。D 標識グルコースを含む培地で *A. nidulans* を培養したとき、還元型シトクロム b/c や脂質などを含む多種分子全体の分布を可視化することに成功した。特に、D 標識グルコースの分布は菌糸先端の縁に沿って局在していた。この局在は D 標識グルコースがグルコーストランスポーター等により菌糸先端から選択的に取り込まれたことを示唆する。一方、¹³C 標識グルコースを用いた実験では、培養時間の経過に伴い ¹³C をもつシトクロムが徐々に観測された。この ¹³C-シトクロムは ¹³C 標識グルコースの代謝によって生合成されたものである。またシトクロムはミトコンドリアに多く含まれているが、それはグルコース濃度の高い菌糸先端の縁よりも内側に多く分布していた。この結果は、菌糸先端内部に ATP などのエネルギー源が豊富に存在することを示唆する。さらに、菌糸先端は ¹²C や ¹³C をもつ有機分子の総数も多く、酵素群が多量に存在することから、代謝活性が高いと解釈できる。したがって、先端部では生長に必要な物質が活発に合成されることで菌糸が生長すると推測される。以上より、本研究で我々はラマン分光法が菌糸生長機構の理解に対して新たな視点から迫る有効なアプローチとなりうることを実証した。

Simultaneous Raman spectroscopic mapping analysis of multiple molecular species involved in glucose metabolism in fungal tips

Mitsuru Yasuda¹, Norio Takeshita², Shinsuke Shigeto¹

(¹Sch. Sci. Tech., Kwansai Gakuin Univ., ²Faculty Life and Environ. Sci., Univ. of Tsukuba)

O-14 (P-12)

ホンシメジと宿主植物アカマツをモデルとした外生菌根菌の分子遺伝学的解析手法の確立 — 3 種の MAP kinase および *LsATG8* 遺伝子の破壊および機能解析 —

前田和穂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・環境, ²京大院・農)

マツタケ、ホンシメジ、トリュ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進んでいなかった。我々の研究グループでは、外生菌根菌ホンシメジにおいて非相同組換え修復に関わる *KU80* の破壊に成功した。そしてこの *KU80* 破壊株を親株として、菌根共生に重要な役割を持つ可能性が考えられる 3 種の MAP kinase 遺伝子 (*LsKSSI*, *LsHOG1*, *LsMPKI*) の破壊を行った。さらに今回、オートファジーの中心的因子である *LsATG8* 遺伝子の破壊株を作出した。これら 4 種の遺伝子破壊株について機能解析を進めている。*LsATG8* 破壊株は菌糸成長の際立った不良および気中菌糸の著しい不全が認められた。*LsMPKI* 破壊株は寒天培地上で特徴的なシート状の生育を示した。*LsHOG1* 破壊株は高浸透圧培地において著しい感受性を示し、殺菌剤フルジオキシニルへの明確な耐性を示した。宿主植物アカマツとの共生試験の結果、*LsKSSI* 破壊株は宿主根と共生することが出来なかった。外生菌根菌は共生初期に、宿主根を菌糸が取り巻くマントル構造を形成するが、*LsKSSI* 破壊株ではマントルが一切認められず、*LsKSSI* が外生菌根共生に重要な役割を持つことが強く示唆された。以上の 4 種の遺伝子破壊の効率は 90% 以上 (15/16) であり、*KU80* 破壊株を親株とすることで、外生菌根菌ホンシメジの分子遺伝学的解析手法を確立することができたと言える。

Establishment of molecular genetic techniques for ectomycorrhizal symbiosis of *Lyophyllum shimeji* with *Pinus*.

Kazuho Maeda¹, Sae Shigeyoshi¹, Chihiro Tanaka², Toshikazu Irie¹, Kazumi Suzuki¹, Kosuke Izumitsu¹

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

O-15 (P-10)

Acremonium egyptiacum におけるアスコフラノン高生産株の育種

荒木康子¹, 淡川孝義², 松崎素道^{3,4}, 伊藤考太郎¹, 阿部郁朗², 北潔^{3,4} (¹キッコーマン (株), ²東大院・薬, ³東大院・医, ⁴長崎大・TMGH)

アスコフラノン(AF)は糸状菌 *Acremonium egyptiacum* から単離された2次代謝産物であり, これまでに抗炎症作用や脂質低下作用など様々な生理活性を有することが報告されている。その中でも, AF はアフリカ眠り病(動物ではナガナ病と呼ばれる)の病原体アフリカ型トリパノソーマの寄生時の呼吸に必須であるTAO(trypansomal alternative oxidase)を強く阻害することから, 抗寄生虫薬としての応用が期待されており, AFの大量生産系の構築が強く望まれている。

しかしながら, AFを工業的に大量生産するためには, *A. egyptiacum* はAF生産量が低いこと, さらに, AFの類似化合物であり細胞毒性を有するアスコクロリン(AC)も同時に生産することが課題となっていた。そこで我々は, AF生産量の異なる2つの培養条件下における発現差解析により, AF及びACの全合成遺伝子を同定した¹⁾。また, 相同組換え効率を向上させた *A. egyptiacum* の *ku70* 破壊株を取得し, ACのテルペン環化酵素をコードする遺伝子を破壊することで, AFのみを生産する株を取得することができた。さらに, AFの生合成において律速となっていた反応を強化することでAFの生産量を向上させることにも成功した。1) Araki et al., *Proc Natl Acad Sci U S A.*, (2019) 116(17):8269-8274

Improvement of ascofuranone production in *Acremonium egyptiacum*

Yasuko Araki¹, Takayoshi Awakawa², Motomichi Matsuzaki^{3,4}, Kotaro Ito¹, Ikuro Abe², Kiyoshi Kita^{3,4}

(¹Kikkoman Corp., ²Grad. Sch. of Pharm. Sci., Univ. of Tokyo, ³Grad. Sch. of Medicine, Univ. of Tokyo, ⁴Sch. of Tropical Medicine & Global Health, Nagasaki Univ.)

O-16 (P-1)

マイクロ流体デバイスを用いた糸状菌の菌糸における可塑性の解析

福田紗弓¹, 柳沢直樹², 高谷直樹¹, 佐藤良勝², 竹下典男¹ (¹筑波大院・生命環境・微生物サステナビリティ研究センター, ²名古屋大・ITbM)

糸状菌は, 菌糸先端を伸長させることで生長する。糸状菌は高い酵素分泌能を持ち, 醸造・醗酵や酵素・食品生産などのバイオ産業に利用されている。一方で, 菌糸生長を介して動植物の宿主細胞に侵入し, 病原性を示すことも知られている。菌糸の可塑性は, 糸状菌が動植物の細胞間や土壌団粒等の隙間に侵入し伸長する際の菌糸生長に関わると考えられる。菌糸細胞には, 細胞壁の圧力である壁圧と, 細胞膜が細胞壁を逆向きに押す膨圧が存在する。菌糸先端部は柔軟性が高いことが知られ, 膨圧と壁圧, 細胞壁の再構成(分解と合成)のバランスが菌糸生長に関わる。そこで, 我々は菌糸直径より幅の狭い1 μm の溝(長さ:50 - 200 μm)を有するマイクロ流体デバイスを設計し, モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans*, *Neurospora crassa*, 麹菌 *Aspergillus oryzae*, 植物病原糸状菌 *Fusarium oxysporum*, 植物共生菌 *Colletotrichum tofieldiae* などを生育させた。多くの糸状菌の菌糸が伸長速度を落とすことなく溝を通過し, 正常に菌糸生長を続けた。一方, *N. crassa* の菌糸は溝を通過する際, 伸長速度が低下し途中で生長を停止するものや, 通過した後に脱極性を示し生長が停止したのが見られ, 可塑性が低いことが示された。菌糸の直径や伸長速度との関連を解析したところ, 菌糸の伸長速度が可塑性に関与することが示唆された。そこで, 生長速度の速い糸状菌 *Rhizopus oryzae*, *Coprinus cinereus* を同様にマイクロ流体デバイスで生育したところ, 幅1 μm の溝における通過中の生長停止と通過後の脱極性が見られ, 菌糸の伸長速度が速いほど可塑性が低いという仮説を支持する結果が得られた。

Plasticity in filamentous fungi analysed by microfluidic devices

Sayumi Fukuda¹, Naoki Yanagisawa², Naoki Takaya¹, Yoshikatsu Sato², Norio Takeshita¹

(¹Life Enviro Sci, Univ. of Tsukuba, Microbiology Research Center for Sustainability, ²Univ. of Nagoya, ITbM)

O-17 (P-24)

黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* が生産する細胞壁多糖ニゲランの合成関連遺伝子の解析

上地敬子, 渡嘉敷直杏, 平良東紀, 水谷治 (琉球大・農)

一部の *Aspergillus* 属や *Penicillium* 属糸状菌は, グルコース残基が α -1,3 結合と α -1,4 結合を交互に繰返すニゲランという細胞壁多糖を生産する。これまでに窒素飢餓条件下においてニゲランの生産が活性化されると報告がなされているが, ニゲランの生理学的な役割やその生合成メカニズムについては不明な点が多い。

本研究では, 黒麹菌 *A. luchuensis* 株を供試菌として RNA-seq 解析を行い, 窒素飢餓条件下で mRNA の発現量が増加する推定 α -1,3-グルカン合成酵素遺伝子 (*alagsB*) を見出した。また, *alagsB* に隣接する推定 α -グルカノトランスフェラーゼ遺伝子 (*alagtC*) と機能未知遺伝子 (*alun*) も, *alagsB* と同様に窒素飢餓条件下で発現量が増加した。フュージョン PCR 法によって当該遺伝子群の破壊用コンストラクトを作製し, *A. luchuensis* *ligD::ptrA* 株を親株としてアグロバクテリウム法によって形質転換を行った。得られた遺伝子破壊株をニゲラン生産培地で培養し, ニゲランを調製した結果, Δ *alagsB* 株ではニゲラン生産能がほぼ完全に失われた。また, Δ *alagtC* 株と Δ *alun* 株はそれぞれ親株の 32%, 39%までニゲラン生産量が低下した。この結果より, *alagsB*, *alagtC*, および *alun* の 3 つの遺伝子がクラスターを形成し, ニゲラン合成を担うことが示唆された。現在, 各遺伝子破壊株の生産するニゲランの分子量解析試験等を実施している。

Elucidation of nigeran synthesis-related genes from *Aspergillus luchuensis*

Keiko Uechi, Jikian Tokashiki, Toki Taira, Osamu Mizutani

(Univ. Ryukyus)

O-18 (P-20)

麹菌における細胞外分泌多糖ガラクトサミノガラクトンによる菌糸凝集メカニズムの解析

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

糸状菌は一般的に液体振盪培養時に菌糸が塊を形成しながら生育する。これまで我々は, 麹菌 *Aspergillus oryzae* において細胞壁多糖 α -1,3-グルカン (AG) と細胞外分泌多糖ガラクトサミノガラクトン (GAG) が菌糸の塊形成に寄与し, 両多糖の生合成遺伝子を共に欠損した株 (AG-GAG 二重欠損株) では菌糸が全く塊を形成しないことを発見した¹⁾。GAG は *N*-アセチルガラクトサミン (GalNAc) とガラクトース (Gal) が α -1,4-結合でランダムに結合した直鎖ヘテロ多糖で, GalNAc 残基は一部が脱アセチル化されてガラクトサミン (GalN) 残基になっていることが分かっている。これまで, AG による接着メカニズムについては解析例があるものの²⁾, GAG についてはその報告は皆無であった。そこで本研究では, 麹菌の GAG を介した菌糸凝集メカニズムを明らかにすることを目的とした。まず, 麹菌の培養上清から GAG を精製する方法を確立し, GAG を主に含む画分 (GAG 画分) を取得した。この GAG 画分を AG-GAG 二重欠損株の菌糸と混合し 48 穴プレート中で振盪したところ, 分散菌糸が凝集した。このことから, GAG が直接的に菌糸の塊形成に寄与することが強く示唆された。次に, GAG 画分に含まれる GalN を無水酢酸存在下で *N*-アセチル化し, コロイド滴定による脱アセチル化度 (DD) の測定と菌糸凝集性評価を行った。その結果, アセチル化 GAG 画分の DD ($2.0 \pm 0.5\%$) は, アセチル化していない GAG 画分 ($43.6 \pm 5.2\%$) に比べて顕著に減少しており, アセチル化 GAG 画分は菌糸凝集能を失っていた。更に, 尿素存在下では GAG による菌糸凝集性が失われた。以上のことから, GAG による菌糸凝集は, GAG 中の GalN 残基のアミノ基を介した水素結合によってもたらされることが強く示唆された。1) 阿部ら 特願 2017-91734; 2) Fontaine et al. *Fungal Genet. Biol.* (2010) 47:707-712

Analysis of the mechanism of galactosaminogalactan-dependent hyphal aggregation in *Aspergillus oryzae*

Ken Miyazawa¹, Akira Yoshimi², Tasuku Nakajima¹, Keietsu Abe^{1,2}

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

O-19 (P-32)

Aspergillus nidulans のゴルジ体に局在する機能未知な II 型膜タンパク質遺伝子破壊株ライブラリーの構築

甲斐万紀子¹, 守田湧貴², 千原由莉亜¹, 太田一良¹, 岡拓二¹ (¹崇城大院・工, ²崇城大・生物生命)

【目的】*Aspergillus* 属糸状菌の細胞壁表層に存在するガラクトマンナン(GM)は α -(1→2)-/ α -(1→6)-マンノース(Man)と β -(1→5)-/ β -(1→6)-ガラクトフラノース(Gal_f)からなる糖鎖である。これまで我々の研究室では GM の生合成に関与する Man 糖転移酵素および Gal_f 糖転移酵素の同定と機能解析を進めてきた。しかし GM 中の Man 残基に Gal_f 残基を転移する酵素は未だ同定できていない。GM の生合成の場はゴルジ体であり、生合成に関わる糖転移酵素は II 型膜タンパク質であることが知られている。そこで、本研究ではゲノム情報から絞り込んだ機能未知な II 型膜タンパク質遺伝子の破壊株ライブラリーを構築し、各破壊株の表現型の解析を行うことで今まで全く知られていない糖転移酵素遺伝子を同定することを試みる。

【方法・結果】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)が 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。GM 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き、さらに機能既知の遺伝子を除いたところ、113 個の遺伝子が機能未知 II 型膜タンパク質遺伝子として選抜された。113 個の機能未知 II 型膜タンパク質遺伝子の遺伝子破壊用 DNA 断片を調製し、*Aspergillus nidulans* AKU89PyrG 株を形質転換した。その結果、90 種類の遺伝子破壊株を構築することができた。また、構築した破壊株のうち 9 株において生育に異常が認められた。このことから、この 9 種類の遺伝子が *A. nidulans* の正常な生育において重要な役割を果たしていることが示された。

Construction of knockout mutants of genes coding for type II membrane protein localized in the Golgi apparatus of *Aspergillus nidulans*.

Makiko Kai¹, Yuki Morita², Yuria Chihara¹, Kazuyoshi Ohta¹, Takuji Oka¹

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

O-20 (P-28)

イネいもち病菌における細胞外膜小胞の探索と性状解析

浦山俊一^{1,2}, 岩橋由佳¹, 榎尾俊介^{1,2}, 兼松周作¹, 森山裕充³, 高谷直樹^{1,2}, 野村暢彦^{1,2}, 竹下典男^{1,2}, 豊福雅典^{1,2}, 萩原大祐^{1,2} (¹筑波大・生命環境, ²筑波大・MiCS, ³農工大・農)

生物が細胞外に産生する膜小胞 (extracellular membrane vesicle, 以下 eMV) は、『細胞外への物質輸送』を担う新たな機構として認識されつつある。哺乳類の exosome, バクテリアの outer-membrane vesicle 等 (いずれも広義の eMV) の研究から、その内容物は核酸、タンパク質、化合物と多岐にわたり、eMV は生物間のコミュニケーションにおいても重要な役割を担っていることが知られている。本研究ではこれまで報告のほとんどない糸状菌における eMV 産生の有無やその性状について、植物病原菌であるイネいもち病菌を用いた解析を行った。

イネいもち病菌の液体培養試料を経時的に観察した結果、菌糸成長に伴って細胞外に脂質粒子が現れた。これら脂質粒子を精製・TEM 観察したところ、多数の小胞構造が観察されたことから、これら脂質粒子はイネいもち病菌由来の eMV であることが示唆された。また、プロテオーム解析の結果、イネいもち病菌 eMV には形質膜関連タンパク質および分泌タンパク質が多く含まれており、輸送小胞様のタンパク質組成を有することが明らかになった。糸状菌における新たな物質輸送機構の解明は、糸状菌の生態や特性理解に直結するものであり、今後は糸状菌 eMV の産生機構やその生態学的意義に迫りたい。

Characterization of extracellular membrane vesicle in liquid culture of *Magnaporthe oryzae*.

Syun-ich Urayama^{1,2}, Yuka Iwahashi¹, Shunsuke Masuo^{1,2}, Shusaku Kanematsu¹, Hiromitsu Moriyama³, Naoki

Takaya^{1,2}, Nobuhiko Nomura^{1,2}, Norio Takeshita^{1,2}, Masanori Toyofuku^{1,2}, Daisuke Hagiwara^{1,2}

(¹Fac. of Life&Env., ²MiCS., Univ. of Tsukuba, ³TUAT)

Poster Session

P-1 (O-16)

マイクロ流体デバイスを用いた糸状菌の菌糸における可塑性の解析

福田紗弓¹, 柳沢直樹², 高谷直樹¹, 佐藤良勝², 竹下典男¹ (¹筑波大院・生命環境・微生物サステイナビリティ研究センター, ²名古屋大・ITbM)

糸状菌は、菌糸先端を伸長させることで生長する。糸状菌は高い酵素分泌能を持ち、醸造・醗酵や酵素・食品生産などのバイオ産業に利用されている。一方で、菌糸生長を介して動植物の宿主細胞に侵入し、病原性を示すことも知られている。菌糸の可塑性は、糸状菌が動植物の細胞間や土壌団粒等の隙間に侵入し伸長する際の菌糸生長に関わると考えられる。菌糸細胞には、細胞壁の圧力である壁圧と、細胞膜が細胞壁を逆向きに押す膨圧が存在する。菌糸先端部は柔軟性が高いことが知られ、膨圧と壁圧、細胞壁の再構成（分解と合成）のバランスが菌糸生長に関わる。そこで、我々は菌糸直径より幅の狭い 1 μm の溝（長さ：50 - 200 μm）を有するマイクロ流体デバイスを設計し、モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans*, *Neurospora crassa*, 麹菌 *Aspergillus oryzae*, 植物病原糸状菌 *Fusarium oxysporum*, 植物共生菌 *Colletotrichum tofieldiae* などを生育させた。多くの糸状菌の菌糸が伸長速度を落とすことなく溝を通過し、正常に菌糸生長を続けた。一方、*N. crassa* の菌糸は溝を通過する際、伸長速度が低下し途中で生長を停止するものや、通過した後に脱極性を示し生長が停止したのが見られ、可塑性が低いことが示された。菌糸の直径や伸長速度との関連を解析したところ、菌糸の伸長速度が可塑性に関与することが示唆された。そこで、生長速度の速い糸状菌 *Rhizopus oryzae*, *Coprinus cinereus* を同様にマイクロ流体デバイスで生育したところ、幅 1 μm の溝における通過中の生長停止と通過後の脱極性が見られ、菌糸の伸長速度が速いほど可塑性が低いという仮説を支持する結果が得られた。

Plasticity in filamentous fungi analysed by microfluidic devices

Sayumi Fukuda¹, Naoki Yanagisawa², Naoki Takaya¹, Yoshikatsu Sato², Norio Takeshita¹

(¹Life Enviro Sci, Univ. of Tsukuba, Microbiology Research Center for Sustainability, ²Univ. of Nagoya, ITbM)

P-2

泡盛中の香気物質組成に対する黒麹菌 *ppo* 遺伝子破壊の影響の解析

片岡涼輔¹, 渡邊泰祐^{1,2}, 林梨咲³, 山田修³, 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酒総研)

【背景・目的】 1-octen-3-ol は泡盛に含まれる代表的な香気物質の 1 つであるが、その生合成経路に関する詳細は分かっていない。本研究において、泡盛醸造に使用される黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* が麹中において本化合物を生産することを明らかにした。また、遺伝子破壊株を用いた解析により、本化合物の生成に対して脂肪酸オキシゲナーゼ *ppoC* が直接的に関与し、*ppoA* は関与しない結果を得ている。今回は新たに *ppoD* 破壊株を取得すると共に、小仕込み試験により各遺伝子破壊が泡盛中の香気物質組成に与える影響について検討を行った。

【方法・結果】 *A. luchuensis* のゲノムデータベース上において、*Aspergillus flavus* の *ppoD* と相同性が高い遺伝子が見出されたことから、これを標的遺伝子とした。*ppoD* 破壊は、*A. luchuensis* Δ *ligD* 株を供試菌株としてアグロバクテリウム法を用いて実施した。得られた形質転換体についてコロニーPCR およびサザンブロット解析により、*ppoD* 破壊を確認した。次に、*A. luchuensis* の Δ *ligD* 株および *ppoA*, *C*, *D* 各単独破壊株を用いて、小仕込み試験を行った。 α 米化したインディカ種の米を用いて製麹を行い、全麹仕込みにてアルコール発酵後に単式蒸留にて蒸留した。得られた麹および蒸留液に含まれる香気物質について、GCMS による分析を進めている。

Effect of *ppo* disruption in *Aspergillus luchuensis* on the aroma component in Awamori

Ryousuke Kataoka¹, Taisuke Watanabe^{1,2}, Risa Hayashi³, Osamu Yamada³, Jun Ogihara^{1,2}

(¹Dept. Biores. Util. Sci., Grad. Sch. Biores. Sci., Nihon Univ., ²Dept. Chem. Life. Sci., Nihon Univ., ³NRIB)

P-3

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* の分泌経路における SM タンパク質の機能解析

原爽太朗, 竹川薫, 樋口裕次郎 (九大院・生資環・生命機能)

Sec1/Munc18 (SM) タンパク質は、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、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* の SM タンパク質 Sec1p, Sly1p それぞれの過剰発現株において、異種タンパク質である黄麹菌 *Aspergillus oryzae* 由来 α -amylase の分泌量の増加が報告されている。しかし黄麹菌を含む糸状菌において、分泌に寄与する SM タンパク質に関する報告はなされていなかった。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。

本研究ではさらに黄麹菌 SM 遺伝子の発現様式を解析するため、野生株 RIB40 を用いた DPY 液体培養における *Aosec1*, *Aosly1* の発現量を定量 RT-PCR によって経日的に測定した。その結果、両遺伝子共に 1 日目において高い発現が見られ、2 日目以降の発現量は 1 日目と比較して大きく低下した。以上から、1 日目に発現した転写産物から翻訳されたタンパク質が、2 日目以降も安定して機能し続けている可能性が考えられた。またこのことから、培養 2 日目以降の SM 遺伝子の発現量増強が、さらなるタンパク質分泌生産に寄与する可能性が示唆された。現在、異種タンパク質分泌生産に与える SM タンパク質の影響を解析するため、仔牛由来キモシン発現株を作製し、キモシン分泌生産量の解析を行っている。さらに、出芽酵母において過剰発現することでタンパク質分泌量の増加が報告されている SNARE タンパク質と AoSec1, AoSly1 との共過剰発現株を作製し、同様にタンパク質分泌量解析を進めている。

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

Shotaro Hara, Kaoru Takegawa, Yujiro Higuchi

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

P-4

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* における N 型糖鎖欠損糖タンパク質分泌生産株の解析

李秋実, 竹川薫, 樋口裕次郎 (九大院・生資環・生命機能)

【背景および目的】タンパク質に修飾される糖鎖はタンパク質自体の安定性などに寄与し、糖鎖の構造および様式は生物種によって異なる。例えば、微生物を宿主にヒト由来の医薬糖タンパク質を生産させると、宿主の微生物由来の糖鎖修飾がなされる。こうした糖タンパク質をヒトに投与すると、抗原と認識され薬効が発揮されない。このため、糖タンパク質糖鎖の構造は極めて重要であり、また品質という点で均一であることが求められる。そこで我々は、N 型糖鎖を欠損し、末端の N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) のみ修飾された GlcNAc タンパク質を分泌生産する黄麹菌株 (AoGlycoDelete 株) を作製した¹⁾。本研究では AoGlycoDelete 株についてさらなる詳細な解析を行った。

【方法および結果】AoGlycoDelete 株における EndoT の局在を確認するため、EGFP 融合型 EndoT (EndoT-EGFP) 発現株を構築した。蛍光顕微鏡を用いた解析により、EndoT の局在はゴルジ体であることが示唆された。また、対照株および AoGlycoDelete 株において、グルコアミラーゼである GlaA, GlaB に HA タグを融合発現する株を作製した。それぞれの株由来の GlaA, GlaB を HA タグ精製し、抗 HA 抗体を用いたウエスタンブロットで確認した結果、AoGlycoDelete 株由来の GlaA, GlaB は対照株よりバンドサイズが減少していた。また、精製した GlaA, GlaB を EndoCC 処理したところ、AoGlycoDelete 株由来の GlaA, GlaB のバンドサイズが変化しなかったことから、AoGlycoDelete 株は N 型糖鎖修飾しない GlaA, GlaB を生産することが確認された。以上から、AoGlycoDelete 株を用いることで、費用対効果の高い医薬糖タンパク質の分泌生産が期待される。

1) 李ら, 第 18 回糸状菌分子生物学コンファレンス要旨, O-19 (P-110)

Analysis of the AoGlycoDelete strain in *Aspergillus oryzae*

Qiushi Li, Kaoru Takegawa, Yujiro Higuchi

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

P-5

***Pleurotus salmoneostramineus* NBRC31859 株由来, 子実体形成および非形成単核体の生活環における RNA Seq 解析**

平山朋美¹, 福田泰久², 白坂憲章² (¹近畿大学・院農, ²近畿大学・農)

【背景と目的】担子菌の単胞子分離によって得られた単核体は、菌糸体及び子実体の表現型がそれぞれ異なっている。近年の遺伝子工学研究では全ゲノム解析データは必要不可欠であるが、二核菌糸体 (n+n') から抽出した DNA を次世代シーケンサーで解析した際、異なる核由来の配列をアセンブルするためにうまく繋がらないという問題が発生する。それに対し、単核体ではシーケンス解析後のアセンブルにより得られるコンティグ数は、二核体に比べて大幅に減少し、データベース構築が容易になる。以上のことから、単胞子分離株は子実体形成に関わる因子探索の実験材料として優れていると考えられる。本研究では、菌糸伸長速度の似通った子実体形成および非形成単核体を RNA Seq 解析し、生育段階ごとの発現遺伝子を比較することで子実体形成に必要な遺伝子の探索を試みた。

【材料と方法】供試菌株は *P. salmoneostramineus* NBRC31859 株由来単胞子分離株を多数獲得し、その中でスクリーニングを行い、菌糸伸長速度は同程度だが子実体形成の有無がある 2 株を実験に用いた。各生活環の発現遺伝子解析は、シーケンシングに Next Seq 500 を、解析処理は CLC Genomics Workbench 9 を用いた。

【結果と考察】得られたリード配列をアセンブルしたところ、子実体形成株で 4292 本、非形成株で 4712 本の contig が得られた。この配列で RNA Seq 解析を行い、各生育段階における遺伝子発現差解析を行ったところ、原基形成期において子実体形成株で 26 遺伝子、子実体非形成株で 5 遺伝子が特異的に発現していた。

De novo transcriptomic analysis during fruiting and non-fruiting monokaryons from *Pleurotus salmoneostramineus* NBRC31859.

Tomomi Hirayama¹, Yasuhisa Fukuta², Norifumi Shirasaka²

(¹Grad. School of Agr., Kindai Univ., ²Fac. of Agr., Kindai Univ.)

P-6

Development of an effective method for genetic transformation of filamentous fungi using droplet-based microfluidic platform

Xuan Chinh Luu¹, Nobuyuki Honma², Yukina Kitahara¹, Yosuke Shida², Wataru Ogasawara^{1,2}

(¹Dept. of Science of Technology Innovation, Nagaoka Univ. of Technology, ²Dept. of Bioengineering, Nagaoka Univ. of Technology)

Filamentous fungi have an essential role in many industries such as food and feed, pharma, and biofuels. These days, the development of genetic transformation techniques has allowed constructing hyper producing strains, opening up new opportunities in industrial applications of the fungi. However, this technique has some disadvantages related to time-consuming and low-throughput screening, leading to an inefficiency in generating the strains with high productivity. Hence, to tackle these problems, we developed a novel method by coupling droplet-based microfluidic platform with Green Fluorescent Protein (GFP) as a potential selectable marker for high-throughput screening of the modified filamentous fungi *Trichoderma reesei*. In the beginning, a *T. reesei* strain expressing the GFP gene under the control of *cbh1* promoter was used to investigate the effects of inducers on GFP gene expression in droplets and the findings showed that α -sophorose could be considered the most potential inducer for the GFP gene expression. By employing Fluorescence-Activated Droplets Sorters (FADS) with sorting speeds of up to approximately 6,000 droplets per minute, we carried out the rapid screening of the GFP expressing *T. reesei* from a mixture of strains. To examine whether droplet cultivation could be useful for fungal protoplast recovery, we compared the regeneration frequency of *T. reesei* protoplasts in droplets with classical transformation method using Petri plates. For the future, we will employ droplet microfluidics as a powerful tool and use GFP as a useful marker for fungal transformation for high-throughput sorting of fungal transformants.

P-7

醤油醸造における麹菌グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (AoGdhB) の機能解析

豊島快幸, 松岡太郎, 渡部潤 (ヤマサ醤油)

醤油醸造において製麹工程は原料に麹菌を培養する重要な工程である。また、この工程で得られた麹の pH は、各種酵素の作用や発酵微生物の挙動に大きな影響を及ぼし、その制御は原料の窒素回収率や風味を管理する上で非常に重要である。pH の変動に影響を及ぼす要素として、製麹中でのクエン酸等の有機酸の減少とアンモニアの生成があり、経過に伴って pH が上昇することが知られている。しかしこれらがどのような遺伝子によって制御されているのかについては知られていなかった。そこで本研究では、製麹工程で麹の pH が上昇しない実用麹菌の変異株を取得し、次世代シーケンサーを用い、変異点解析による遺伝子の特定を試みた。

pH が上昇しない株のスクリーニングにはアルギニン、オルニチンを窒素源とし、プロモクレゾールパープルを pH 指示薬とした最少培地上で、コロニーが青色に変色しないものをスクリーニングした。得られた麹菌を醤油の原料培地上で培養すると、親株に対し pH 上昇が弱い麹菌株が 2 株得られた。これらの菌株について変異点解析をした結果、共通の変異遺伝子として *AogdhB* の変異を同定した。そこで、 $\Delta ligD$ (*ligD::ptrA*, *niaD-*, *sC-*) 株を用いて *AogdhB* を破壊し、醤油原料培地上で培養した結果、コントロール株に対して pH 上昇が弱いことが確認された。また、*AogdhB* 破壊株を用いて醤油醸造を実施した結果、醤油中のアンモニア量の低減と遊離アミノ酸量の増加が確認され、実用麹菌変異株と同様の表現型を示した。以上から *AogdhB* は醤油中の窒素化合物に影響を与える重要な遺伝子であることが明らかとなった。

Functional analysis of glutamate dehydrogenase (AoGdhB) of *Aspergillus oryzae* in soy sauce brewing

Yoshiyuki Toyoshima, Taro Matsuoka, Jun Watanabe

(Yamasa corporation)

P-8

S-Adenosyl-L-methionine の麹菌発育促進効果

佐々木駿祐¹, 倉橋敦², 藤井力³, 金井宗良³, 石川雄樹¹, 大島敏明¹ (¹東京海洋大学大学院・食品栄養化学研究室, ²八海醸造(株)・研究開発室, ³酒類総合研究所)

麹菌 (*Aspergillus oryzae*) の発育を促進する液体培養方法を検討し、麹菌が生合成する機能性化合物 3-(2-sulfanylidene-1,3-dihydroimidazol-4-yl)-2-(trimethylazaniumyl)propanoate (Ergothioneine: ESH) の効率的な量産化を目指した。CD 液体培地 (植菌時 150 mL, pH3.5) における 30 °C, 3 日間の巡回振盪培養後には、0.5 mM S-adenosyl-L-methionine *p*-toluensulfonate (SAM-*p*-TS) を含有する試験区の菌体量は 345 mg であった。一方、SAM-*p*-TS を含まない対照区では、菌体量は 138 mg であった。さらに、試験区の ESH の生成量 (40.6 μ g) は対照区のそれの約 2 倍であった。*p*-TS 単独では、発育促進効果は認められなかった。以上の結果より、SAM を用いて麹菌の有用機能性二次代謝物の連続生産が可能であると考えた。

Preliminary studies on efficient mass production of metabolites by *Aspergillus oryzae*

Shunsuke Sasaki¹, Atsushi Kurahashi², Tsutomu Fujii³, Muneyoshi Kanai³, Yuki Ishikawa¹, Toshiaki Ohshima¹

(¹Food Chemistry and Functional Nutrition Lab. Graduate School of Tokyo Univ. of Marine Sci. & Tech, ²Hakkaisan Brewery Co., Ltd., ³National Research Institute of Brewing)

P-9

***Aspergillus nidulans* において *rseA/cpsA* の破壊は cell wall integrity (CWI) 経路と high osmolarity glycerol (HOG) 経路の活性化を引き起こす**

小川真弘^{1,2}, 福田良一^{2,3}, 小山泰二¹, 堀内裕之^{2,3} (¹野田産研, ²東大院・農生科・応生工, ³東大・CRIIM)

我々は、麹菌 *Aspergillus oryzae* および *Aspergillus sojae* において、*rseA* (regulator of secretory enzymes A) を変異または破壊すると、菌体外酵素生産能が向上することを既に報告している¹⁾。*rseA* は family 2 の糖転移酵素と相同性のあるタンパク質をコードしていたが、RseA が、直接的に酵素生産を制御する役割を果たしているとは考えにくい。そこで *rseA* 破壊の影響が細胞内シグナル伝達経路を介して菌体外酵素の生産制御系に伝わることで、その生産が促進されている可能性を考え、今回、細胞内シグナル伝達系に関する知見が麹菌類よりも蓄積されている *Aspergillus nidulans* を用いて、麹菌 *rseA* のオルソログ (*AnrseA*, *AN9069*, 別名 *cpsA*²⁾) の破壊株を作製し、本株のシグナル伝達経路の活性化状態を検証することにした。

始めに、*A. nidulans* の *rseA/cpsA* を *pyrG* マーカーを用いて破壊した。この破壊株と野生株を小麦フスマにて培養し、破壊株において麹菌類と同様に菌体外酵素生産能の向上が見られるかを確認した。その結果、本破壊株では野生株と比べ複数の菌体外酵素の生産量が増加していた。次に、本破壊株と野生株を、セロファンを敷いた完全寒天培地にて培養し、得られた菌体に対し、抗リン酸化 MpkA 抗体および抗リン酸化 HogA 抗体を用いたウェスタンブロッティングを実施し、CWI 経路および HOG 経路の活性化状態を調べた。その結果、破壊株において CWI, HOG の両経路とも野生株と比べ活性化されていた。現在、本破壊株におけるシグナル伝達経路の活性化と菌体外酵素生産能向上との関連性について検証を行っており、その結果についても報告する予定である。

1) 吉村ら, 日本生物工学会 2016 年度大会 (3p-1p83), 2) Feng, X., *et al.*, *Mol Microbiol.* **105**, 1–24, 2017

Disruption of the *rseA/cpsA* induces activation of the CWI and HOG pathways in *Aspergillus nidulans*

Masahiro Ogawa^{1,2}, Ryouichi Fukuda^{2,3}, Yasuji Koyama¹, Hiroyuki Horiuchi^{2,3}

(¹Noda Institute for Sci. Res., ²Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo, ³CRIIM, Univ. of Tokyo)

P-10 (O-15)

***Acremonium egyptiacum* におけるアスコフラノン高生産株の育種**

荒木康子¹, 淡川孝義², 松崎素道^{3,4}, 伊藤考太郎¹, 阿部郁朗², 北潔^{3,4} (¹キッコーマン (株), ²東大院・薬, ³東大院・医, ⁴長崎大・TMGH)

アスコフラノン(AF)は糸状菌 *Acremonium egyptiacum* から単離された2次代謝産物であり、これまでに抗炎症作用や脂質低下作用など様々な生理活性を有することが報告されている。その中でも、AF はアフリカ眠り病(動物ではナガナ病と呼ばれる)の病原体アフリカ型トリパノソーマの寄生時の呼吸に必須であるTAO(trypanosome alternative oxidase)を強く阻害することから、抗寄生虫薬としての応用が期待されており、AF の大量生産系の構築が強く望まれている。

しかしながら、AF を工業的に大量生産するためには、*A. egyptiacum* は AF 生産量が低いこと、さらに、AF の類似化合物であり細胞毒性を有するアスコクロリン(AC)も同時に生産することが課題となっていた。そこで我々は、AF 生産量の異なる2つの培養条件下における発現差解析により、AF 及び AC の全合成遺伝子を同定した¹⁾。また、相同組換え効率を向上させた *A. egyptiacum* の *ku70* 破壊株を取得し、AC のテルペン環化酵素をコードする遺伝子を破壊することで、AF のみを生産する株を取得することができた。さらに、AF の生合成において律速となっていた反応を強化することで AF の生産量を向上させることにも成功した。

1) Araki *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, (2019) 116(17):8269-8274

Improvement of ascofuranone production in *Acremonium egyptiacum*

Yasuko Araki¹, Takayoshi Awakawa², Motomichi Matsuzaki^{3,4}, Kotaro Ito¹, Ikuro Abe², Kiyoshi Kita^{3,4}

(¹Kikkoman Corp., ²Grad. Sch. of Pharm. Sci., Univ. of Tokyo, ³Grad. Sch. of Medicine, Univ. of Tokyo, ⁴Sch. of Tropical Medicine & Global Health, Nagasaki Univ.)

P-11

麴菌界面活性蛋白質ハイドロフォビン RolA の自己組織化膜の可視化・解析

寺内裕貴¹, 田中拓未¹, 三ツ石方也², 藪浩², 吉見啓³, 阿部敬悦^{1,3} (¹東北大院・農, ²東北大・多元研, ³東北大・未来研)

糸状菌が特異的に分泌する低分子界面活性蛋白質ハイドロフォビンは、固体表面に吸着し自己組織化構造 rodlet を形成する。麴菌 *Aspergillus oryzae* のハイドロフォビン RolA は生分解性ポリエステル PBSA に吸着し、PBSA 分解酵素クチナーゼ CutL1 をリクルートして基質分解を促進する¹⁾。しかしながら、ハイドロフォビンの自己組織化構造形成機構や、CutL1 が RolA 膜を通過して下層の固体基質に到達する分子機構の詳細はいまだ不明である。そこで本研究では、RolA-CutL1 間相互作用の分子機構の詳細を明らかにするため、RolA の自己組織化過程を可視化・解析することを目的とした。まず、RolA の自己組織化単層膜 (Langmuir 膜; L 膜) を様々な pH 条件で作製し、疎水化した Si 基板に転写して、原子間力顕微鏡 (AFM) を用いて RolA 自己組織化 L 膜を観察した。その結果、RolA は 2 段階の相転移を経て自己組織化膜を形成すること、自己組織化構造の形成は RolA 展開液の pH に影響されることが明らかになった。さらに、L 膜の膜圧変化に応じた RolA 自己組織化過程を AFM により可視化したので、その結果についても考察する。

¹⁾ Takahashi T., et al. *Mol. Microbiol.* **57**: 1780–1796. (2005)

Visualization and analysis of self-assembled film of *Aspergillus oryzae* surfactant protein hydrophobin RolA

Yuki Terauchi¹, Takumi Tanaka¹, Masaya Mitsuishi², Hiroshi Yabu², Akira Yoshimi³, Keietsu Abe^{1,3}

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

P-12 (O-14)

ホンシメジと宿主植物アカマツをモデルとした外生菌根菌の分子遺伝学的解析手法の確立 — 3 種の MAP kinase および *LsATG8* 遺伝子の破壊および機能解析 —

前田和穂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・環境, ²京大院・農)

マツタケ、ホンシメジ、トリュ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進んでいなかった。我々の研究グループでは、外生菌根菌ホンシメジにおいて非相同組換え修復に関わる *KU80* の破壊に成功した。そしてこの *KU80* 破壊株を親株として、菌根共生に重要な役割を持つ可能性が考えられる 3 種の MAP kinase 遺伝子 (*LsKSSI*, *LsHOG1*, *LsMPKI*) の破壊を行った。さらに今回、オートファジーの中心的因子である *LsATG8* 遺伝子の破壊株を作出した。これら 4 種の遺伝子破壊株について機能解析を進めている。*LsATG8* 破壊株は菌糸成長の際立った不良および気中菌糸の著しい不全が認められた。*LsMPKI* 破壊株は寒天培地上で特徴的なシート状の生育を示した。*LsHOG1* 破壊株は高浸透圧培地において著しい感受性を示し、殺菌剤フルジオキシニルへの明確な耐性を示した。宿主植物アカマツとの共生試験の結果、*LsKSSI* 破壊株は宿主根と共生することが出来なかった。外生菌根菌は共生初期に、宿主根を菌糸が取り巻くマントル構造を形成するが、*LsKSSI* 破壊株ではマントルが一切認められず、*LsKSSI* が外生菌根共生に重要な役割を持つことが強く示唆された。以上の 4 種の遺伝子破壊の効率は 90% 以上 (15/16) であり、*KU80* 破壊株を親株とすることで、外生菌根菌ホンシメジの分子遺伝学的解析手法を確立することができたとと言える。

Establishment of molecular genetic techniques for ectomycorrhizal symbiosis of *Lyophyllum shimeji* with *Pinus*.

Kazuho Maeda¹, Sae Shigeyoshi¹, Chihiro Tanaka², Toshikazu Irie¹, Kazumi Suzuki¹, Kosuke Izumitsu¹

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

P-13

遊離ジホモ- γ -リノレン酸生産麹菌株における伸長酵素遺伝子過剰発現化による生産向上

玉野孝一^{1,2}, 上嶋実咲³, 安中優太³, 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)

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。これまでに、アシル CoA 合成酵素遺伝子 *faaA* の破壊により、FFA 生産性を、野生株の 9.2 倍に増大させることができた。そしてこの *faaA* 破壊株に、リノール酸をジホモ- γ -リノレン酸 (DGLA) に変換する糸状菌 *Mortierella alpina* 由来の 2 種類の遺伝子を導入し、DGLA1 株を構築した。この DGLA1 株は DGLA を遊離型で生産した。そこでさらに、遊離 DGLA 生産を向上させる目的で、DGLA1 株において、麹菌が本来有する脂肪酸不飽和化反応を、不飽和化酵素遺伝子の二重過剰発現化により強化した。その結果、遊離 DGLA 生産の全 FFA における割合が、8.1%から 12.9%に向上した。

今回、脂肪酸伸長反応も、同様に遺伝子過剰発現化により強化することで、遊離 DGLA 割合の更なる向上を試みた。麹菌ゲノムには、パルミチン酸をステアリン酸に変換する伸長酵素の遺伝子が、3 個予測されている。これら 3 個のうち、どれが最も機能しているのかは不明であった。そこで、不飽和化酵素遺伝子が二重過剰発現化した DGLA1 株に伸長酵素遺伝子の個別の過剰発現化を導入して三重過剰発現株を構築し、FFA 組成を解析した。その結果、3 個中 1 個の過剰発現化で、遊離 DGLA の生産割合が 12.9%から 14.5%にさらに向上した。

Increased production of free dihomomono- γ -linolenic acid by overexpression of an elongase gene in *Aspergillus oryzae*

Koichi Tamano^{1,2}, Misaki Kamishima³, Yuta Yasunaka³, Eiichiro Kan⁴, Yasuji Koyama⁴, Tomohiro Tamura^{1,2}

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

P-14

クエン酸生産糸状菌 *Aspergillus tubingensis* (*A. niger*) WU-2223L における CRISPR/Cas9 システムを用いた遺伝子ノックアウトおよびノックイン

吉岡育哲, 脇本紗梨, 桐村光太郎 (早大・先進理工・応化)

クエン酸は糸状菌 *Aspergillus niger* を用いた発酵によって工業生産されている。演者らは、クエン酸を供与糖当たり 50% 以上の収率で生産する *A. tubingensis* (以前は *A. niger*) WU-2223L を供試菌として、クエン酸の大量生産機構に関する研究を進めている [1]。本研究では、演者らは CRISPR/Cas9 システムを利用し、簡便な遺伝子ノックアウト法および遺伝子ノックイン法を構築した。

演者らは、gRNA の転写に最適な WU-2223L 株由来の *U6snRNA* プロモーター下流にオリゴ DNA を任意のプロトスペーサー配列として挿入可能な gRNA 発現カセット pU6GRNA-ANT (3.4 kb) を構築した。一例として、ATP-sulfurylase 遺伝子 (*sC* 遺伝子) に対する gRNA 発現ベクターを構築して Cas9 タンパクとともに WU-2223L 株に導入し、遺伝子ノックアウトを実施した。セレン酸耐性を示す *sC* ノックアウト株については、*sC* 遺伝子上のプロトスペーサー配列付近に Indel 変異が確認された。さらに、*sC* 遺伝子上の推定 Cas9 切断部位に相同な配列を 15 bp 付加したピリチアミン (PT) 耐性遺伝子 (*ptrA*) を調製しノックインドナーとして用いた。取得した PT 耐性株すべてについて、*sC* のノックアウトと *ptrA* ノックインが確認された。以上より、簡便な遺伝子ノックアウト法および遺伝子ノックイン法の構築に成功した。

[1] Kirimura, K. and Yoshioka, I., Comprehensive Biotechnology (3rd ed.), vol. 3., 158-165 (2019).

Gene knock-out and knock-in toward a citric acid-producing *Aspergillus tubingensis* (*A. niger*) WU-2223L using CRISPR/Cas9 system

Isato Yoshioka, Sari Wakimoto, Kohtaro Kirimura

(Dept. Appl. Chem., Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ.)

P-15

黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* のエレクトロポレーション法による形質転換系の開発

上元優¹, 玉井萌子², 渡嘉敷直杏³, 外山博英¹, 水谷治¹ (¹琉大院・農, ²琉大・農, ³鹿児島連大・農)

黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* は 11,691 の遺伝子を有しており, その中の 6,161 の遺伝子が機能未知となっている。残りの遺伝子も相同性からの機能推察のみで, 黒麹菌における殆どの遺伝子は未調査となっており, 黄麹菌を含む他の *Aspergillus* 属糸状菌と比較して研究が遅れている。*A. luchuensis* の形質転換系は, アグロバクテリウム法や α -1,3-glucan 合成酵素遺伝子 *agsE* を破壊した株を用いたプロトプラスト-PEG 法が可能であることが分かっているが, これらは形質転換系の構築に時間がかかることや, 導入する DNA やタンパク質量が多く準備を要する。そこで本研究では, 新規エレクトロポレーション技術が搭載された ELEPO21 (ネッパジーン) を用い, エレクトロポレーション (EP) による *A. luchuensis* におけるより簡便な形質転換法の開発を目的とする。

ELEPO21 は細胞に微細孔を開ける Poring Pulse と, 遺伝子等を細胞内に送り込む Transfer Pulse の 2 種類のパルスを用いて EP を行うことが出来る。そこで, 黒麹菌野生株 RIB2604 の出芽分生子とハイグロマイシン耐性遺伝子を搭載した自立複製型プラスミドを用いて, Poring Pulse と Transfer Pulse の電圧条件の検討を行った。その結果, 4 つの条件下においてコロニーが得られた。そこで, より簡便に行えるかを検討するために, 通常の分生子に対して上記の 4 つの条件下で EP を行った。また, 自立複製型プラスミドのみではなく, 染色体組込み型の系においても EP による形質転換が可能かの検討も行った。その結果, 出芽分生子と比較して, 形質転換効率は下がるものの, 両系においてコロニーが得られ, PCR の結果, 目的の位置にバンドが観察された。現在, 再現性の確認とともに, 分生子に対する高効率な条件検討を行っている。

Construction of transformation system using novel Electroporation (ELEPO21) in *Aspergillus luchuensis*

Yu Uemoto¹, Moeko Tamai², Jikian Tokashiki³, Hirohide Toyama¹, Osamu Mizutani¹

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

P-16

ゲノム編集を利用した多重代謝改変による麹菌における異種天然物生産性の向上

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・微生物連携機構, ³北大院・理)

麹菌 *Aspergillus oryzae* は近年異種天然物の生合成研究に利用されている¹⁾。有用な天然物について工業的利用が見込める高い生産性を実現するためには, 異種経路に代謝を集中させる必要があり, これには多重の遺伝子改変が不可欠である。当研究室にて確立された *A. oryzae* におけるゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 システムにより高効率な遺伝子改変が可能となり, さらにゲノム編集プラスミドのリサイクリングにより多重の遺伝子改変²⁾を行うことで, 大規模な代謝改変を試みる事が可能になっている。本研究では, 代謝経路に対する多重遺伝子改変を行うことによって, *A. oryzae* における異種天然物の生産性向上を目的とした。

異種天然物生産のモデルとして, 担子菌由来の抗生物質であるジテルペン pleuromutilin について, ゲノム編集によって取得された生産株 (収量 34.5 mg/L) を用い, その合成につながる代謝経路に対する多重遺伝子改変を行った。メバロン酸経路の主要な酵素であり, *A. oryzae* では 5 個存在する HMG-CoA レダクターゼ (HMGR) 遺伝子について, 高発現プロモーターによる過剰発現を行った。その結果, HMGR 遺伝子のうち 2 個の同時過剰発現によって, 生産量が 2.8 倍まで増加した。また, より上流の前駆物質であるアセチル CoA の供給量増加を目的としたアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子の破壊により, 生産量が 1.9 倍まで増加した。これら代謝改変を組み合わせることで生産量を 4.5 倍まで増加させることに成功し, 現在さらなる遺伝子改変による生産性向上と高生産株の他の天然物生産への適用を検討している。

1) 南ら, 日本醸造協会誌, Vol. 112, 592-597 (2017) 2) Katayama et al. (2019) *Appl. Environ. Microbiol.*

Productivity enhancement of heterologous natural products in *Aspergillus oryzae* by metabolic engineering based on multigene targeted-genome editing

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

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

P-17

麹菌 *Aspergillus oryzae* における新規ピリチアミン耐性マーカー遺伝子 *thiI* を用いた

Genome co-editing

戸所健彦, 坂東弘樹, 小高敦史, 堤浩子, 秦洋二, 石田博樹 (月桂冠・総研)

【背景・目的】 麹菌 *Aspergillus oryzae* の研究において遺伝子の機能解析や有用形質の獲得には変異導入がしばしば用いられる。目的変異株は一般的に薬剤耐性を指標に選抜され、中でもピリチアミン (PT) は *A. oryzae* において 0.1 mg/L と低濃度で機能し有用である。ただし既知のマーカー遺伝子 (*thiA*) による PT 耐性獲得はプロモーター領域の限られた範囲への変異導入が必要なため、ゲノム編集への利用は困難であった。本研究では、麹菌 *A. oryzae* において PT 耐性に寄与する新規マーカー遺伝子の同定とゲノム編集への応用を試みた。

【方法・結果】 *A. oryzae* RIB40 の UV 変異株から、*thiA* に変異を持たない PT 耐性株を得た。全ゲノム解析により、*Schizosaccharomyces pombe* のチアミントランスポーター (Thi9) と約 50%の相同性を示す遺伝子 *thiI* への変異が見つかった。*thiI* をターゲットとしたゲノム編集により *thiI* の機能欠損株 ($\Delta thiI$) を取得したところ $\Delta thiI$ は PT 耐性を示すことが確認された一方で、最小培地 (Czapek-dox) において栄養要求性を示さなかった。これらの形質から、*thiI* は麹菌においてゲノム編集に利用できる有望な新規マーカー遺伝子であることが示唆された。また、*thiI* をマーカーに用いて genome co-editing による *wA* 遺伝子破壊を検討したところ、高頻度で白色分生子株 (*wA* 機能欠損変異株) を得ることができた。さらに、*A. niger* および *A. nidulans* においても *thiI* ホモログを同定し、PT 耐性マーカーとして利用できることを確認した。

Identification of a novel pyrithiamine resistance marker gene *thiI* in *Aspergillus oryzae* and other *Aspergilli* and their application for genome co-editing

Takehiko Todokoro, Hiroki Bando, Atsushi Kotaka, Hiroko Tsutsumi, Yoji Hata, Hiroki Ishida

(Research Institute, Gekkeikan Sake Co., Ltd.)

P-18

麹菌コロニーの相互増殖抑制に関わる遺伝子の探索

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)

麹菌 *Aspergillus oryzae* を同一の寒天培地上の2か所以上に植菌・培養すると、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相互増殖抑制は、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も分かっている。今回、RIB40株を培地中の1か所もしくは2か所に植菌して3日間培養した菌体よりRNAを抽出し、RNAの発現比較解析を行った。その結果、1か所に植菌した群、2か所に植菌した群の間で有意に発現差を示す遺伝子が16個同定された。これらの内、特に麹菌コロニーの相互増殖抑制に関わると思われる遺伝子を報告する。

Isolation of genes regulating mutual growth inhibition occurred at the boundary of two *Aspergillus oryzae*'s colonies

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

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

P-19

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* における AoCdc48 の機能解析

守田湧貴, 菊松風大, 竹川薫, 樋口裕次郎 (九大院・生資環・生命機能)

Cdc48 は出芽酵母において、小胞体関連分解 (ER-associated degradation, ERAD)や核内膜関連分解(inner nuclear membrane-associated degradation, INMAD), エンドソーム-ゴルジ体関連分解(endosome and Golgi-associated degradation, EGAD)などにおいてユビキチン付加された異常タンパク質や不要タンパク質を認識し、プロテアソームにおける分解へと導く重要な機能を有する。また Cdc48 は生育に必須なタンパク質であり、機能不全を起こした際に ER ストレスを生じることも報告されている。しかし、黄麹菌における Cdc48 のオルソログである AoCdc48 の機能やアミラーゼやコウジ酸といった大量分泌される有用物質の生産性への関与は明らかとなっていない。本研究では *Aocdc48* の条件発現株や過剰発現株などを用い、AoCdc48 の機能解析を行った。

まず *Aocdc48* 発現抑制時において、EGFP-AoSnc1 を指標に分泌小胞を顕微鏡観察したところ、菌糸先端への局在が失われていることが確認された。次に *Aocdc48* 過剰発現時における表現型及びアミラーゼ、コウジ酸生産性の解析を行った。表現型解析においては 30℃において過剰発現株でのコロニー形態の異常が各培地で観察された。また浸透圧ストレス、酸性ストレス(pH=4.0), アルカリ性ストレス(pH=8.0)条件下においてはコロニー形態の異常が抑圧された。アミラーゼ及びコウジ酸生産性ではコントロール株と *Aocdc48* 過剰発現株に差は見られなかった。

AoCdc48 の機能に関して更に解析を行うために、AoCdc48 の 2 つの AAA ATPase ドメインそれぞれにアミノ酸点変異を加えた株を構築し、表現型解析を行う。また、異常タンパク質発現株を作製し、ERAD および EGAD における AoCdc48 の機能について解析を行う。

Functional analysis of AoCdc48 in *Aspergillus oryzae*.

Yuuki Morita, Futa Kikumatsu, Kaoru Takegawa, Yujiro Higuchi

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

P-20 (O-18)

麹菌における細胞外分泌多糖ガラクトサミノガラクトンによる菌糸凝集メカニズムの解析

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

糸状菌は一般的に液体振盪培養時に菌糸が塊を形成しながら生育する。これまで我々は、麹菌 *Aspergillus oryzae* において細胞壁多糖 α -1,3-グルカン (AG) と細胞外分泌多糖ガラクトサミノガラクトン (GAG) が菌糸の塊形成に寄与し、両多糖の生合成遺伝子を共に欠損した株 (AG-GAG 二重欠損株) では菌糸が全く塊を形成しないことを発見した¹⁾。GAG は *N*-アセチルガラクトサミン (GalNAc) とガラクトース (Gal) が α -1,4-結合でランダムに結合した直鎖ヘテロ多糖で、GalNAc 残基は一部が脱アセチル化されてガラクトサミン (GalN) 残基になっていることが分かっている。これまで、AG による接着メカニズムについては解析例があるものの²⁾、GAG についてはその報告は皆無であった。そこで本研究では、麹菌の GAG を介した菌糸凝集メカニズムを明らかにすることを目的とした。まず、麹菌の培養上清から GAG を精製する方法を確立し、GAG を主に含む画分 (GAG 画分) を取得した。この GAG 画分を AG-GAG 二重欠損株の菌糸と混合し 48 穴プレート中で振盪したところ、分散菌糸が凝集した。このことから、GAG が直接的に菌糸の塊形成に寄与することが強く示唆された。次に、GAG 画分に含まれる GalN を無水酢酸存在下で *N*-アセチル化し、コロイド滴定による脱アセチル化度 (DD) の測定と菌糸凝集性評価を行った。その結果、アセチル化 GAG 画分の DD ($2.0 \pm 0.5\%$) は、アセチル化していない GAG 画分 ($43.6 \pm 5.2\%$) に比べて顕著に減少しており、アセチル化 GAG 画分は菌糸凝集能を失っていた。更に、尿素存在下では GAG による菌糸凝集性が失われた。以上のことから、GAG による菌糸凝集は、GAG 中の GalN 残基のアミノ基を介した水素結合によってもたらされることが強く示唆された。1) 阿部ら 特願 2017-91734; 2) Fontaine et al. *Fungal Genet. Biol.* (2010) 47:707-712

Analysis of the mechanism of galactosaminogalactan-dependent hyphal aggregation in *Aspergillus oryzae*

Ken Miyazawa¹, Akira Yoshimi², Tasuku Nakajima¹, Keietsu Abe^{1,2}

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

P-21

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* における初期エンドソーム動態と他の細胞小器官との関連性解析

高田歩未, 竹川薫, 樋口裕次郎 (九大院・生資環・生命機能)

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* において、我々はこれまでに初期エンドソームとモータータンパク質のリンカータンパク質として機能する AoHok1 を同定した。Aohok1 破壊株では、初期エンドソーム動態の停止に伴って菌糸先端の分泌小胞の細胞内分布に異常をきたし、 α -アミラーゼの分泌量が減少することなど、初期エンドソーム動態と酵素分泌生産の関連性を明らかにした¹⁾。本研究では、初期エンドソーム動態欠損株における他の細胞小器官への影響を解析することにより、各細胞小器官との相互作用における初期エンドソーム動態の生理機能を明らかにすることを目的とした。

各細胞小器官の細胞内分布観察を行うため、それぞれの細胞小器官に局在するタンパク質に EGFP を融合して発現するコンストラクトを黄麹菌対照株および Aohok1 破壊株に導入し、蛍光顕微鏡にて解析した。脂肪滴、ミトコンドリア、後期エンドソーム、液胞のマーカータンパク質としてそれぞれ AoErg6, AoFbh2, AoRab7, AoVam3 を用いた。脂肪滴およびミトコンドリアの局在に関しては、対照株および Aohok1 破壊株において顕著な差は見られなかった。それに対し、Aohok1 破壊株において、後期エンドソームは対照株では見られない動態を示し、また液胞は菌糸先端部にも多く局在する様子が観察された。現在、後期エンドソームに関して、AoRab7 以外のマーカータンパク質を用いた確認を行っている。また、それぞれの細胞小器官と初期エンドソーム動態を同時に解析するため、細胞小器官を EGFP でラベルした株に、初期エンドソームを mDsRed でラベルして共染色する株の作製を進めている。

1) Togo Y et al. 2017 Sci Rep 7, 15757.

Analysis on the relationship between early endosome dynamics and other organelles in *Aspergillus oryzae*

Ayumi Takata, Kaoru Takegawa, Yujiro Higuchi

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

P-22

植物への侵入に付着器のメラニン化を必須としない炭疽病菌の新規同定

工藤健央¹, 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、イネいもち病菌と同様に感染器官である付着器を介して植物へ侵入する。本過程では付着器のメラニン化が必須のステップであり、付着器内部の膨圧上昇や細胞壁の剛性維持が植物侵入に寄与すると報告されている。実際に、これら病原糸状菌に対する有効な農薬として複数のメラニン合成阻害剤が活用されており、付着器を介した植物感染にメラニン化を不要とするイネいもち病菌および炭疽病菌の報告例はこれまでにない。一方で、メラニン合成阻害剤であるカルプロパミドを処理したコスモス炭疽病菌が、非メラニン化付着器から植物細胞に侵入して壊死斑を形成することを我々は発見している。本菌は、メラニン化を阻害されても付着器内部の膨圧、人工膜侵入能、細胞壁分解酵素耐性を維持しており、ウリ類炭疽病菌とは異なる特性を示した。今回、カルプロパミドとは作用点の異なるメラニン合成阻害剤ピロキロンを用いて追加解析を実施した。その結果、コスモス炭疽病菌がピロキロンに対しても耐性をもつことが明らかとなった。本菌の付着器を介した植物侵入におけるメラニン化非依存性をさらに調査するため、メラニン合成経路で機能するシタロン脱水酵素遺伝子 (*SCD1*) の破壊を試みたところ、胞子発芽後に形成される付着器が全くメラニン化しないメラニン合成欠損株 ($\Delta scd1$) を得ることに成功した。作出した $\Delta scd1$ 株はメラニン化しない付着器から植物へ侵入し、壊死斑を形成した。以上より、植物への侵入に付着器のメラニン化を必須としない初めての例としてコスモス炭疽病菌を報告する。

Identification of a novel *Colletotrichum* fungus characterized by the ability to invade plant via nonmelanized appressorium

Takehiro Kudo¹, Kazuho Takesue¹, Hiroki Irieda²

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

P-23

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 の機能解析

北原雪菜¹, 吉澤和将², 谷口大樹², 古川隆紀³, 志田洋介², 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マンチェスター大・感染)

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たため、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。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。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が、その詳細な機能は明らかとなっていない。昨年度は Crt1 の局在性について報告した。今年度は Crt1 のセルラーゼ生産シグナル伝達機構への関与について検討した。

Crt1 は既知のトランセプターよりも短い C 末端領域を持っている。この領域がシグナル伝達に関与する可能性があるかと推測された。C 末端削除型 Crt1 株の機能解析を行った結果、C 末端削除株ではセルラーゼ生産性が欠如した。このことから、Crt1 では C 末端テール領域がセルラーゼ生産へのシグナル伝達に関与することが判明した。C 末端テール領域の一部がシグナル伝達に関与すると仮説を立て、種々の C 末端改変株を用いた機能解析を進めている。

Functional analysis of putative transeptor Crt1 in highly producing cellulase filamentous fungus, *Trichoderma reesei*

Yukina Kitahara¹, Kazumasa Yoshizawa², Hiroki Taniguchi², Takanori Furukawa³, Yosuke Shida², Wataru Ogasawara^{1,2}

(¹Dept. of Sci. of Tech. Innov., Nagaoka Univ. of Tech., ²Dept. of Bioeng., Nagaoka Univ. of Tech., ³Division of Infection, The Univ. of Manchester)

P-24 (O-17)

黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* が生産する細胞壁多糖ニゲランの合成関連遺伝子の解析

上地敬子, 渡嘉敷直杏, 平良東紀, 水谷治 (琉球大・農)

一部の *Aspergillus* 属や *Penicillium* 属糸状菌は、グルコース残基が α -1,3 結合と α -1,4 結合を交互に繰返すニゲランという細胞壁多糖を生産する。これまでに窒素飢餓条件下においてニゲランの生産が活性化されると報告がなされているが、ニゲランの生理学的な役割やその生合成メカニズムについては不明な点が多い。

本研究では、黒麹菌 *A. luchuensis* 株を供試菌として RNA-seq 解析を行い、窒素飢餓条件下で mRNA の発現量が増加する推定 α -1,3-グルカン合成酵素遺伝子 (*alagsB*) を見出した。また、*alagsB* に隣接する推定 α -グルカノトランスフェラーゼ遺伝子 (*alagtC*) と機能未知遺伝子 (*alun*) も、*alagsB* と同様に窒素飢餓条件下で発現量が増加した。フュージョン PCR 法によって当該遺伝子群の破壊用コンストラクトを作製し、*A. luchuensis ligD::ptrA* 株を親株としてアグロバクテリウム法によって形質転換を行った。得られた遺伝子破壊株をニゲラン生産培地で培養し、ニゲランを調製した結果、 Δ *alagsB* 株ではニゲラン生産能がほぼ完全に失われた。また、 Δ *alagtC* 株と Δ *alun* 株はそれぞれ親株の 32%、39%までニゲラン生産量が低下した。この結果より、*alagsB*、*alagtC*、および *alun* の 3 つの遺伝子がクラスターを形成し、ニゲラン合成を担うことが示唆された。現在、各遺伝子破壊株の生産するニゲランの分子量解析試験等を実施している。

Elucidation of nigeran synthesis-related genes from *Aspergillus luchuensis*

Keiko Uechi, Jikian Tokashiki, Toki Taira, Osamu Mizutani

(Univ. Ryukyus)

P-25

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・MiCS, 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、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。私達は、精米歩合 50% または 90% の酒米(山田錦) または食用米(千代錦) に、GFP で核を標識した *A. oryzae* を生育させて製麴し、クライオマイクロトームを用いて作製した切片の蛍光観察、SEM や X 線 CT により破精込みのイメージング解析を行った。その結果、菌糸は精米歩合 90% と比較して 50% の米でより長い距離を破精込んでいた。さらに、菌糸が米の細胞と細胞の間を伸長している様子や、蒸米内部を溶かしながら伸長している様子も観察された。また、*A. oryzae* の性質を特徴付ける機構を明らかにするため、固体培地での核の動態を解析した。その結果、培養時間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 *Aspergillus nidulans* では見られなかった。現在、*A. oryzae* における核分裂のタイミングに着目し、米麴内部の菌糸と核のばらつきの関係性について解析している。

Fluorescence imaging analysis of fungal mycelial growth in steamed rice

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

(¹MiCS, Facult. of Life Enviro. Sci., Univ. of Tsukuba, ²Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo)

P-26

Functional characterization of RGS domain-containing putative G protein-coupled receptors in *Aspergillus oryzae*

Dong Min Kim¹, Manabu Arioka^{1,2}

(¹Dept. of Biotechnol., ²CRIIM, Univ. of Tokyo)

G protein-coupled receptors (GPCRs) are the largest group of transmembrane proteins that detect and transmit extracellular signals into cells. In each *Aspergillus* spp., about 15 GPCRs genes have been identified in the genome, which are classified into 9 classes. Despite their possible important roles, their functional properties such as the ligands, the modes of G protein coupling, and the signaling pathways are largely unknown. Class VI GPCRs (GprK and GprR) are, unlike other GPCRs, characterized by a hybrid structure containing both the 7-transmembrane and the regulator of G-protein signaling (RGS) domains, which is found only in fungal and plant, but not in animal, GPCRs. Since RGS proteins are known to accelerate the intrinsic GTPase activity of G proteins and inhibit GPCR signaling, how the activation and inactivation of GPCR signaling are controlled in these hybrid GPCRs is enigmatic and of central interest. Here we characterized the class VI GPCRs in *A. oryzae*, AoGprK-1, AoGprK-2, and AoGprR. Overexpression of class VI GPCRs resulted in the enhanced response to linoleic acid (LA) and 13(S)-HpODE, a derivative of LA, in conidia production. In contrast, deletion of either one of class VI GPCRs caused a decrease in conidiation. Strains with multiple gene deletion are now under construction. Class VI GPCRs were localized to several cell organelles such as plasma membrane and vacuoles. Heterologous expression of RGS domains of class VI GPCRs in the yeast strain lacking the Sst2 protein, the RGS that controls the mating pheromone response, partially mitigated the hypersensitivity of the host to α -factor, indicating that these RGS domains are functional. In summary, the results obtained so far suggest that class VI GPCRs play important roles in the development of *A. oryzae*.

P-27

黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* における転写因子 AmyR の活性化機構の解析

橋本涉¹, 渡部昭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)

産業上重要なアミラーゼの生産制御に必須な転写因子 AmyR の活性化機構が、麹菌 *Aspergillus oryzae* とモデルカビ *A. nidulans* では異なることが報告されている。*A. oryzae* ではマルトース資化クラスターの機能により環境中のマルトースが細胞内に取り込まれ、菌体内 α -グルコシダーゼによりイソマルトースへと変えられる。このイソマルトースにより AmyR が活性化される。一方、*A. nidulans* ではマルトース資化クラスターのホモログクラスターを有するものの、マルトースは菌体外 α -グルコシダーゼの糖転移反応によって AmyR の直接の活性化基質であるイソマルトースに変換されていると考えられている。また、焼酎醸造に用いられる黒麹菌 *A. luchuensis* では麹菌や *A. nidulans* に存在するマルトース資化クラスターは見出されない。このように同じアスペルギルス間でもアミラーゼの生産制御において異なる分子機構を有していることが考えられる。本研究では黒麹菌における AmyR の活性化機構解析を通して、アスペルギルス属間におけるアミラーゼの生産制御機構の多様性の解明を目指した。

A. luchuensis をマルトース単一炭素源とした培地にて誘導を行い 2 時間ごとに培養液を回収し、マルトースの取り込みについて HPLC を用いて解析を行った。この結果マルトースは 10 時間後に培養液中から見られなくなった。しかし、培地に α -グルコシダーゼ阻害剤を添加したところマルトース濃度は 10 時間後にもほとんど変化が見られなかった。このことから黒麹菌では *A. nidulans* 同様に菌体外 α -グルコシダーゼによりマルトースをイソマルトースに転換し AmyR を活性化している可能性が示唆された。今後はイソマルトースの取り込みの解析や AmyR の局在解析を進める計画である。

Analysis of activation mechanism of AmyR in the black koji-mold *Aspergillus luchuensis*

Wataru Hashimoto¹, Akira Watanabe¹, Osamu Mizutani², Osamu Yamada³, Takahiro Shintani¹, Katsuya Gomi¹

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

P-28 (O-20)

イネいもち病菌における細胞外膜小胞の探索と性状解析

浦山俊一^{1,2}, 岩橋由佳¹, 榎尾俊介^{1,2}, 兼松周作¹, 森山裕充³, 高谷直樹^{1,2}, 野村暢彦^{1,2}, 竹下典男^{1,2}, 豊福雅典^{1,2}, 萩原大祐^{1,2} (¹筑波大・生命環境, ²筑波大・MiCS, ³農工大・農)

生物が細胞外に産生する膜小胞 (extracellular membrane vesicle, 以下 eMV) は、『細胞外への物質輸送』を担う新たな機構として認識されつつある。哺乳類の exosome, バクテリアの outer-membrane vesicle 等 (いずれも広義の eMV) の研究から、その内容物は核酸, タンパク質, 化合物と多岐にわたり, eMV は生物間のコミュニケーションにおいても重要な役割を担っていることが知られている。本研究ではこれまで報告のほとんどない糸状菌における eMV 産生の有無やその性状について, 植物病原菌であるイネいもち病菌を用いた解析を行った。

イネいもち病菌の液体培養試料を経時的に観察した結果, 菌系成長に伴って細胞外に脂質粒子が現れた。これら脂質粒子を精製・TEM 観察したところ, 多数の小胞構造が観察されたことから, これら脂質粒子はイネいもち病菌由来の eMV であることが示唆された。また, プロテオーム解析の結果, イネいもち病菌 eMV には形質膜関連タンパク質および分泌タンパク質が多く含まれており, 輸送小胞様のタンパク質組成を有することが明らかになった。糸状菌における新たな物質輸送機構の解明は, 糸状菌の生態や特性理解に直結するものであり, 今後は糸状菌 eMV の産生機構やその生態学的意義に迫りたい。

Characterization of extracellular membrane vesicle in liquid culture of *Magnaporthe oryzae*.

Syun-ich Urayama^{1,2}, Yuka Iwahashi¹, Shunsuke Masuo^{1,2}, Shusaku Kanematsu¹, Hiromitsu Moriyama³, Naoki

Takaya^{1,2}, Nobuhiko Nomura^{1,2}, Norio Takeshita^{1,2}, Masanori Toyofuku^{1,2}, Daisuke Hagiwara^{1,2}

(¹Fac. of Life&Env., ²MiCS., Univ. of Tsukuba, ³TUAT)

P-29

Aspergillus oryzae における菌体内 metalloendopeptidase insulysin ホモログの局在解析

溝上哲哉, 鈴木遥, 吉永良平, 佐々木信光, 竹内道雄, 山形洋平 (農工大・応生化)

Insulysin は真核生物で広く見出されている metalloendopeptidase の一つである。酵母の insulysin はミトコンドリアに局在し未成熟タンパク質のプロセッシングに働いている 1)。黄麹菌 *Aspergillus oryzae* には, insulysin のホモログをコードする遺伝子が 3 種類存在する。(以下 InsA, InsB, InsC) *A. oryzae* はヒトや酵母より多くの insulysin 遺伝子を保有している。InsA, InsC は酵母の insulysin との相同性が高いことから類似の働きをしていると考えられるが InsB はヒトや酵母の insulysin との相同性が低く, 麹菌特異的な役割を担っていると考えられる。また, 欠損株の観察により *A. oryzae* の insulysin は TOR 経路に関与している可能性が示唆されている 2)。そこで InsA, InsB, InsC の機能を解析するにあたり酵母の insulysin と相同性の高い InsA, InsC について局在解析を行うことにした。

まず本研究では, *A. oryzae* の InsA, InsC と HA tag, DsRed の融合タンパク質, またコントロールとして HA tag と DsRed の融合タンパク質を発現する遺伝子を作製し, *A. oryzae* の形質転換をした。形質転換株の蛍光観察の結果, InsA ではミトコンドリアと蛍光が一致, InsC では菌糸全体に繊維状の蛍光が見られた。InsA に関しては相同性の高い酵母の insulysin がミトコンドリアに局在することから同様の働きを持つ可能性が考えられた。InsC に関しては局在の特定は出来ていないがミトコンドリア以外のオルガネラに局在していると考えられた。

1) Asli Aras Taskin, *et al. Mol Biol Cell.* 28:997-1002 (2017)

2) 鈴木遥ら 日本農芸化学会 2017 年度大会要旨集

Localization analysis of intracellular metalloendopeptidase insulysin homolog in *Aspergillus oryzae*

Tetsuya Mizokami, Haruka Suzuki, Ryohei Yoshinaga, Nobumitsu Sasaki, Michio Takeuchi, Yohei Yamagata

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

P-30

Aspergillus 属菌における細胞外膜小胞の探索

岩橋由佳¹, 浦山俊一^{1,2}, 榎尾俊介^{1,2}, 兼松周作¹, 高谷直樹^{1,2}, 野村暢彦^{1,2}, 竹下典男^{1,2}, 豊福雅典^{1,2}, 萩原大祐^{1,2} (¹筑波大・生命環境, ²筑波大・MiCS)

細胞外膜小胞 (eMV: extracellular membrane vesicle) は, 細胞外に放出された膜小胞の総称であり, 細胞外への新たな物質輸送機構としてヒトや細菌で注目が集まっている。細菌由来の eMV には酵素や毒素, クオラムセンシングシグナルなどが内包され, 様々な細胞間相互作用に関与している。一方で, 糸状菌においては様々な相互作用が知られているものの, それを担う物質の輸送機構が解明されている事例は少ない。糸状菌における eMV の理解は, 生物間相互作用の根幹ともいえる物質輸送機構に新たな視点を与え, 病原菌や産業菌の新たな制御法の確立に繋がると期待される。我々はイネいもち病菌由来の eMV を見出しており, 本研究では糸状菌における eMV 産生の普遍性理解を目指し, 様々な *Aspergillus* 属菌における eMV 産生を調査した。

培養液中の脂質量を指標とした eMV 産生条件の探索により, 特に YPD 培地で *Aspergillus oryzae* が菌体対数増殖初期および定常期に eMV を多く産生していることが示唆された。同様の eMV 産生は *Aspergillus flavus* や *Aspergillus luchuensis*, *Aspergillus kawachii* などで確認されたことから, 糸状菌による eMV 産生はイネいもち病菌だけでなく, 様々な菌種で認められる現象であると考えられた。また, YPD 培地において eMV 産生が示唆された菌種においても, 他の培地では eMV 産生が認められない場合もあったことから, 多量の eMV 産生には一定の条件が必要であることも明らかとなった。一方, *Aspergillus nidulans* や *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus* では, 試験した条件下での eMV 産生は確認されなかった。*A. oryzae* については変異体等を用いた検討も行っており, その結果についても議論する。

Identification of extracellular membrane vesicles in the genus *Aspergillus*.

Yuka Iwahashi¹, Syunichi Urayama^{1,2}, Shunsuke Masuo^{1,2}, Shusaku Kanematsu¹, Naoki Takaya^{1,2}, Nobuhiko Nomura^{1,2}, Norio Takeshita^{1,2}, Masanori Toyofuku^{1,2}, Daisuke Hagiwara^{1,2}

P-31

麹菌 *Aspergillus oryzae* におけるヌクレオファジーレセプター探索を目指した AoAtg8 相互作用タンパク質の単離

高橋慶晃, 武田陽一, 菊間隆志 (立命館大・生命科学)

真核生物ではミトコンドリア, ペルオキシソームなどの様々なオルガネラがオートファジー (選択的オートファジー) によって分解されることが知られている。多核細胞からなる糸状菌においては核全体を分解するヌクレオファジーが報告されており, なかでも麹菌 *Aspergillus oryzae* は, 核を丸ごとオートファゴソームで囲い込み, 液胞へ輸送し分解する過程が観察されている唯一の生物である。しかし, どのようにして複数ある核の中から特定の核を選別するのか, ほかのオルガネラと区別するのか, その分子機構は不明である。一般に選択的オートファジーは, 分解基質に存在するレセプタータンパク質と Atg8 とが結合することによってその特異性が生じると考えられている。これまで, Tandem Affinity Purification (TAP) タグを AoAtg8 (Atg8 の *A. oryzae* オルソログ) の N 末端に付加した TAP-AoAtg8 により, 6 個の相互作用候補タンパク質を単離された¹⁾。今回, 我々は TAP タグを AoAtg8 の C 末端に付加した AoAtg8-TAP 発現株の作製およびその評価を行った。AoAtg8 の C 末端は, AoAtg4 によりプロセッシングを受けグリシン残基が露出する。そのため, このグリシン以降の 3 アミノ酸 (GDL) を欠損した AoAtg8 に TAP タグを付加し, さらに *Aoatg4* 破壊株での発現を試みた。抗 calmodulin binding protein 抗体を用いたウエスタンブロッティングを行ったところ, AoAtg8-TAP のバンドが検出され, TAP タグが切断されないことが確認された。これらの株は親株と比較して, 生育阻害などは見られなかった。現在, 炭素源飢餓によりヌクレオファジーを誘導させ, TAP タグを用いた相互作用タンパク質の精製を行っている。 1) 湯浅ら, 日本農芸化学会大会要旨集 4C3a04 (2019)

Purification of AoAtg8-interacting proteins for identification of nucleophagy receptors in *Aspergillus oryzae*

Yoshiaki Takahashi, Yoichi Takeda, Takashi Kikuma

(Dept. of Biotechnol., Ritsumeikan Univ.)

P-32 (O-19)

Aspergillus nidulans のゴルジ体に局在する機能未知な II 型膜タンパク質遺伝子破壊株ライブラリーの構築

甲斐万紀子¹, 守田湧貴², 千原由莉亜¹, 太田一良¹, 岡拓二¹ (¹崇城大院・工, ²崇城大・生物生命)

【目的】*Aspergillus* 属糸状菌の細胞壁表層に存在するガラクトマンナン(GM)は α -(1→2)-/ α -(1→6)-マンノース(Man)と β -(1→5)-/ β -(1→6)-ガラクトフラノース(Gal_f)からなる糖鎖である。これまで我々の研究室では GM の生合成に関与する Man 糖転移酵素および Gal_f 糖転移酵素の同定と機能解析を進めてきた。しかし GM 中の Man 残基に Gal_f 残基を転移する酵素は未だ同定できていない。GM の生合成の場はゴルジ体であり, 生合成に関わる糖転移酵素は II 型膜タンパク質であることが知られている。そこで, 本研究ではゲノム情報から絞り込んだ機能未知な II 型膜タンパク質遺伝子の破壊株ライブラリーを構築し, 各破壊株の表現型の解析を行うことで今まで全く知られていない糖転移酵素遺伝子を同定することを試みる。

【方法・結果】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(TMHHMM)を用いて膜貫通領域(TM)が 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。GM 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き, さらに機能既知の遺伝子を除いたところ, 113 個の遺伝子が機能未知 II 型膜タンパク質遺伝子として選抜された。113 個の機能未知 II 型膜タンパク質遺伝子の遺伝子破壊用 DNA 断片を調製し, *Aspergillus nidulans* AKU89PyrG 株を形質転換した。その結果, 90 種類の遺伝子破壊株を構築することができた。また, 構築した破壊株のうち 9 株において生育に異常が認められた。このことから, この 9 種類の遺伝子が *A. nidulans* の正常な生育において重要な役割を果たしていることが示された。

Construction of knockout mutants of genes coding for type II membrane protein localized in the Golgi apparatus of *Aspergillus nidulans*.

Makiko Kai¹, Yuki Morita², Yuria Chihara¹, Kazuyoshi Ohta¹, Takuji Oka¹

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

P-33

イネいもち病菌におけるクロラムフェニコールの新規作用点の探索

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

イネいもち病菌 (*Pyricularia oryzae*) はイネに感染する植物病原糸状菌であり, 感染する際に葉面上で付着器という感染特異的の器官を形成して植物体内に侵入する。付着器の形成は一度の細胞分裂, 細胞分化によって生じることがわかっており, 本菌の付着器形成率を指標とした細胞分裂, 細胞分化に影響を与える既存薬剤のスクリーニングが行われた。その結果, 原核細胞に作用するクロラムフェニコール (Cm) が本菌の付着器形成を特異的に阻害することが示され, 真核生物においても Cm の新規作用点が存在することが示唆された。先行研究において, MoDullard タンパク質がイネいもち病菌における Cm の標的因子の一つであることを報告したが (Nozaka et al., 2019), 薬剤の標的は複数存在することが考えられ, T7 ファージディスプレイ法によるスクリーニング結果からも MoDullard 以外の標的因子の存在が示唆された。そこで Cm の標的候補因子として同定された 22 の遺伝子のうち, 8 遺伝子について破壊株の作出と, 形質の確認を行った。その結果, 5 遺伝子の破壊株において付着器形成率の低下または低下傾向が見られた。特に Cdc25 をコードする遺伝子破壊株においては顕著な付着器形成率の低下が見られ, 固形培地上での生育速度の低下や分生子形態の異常が観察された。Cm と Cdc25 の相互作用を確認するために, CDC25 の過剰発現株を作出し, Cm 添加による付着器形成への影響を調査した。その結果, 過剰発現株においては Cm による付着器形成阻害効果の緩和が見られた。一方で, CDC25 破壊株においても Cm による生育阻害が確認されたことから, Cdc25 以外の Cm の標的因子の存在が示唆された。今後, Cdc25 や MoDullard 以外の候補遺伝子についても研究対象として解析を進めていく予定である。

Identification of novel chloramphenicol targets in *Pyricularia oryzae*

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

(Grad. Sch. Sci. Tech., Tokyo Univ. of Sci.)

P-34

イネいもち病菌 (*Pyricularia oryzae*)における交配型決定領域の機能解析

喜多光徹¹, 内田百岳¹, 藤ヶ崎礼夏¹, 小西高裕¹, 寺岡徹², 有江力², 荒添貴之¹, 鎌倉高志¹ (¹東理大院・理工, ²農工大院・農)

イネいもち病菌は有性世代が確認されている植物病原糸状菌である。異なる交配型領域 (MAT1, mating-type locus1) を持つ菌株同士が交配し, 子嚢殻内に子嚢胞子を形成する。しかしながら, 自然環境下から分離されたイネいもち病菌の大半は, 一部の地域で採集された菌株を除き, 交配を行うことができない不稔性株であることが知られている。交配型は交配型領域に支配されており, アレルとして MAT1- α 領域と MAT1-HMG領域が存在する。MAT1- α 領域には 3 つの遺伝子 (MAT1- α -1, -2, -3) が, MAT1-HMG 領域には 2 つの遺伝子 (MAT1-HMG-1, -2) が座乗している。これらの遺伝子は転写因子としての機能が推測されているが, イネいもち病菌における遺伝子破壊株を用いた解析報告はなく, その機能については未解明である。興味深いことに, MAT1 領域の構造や座乗遺伝子配列は稔性株・不稔性株間で高度に保存されており, 両菌株において転写が確認されている。そこで本研究では CRISPR/Cas9 システムを用いることで, 稔性株, 雌性不稔性株の MAT1 遺伝子群の単独あるいは二重遺伝子破壊株を作出し, その表現型解析を行った。作出した全ての破壊株において固形培地上での栄養菌糸生育に差異はみられなかったものの, 対峙培養による交配能の調査では MAT1- α -1 および -2 の各遺伝子の単独破壊株および MAT1-HMG-1, -2 の二重破壊株で不稔性を示した。一方, MAT1- α -3 の単独破壊株では子嚢殻の減少と肥大化がみられた。また, 一部の破壊株で付着器形成率の低下傾向が見られ, 病原性等の無性生活環への関与も示唆された。

Functional analysis of the mating type locus in the rice blast fungus *Pyricularia oryzae*

Kohtetsu Kita¹, Momotaka Uchida¹, Ayaka Fujigasaki¹, Takahiro Konishi¹, Tohru Teraoka², Tsutomu Arie², Takayuki Arazoe¹, Takashi Kamakura¹

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

P-35

麴菌マルトース輸送体 MalP のエンドサイトーシスにはアレスチン様因子 CreD のユビキチン化が必要である

藤田翔貴¹, 多田日菜子¹, 田中瑞己², 新谷尚弘¹, 五味勝也¹ (¹東北大院・農, ²静岡県立大・食栄)

麴菌のデンプン分解酵素生産において、誘導基質であるマルトースの菌体内取り込み系が重要である。麴菌マルトース輸送体 MalP は、グルコース存在下で転写抑制を受けるだけでなく、エンドサイトーシスによって速やかに細胞膜上から除去され、液胞にて分解される。この MalP の細胞膜上からの除去には、アレスチン様タンパク質 CreD を介した HECT 型ユビキチンリガーゼ HulA による MalP のユビキチン化 (Ub 化) が必要である。また、アダプターとして機能する CreD も HulA によって Ub 化されていることが明らかになってきた。本研究では、CreD の被ユビキチン残基の同定を行い、CreD のユビキチン修飾状態が MalP 分解へ及ぼす影響を解析することで、CreD の Ub 化が MalP の分解に必要なものであるのか検証した。

まず、CreD の C 末端へ FLAG タグを付加させた CreD-3FLAG を免疫沈降し、Ub 抗体を用いて CreD のユビキチン修飾状態を解析したところ、CreD はグルコースの有無に関わらず Ub 化されていることが明らかになった。一方で、麴菌近縁種の CreD において、よく保存された 4 つのリシン残基をアルギニンに置換した CreD 変異体では、Ub 化が著しく抑制された。さらに、この CreD 変異体発現株では、MalP のグルコース依存的なユビキチン化および細胞内への取り込みが抑制された。以上の結果より、MalP のグルコース依存的な分解には、MalP だけでなく、その Ub 化を仲介するアダプター CreD も HulA によって Ub 化される必要があることが明らかになった。

CreD ubiquitination required for glucose-induced endocytosis of maltose transporter MalP in *Aspergillus oryzae*.

Shoki Fujita¹ Hinako Tada¹, Mizuki Tanaka², Takahiro Shintani¹, Katsuya Gomi¹

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

P-36

担子菌 *Coprinopsis cinerea* におけるオートファジー関連遺伝子 *Cc.atg8* 破壊株の構築

今村友紀, 麻田恭彦, 渡邊彰 (香川大・農)

担子菌が示す顕著な形態変化機構には、栄養飢餓などの外的環境要因が大きな影響を及ぼすことが知られている。一方、オートファジーは真核生物が保持する大規模な細胞内分解システムであり、栄養飢餓に対する適応機構だけでなく、分化や発生などの様々な生命現象にも関与することが明らかとなってきた。当研究室では、モデル担子菌 *Coprinopsis cinerea* (ウシグソヒトヨタケ) のオートファジー誘導条件について解析を進めてきており、これまで窒素源飢餓条件や糖源飢餓条件において、オートファジーが誘導されることを示唆してきている。そこで本研究では、オートファゴソームの構成成分として機能し、オートファジーに必須であることが考えられている関連タンパク質 Atg8 に着目し、相同組換えによる *Cc.atg8* の破壊を試みた。一般に、担子菌では相同組換えがほとんど起こらないことから、宿主株には高頻度で相同組換えが起こる株を使用した。また、*Cc.atg8* の破壊ベクターには、ハイグロマイシンに耐性を付与する領域の上流および下流に、*Cc.atg8* の上流および下流の 2 Kb の DNA 断片をそれぞれ使用した。宿主菌糸から調製したプロトプラストに対し、ポリエチレングリコール法を用いて上記破壊ベクターを導入した結果、ハイグロマイシン耐性を示す株をいくつか取得することができた。その後、*Cc.atg8* 領域において相同組換えが起こっている株を選抜し解析を行った結果、*Cc.atg8* 破壊株は、宿主株に比べて、菌糸の発達が未熟であることが観察された。現在、その他の諸性質についてさらに解析を進めている。

Construction of autophagy-related gene *Cc.atg8* disrupted strain in basidiomycete *Coprinopsis cinerea*.

Yuki Imamura, Yasuhiko Asada, Akira Watanabe

(Fac. of Agr., Kagawa Univ.)

P-37

麹菌 *Aspergillus oryzae* における菌核内の孢子様構造形成と有性生殖誘導の試み

菅原由香¹, 片山琢也^{1,2}, 丸山潤一^{1,2} (¹東大院・農生科・応生工, ²東大・微生物連携機構)

麹菌 *Aspergillus oryzae* において有性世代は発見されていないが, 株によって異なる接合型遺伝子 *MAT1-1* あるいは *MAT1-2* をもつことから, ヘテロタリックな有性生殖を行う可能性が示唆されている¹⁾。我々は以前, *A. oryzae* の *MAT1-1* 型株と *MAT1-2* 型株にそれぞれアデニン要求性とウリジン・ウラシル要求性を付与した株間の対峙培養を行ったところ, コロニー境界線上に形成された菌核の内部に有性生殖器官様構造および有性孢子様構造が観察された²⁾。しかし, 有性孢子様構造の形成効率は低かったため, 今回は栄養要求性と培養条件のさらなる検討を行い, *A. oryzae* の菌核内部における有性孢子様構造の形成の効率化を試みた。

以前の我々の実験では, ウリジン・ウラシル要求性と比較してアデニン要求性株は菌核の形成効率が低下していたことから, 今回はその代わりにピリドキシン要求性株を作製した。ウリジン・ウラシル要求性の *MAT1-1* 型株とピリドキシン要求性の *MAT1-2* 型株を作製し, 対峙培養にて境界線上に菌核を形成させた。これとは別に菌核を効率的に形成させるために, 上記の2株間でプロトプラスト融合を行ってヘテロカリオン(異核共存体)を形成させ, これを寒天培地に画線植菌することで多数の菌核を取得した。驚くべきことに, 対峙培養および画線培養によって得られた菌核の内部には, 孢子様構造が多数含まれていた。そこで, 異なる2重栄養要求性を付与した株同士の遺伝的掛け合わせで形成する孢子様構造について, 特異的に検出できる実験系を構築することで有性生殖が起こったかどうかを検討している。さらに, 有性生殖関連遺伝子を高発現させた状態での *A. oryzae* における有性生殖誘導への効果を解析する予定である。

1) Wada *et al.* (2012) *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 2819-2829.

2) 田中勇氣ら, 2014年日本農芸化学会大会講演要旨 4A10a13

Analysis of spore-like structures formed in sclerotia and induction of sexual reproduction in *Aspergillus oryzae*

Yuka Sugawara¹, Takuya Katayama^{1,2}, Jun-ichi Maruyama^{1,2}

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

P-38

Study on scaffold candidates in the regulation of Fus3 MAPK cascade in *Aspergillus oryzae*

Yue Chen¹, Takuya Katayama^{1,2}, Ozgur Bayram³, Gerhard H. Braus⁴, Katsuhiko Kitamoto⁵, Jun-ichi Maruyama^{1,2}

(¹Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, ²CRIIM, UTokyo, ³Dept. of Biol., Maynooth Univ., ⁴Dept. of Mol.

Microbiol. Genet., Georg-August-University Goettingen, ⁵Nihon Pharmaceutical Univ.)

The Fus3 mitogen activated protein kinase (MAPK) cascade regulates pheromone-responsive cell fusion in yeast, and it also regulates cell fusion and development in filamentous fungi. In yeast, Ste5 functions as a scaffold protein, mediating the activation of the cascade. Although an ortholog of Ste5 is not conserved, HAM-5 is recognized as the scaffold protein in filamentous fungi. In *Aspergillus oryzae*, our group recently identified FipA as an AoFus3-interacting protein by tandem affinity purification¹⁾, and yeast two-hybrid assay revealed its interaction with the upstream MAPKK, raising the possibility that FipA is another scaffold candidate. In this study, we aim to comparatively investigate the function of AoHam5 and FipA as the scaffold for the Fus3 MAPK cascade.

We performed comparative phenotypic analysis in the deletion strains of *Aoham5*, *fipA* and the Fus3 MAPK cascade components encoding genes (*Aoste11*, *Aoste7* and *Aofus3*) for cell fusion and asexual development such as conidiation and sclerotia formation. Although the *Aoham5* deletion strain exhibited defects in cell fusion and conidiation, sclerotia were normally formed. In contrast, the *fipA* deletion strain showed defects in cell fusion, conidiation and sclerotia formation, which is fully consistent with the *Aoste11*, *Aoste7* and *Aofus3* deletion strains, supporting the possibility of scaffold function in FipA. We are clarifying the scaffold function of AoHam5 and FipA in the AoFus3 phosphorylation level and their direct interactions with the AoFus3 MAPK cascade components.

1) Katayama *et al.*, Annual meeting of JSBBA 2016, 2F049

P-39

Comprehensive localization-based screening with Pezizomycotina-specific proteins identified novel components regulating septal pore-mediated cell-to-cell communication

M. Abdulla Al Mamun¹, Takuya Katayama¹, Wei Cao², Shugo Nakamura², Jun-ichi Maruyama¹

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

Filamentous fungi possess a primitive morphological structure for cell-to-cell communication, the septal pore, which confers exchange of cytoplasmic constituents between the flanking cells. This feature is shared with higher eukaryotes by gap junction and plasmodesmata of animal and plant, respectively. However, the septum-related proteins may have been insufficiently identified to better understand a possible complexity of the septal pore function when comparing with a larger number of proteins in the regulation of gap junction and plasmodesmata. Here, we performed a comprehensive localization-based screening to find proteins regulating the cell-to-cell communication via septal pore in *Aspergillus oryzae* as a representative for multicellularity study in filamentous fungi.

In this study, 776 Pezizomycotina-specific uncharacterized proteins were selected using BLAST-based genomic comparison between multicellular and unicellular ascomycete species along with gene ontology category “no biological data available” for molecular function, cellular component and biological process. The selected proteins were tagged with EGFP at the C-terminal end and expressed in *A. oryzae*. Various localization patterns were found, and ~10% of the proteins localized at the septum or septal pore. As septal pore function was evaluated by the ability to protect the flanking cell from the excessive loss of cytoplasm upon hyphal wounding, approximately 50% of the strains with deletion of genes for the septum-localizing proteins exhibited lower abilities. In conclusion, the present localization-based screening was effective for finding a number of septum-localizing proteins with the septal pore function, which suggests that multicellular fungi had evolved to acquire specific components for the septal pore-mediated cell-to-cell communication.

P-40

麹菌 *Aspergillus oryzae* 由来のトリグリセリドおよびステロールエステル加水分解能を有する油脂分解酵素の特徴づけ

市川響太郎, 吉田彩花, 塩野義人, 小関卓也 (山形大・農)

【導入】リパーゼは、グリセロールの脂肪酸エステルを加水分解して脂肪酸を遊離させる酵素である。またステロールエステラーゼは、ステロール骨格3位に脂肪酸がエステル結合したステロールエステルを加水分解する酵素である。AO090010000745 (*lipO745*) は *Aspergillus oryzae* RIB40 が持つ機能未知酵素遺伝子であり、SignalP-5.0 によってシグナルペプチドを持たない酵素遺伝子であると予測されていた。我々の研究目的は機能未知な酵素遺伝子の機能解析を行い、産業利用に繋げることである。

【方法】本研究では、メタノール資化性酵母である *Pichia pastoris* GS115 を用いて *lipO745* を異種発現させた。なお発現の際に N 末端側の 27 アミノ酸残基を欠損させ、*Saccharomyces cerevisiae* 由来のシグナルペプチドである α -factor を用いて発現させたものを Δ 27LipO745 と名付けた。

【結果】 Δ 27LipO745 は SDS-PAGE では約 60kDa のタンパク質で、合成基質 α -ナフチル酪酸 (C4) を用いた最適条件は最適 pH7.0, 最適温度 40°C を示した。熱安定性は 40°C の 1 時間処理で 84% の残存活性を示し、60°C の処理でも 30% の残存活性を示した。また本酵素は C4 および C8 を中心に広範囲な鎖長の α -ナフチルエステルを加水分解し、高い比活性を示した。さらに中性脂肪であるトリブチリンおよびステロールエステルである酢酸コレステロールの加水分解が確認された。一方で *P. pastoris* による異種発現では、通常 Yeast nitrogen base (YNB) を培地に添加するが、YNB に代替し D-ソルビトールを添加した際に、4 日目培養上清中における C4 の分解活性が約 1.2 倍に上昇した。現在はエステル合成や交換反応について調べている。

A novel *Aspergillus oryzae* lipolytic enzyme that hydrolyzes triacylglycerol and sterol esters

Kyotaro Ichikawa, Ayaka Yoshida, Yoshihito Shiono, Takuya Koseki

(Faculty of Agriculture, Yamagata Univ.)

P-41

合成ペプチド HAP-01 を利用した新規な米麴の酸性プロテアーゼ活性測定法

大東功承¹, 山下伸雄¹, 津田修吾², 増田駿², 山内隆寛¹, 窪寺隆文¹, 吉矢拓², 広畑修二¹ (¹白鶴酒造,
²ペプチド研究所)

【目的】清酒醸造において重要な麴菌 *Aspergillus oryzae* が生産する主要加水分解酵素である α アミラーゼ, 糖化力, 酸性カルボキシペプチダーゼの活性測定法には, 酒類総合研究所標準分析法 (標準法) に示される簡便な方法がある。その一方で, エンド型酵素である酸性プロテアーゼ (AP) には, 分析キットに類する簡便な測定法は無いため, 我々は簡便な新規 AP 活性測定法を開発した。

【方法】*A. oryzae* の AP が特異的に切断するアミノ酸配列を含み, アミド結合の切断によりパラニトロフェノールが遊離して発色する合成基質 (HAP-01) を用いて, 米麴の AP 活性測定方法を最適化した。次に, 社内外の米麴の AP 活性を測定し, 本法と標準法との相関性を確認した。また基質である HAP-01 の安定性を, 貯蔵促進試験により評価した。さらに, 本法の分析作業性を標準法と比較した。

【結果】市販の *A. oryzae* 由来の AP 酵素剤を用いて分析条件を最適化した結果, 酵素反応は pH3.0 で 40°C, 20min, 失活反応は pH7.0 で 100°C, 5min, 発色反応は pH10.0 で 20°C とすることで, AP 活性と発色強度に良好な直線性 ($R^2=0.9996$) が得られた。当社と他 2 社の米麴 (n=82) を用いて, 本法と標準法との相関性を確認した結果, 良好な相関性 ($R^2=0.8989$) が得られた。また HAP-01 は貯蔵促進後 (55°C, 9 日) においても安定した発色を呈した。以上から, 本法は従来の標準法との相関性が高く, 従来法が 3 時間以上を要するのに対して, 本法は 1 時間以内と短時間で *A. oryzae* 由来の AP 活性を測定可能であることを確認した。

The new measurement method of acid protease activity from koji used by synthetic peptide, HAP-01.

Koushou Oohigashi¹, Nobuo Yamashita¹, Shugo Tsuda², Shun Masuda², Takahiro Yamauchi¹, Takafumi Kubodera¹,
Taku Yoshiya², Shuji Hirohata¹

(¹Hakutsuru Sake Brewing Co., Ltd, ²Peptide Institute Inc.)

P-42 (O-10)

Talaromyces cellulolyticus におけるセルラーゼ発現誘導機構の生産培養プロセスへの応用

矢萩大貴¹, 吉田エリカ¹, 深田寛朗¹, 十倉充範², 白田佳弘¹ (味の素 (株)¹ バイオ・ファイン研究所,
² 研究開発企画部)

【緒言】非可食バイオマスからセルラーゼによって生成される糖類は, 食資源と競合しない発酵主原料として期待されている。しかし, セルラーゼの製造コストが高いことが, 実用化の課題の一つとなっており, より効率的なセルラーゼの生産技術が求められている。そこで, 我々は有望なセルラーゼ生産糸状菌である *Talaromyces cellulolyticus* のセルラーゼ遺伝子の発現誘導機構を解析し, その知見を菌株改良および培養プロセス構築に応用することとした。

【結果・考察】細胞内に局在する β -glucosidase をコードする *bgl1A* は, 破壊株ではセルラーゼ発現が著しく低下する一方で, セルラーゼ発現を大幅に増加させる有効変異型の存在が見いだされ, *T. cellulolyticus* のセルラーゼ発現の中核となる因子であることが示された。また, この *Bgl1A* が cellobiose から糖転移反応によって生成する gentiobiose は *T. cellulolyticus* のセルラーゼ発現を極めて高く誘導することが明らかになった。*Bgl1A* の有効変異型は, 加水分解活性の低下を示したことから, 細胞内での gentiobiose の分解を抑制するものと考えられた。我々は酵素反応による gentiobiose の自製のプロセスを構築した。そして, *T. cellulolyticus* の *bgl1A* の欠失株に対して gentiobiose を添加する培養プロセスにおいて, 高いセルラーゼ生産性を確認したので報告する。

Application of cellulase induction mechanism to production process in *Talaromyces cellulolyticus*.

Daiki Yahagi¹, Erika Yoshida¹, Hiroaki Fukada¹, Mitsunori Tokura², Yoshihiro Usuda¹

(¹Research Institute for Bioscience Products & Fine Chemicals, ²R&D Planning Dept., Ajinomoto Co., Inc.)

P-43

ケトシンターゼドメインによるかび毒テヌアゾン酸の環状骨格形成メカニズム

尹忠鉄¹, 西本一希², 本山高幸¹, 日野智也², 永野真吾², 長田裕之¹ (¹理研 CSRS・ケミカルバイオロジー,
²鳥取大院・工・化学生物)

テヌアゾン酸は *Pyricularia oryzae* や *Alternaria* sp. などの植物病原性糸状菌が生産するかび毒の一種である。我々は今まで不明であったテヌアゾン酸の生合成遺伝子 (*TAS1*) を *P. oryzae* より同定し、テヌアゾン酸の生合成及び制御機構を明らかにしている。*TAS1* は糸状菌では初めて見出した NRPS-PKS hybrid 酵素であり、PKS 部分はケトシンターゼ (KS) ドメインのみで構成されている。この KS ドメインは基質伸長反応は触媒せずに環化反応のみを触媒する新規の酵素である。今回、その反応メカニズムを明らかにするため KS ドメインの立体構造解析を行った。*TAS1* の KS ドメインタンパク質を用いた X 線結晶構造解析により 1.80Å の分解能で立体構造を決定した。決定した全体構造は type I PKS の KS と類似しているが基質ポケットの構造が大きく異なっている。一般的 type I PKS の KS は α -helix が基質ポケットの上部を覆うように存在しているが *TAS1* の KS にはこの α -helix がいないため基質ポケットが大きく広がっている。現在までに PKS の KS は二量体として機能していることが報告されているがゲルろ過の結果から *TAS1* の KS は溶液中で単量体として存在することが示唆された。*TAS1* KS ドメインの活性残基の変異体解析と基質であるイソロイシン・ジケチドをリガンドとしたドッキングシミュレーションの結果からリガンド結合部位の近傍に存在する His346 がプロトンを引き抜くことで環化反応が誘起されると推定している。

本研究の一部は、科研費及び農研機構生研支援センター「イノベーション創出強化研究推進事業による支援を受けた。

Mechanism of cyclic skeleton formation in tenuazonic acid biosynthesis by ketosynthase domain

Choong-Soo YUN¹, Kazuki Nishimoto², Takayuki Motoyama¹, Tomoya Hino², Shingo Nagano², Hiroyuki Osada¹

(¹Chem. Biol., RIKEN CSRS, ²Grad. School of Eng., Tottori Univ.)

P-44

麹菌 *Aspergillus oryzae* 由来ルチノシダーゼの基質選択性および効率的生産

廣田瑠花, 石川真衣, 川崎真由, 塩野義人, 小関卓也 (山形大・農)

【背景】ルチノシダーゼは、フラボノイドに二糖 6-O- α -L-ラムノシル- β -D-グルコシド (ルチノース) がグリコシル結合したフラボノイド配糖体を、アグリコンと二糖ルチノースに加水分解する酵素である。フラボノイド配糖体は柑橘類の苦みや飲料にした際の白濁化の原因となることが知られており、糖部分を遊離させることで苦み低減や清澄化、さらには抗酸化作用があるフラボノイドの回収などへ産業利用が可能である。我々はこれまでに麹菌 *Aspergillus oryzae* RIB 40 由来のルチノシダーゼをコードしている遺伝子を特定し、*Pichia pastoris* において α -ファクターシグナルペプチドを介して分泌させたリコンビナント酵素を特徴づけた¹⁾。本研究では、*A.oryzae* 由来ルチノシダーゼ (AoRut) のフラボノイド配糖体における基質選択性を明らかにし、また AoRut 自身のシグナルペプチドを利用した *P.pastoris* での分泌生産を検討した。

【結果・考察】AoRut 由来ルチノシダーゼをケンフェロール-3-O-ルチノシド、ルチン、ヘスペリジン、ジオスミン、ナリルチン、ナリンギンを基質として活性測定を行った結果、糖のフラボノイドへの結合様式の違いにより活性の大きさが左右される傾向が見られた。またナリンギンに対して活性が見られないことから AoRut がルチノース特異的であることが示唆された。一方、AoRut 自身のシグナルペプチドを利用した *P.pastoris* の発現ではタンパク質の分泌が確認され、SDS-PAGE において α -ファクターを用いて分泌させたリコンビナント酵素と同様の大きさを示した。このことから AoRut のシグナルペプチドが *P.pastoris* において機能することが示唆された。

1) Ishikawa et al. Appl.Microbiol.Biotechnol.,102,3193-3201(2018)

Substrate specificity and efficient production of rutinoidase from *Aspergillus oryzae*

Ruka Hirota, Mai Ishikawa, Mayu Kawasaki, Yoshihito Shiono, Takuya Koseki

(Faculty of Agriculture, Yamagata Univ.)

P-45

麹菌の GH1 に属するグルコース耐性能を有した新規 β -グルコシダーゼの酵素学的諸性質

渡部昭, 新谷尚弘, 五味勝也 (東北大院農・生物産業創成)

【目的】麹菌(*Aspergillus oryzae*)の未解析な新規 β -グルコシダーゼの機能解明を目的に、ゲノム情報を元に麹菌の推定 β -グルコシダーゼの内、菌体内に局在すると考えられる Glycoside hydrolase family 1(GH1)に属する新規 β -グルコシダーゼ(BglU/Bgl5)の大腸菌での発現に成功したので、その酵素学的諸性質について報告する。

【方法】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/>)及び Carbohydrate-Active Enzymes Database(CAZy: <http://www.cazy.org/>)を用いて探索し、麹菌 mRNA から逆転写した cDNA を鋳型とした PCR 反応で目的 DNA 断片を増幅後、大腸菌発現用ベクター(pCold II)に組み込んだ推定 β -グルコシダーゼ遺伝子(*bglU/bgl5*)を *E. coli* Rosetta2 (DE3)に導入して高発現させ、TALON クロマトグラフィーに供して精製しその酵素学的諸性質を調べた。

【結果】BglU/Bgl5は、他のGH1に属する多くの β -グルコシダーゼのように広い範囲の基質に特異性を示し、合成基質の *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside(pNPG)の他、*p*-nitrophenyl- β -D-fucopyranoside(pNPFuc)、*p*-nitrophenyl- β -D-lactopyranoside(pNPLac)、*p*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside(pNPGal)、*p*-nitrophenyl- β -D-cellobioside に対して加水分解活性を有していた。また、 β -グルコシダーゼはその多くが反応生成物であるグルコースによって活性が阻害され酵素反応に影響が出るため、グルコースに対する耐性を調べたところ、本酵素は反応系にグルコースを含まない場合の活性を100%とした際の相対活性では、200mMのグルコースを含んだ場合に約80%、500mMのグルコースを含んだ際には約50%の活性を示し、麹菌由来の酵素の中ではグルコースに対してかなり高い耐性を有していた。この他、BglU/Bgl5の他の諸性質を合わせて報告する。

本研究は科学研究費助成事業(基盤研究(C)(一般))の補助を受けて実施された。

Enzymatic properties of a novel GH1 glucose-tolerant β -glucosidase from *Aspergillus oryzae*

Akira Watanabe, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi

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

P-46

逐次反応によるガラクトフラノース転移酵素活性測定法を用いた GfsA, GfsB および GfsC の機能解析

千原由莉亜¹, 田中大², 泉実³, 太田一良¹, 岡拓二¹ (1崇城大院・工, 2東北医薬大・薬, 3岡山大・農)

【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-ガラクトピラノース(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 側に傾いている。よって、組換え GLF を用いて UDP-Gal_f を大量に取得することは非常に困難であった。そこで本研究では、GLF と Gal_f 転移酵素を同一反応系にて反応させる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を行い、その測定法を用いた GfsA および、そのパラログである GfsB, 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, 還元剤として Sodium Dithionite, UDP-Gal_p, Mn²⁺, 4-Methylumbelliferyl (4MU)- β -Gal_f および組換え GfsA, 組換え GfsB もしくは組換え GfsC を混合することで逐次的な反応を試みた。その結果、GfsA は6つ、GfsB は2つ、GfsC は4つの Gal_f 残基を 4MU-Gal_f に対して転移する活性を有していた。反応産物の構造解析を行ったところ、 β -1,5-Gal_fオリゴマーであることが確認された。以上のことから、本反応により 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、*gfsAgfsC* 二重破壊株から抽出したガラクトマンナンでは全ての β -1,5-Gal_f残基が失われていた。以上のことから、GfsC の β -1,5-Gal_f 生合成における重要性が明らかになった。

Functional analysis of GfsA, GfsB and GfsC using novel galactofuranosyltransferase assay.

Yuria Chihara¹, Yutaka Tanaka², Minoru Izumi³, Kazuyoshi Ohta¹, Takuji Oka¹

(¹Grad. Sch. Eng., Sojo Univ., ²Tohoku Med and Pharma Univ., ³Okayama Univ.)

P-47

固体培地上において生産されるマツタケ由来 GH5 エンドグルカナーゼの諸性質の解明

大沼広宜, 福田泰久, 白坂憲章 (近畿大・農)

【目的】 これまでに、当研究室ではマツタケの人工栽培化に向け、押麦とパーミキュライトを用いた固体培養系によって菌糸培養期間の短縮化に成功している。さらに、先行研究において、押麦を用いた固体培養により押麦粒表皮中の細胞壁多糖類の内約 75%含有する barley β -glucan (β -1,3-1,4-) に加水分解活性を示すことを見出した。しかしながら、マツタケのゲノム上においてエンドグルカナーゼ様の遺伝子は複数存在しているが、タンパク質として生産されるかは不明である。本発表では、固体培養時に生産され、barley β -glucan に加水分解活性を示すマツタケ由来エンドグルカナーゼの精製およびその性質について報告する。

【方法・結果】 本研究では、供試菌株としてマツタケ NBRC 30605 株を用いた。押麦およびパーミキュライトを乾燥重量比 2:1 の比率で混合した固体培地上で、40 日間生育させた培地抽出液より、barley β -glucan 分解活性を指標としたエンドグルカナーゼ (*TmEgl5A*) を単一に精製した。*TmEgl5A* は、SDS-PAGE で測定した分子量が約 40 kDa であった。タンパク質の単一バンドを、MALDI-TOF/MS により分析し、推定ペプチド配列は、JGI *T. matsutake* 945 v3.0 ゲノムデータベースの推定エンドグルカナーゼと一致した。さらに、クローニングした本遺伝子のアミノ酸配列は、*Volvariella volvacea* および *Irpex lacteus* 由来の典型的な担子菌由来の GH family 5 のエンドグルカナーゼと相同性を示した。続いて、*Pichia pastoris* KM71H に分泌発現させた *TmEgl5A* は精製酵素と同様に barley β -glucan に活性を示し、CMC に対しては約 40%程度の相対活性であった。さらに、TLC による加水分解生成物を分析したところ、barley β -glucan, Lichenan および CMC 中の β -1,4-グリコシド結合に作用することが示唆された。これらの結果は、マツタケが押麦を主体とした固体培養によって典型的なエンドグルカナーゼが生産され、腐生能力を有する可能性が示された。

Characterization of a GH5 endoglucanase from *Tricholoma matsutake* grown on barley based solid-state medium

Hiroki Onuma, Yasuhisa Fukuta, Norifumi Shirasaka

(Fac.Agr., Kindai Univ.)

P-48

硫黄制限条件下での白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* による塩素化芳香族化合物分解の活性化について

ワイズ里沙, 酒井杏匠, 志水元亨, 加藤雅士 (名城大院・農)

塩素化有機化合物は農薬・溶媒・医薬品などに広く使用されており、それらが環境中に流出することで環境汚染をもたらしている。また、塩素化芳香族化合物は生物に有害な影響をもたらすことが報告されている。白色腐朽菌は不定形芳香族高分子であるリグニンだけでなく、テトラクロロヒドロキノンのような塩素化芳香族化合物など様々な芳香族化合物を分解することが報告されている。しかしながら、白色腐朽菌による塩素化芳香族化合物の分解については、実験室で培養に用いる培地など富栄養条件下では検証されているが、環境中のような貧栄養条件下でどの程度分解されているかは不明である。

本研究では栄養源が少ない、より環境に近い培養条件における塩素化芳香族化合物の分解について調べた。その結果、白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* は富栄養条件下に比べて、栄養制限下(特に硫黄制限下)においてテトラクロロヒドロキノンの分解能が高かった。そこで、硫黄制限下における *P. chrysosporium* の菌体内タンパク質を 2-DE で解析したところ、2 つの omega 型 glutathione S-transferase (GST) が高発現していた。現在、テトラクロロヒドロキノンの分解におけるこれら GST の役割について検討している。

Activation of tetrachlorohydroquinone degradation by white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* under sulfur depletion conditions

Lisa Wise, Kiyota Sakai, Motoyuki Shimizu, Masashi Kato

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

P-49 (O-9)

白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* 由来のシトクロム P450 CYP505D ホモログの機能解析

森玲香, ワイズ里沙, 酒井杏匠, 志水元亨, 加藤雅士 (名城大・農)

白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* は芳香族高分子であるリグニンの分解能を有するが、その詳細は未だ明らかとなっていない。これまでに *P. chrysosporium* 由来のシトクロム P450 (以下 P450 と略記する) が芳香族化合物を含めた様々な化合物を水酸化することが報告されている。*P. chrysosporium* のゲノム中には 154 種の P450 遺伝子がコードされており、この中で class 3 に属する P450 / P450 レダクターゼ融合タンパク質遺伝子は 7 つ (CYP505D1 ~ CYP505D7) 存在する。本研究では、この class 3 P450 の機能を解析した。class 3 P450 の機能については枯草菌由来の P450BM-3 (CYP102A1) や糸状菌 *Fusarium oxysporum* 由来の P450foxy (CYP505A1) について詳細に研究がなされており、飽和脂肪酸の ω -1 ~ ω -3 位を水酸化することが明らかになっている。昨年、我々は、CYP505D6 がラウリン酸の ω -1 ~ ω -6 位と脂肪酸アルコールである 1-ドデカノールの ω -1 ~ ω -7 位、さらにナフタレンとナフトールを水酸化することを明らかにした¹⁾。また、反応産物の広い位置選択性と基質特異性には、CYP505D6 の活性部位の入り口付近に存在する V51 が重要であることも証明した。現在、CYP505D6 以外の CYP505D ホモログについてリコンビナントタンパク質を調製し、それらの機能を解析している。

¹⁾Sakai K *et al.* Appl Environ Microbiol 84 (2018) e01091-18

Biochemical characterization of a self-sufficient cytochrome P450 CYP505D homologs from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*

Reini Mori, Lisa Wise, Kiyota Sakai, Motoyuki Shimizu, Masashi Kato

(Fac. of Agric, Univ. of Meijo)

P-50

麹菌の細胞壁 α -1,3-グルカン生合成に関与する α -アミラーゼ AgtA の反応速度論解析

小泉亜未¹, 尾形慎², 矢野成和³, 宮澤拳¹, 吉見啓⁴, 佐野元昭⁵, 阿部敬悦^{1,4} (¹東北大院・農, ²福島高専・化学バイオ, ³山形大院・理工, ⁴東北大・NICHe, ⁵金沢工大・ゲノム研)

【目的】糸状菌には特有の細胞壁多糖である α -1,3-グルカン (AG) が存在するが、その生合成機構および制御機構の詳細は未だ不明である。我々はこれまでに *Aspergillus oryzae* の主要 AG 合成酵素遺伝子 *agsB* とゲノム上でクラスターを成す *agtA* 遺伝子のコードする GPI アンカー型 α -アミラーゼ AgtA に着目し、高発現株の表現型および組換え酵素の特性を報告している¹⁾。今回は、AgtA のより詳細な酵素学的性質を明らかにするため、マルトオリゴ糖誘導体を用いた加水分解位置の特定ならびに反応速度論解析を行うことを目的とした。

【方法】これまでの研究により AgtA は糖転移活性も有していることが明らかになっている。そこで本研究では、*pNP*- α -マルトペンタオシド (G5P) を供与体兼受容体に用いた AgtA の自己糖転移反応を利用し、重合度 2~18 の *pNP*- α -マルトオリゴシドを合成した (G2P~G18P)。その後、分画精製をして得られた各種マルトオリゴ糖誘導体基質 (G2P~G8P) に対する組換え AgtA の反応を HPLC 法により分析した。

【結果】AgtA は、単糖誘導体 (G1P) および重合度 2~4 のオリゴ糖誘導体 (G2P~G4P) には活性を示さなかった。一方、重合度 5 以上のオリゴ糖誘導体 (G5P~G8P) に対してはエンド型の加水分解能を示した。さらに、それら基質に対する触媒効率 ($s^{-1}mM^{-1}$) は G6P の時に最大値を示したものの、G6P~G8P 間では触媒効率に大きな差異は見られなかった。本発表では、これまでに明らかにした AgtA の諸性質と今回の結果を合わせて AgtA の特性について報告し、細胞壁 AG 生合成への関与についても考察する。

1) 小泉亜未ら 日本応用糖質科学会平成 30 年度大会 (第 67 回) 講演要旨集, P.43

Kinetic study of the α -amylase, AgtA, involved in biosynthesis of cell wall α -1,3-glucan in *Aspergillus oryzae*

Ami Koizumi¹, Makoto Ogata², Shigekazu Yano³, Ken Miyazawa¹, Akira Yoshimi⁴, Motoaki Sano⁵, Keietsu Abe^{1,4}

(¹Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., ²Dept. Appl. Chem. Biochem., Natl. Inst. Tech., Fukushima Coll., ³Grad. Sch. Sci. Eng., Yamagata Univ., ⁴NICHe, Tohoku Univ., ⁵Genome Biotech. Lab., Kanazawa Inst. Tech.)

P-51 (O-2)

土壌培養における *Aspergillus nidulans* の生態と土壌微生物叢との相互作用の解析

高田万里奈^{1,2}, 河内護之³, 大西康夫^{3,4}, 妹尾啓史^{3,4}, 清水公德², 浦山俊一^{1,5}, 萩原大祐^{1,5} (¹筑波大・生命環境, ²東理大・基礎工, ³東大院・農生科, ⁴東大・CRIIM, ⁵筑波大・MiCS)

微生物は自然環境中では液体培地や寒天培地のような物性的に均一な環境に遭遇することはあり得ず、微生物本来の生理生態を理解するには、より複雑な培養系における評価が必要である。そこで本研究では、土壌生態系の主要な構成微生物である糸状菌を対象に、実験室で運用可能な閉鎖的土壌培養系を確立し、土壌における生態の理解を目指した。野外で採取した土壌を用いて *Aspergillus nidulans* を培養し、着生する孢子数の計測と菌体 DNA の定量を行なったところ、滅菌土壌では 5-7 日目に最大の孢子数を示す一方、DNA 量は 1 日目が最大となり、それ以降は減少した。この結果から、土壌表面で孢子を著量着生するが、土壌内部では著しい生育菌体の減少が起こっていることが示唆された。一方、非滅菌土壌では総じて菌体量が少なく、土着の微生物等による拮抗作用が考えられた。続いて、滅菌土壌培養 7 日目の *A. nidulans* 菌体から RNA を抽出し、網羅的な遺伝子発現解析を行なった。非土壌培養（液体、寒天培養）との比較により、土壌特異的に発現する一群の遺伝子の存在を明らかにした。また、キチナーゼ等の自己溶菌に関連する遺伝子群が高発現しており、土壌内部で自己溶菌が進んでいる可能性が示唆された。

非滅菌土壌において、*A. nidulans* が土壌微生物叢に与える影響を評価するために 16S rDNA アンプリコンシーケンスにより土壌マイクロバイオーム解析を行なった。その結果、*A. nidulans* の存在に依存して増減する複数の OTU が示された。土壌における糸状菌と細菌の相互作用機構について現在詳細な解析を進めている。

Study of *Aspergillus nidulans* in soil culture and interaction with soil microbiome

Marina Takata^{1,2}, Moriyuki Kawauchi³, Yasuo Ohnishi^{3,4}, Keishi Senoo^{3,4}, Kiminori Shimizu², Shunichi Urayama^{1,5}, Daisuke Hagiwara^{1,5}

(¹Life Env. Sci., Univ. of Tsukuba, ²Dept. Biol. Sci. Technol., Tokyo Univ. Sci., ³Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., Univ. of Tokyo, ⁴CRIIM, Univ. of Tokyo, ⁵MiCS, Univ. of Tsukuba)

P-52

麴菌における小胞体ターゲティングに依存した分泌タンパク質 mRNA の品質管理

佐藤駿¹, 杉山優子¹, 田中瑞己², 五味勝也¹, 新谷尚弘¹ (¹東北大・農, ²静岡県大・食栄)

分泌タンパク質の合成は、N 末端のシグナルペプチド (SP) に依存して小胞体膜の透過と共役して進行する。一方で、小胞体内での異常タンパク質の蓄積は、小胞体膜結合型エンドヌクレアーゼである *IreA* を活性化し、*hacA* mRNA をスプライシングする。活性化型 *HacA* は更に小胞体シャペロンや小胞体関連分解などに関する遺伝子群の転写活性化を引き起こす (unfolded protein response; UPR)。加えて、糸状菌では小胞体ストレス条件下で、主要分泌タンパク質遺伝子の mRNA が特異的に減少することが知られている。この現象は repression under secretion stress (RESS) と呼ばれ、分泌タンパク質遺伝子プロモーターに依存した転写抑制が原因の一つだとされているが、その機構の全容は不明である。そこで、私たちは麴菌をモデルとして、RESS の機構の解明を目指した。まず、分泌タンパク質 mRNA の減少が小胞体へのターゲティングに依存しているか調べるため、SP コード領域のみにフレームシフトが生じるアミラーゼ *AmyB* を *amyB* プロモーター制御下で発現させた。この株を小胞体ストレス誘発剤ジチオトレイトール (DTT) で処理しても変異型 *amyB* mRNA の急激な減少は観察されなかった。さらに、活性型 *HacA* を発現する $\Delta ireA$ 破壊株では、DTT 処理による野生型 *amyB* mRNA の減少も回避された。これらの結果から、RESS はプロモーター依存的な転写抑制ではなく、小胞体ターゲティングに依存した分泌タンパク質 mRNA の転写後品質管理であることが示唆された。また、その品質管理は *HacA* 制御下になく、*IreA* 下流の別のブランチに位置することが示唆された。本研究は、「野田産研研究助成」の支援により実施された。

Endoplasmic reticulum targeting-dependent quality control of secretory protein mRNAs in *Aspergillus oryzae*

Shun Sato¹, Yuko Sugiyama¹, Mizuki Tanaka², Katsuya Gomi¹, Takahiro Shintani¹

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

P-53 (O-4)

白麹菌における *LaeA* によるクエン酸生産制御機構の解析

二神泰基^{1,2}, 門岡千尋^{1,2}, 中村恵理², 森一樹³, 奥津果優², 吉崎由美子^{1,2}, 高峯和則^{1,2}, 後藤正利^{1,4}, 玉置尚徳^{1,2} (¹鹿児島大・連農, ²鹿児島大・農, ³鹿児島高専・専攻科, ⁴佐賀大・農)

白麹菌 *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii* はクエン酸を高生産する能力をもつ。糸状菌において、推定メチルトランスフェラーゼ *LaeA* は二次代謝や分化に関わる制御因子として知られている。本研究は、白麹菌のクエン酸高生産に *LaeA* が関与することが示唆されたため、その制御機構を解明することを目的とした。

白麹菌の *laeA* 破壊株のクエン酸生産量は、コントロール株の約 0.03 倍に低下した。そこで、*laeA* 破壊により発現変動した遺伝子を Cap Analysis Gene Expression により解析した。その結果、*laeA* 破壊により推定細胞膜局在クエン酸トランスポーターをコードする *cexA* の発現がコントロール株の約 0.01 倍に低下したことが示唆された。この結果から、*laeA* 破壊によるクエン酸生産能の低下の原因は、*cexA* の発現低下によると推察し、*laeA* 破壊株において恒常的に働く *gpdA* のプロモーターで *cexA* を強制発現させた。その結果、*laeA* 破壊株のクエン酸生産能はコントロール株と同程度まで回復し、仮説が支持された。*LaeA* は、ヒストンのメチル化修飾を介した遺伝子発現調節に関わると推定されている。そこで、抗メチル化ヒストン抗体を用いた ChIP-qPCR 解析を行った。その結果、*laeA* 破壊株の *cexA* プロモーター領域はユークロマチン状態の指標となるヒストン H3K4me3 占有率が減少し、ヘテロクロマチン状態の指標となるヒストン H3K9me3 占有率が増加したことが示唆された。以上の結果より、*LaeA* は *cexA* プロモーターのクロマチン構造を開閉することにより *cexA* の遺伝子発現を調整し、クエン酸生産を制御することが示唆された。

Analysis of regulatory mechanism of the citric acid production by *LaeA* in *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii*

Taiki Futagami^{1,2}, Chihiro Kadooka^{1,2}, Eri Nakamura², Kazuki Mori³, Kayu Okutsu², Yumiko Yoshizaki^{1,2}, Kazunori Takamine^{1,2}, Masatoshi Goto^{1,4}, Hisanori Tamaki^{1,2}

(¹Unit. Grad. Sch. Agric. Sci. Kagoshima Univ., ²Fac. Agric., Kagoshima Univ., ³Nat. Inst. Tech. Kagoshima Col., ⁴Fac. Agric., Saga Univ.)

P-54 (O-1)

麹菌のグルコース依存的アミラーゼ生産抑制におけるグルコースキナーゼの関与

田中瑞己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)

麹菌のアミラーゼ遺伝子の発現はマルトースによって誘導されるが、グルコースが存在するとカーボンカタボライト抑制によって抑制される。我々はこれまでに、グルコースが存在すると細胞膜上のマルトーストランスポーター(MalP)が液胞に輸送されて分解されるとともに、カーボンカタボライト抑制を制御する転写因子 CreA が核内に留まって安定化することを明らかとしてきた(Hiramoto et al. 2015; Tanaka et al. 2018)。出芽酵母においては、ヘキソキナーゼがカーボンカタボライト抑制を制御する転写因子 Mig1 の核局在に重要であることが報告されている。本研究では、麹菌におけるグルコースキナーゼのカーボンカタボライト抑制制御への関与について調べた。

麹菌においてヘキソキナーゼ HxkA とグルコキナーゼ GlkA の遺伝子破壊株を作成した結果、いずれの破壊株もグルコースを添加したデンプン培地で野生株よりも明瞭なハローを形成し、*glkA* 破壊株はより大きなハローを形成した。タグを付加した CreA の細胞内存在量を比較した結果、*glkA* 破壊株ではグルコース培地に移した場合の CreA 量が野生株と比較して著しく減少した。さらに、グルコース添加後の GFP 融合 MalP の分解を調べた結果、*glkA* 破壊株では GFP-MalP の分解が著しく抑制された。また、MalP の液胞への輸送に関与する CreD は、グルコース添加後に速やかに脱リン酸化されることが明らかとなっている(Tanaka et al. 2017)、*glkA* 破壊株では CreD の脱リン酸化が抑制された。一方、*hxkA* 破壊株では、細胞内 CreA 量、GFP-MalP の分解、CreD の脱リン酸化のいずれも野生株と大きな違いは見られなかった。以上の結果から、麹菌におけるグルコース依存的アミラーゼ生産抑制においては、GlkA が重要な役割を果たしていることが示唆された。

Involvement of glucosekinase in glucose-dependent repression of amylase production in *Aspergillus oryzae*.

Mizuki Tanaka¹, Yasuaki Kawarasaki¹, Katsuya Gomi²

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

P-55

アカパンカビの COL-26/AmyR のソルボース耐性とアミラーゼ遺伝子の発現調節

平井献士, 佐竹諒子, 藤村真 (東洋大院・生命科)

アカパンカビは、スクロースを糖源とする Vogel 最小培地 (Vm 培地) では菌糸生育をするが、ソルボース含有最小培地 (SOR 培地; 1% ソルボース, 0.2%スクロース) ではコロニー状に生育する。SOR 培地上でも菌糸上に生育する *sor* 変異株が複数単離されているが、唯一遺伝子が特定されているのは *sor-4/rco-3* (glucose transporter) のみである。今回、我々は $\Delta col-26$ (麴カビのアミラーゼ生産に関与する転写因子 AmyR ホモログ) が、ソルボース耐性を示すことを見出した。 $\Delta col-26$ と *sor-4/rco-3* 株は SOR 培地上で、Vm 培地と同様の菌糸生育を示した。一方、マルトース又はデンプンを糖源とした液体培地では、両株の生育は野生株よりも低下した。*col-26* がアミラーゼ遺伝子の制御に関わるかを検討した。その結果、*col-26* はいくつかのアミラーゼ遺伝子とインベルターゼの制御に関与することが明らかになった。*sor-4* 株では、アミラーゼ遺伝子のグルコース存在下での亢進が認められた。SOR-4/RCO-3 はカタボライト抑制に関わる因子であることから、転写因子 COL-26 はアミラーゼ遺伝子の制御だけではなくカタボライト抑制にも関与する可能性が考えられる。

Transcription factor COL-26/AmyR affects sorbose resistance and amylase gene expression in *Neurospora crassa*.

Kenshi Hirai, Ryoko Satake, Makoto Fujimura

(Life science, Univ. of Toyo)

P-56

糸状菌の先端生長におけるカルシウム情報伝達経路の役割

芹澤知子, 榎尾俊介, 別役重行, 高谷直樹, 竹下典男 (筑波大院・生命環境・微生物サステイナビリティ研究センター)

糸状菌の菌糸生長に必要な膜やタンパク質は、菌糸先端への分泌小胞の輸送とエキソサイトーシスによって供給される。この過程において、菌糸先端部での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。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。その結果、どの機構も通常の先端生長を行う上で、必要不可欠であることが示唆された。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い、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を同定した。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た。熱ストレスによって誘導された細胞内 Ca^{2+} シグナルの速度や継続時間の算出を通し、 Ca^{2+} を介したシグナル伝達の解明を目指している。

The role of Calcium signaling in tip growth of filamentous fungi

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

(Faculty of Life and Environmental Sciences, Microbiology Research Center for Sustainability, Univ. of Tsukuba)

P-57

Aspergillus aculeatus SepM の形態形成および cell wall integrity 経路への関与

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

【目的】我々はこれまでに, *Aspergillus aculeatus* における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を探索し, 分裂酵母の隔壁形成因子 septation initiation network component (Cdc14p) の *A. aculeatus* ホモログ(AaSepM)が, セルロースに応答した遺伝子発現制御に関わることを遺伝学的に明らかにした。そこで *A. aculeatus* の形態形成における AaSepM の機能を解析し, 様々な環境因子に制御されるセルラーゼの遺伝子発現制御機構を体系的に理解することを目的としている。【方法・結果】まず, control 株と *AasepM* 破壊株 ($\Delta AasepM$) における隔壁形成と胞子形成能を観察した。control 株と $\Delta AasepM$ を calcofluor white で染色して観察したところ, control 株と比べ $\Delta AasepM$ では隔壁数が 16 h 培養で約 5%, 24 h 培養で約 40% まで減少していた。 $\Delta AasepM$ の胞子数は, control 株と比べ約 40% にまで低下した。次に細胞壁ストレス感受性および cell wall integrity (CWI) 経路における遺伝子発現に対する *AasepM* 破壊の影響について解析した。Congo red 20 mg/L を含む最小培地上での $\Delta AasepM$ の生育は control 株と比べ約 10% まで低下した。CWI 経路の制御下にある α -glucansynthase A, B 遺伝子 (*agsA*, *agsB*), β -glucan synthase 遺伝子 (*fksA*), chitin synthase B 遺伝子 (*chsB*) の発現量を qRT-PCR により定量した。Control 株においては 200 μ g/L caspofungin 存在下で各遺伝子発現量が経時的に増加する傾向にあった。この caspofungin に応答した *agsA*, *agsB* の発現が *AasepM* 破壊により変動したものの, *fksA*, *chsB* 遺伝子の発現は *AasepM* 破壊の影響を受けなかった。*A. nidulans* において *agsA* と *agsB* の発現は転写因子 RlmA により制御されていることから, AaSepM が RlmA を介したシグナル伝達経路に関与していることが示唆された。以上の結果より, CWI 経路とセルラーゼ遺伝子発現制御経路の AaSepM を介した調節機構について議論する。

SepM is involved in morphogenesis and in maintaining cell wall integrity in *Aspergillus aculeatus*

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

(Osaka Pref. Univ.)

P-58

5' CAGE データに基づく *Aspergillus* 属真菌種間の解糖系酵素遺伝子群における転写開始点の比較解析

井上大志, 新谷尚弘, 五味勝也 (東北大院・農・生物産業創成)

選択的プロモーター(AP) は, 環境の違いによって使い分けられる複数の転写開始点(TSSs) を含むプロモーターであり, 環境に応答した精密な転写調節を可能にする。動物や植物では, 異種間のオルソログ遺伝子における AP の TSSs 使用法はしばしば異なることが知られており, このような AP の多様化は真核生物の転写段階における進化機構の一つと考えられている。しかし, 真菌類では近縁種間における包括的な AP の比較解析例がなく, AP 多様化の意義は未だ明確でない。一方, 我々は以前に, 麹菌 *Aspergillus oryzae* の解糖系酵素であるエノラーゼ遺伝子 *enoA* に炭素源種の違いに応答する AP を発見し, その AP の TSSs 選択性が *Aspergillus nidulans* と異なることを示した。そこで本研究では, TSSs 情報をゲノム網羅的かつ定量的に取得可能な 5' Cap Analysis of Gene Expression (5' CAGE) のデータを *A. oryzae* と *A. nidulans* の 2 種間で比較し, 解糖系酵素遺伝子群の AP 多様化の有無を網羅的に検討した。*A. oryzae* RIB40 と *A. nidulans* FGSCA4 について, グルコースおよび酢酸培養条件下の 5' CAGE データをそれぞれ取得し, 解糖系酵素遺伝子群のうち 2 種間でオルソログな関係にある 15 遺伝子の TSSs を調べた。その結果, *A. oryzae* と *A. nidulans* のそれぞれで, 少なくとも 5 遺伝子に複数の TSSs の存在が認められ, *enoA* を含む 4 遺伝子に 2 種間で異なる TSSs 選択性が認められた。以上の結果と 5' CAGE データに基づく遺伝子発現量情報をもとに, AP 多様化の意義を議論したい。

Comparative analysis of transcription start sites of glycolytic genes in *Aspergillus* spp. based on the 5' CAGE data

Taishi Inoue, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi

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

P-59

ウシグソヒトヨタケにおける子実体原基形成に必要な遺伝子の探索

坂本裕一¹, 佐藤志穂¹, 刑部敬史², 中沢威人³, 石井一夫⁴ (¹岩手生工研, ²徳島大・生物資, ³京大・院農, ⁴久留米大)

ウシグソヒトヨタケにおいて、光照射後に発現し子実体原基 (hyphal knot) 形成に必要な遺伝子の特定を目的として研究を行っている。これまですでに、光照射により発現が誘導される遺伝子の特定を行い、青色光照射により 1 時間で発現が急激に増加する遺伝子群として、細胞接着 (*fas1*), 脂質合成修飾関連酵素 (*cfs1, cfs2*), 新規光受容体候補遺伝子 *cryA* を含む遺伝子発現調節因子等を特定した。その中で脂質修飾酵素 *cfs1* を破壊すると子実体形成不全となることを明らかにした。また、子実体形態形成に関わることが知られていた光受容体 (*dst1, dst2, wc2*) がそれらの発現誘導に関わることも明らかにした。そこで、光照射後 12-18 時間後に knot 子実体原基が形成される低グルコース条件でのみ発現が誘導される遺伝子群 (ガレクチン, フェロモンペプチド及び修飾酵素, ラッカーゼ) について、CRISPR/cas9 によるゲノム編集を行った。その結果、フェロモンペプチド修飾酵素である farnesyl cysteine-carboxyl methyltransferase (*fcm2*) を破壊すると、原基は形成されるが、子実体への成長が止まることを明らかにした。hyphal knot 形成に関わる遺伝子を特定する目的で、光照射後 6 時間に発現が上昇する遺伝子の解析を行ったところ、この時間帯に発現が上昇する遺伝子は少ないことが明らかになった。一方複数のハイドロホビン遺伝子がこの時間帯から発現が上昇し始めることから、原基形成のための菌糸接着にハイドロホビンが関わっている可能性が示唆された。

Identification of genes that is critical for hyphal knot formation in *Coprinopsis cinerea*

Yuichi Sakamoto¹, Shiho Sato¹, Keishi Osakabe², Takehito Nakazawa³, Kazuo Ishii⁴

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

P-60 (O-3)

真正担子菌特異的な転写因子をコードする *gat1* 遺伝子の破壊株において転写抑制されるヒラタケのハイドロフォビン遺伝子 *poh2* は子実体発生に必須である

中沢威人, 竹中敦紀, 呉紅麗, 坂本正弘, 本田与一 (京大院・農)

担子菌の一部の種は、有性生殖の過程で、菌類の中では比較的巨大な子実体を形成する。しかし、その分子機構はほとんど明らかとなっていない。我々は最近、白色腐朽菌ヒラタケにおいて、GATA 転写因子をコードする *gat1* 遺伝子の変異が、ブナ木粉中のリグニン分解能の顕著な低下ならびに子実体発生不全を、それぞれ遺伝的優性に引き起こすことを報告した (Nakazawa *et al.*, 2019 Fungal Biol.)。本研究では、ヒラタケにおいて、*gat1* 変異による子実体発生不全の原因を明らかにすることを目的として行なった。野生型ダイカリアオン株 (PC9×PC15) を、50 ml 瓶に詰めたブナ木粉培地 (小麦ふすま 6.0% w/w 含有) で培養した後、低温処理を行い子実体の発生を誘導した。RNA-seq 解析を行い、原基が観察されない誘導後 2 日目の段階において、誘導前よりも顕著 (FPKM 値で 10 倍以上) に転写産物の蓄積量が増加する遺伝子を選抜した。この中からさらに、シャーレに敷き詰めたブナ木粉培地 (小麦ふすま 1.3% w/w 含有) 上で 13 日間培養した *gat1* 破壊株 (モノカリアオン) において、親株である 20b よりも顕著に転写産物の蓄積量が低い遺伝子を絞り込んだ。該当した 6 種類の遺伝子の中に、ハイドロフォビンをコードする *poh2* 遺伝子 (Ásgeirsdóttir *et al.* 1998 Microbiology) が含まれていた。この *poh2* 遺伝子の転写産物の蓄積量は、通常の子実体発生誘導後の $\Delta gat1 \times gat1^+$ ダイカリアオン株 (子実体発生しない) でも顕著に少なかった (野生株の 1/300 以下)。次に *poh2* 遺伝子の破壊株を作成し、PC15 と交配させた。得られた $\Delta poh2 \times poh2^+$ ダイカリアオン株からは、子実体が発生した。一方、交雑によって作成した $\Delta poh2 \times \Delta poh2$ の 3 株全てからは、子実体は発生しなかった。以上の結果は、*poh2* 遺伝子の転写不活性化が、*gat1* 変異による子実体発生不全の原因の一つであることを示唆する。

The hydrophobin gene *poh2* downregulated in $\Delta gat1$ strains is essential for fruiting in *Pleurotus ostreatus*

Takehito Nakazawa, Atsuki Takenaka, Hongli Wu, Masahiro Sakamoto, Yoichi Honda

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

P-61

担子菌ヒラタケにおける *ccl1* 遺伝子破壊がヒストン修飾および転写発現に及ぼす影響

奥田希実¹, 中沢威人², 堀井雅人², 坂本正弘², 本田与一² (¹京大・農, ²京大院・農)

ヒストン修飾の一部(ヒストン H3 の N 末端から 4 番目アミノ酸であるリジン残基の N-メチル化など)は、クロマチンの高次構造を変化させて転写の活性化もしくは不活性化に関与することが一般的に知られている。しかし、多くのきのこを含む真正担子菌類においては、ヒストン修飾に関する研究知見はほとんど存在しない。本研究の目的は、担子菌ヒラタケにおけるヒストン H3K4 メチル化の転写制御への関与を調査することである。まず、推定上の COMPASS (ヒストンのメチル化酵素複合体) 構成因子をコードする *ccl1* 遺伝子を、ヒラタケの *ku80* 破壊株 (20b) において相同組換えによって破壊した。次に、*ccl1* 破壊株 (*ccl1d#1*) および 20b を、ブナ木粉培地上で 13 日間培養した菌体から抽出した全タンパク質を用いて、ウェスタンブロット解析を行った。その結果、ヒストン H3 全体に占める K4 のジメチル化およびトリメチル化の割合が、それぞれ 1/10 および 1/100 程度減少していた。次に、*ccl1* 遺伝子破壊が転写発現に与える影響を解析するため、20b および *ccl1d#1* を、同じくブナ木粉培地上で 13 日間培養した菌体から抽出した全 RNA を用いて RNA-seq 解析を行った。その結果、*ccl1d#1* において顕著に転写不活性化した遺伝子が集中するゲノム領域が複数存在することが明らかとなった。ヒラタケのゲノム情報からは、これらのゲノム領域がサブテロメア領域である可能性が考えられた。以上の結果からは、ヒラタケにおける H3K4 のメチル化は、特定のゲノム領域に存在する遺伝子群の転写活性化に関与していることが示唆された。今後は、転写不活性化した遺伝子が集中するゲノム領域に分布するヒストンの修飾状態などを調査する予定である。

Effects of *ccl1* disruption on histone modification and transcriptional expression in *Pleurotus ostreatus*

Nozomi Okuda¹, Takehito Nakazawa², Masato Horii², Masahiro Sakamoto², Yoichi Honda²

(¹Dept. of Agr., Kyoto Univ., ²Grad. Sch. of Agr., Kyoto Univ.)

P-62

多重遺伝子破壊による黄麹菌 *Aspergillus oryzae* が有するハイドロフォービン遺伝子群の機能解析

近藤永治, 安藤裕人, 山川結, 中島春紫 (明治大院・農・農化)

ハイドロフォービンは糸状菌や担子菌が生産する両親媒性の低分子量タンパク質であり、単量体として分泌された後、菌体表面に自己集合して単層を形成することにより、気中菌糸や分生子に撥水性を付与している。単一の菌株が複数のハイドロフォービン遺伝子を保有していることに加え、ハイドロフォービンに特徴的な 8 つのシステイン残基によるパターン配列が保存されている一方、アミノ酸配列の相同性が低い上に、特異な C 末端ドメインを有するものも存在している。このことから、個々のハイドロフォービンは固有の機能や役割を有していると考えられる。

筆者らは黄麹菌 *A. oryzae* のゲノムから 9 種類のハイドロフォービン遺伝子 *hypA~hypI* を単離しており、それぞれの遺伝子が異なるパターンで発現することを観察している。これまでに、*hyp* 遺伝子群の生態的な機能を解析するために作製した 3 重破壊株 ($\Delta hypA,B,C$) では、大きな表現型の変化が見られないことを報告している。

現在、9 種のハイドロフォービン遺伝子について系統的な破壊株の作製を進めており、7 重破壊株 ($\Delta hypA,B,C,D,E,F,G$) の構築まで作製している。順次、残りの *hyp* 遺伝子の欠失を進めるとともに、既に作成に成功した多重破壊株と表現型解析用宿主の表現型を比較することで、黄麹菌におけるハイドロフォービン遺伝子群の生態的な役割について考察する。

Functional analysis of hydrophobins by multiple gene disruption in *Aspergillus oryzae*

Eiji Kondo, Yuto Ando, Yui Yamakawa, Harushi Nakajima

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

P-63

麹菌の共ゲノム編集法による有用二次代謝産物（コウジ酸）の生産制御

弓場一輝^{1,2}, 織田健², 田崎三香子², 和田悠作³, 岩下和裕^{1,2} (¹ 広大院・先端研, ² 酒総研, ³ ファスマック (株))

【背景・目的】 麹菌は、高い酵素生産性等から様々な分野で活躍している微生物で、近年では、二次代謝産物 (SM) の多種多様な生産のホストとしても利用されている。そのため、糸状菌の産業基盤として共ゲノム編集によるクラスター制御技術の開発と応用は重要である。本研究では、麹菌の SM クラスター制御のモデルとして、メラニン合成酵素の活性を阻害するコウジ酸の制御を3つの系で実施した。第1の系は、コウジ酸等の SM 生産を抑制制御している *hstD* 遺伝子の破壊による正の制御、第2の系は、約 6kb のコウジ酸合成遺伝子クラスターの領域欠失による負の制御、第3の系では、同クラスター内の *kojR* 遺伝子直前に制御可能な *xylanaseG2* プロモーターを挿入し、任意の培地条件下で、正、負の両方向の制御を行った。

【方法・結果】 3つの実験系において親株は RIB40 株、マーカー遺伝子として、5-Fluoroorotic acid(5-FOA)耐性で選抜可能な *pyrG* を使用し、ターゲット領域の共ゲノム編集を行った。5-FOA 耐性で選抜した3つの系の変異候補株について、コウジ酸の生産性をプレートアッセイ、定量実験で確認し、目的の表現型を示した候補株については、ターゲット領域近傍のシーケンズ解析を行った。その結果、ターゲット領域で目的の変異が起きているゲノム編集株を複数獲得した。以上から、コウジ酸の生産性の向上、低下、及びコントロールを確認し、麹菌の有用二次代謝産物であるコウジ酸の生産性を共ゲノム編集により、容易かつ多様に制御することが可能であると示唆された。

Production control of useful secondary metabolite (kojic acid) by co-genome editing of *Aspergillus oryzae*.

Kazuki Yumiba^{1,2}, Ken Oda², Mikako Tasaki², Yusaku Wada³, Kazuhiro Iwashita^{1,2}

(¹AdSM Hiroshima Univ., ²NRIB, ³Fasmac Co., Ltd.)

P-64

糸状菌 *Aspergillus nidulans* の NO 耐性に関わるシトクロム P450 の機能とその役割

鈴木康太, 榎尾俊介, 高谷直樹 (筑波大学・生命環境系・微生物サステナビリティ研究センター)

【目的】 糸状菌は一酸化窒素 (NO) に応答して遺伝子の発現を変化させることによって NO による毒性を回避している。これまでに、病原性酵母は NO に応答して 100 以上の遺伝子の発現を変化させることが知られているが、NO により誘導される糸状菌の遺伝子とその役割はほとんど知られていない。本研究は、糸状菌のモデル生物である *A. nidulans* において NO により誘導される遺伝子とその機能を解明することによって、糸状菌の NO 耐性化の分子機構を理解することを目指している。

【方法および結果】 我々は、トランスクリプトーム解析によって、NO 存在下において *A. nidulans* の多数の遺伝子の発現量が大きく変化することを明らかにした。それらの中でシトクロム P450 (P450) をコードする遺伝子の発現が NO によって強く誘導されることを見出した。*A. nidulans* のゲノム上には少なくとも 111 の P450 遺伝子がコードされているが、その多くの機能は未知である。トランスクリプトーム解析によって発現量が増加した P450 遺伝子から AN8919, AN10479, AN7066, AN9218, AN5837 を選抜し、これらの NO 耐性化における役割を明らかにすることを目指した。過酸化水素 (H₂O₂) または NO を曝露した菌体内での上記の P450 遺伝子の発現量を PCR を用いて定量した結果、H₂O₂ を添加によって 10 倍程度の発現量の増加が見られたのに対し、NO を添加した場合は 80 倍程度の発現量が増加した。これらの P450 の組換えタンパク質を pCW ベクターを用いて大腸菌 DH5 α 株内で発現を試みたところ、AN9218 を発現させた菌体の可溶性画分が、還元・一酸化炭素結合条件下において、一般的な P450 と類似した 446 nm 付近に吸収極大を示した。また、この遺伝子の遺伝子破壊株の生育は、野生型株と比べて強い NO 感受性を示した。以上の結果から、AN9218 がコードする P450 は、*A. nidulans* の生育の NO 耐性に関与することが示された。

New fungal cytochrome P450 tolerates nitric oxide

Kouta Suzuki, Shunsuke Masuo, Naoki Takaya

(University of Tsukuba, Microbiology Research Center for Sustainability)

P-65

麴菌群の比較ゲノム解析

齊藤亮太, 織田健, 岩下和裕 ((独) 酒類総合研究所)

麴菌(*A. oryzae*)は日本の伝統食品の製造に不可欠であり, 特性の異なる多様な菌株が使用されている。その特性の違いは, 各菌株のゲノムの配列や構造の違いに因ると考えられるが, 十分な解析は進んでいない。

これまで我々は, 55 麴菌株のゲノムアレイによる系統解析, 麴菌 RIB40, RIB128, RIBOIS01, RIB915 の 4 株間での比較ゲノムシーケンス解析を行ってきた。その結果, ①麴菌株群は 13 系統に分けられ, 各ゲノム系統と株の特性には相関があること。②各系統間では約 10 万箇所の配列の違いがある。③各菌株のゲノム中には大小様々な塩基の欠失や挿入が存在し, 頻繁に染色体間組み換えが起きていることを示した。

本研究では, 麴菌群全体を理解する上での基本情報とするために, 13 系統株間で比較ゲノムシーケンス解析を行った。最初に, ゲノム配列を取得していない 9 系統の代表株を illumina 社の HiSeqX に供しリードデータを取得した。その後 RIB40 を参照配列としたマッピング解析, de novo アセンブルにより得られた配列をベースに遺伝子予測等の解析データを得た。その結果, SNP 及び in/del 数は 6 千~18 万箇所, 16 bp 以上の欠失, 新規塩基配列の挿入, 染色体間組み換え等の構造変異は合計 6 千箇所にのぼった。以上の結果から, 麴菌群のゲノム構造の多様性は非常に大きいことが示唆された。続いて, 2 次代謝遺伝子クラスターに対して比較ゲノム解析を行った結果, 全ての菌株で保存されている遺伝子クラスターは 47 個であった。さらに, RIB40 株のゲノムにマッピングされなかった各菌株の配列をアセンブルし, backbone 遺伝子, C6 型転写因子, Cytochrome P450 の有無を探索した結果, それぞれ 0~8 個, 0~3 個, 0~4 個の遺伝子が確認されたことから, これらの遺伝子は各株を特性づける因子の 1 つであると考えられた。

Comparative genome analysis of *Aspergillus oryzae* strains.

Ryota Saito, Ken Oda, Kazuhiro Iwashita

(Nat. Res. Inst. of Brew.)

P-66

非相同組み換え的遺伝子導入における同方向性ロングタンDEMリピート構造の謎

若井暁^{1,2}, 張斯来², 荻野千秋³, 堤浩子⁴, 秦洋二⁴, 近藤明彦² (¹海洋機構, ²神戸大院・イノベ, ³神戸大院・工, ⁴月桂冠・総研)

黄麴菌 *Aspergillus oryzae* は, 菌体外に著量の酵素を分泌生産できることに加えて, 有機酸や二次代謝産物の生産も可能であり, 多彩な能力を持っている。このような能力のさらなる増強には遺伝子組み換えが近道であり, 我々もこれまでに多数の遺伝子組み換え麴菌を産出している。昨年度, 遺伝子組み換え麴菌の二株についてナノポアシーケンサを用いた解析から導入遺伝子のロングタンDEMリピート構造について報告した。今回, さらに三株追加し, ロングタンDEMリピート構造がこれらの株でも見いだされるかどうか検討した。

解析には, 導入遺伝子断片末端配列が異なり, かつ, コピー数が多いことが定量 PCR で確認されている三株を使用した。当初, 染色体上の複数位置に導入されていることを予想してしたが, 先の二株と同様に導入断片が集約的に導入されていた。さらに, その超ロングタンDEMリピート構造において, 最大で 21 コピーが同じ方向を向いて連続して導入されていた。21 コピーの遺伝子が全て同じ方向に入る可能性はおおよそ百万分の一であり, その同方向性ロングタンDEMリピート構造の形成には, 何かしらの生体内分子システムが関与していると考えられる。

現時点で, この分子メカニズムは謎であるが, この形成メカニズムの解明が進めば, 導入遺伝子サイズに制限を受けない超大型遺伝子クラスターの *in vivo* 構築や多様な人工遺伝子クラスター形成といった新しい遺伝子導入技術の開発につながると期待できる。

Isodirectional long-tandem repeat structure of integrated gene in non-homologous recombination

Satoshi Wakai^{1,2}, Silai Zhang², Chiaki Ogino³, Hiroko Tsutsumi⁴, Yoji Hata⁴, Akihiko Kondo²

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

P-67

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・応生化)

【背景と目的】硝酸ナトリウムを唯一の窒素源として培養した *Aspergillus oryzae* RIB40 株を様々な窒素源に切り替えて振盪培養したところ, L-ロイシンや大豆タンパクなどを窒素源とした場合に多くのペプチダーゼ遺伝子の転写量が誘導されることを見出した¹⁾。そこで本研究では *A. oryzae* における窒素源の変化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ために, L-ロイシンを窒素源とした時の転写応答に着目して解析を行うこととした。

【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, 窒素源を硝酸ナトリウムと L-ロイシンにそれぞれ切り替えて 1, 2, 3, 4, 8, 12 時間培養した。この条件下で, 数種のペプチダーゼ遺伝子や, 窒素代謝に関わると考えられている既知の転写因子をコードする遺伝子の転写量を定量 PCR によって調べた。その結果ペプチダーゼ遺伝子は, 窒素源を L-ロイシンに切り替えてから 3 及び 8 時間後に転写量が増加するものと, 3 時間後にのみ増加するものに分類することができた。また, 転写因子の中では PrtR をコードする遺伝子の転写が 3 及び 8 時間後に強く誘導され, AreA をコードする遺伝子の転写が 3 時間後に強く誘導されることなどが明らかとなった。このことから, 転写誘導が起きる時間で分類した 2 種のペプチダーゼ遺伝子群が, それぞれ PrtR と AreA に調節されている可能性が示唆された。これらの窒素代謝に関わると考えられている既知の転写因子を欠損した *A. oryzae* における, 窒素源変化への転写応答についても報告する予定である。

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) 白石敦士ら 第 18 回糸状菌分子生物学コンファレンス要旨集 p.65 (2018)

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-68

Aspergillus nidulans におけるヘミセルラーゼ遺伝子のカーボンカタボライト抑制機構

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

Aspergillus nidulans におけるカーボンカタボライト抑制 (CCR) には少なくとも 2 種類の制御システムが関与する。一つは C₂H₂ 型転写抑制因子 CreA による制御であり, アミラーゼ遺伝子ではこれが主要である。一方, セルラーゼ遺伝子ではこれとは独立して cAMP シグナリングが重要な役割を示す。これら 2 種の CCR システムの寄与度は培養方法や添加する抑制性炭素源の種類により変動する。ヘミセルラーゼ遺伝子も CCR を受けるが CreA 依存的 CCR 以外について詳細な解析は行われていない。そこで本研究ではキシラナーゼとマンナナーゼ遺伝子の CCR における CreA と cAMP シグナリングの関与について解析した。

creA 破壊株, cAMP 依存性プロテインキナーゼ遺伝子 (*pkaA*) 破壊株, 三量体 G タンパク質 α サブユニット遺伝子 (*ganA*, *ganB*, *fadA*) 破壊株について様々な単糖存在下でのキシラナーゼ・マンナナーゼ生産性を解析した。野生株においてはグルコースが他の単糖に比べ強いキシラナーゼ生産抑制を引き起こし, マンナナーゼ生産は全ての単糖により強く抑制された。グルコースおよびキシロースによる抑制を各変異株についてみると, キシラナーゼ生産は *creA* 破壊と *fadA* 破壊により抑制が解除された。一方, マンナナーゼ生産は *creA* 破壊株, *pkaA* 破壊株, *Ga* 遺伝子破壊株いずれにおいても完全にあるいは部分的に抑制されたままだった。次に抑制物質としてグルコース又はキシロースを用いて RT-qPCR によりキシラナーゼ遺伝子とマンナナーゼ遺伝子の発現量を解析した。その結果, いずれの遺伝子についてもグルコースによる抑制には CreA と PkaA, GanB が関与するのに対し, キシロースによる抑制では CreA が主として働き, PkaA, GanB の影響は CreA ほど大きくなかった。また, *fadA* 破壊株における脱抑制は観察されなかった。以上より, セルラーゼと同様にヘミセルラーゼ遺伝子の CCR においても, 培養方法により各制御因子の寄与度が変わると考えられる。

Carbon catabolite repression of hemicellulase genes in *Aspergillus nidulans*

Emi Kunitake¹, Tetsuya Kimura¹, Tetsuo Kobayashi²

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

P-69

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* の転写因子 PrtR の解析

田中優花子, 西岡佐和子, 辻僚太郎, 山形洋平 (東京農工大院・応生化)

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* は、日本で古くから醸造産業に用いられてきた糸状菌である。醸造、発酵産業にとって有用なタンパク質分解酵素を多種、多量に生産することが知られているが、これらの酵素の生産がコントロールされているメカニズムは明らかでない。そこで、このメカニズムを明らかにするために転写因子 PrtR に着目した。PrtR とは他の *Aspergillus* 属で見出されている PrtT のオルソログであり、広範な分泌型ペプチダーゼ遺伝子の転写を制御すると考えられている。本研究では PrtR の制御下にある遺伝子の同定、制御機構の解明を目的とした。

PrtR がペプチダーゼ遺伝子の転写に与える影響を調べるため、*A. oryzae* RIB40 Δ *ligD::ptrA* Δ *pyrG* 株をホストとし、Cre/loxP システムを用いて *prtR* 破壊株を作製した。*prtR* 破壊株を CD 液体培地にて 48 時間培養し、アスパルティックエンドペプチダーゼのうちタンパク質として菌体外に分泌が確認されている PepO をコードする遺伝子、セリントイプカルボキシペプチダーゼのうちタンパク質として菌体外に多く分泌される OcpO, OcpA をコードする遺伝子の転写解析を行った。その結果、コントロール株と比較して *ocpA* の転写量のみが減少し、このペプチダーゼ遺伝子が本条件下で PrtR による正の制御を受けていることが示唆された。ペプチダーゼ遺伝子の発現がより強く誘導される条件下でのペプチダーゼ遺伝子の転写解析についても併せて報告する。

なお、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。

Study on transcription factor PrtR of *Aspergillus oryzae*

Yukako Tanaka, Sawako Nishioka, Ryotaro Tsuji, Youhei Yamagata

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

P-70

Bipolaris maydis における赤色化合物合成遺伝子クラスターの活性化とコロニー赤色化について

竹山さわな, 陳帯娣, 吉田裕史, 田中千尋 (京大院・農)

Bipolaris 属菌は、Azaphilone 類の合成に関わると推定される *Rep* クラスターをゲノム上に保存的に有しているが、本クラスター内の遺伝子は通常発現しておらず、その機能や発現制御については明らかになっていない。しかし、*B. maydis* においては、特定のヘム合成系遺伝子の変異株 *pol2* 株で同クラスターが活性化され、赤色化を生ずることが見出されている。さらに、*pol2* 依存的に発現する転写因子 Rpr1 の欠失によりコロニーの赤色化が消失し、クラスター内遺伝子の発現量が減少したことから、Rpr1 が *Rep* クラスター遺伝子を活性化することで赤色化を誘導することが示唆されている。そこでまず、*RPR1* の転写量の増加がコロニーの赤色化の十分条件であるかどうかを確かめるために、野生型株を親株として TEF プロモーター下で *RPR1* を過剰発現させた。しかし、作出菌株 (*Alb3 RPR1^{OE}*) はコロニーの赤色化を示さなかった。このことから、*RPR1* の転写量増加に加えて *pol2* 環境下で働く何らかの転写後制御が赤色化に必要であることが示唆された。そこで次に、*pol2* 株におけるヘム合成の異常による酸化ストレスの蓄積が赤色化の原因である、という仮説の元、酸化ストレス誘発剤であるメナジオン（ビタミン K3）の処理を行い、その影響を調べた。その結果、野生型 (*Alb3*) 株ではコロニーの赤色化が起り、*Alb3 RPR1^{OE}* ではより強い赤色化が認められた。一方で、*Alb3* Δ *RPR1* では赤色化が認められなかった。このことから、メナジオンによるコロニーの赤色化は *pol2* 株と同様に Rpr1 依存的に起こることが明らかとなった。また、酸化ストレスが *RPR1* の転写後制御とそれに伴うコロニー赤色化の要因の一つとして働くと考えられた。

Activation of red compound synthesis gene cluster and red pigmentation of colony in *Bipolaris maydis*

Sawana Takeyama, Daidi Chen, Hiroshi Yoshida, Chihiro Tanaka

(Grad. Sch of Agriculture, Kyoto Univ.)

P-71

Bipolaris maydis における $\Delta pka1 \Delta pka2$ 致死性回避の原因遺伝子の探索

辻健也¹, 湯谷智¹, 泉津弘佑², 住田卓也¹, 北出雄生¹, 田中千尋¹ (¹京大院・農, ²滋賀県大院・環境)

cAMP/PKA シグナル伝達経路は外部刺激を認識し, 細胞内にシグナルを伝達することで遺伝子の発現調節を行っている。本経路における PKA は cAMP に依存的なキナーゼであり, 下流因子のエフェクターとして機能する。PKA は病原糸状菌において病原性および形態形成に重要な役割を担っていることが知られており, 演者らはこれまでにトウモロコシごま葉枯病菌 (*Bipolaris maydis*) の PKA 触媒サブユニットである *PKA1* および *PKA2* の遺伝子破壊株 ($\Delta pka1$ および $\Delta pka2$) を作出し, 機能解析を行ってきた。今回, これら二つの遺伝子の特異的・重複的な機能についてさらなる解析を行うため, *PKA1PKA2* 二重破壊株 ($\Delta pka1 \Delta pka2$) の作出を試みた。作出には, $\Delta pka1$ 株と $\Delta pka2$ 株の交配による方法ならびに, $\Delta pka2$ 株を元に *PKA1* を形質転換により破壊する方法の 2 種を用いた。交配によって得られた $\Delta pka1 \Delta pka2$ 株では, 子嚢胞子は発芽するものの 15 時間以内にメラニン化が生じ, 生育は停止した。このことは, *PKA1PKA2* 二重破壊は致死性であることを示している。しかし, 一方, 形質転換法では $\Delta pka1 \Delta pka2$ 二重破壊株を作出することができた。これらの株を野生株と交配し子孫を分析したところ, 二重破壊の致死性を回避する突然変異が生じている可能性が示唆された。そこでゲノム比較手法を用い本突然変異遺伝子の同定を試みた。戻し交雑 4 世代後の突然変異姉妹株 2 株のゲノム DNA を HiSeq2500 でシーケンスし, 戻し交雑親ゲノムと比較した。その結果, 2605 箇所の特異的多型を見出し, そのうち 102 箇所は ORF 上の多型であることを明らかにした。これら 102 のうちいくつかは, PKA との相互作用が見出されている遺伝子, あるいは下流で遺伝子発現調節に関わる遺伝子のホモログであった。現在, これらの中から *PKA1PKA2* 二重破壊の致死性回避の原因突然変異の同定を行なっている。

Exploration of causal gene suppression of lethality in $\Delta pka1 \Delta pka2$ double mutant in *Bipolaris maydis*

Kenya Tsuji¹, Satoshi Yutani¹, Kosuke Izumitsu², Takuya Sumita¹, Yuki Kitade¹, Chihiro Tanaka¹

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

P-72

Bipolaris maydis の複数の遺伝子クラスターを活性化するクラスター外転写因子 Rpr1

陳帯娣, 竹山さわな, 二神加奈恵, 吉田裕史, 田中千尋 (京大院・農)

B. maydis の殺菌剤ポリオキシシン耐性株として分離された *pol2* 株は, 薬剤耐性に加えてコロニー赤色呈色, アントラキノン類蓄積といった多面的形質を示す。その原因となる変異はヘム合成系遺伝子に見つかっており, *pol2* 株においてヘム合成量の減少が認められることから, ヘム合成の異常が何らかの個別または共通のメカニズムを介して上記の多面的形質をもたらすと考えられる。これまでに, *pol2* 株で特異的に活性化される遺伝子クラスターとして *Rep* クラスター, *Emd* クラスターの 2 つが見出されており, クラスター内の特定遺伝子を欠失すると, それぞれ赤色呈色, アントラキノン類蓄積の形質が消失することが明らかとなっている。ところが, 各クラスター内には転写因子をコードすると推定される遺伝子が存在するものの, それらの欠失は赤色呈色やアントラキノン類蓄積に影響しない。そこで今回, クラスター外の未知なる転写因子がこれらのクラスターを制御するはずであること, 加えて *pol2* 株の多面的形質発現には共通したメカニズムが介在し得ることの 2 点を想定し, 「*pol2* 株の多面的形質発現に関与する転写因子」の探索を試みた。まず, *pol2* 株に対して変異原処理を行い, コロニー赤色呈色とポリオキシシン耐性のいずれも消失するような変異株 P2W61 株を取得した。P2W61 株の変異は *pol2* 復帰変異ではなく, また, P2W61 株の白色コロニーとポリオキシシン感受性の形質は交配により分離しなかった。原因変異遺伝子を同定するため, 転写因子遺伝子上の変異に焦点を当てた比較ゲノム解析および連鎖解析を行った結果, 一つの変異箇所 (一アミノ酸置換に相当) に候補が絞られた。そこで, その周辺領域の野生型 DNA 配列を P2W61 株に導入したところ, *pol2* 株同様のコロニー赤色呈色・ポリオキシシン耐性がもたらされたことから, 同変異箇所の遺伝子を目的の転写因子遺伝子 *RPR1* として同定した。*Rep* クラスター, *Emd* クラスターの一部遺伝子は *pol2* 株で顕著に発現増加するが, これは *Rpr1* 依存的事実であることが確認された。さらに, *RPR1* 自体の発現量が *pol2* 株で増加しており, P2W61 株で減少していたことから, *Rpr1* は自らの遺伝子の転写を正に自己制御する転写因子であると考えられた。

A novel transcription factor Rpr1 which activates multiple gene clusters and is encoded outside the clusters

Daidi Chen, Sawana Takeyama, Kanae Futagami, Hiroshi Yoshida, Chihiro Tanaka

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

P-73

***Aspergillus nidulans*における出芽酵母 Rgt1 類似因子のカーボンカタボライト抑制への関与**
上條順也¹, 木村哲哉¹, 小林哲夫², 國武絵美¹ (¹三重大院・生資, ²名大院・生命農)

*A. nidulans*におけるカーボンカタボライト抑制(CCR)は、転写抑制因子 CreA 関与の経路や cAMP シグナリング経路により制御される。前者は細胞内の、後者は細胞外のグルコースに応答すると考えられる。後者には三量体 G タンパク質の α -subunit である GanB や cAMP 依存性プロテインキナーゼ PkaA が関与する。出芽酵母においてグルコースの取り込みに関わるヘキソーストランスポーター遺伝子 (*hxts*) の発現抑制因子 Rgt1 は、その活性が cAMP 依存性プロテインキナーゼにより調節されている。そこで本研究では、細胞内外グルコースへの応答と CCR の関係について新たな情報を取得するため、*A. nidulans*における Rgt1 類似因子の探索とその機能解析を行い、本因子の CCR への関与を検証した。

Rgt1 と最も高い相同性を有する因子は AN1927 であったが、相同部分は DNA 結合ドメインとその周辺に限られていた。本因子の遺伝子破壊及び translation elongation factor1 プロモーターを用いた高発現株の作製を試みたところ、遺伝子破壊株は取得できなかったため AN1927 は必須因子であると示唆された。また、高発現株 (OE1927) の生育も調べた限りの炭素源全てで低下していた。一方、グルコースの取り込みに限定すると、確かに野生株と比較して OE1927 のグルコース消費は遅延していた。AN1927 過剰発現の CCR への影響を調べるため、グルコース存在下でのセルラーゼ及びアミラーゼ生産性をプレートアッセイにより調べた結果、アミラーゼに関してのみ OE1927 において脱抑制が観察された。*A. nidulans* ではアミラーゼの CCR は CreA 依存的経路が主に働くことから、AN1927 の高発現により引き起こされた細胞内グルコース量の低下がアミラーゼの脱抑制に影響したと考えられる。しかし、*hxts* の転写量については野生株と OE1927 に劇的な差は見られなかったため、本因子は未知のメカニズムによってグルコースの取り込みを制御していると考えられた。

Involvement of yeast Rgt1 homolog in carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*.

Junya Kamijo¹, Tetsuya Kimura¹, Tetsuo Kobayashi², Emi Kunitake¹

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

P-74

糸状菌 *Fusarium solani* D2 株から単離した脂肪酸水和酵素の機能解析

阪本鷹行¹, 村川直美¹, 上野このみ¹, 安藤晃規², 岸野重信², 相馬悠希³, 和泉自泰³, 馬場健史³, 小川順², 櫻谷英治¹ (¹徳島大・生物資源, ²京大院・農, ³九大・生医研)

水酸化脂肪酸(HFA)は分子内に水酸基とカルボキシ基を有するため反応性が高く、医薬品やポリマーなどの原料として幅広い分野で注目されている。我々はこれまでに、バイオディーゼル生産過程の副生成物である廃グリセロールから HFA を生産するユニークな糸状菌 *Fusarium solani* D2 株を単離している。本研究では D2 株における HFA 生産条件を精査し、合成酵素遺伝子のクローニングおよび機能解析を試みた。

ガスクロマトグラフィー質量分析による定性解析の結果、D2 株が 10(OH)c12-18:1 (HYA)および 10(OH)-18:0 (HYB)を生産することが示された。次に、HYA・HYB 生産性が報告されている嫌気性細菌の脂肪酸水和酵素および糸状菌データベースの情報を基に、D2 株におけるホモログ遺伝子(MCRA2)をクローニングした。さらに、組換えタンパクの脂肪酸水和活性を評価したところ、HYA・HYB 生成が確認された。D2 株由来の MCRA2 アミノ酸配列は細菌由来水和酵素と 30%程度の相同性しか示さなかったことから、MCRA2 が真菌由来のユニークな酵素であることが示唆された。

Functional analysis of a fatty acid hydratase isolated from filamentous fungus *Fusarium solani* D2

Takaiku Sakamoto¹, Naomi Murakawa¹, Konomi Ueno¹, Akinori Ando², Shigenobu Kishino², Yuki Soma³, Yoshihiro Izumi³, Takeshi Bamba³, Jun Ogawa², Eiji Sakuradani¹

(¹Fac. Biosci. Bioind., Tokushima Univ. ²Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., ³Med. Inst. Bioregul., Kyushu Univ.)

P-75

水酸化脂肪酸生産性糸状菌 *Fusarium solani* D2 株の形質転換法の開発

野口愛佳, 村川直美, 上野このみ, 阪本鷹行, 櫻谷英治 (徳島大・生物資源)

水酸化脂肪酸は炭素骨格に 1 つ以上の水酸基を有する脂肪酸の総称であり, 医薬品, 化粧品, 化成品の原料として注目されている。微生物がつくる水酸化脂肪酸としては, *Lactobacillus* 属などの一部の嫌気性菌による 10-ヒドロキシ-シス-12-オクタデセン酸(HYA)や, 10-ヒドロキシステアリン酸(HYB)が知られているが, 嫌気性菌の脂質生産性の低さや大量培養の難しさなどから工業生産に至っていない。一方, 我々はこれまでに HYA と HYB を生産するユニークな糸状菌 *Fusarium solani* D2 株を単離している。本菌株は脂質生産性や蓄積性に比較的優れており, 遺伝子機能解析や工業化に向けた分子育種法の確立が望まれる。

本研究では, アグロバクテリウム法(ATMT 法)を用いた D2 株の形質転換を試みた。まず, D2 株の抗生物質に対する感受性を調べた結果, ハイグロマイシンに対して非常に強い感受性を示した。そこで, 接合菌 *Mortierella alpina* 由来の恒常発現プロモーター下流にハイグロマイシン耐性遺伝子を挿入したバイナリーベクターを構築し, *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 株を介した形質転換を行った。得られたハイグロマイシン耐性株については, PCR による導入遺伝子の確認を行った。これらの結果から, *F. solani* D2 株において ATMT 法が有効であること, および *M. alpina* 由来のプロモーターが機能することが示された。今後はさらに諸条件の検討や導入ベクターの最適化を目指す。

Establishment of a transformation method for hydroxy fatty acid-producing fungus *Fusarium solani* D2

Aika Noguchi, Naomi Murakawa, Konomi Ueno, Takaiku Sakamoto, Eiji Sakuradani

(Fac. Biosci. Bioindus., Tokushima Univ.)

P-76 (O-11)

イネいもち病菌における nectriapyrone 類の生産誘導と生理機能解析

本山高幸, 野川俊彦, 長田裕之 (理研 CSRS・ケミカルバイオロジー)

イネいもち病菌 *Pyricularia oryzae* のゲノム中には約 50 個の二次代謝遺伝子クラスターがあるが, 生産物が報告されているのはメラニン, テヌアゾン酸, 及びピリクロール類のみであった。我々は, 二成分情報伝達系を攪乱し, nectriapyrone (1) 及び水酸化類縁体である nectriapyrone D/gulypyrone B (2) の生産誘導を引き起こし, 生合成遺伝子クラスターを同定することに成功している。1 は, エンドファイト(植物内生菌)や植物病原菌を主とした様々な糸状菌が生産する化合物であるが, その生理作用は不明である。今回, nectriapyrone 類の生理機能を明らかにするため, 生合成遺伝子の破壊株と大量発現株を用いた解析を行った。

nectriapyrone 類の生合成遺伝子クラスターは *NEC1* (polyketide synthase gene) と *NEC2* (*O*-methyltransferase gene) からなる。*NEC1* の大量発現株では生合成中間体 3 が蓄積し, *NEC1* と *NEC2* の大量発現株では 1-3 に加えて 4-6 の大量生産が認められた。4-6 を精製し, 構造決定したところ, 4 と 5 は既知の類縁化合物であり, 6 は新規類縁化合物(zaepyrone)であることが明らかになった。興味深いことに, 2 及び 4-6 の生合成に関与する酸化酵素遺伝子は遺伝子クラスター内には存在しなかった。 $\Delta nec1$ 株のイネへの病原性の低下は認められず, nectriapyrone 類は感染には必要とされないことが示唆された。一方, nectriapyrone 類の構造は放線菌 (*Streptomyces* spp.) が生産する自己生育阻害物質 germicidin 類と構造が類似している。そこで, 放線菌に対する活性を評価したところ, *NEC1* と *NEC2* の大量発現株は, *Streptomyces griseus* に対して生育阻害活性と色素生産阻害活性を示した。本阻害活性について 1-6 の関与を評価したところ, 1 が活性を示した。1 が微生物間相互作用に関与し, 2 及び 4-6 は不活性化された化合物であることが示唆された。

Induced production and physiological function analysis of the nectriapyrones in the rice blast fungus

Takayuki Motoyama, Toshihiko Nogawa, Hiroyuki Osada

(RIKEN CSRS, Chemical Biology)

P-77 (O-12)

分散型麹菌の物質高生産メカニズム解明へ向けたメタボローム解析

櫻川拓¹, 張斯来², 若井暁^{2,3}, 近藤明彦², 荻野千秋¹ (¹神戸大院・工, ²神戸大院・イノベ, ³海洋機構)

液体培養時、麹菌は菌糸同士が接着することで菌糸塊を形成し物質生産性が低下する。先行研究において、細胞壁を構成する菌糸接着因子合成遺伝子の破壊により菌糸同士が接着しない分散型麹菌が開発されており、分散型麹菌は液体培養において酵素生産量と菌体増殖量が増加することが報告されている。本研究では、従来株と分散株を用いて代謝解析を実施し、酵素生産性や生育特性の差の理解を目指している。酵素生産のモデルタンパク質として麹菌で分泌生産実績のあるセルラーゼ (CBHI) を選択した。遺伝子組換えにはプロトプラスト PEG 法を用い、従来株と分散株に CBHI 生産能を持たせた株を作製した。GPY 培地で 4 日間培養した結果、従来株に比べて分散株では、乾燥菌体重量が 1.5 倍、CBHI 活性は 10 倍以上となったが、CBHI 生産株では非発現株よりも少ない傾向にあった。さらに培養液のグルコース消費は従来株では 3~4 日かかっていたが、分散株では 2 日であった。次に、培養 24 時間後の菌体内の代謝産物を LC-MS/MS を用いて解析した。解糖系や TCA 回路の多くの中間代謝産物の蓄積量は分散株の方が従来株よりも少なく、代謝経路における淀みの解消が示唆された。一方で、CBHI 発現株と非発現株に明確な差はなかった。この代謝解析の結果は、分散株が従来株よりも早くグルコースを消費する培養特性と一致する。したがって、従来株では代謝の淀みが恒常的に発生しており、分散株では代謝の淀みが解消されて、スムーズにエネルギー代謝が進み、菌体量や酵素生産量の増加に繋がったと考えられる。本結果より、分散型麹菌は酵素生産だけでなく、有機酸等の物質生産においても有用なホストとなることが期待される。

Metabolomic analysis using wild type and hyphae-dispersed type of *Aspergillus oryzae* strains

Taku Sakuragawa¹, Silai Zhang², Satoshi Wakai^{2,3}, Akihiko Kondo², Chiaki Ogino¹

(¹Chem Engi, Univ. of Kobe, ²Inov, Univ. of Kobe, ³JAMSTEC)

P-78

油糧糸状菌 *Mortierella alpina* における perilipin 様タンパク質遺伝子の機能解析

中村和弘¹, 東洗希¹, 阪本鷹行¹, 島田良美², 安藤晃規², 岸野重信², 相馬悠希³, 和泉自泰³, 馬場健史³, 小川順², 櫻谷英治¹ (¹徳島大・生物資源, ²京大院農・応用生命, ³九大・生医研)

アラキドン酸の工業生産菌として利用されている油糧糸状菌 *Mortierella alpina* において、アラキドン酸は主にトリアシルグリセロールとして菌体内の脂肪滴と称されるオルガネラに蓄積される。しかしながら、本糸状菌における脂肪滴の脂質蓄積メカニズムに関しては不明な点が多い。一方、生体内では脂肪滴表層タンパク質の一種である perilipin によって脂質代謝関連酵素の活性が制御されることが知られており、過剰発現させることで代謝抑制に伴った脂質蓄積量の向上が報告されている。そこで本研究では、油糧糸状菌 *M. alpina* が持つ perilipin 様タンパク質遺伝子を過剰発現させ、脂質生産性を評価することとした。

M. alpina のゲノム情報を基に perilipin 遺伝子を探索した結果、2 つのホモログ遺伝子、*maplin1* および *maplin2* が検出された。それぞれの遺伝子の過剰発現株に対して脂質生産性を評価したところ、*maplin1* 過剰発現株は野生株よりも有意な脂質蓄積の向上を示した。

Functional analysis of genes encoding perilipin-like proteins in oleaginous fungus *Mortierella alpina*

Kazuhiro Nakamura¹, Hiroki Azuma¹, Takaiku Sakamoto¹, Yoshimi Shimada², Akinori Ando², Shigenobu Kishino², Yuki Soma³, Yoshihiro Izumi³, Takeshi Bamba³, Jun Ogawa², Eiji Sakuradani¹

(¹Fac. Biosci. Bioind., Tokushima Univ. ²Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., ³Med. Inst. Bioregul., Kyushu Univ.)

P-79

クエン酸生産糸状菌における遺伝子解析と代謝産物解析によるカビ毒非生産性の検証

大越佳乃¹, 吉岡育哲¹, 中川博之², 桐村光太郎¹ (¹早大・先進理工・応化, ²農研機構・食品研究部門)

クエン酸は *Aspergillus niger* によって工業的に発酵生産されている有用有機酸である [1]。しかし、一部の *Aspergillus* Section *Nigri* 属菌にはカビ毒生産性が見られ、安全性が懸念されている。クエン酸生産糸状菌 WU-2223L 株はこれまで *A. niger* としていたが、最新の分類基準に基づいて Section *Nigri* の *A. tubingensis* と再同定した。本研究では、代謝産物解析と遺伝子解析に基づいて WU-2223L 株のクエン酸生産糸状菌としての安全性について検証した。*Aspergillus* 属糸状菌により生産される可能性があるカビ毒としては、アフラトキシン、フモニシン、オクラトキシン、パツリンがある。そこで、数種の培養条件を設定し、代謝産物解析を行った。WU-2223L 株の培養液についての LC-MS 分析では、各カビ毒は検出限界未満であった。さらに、各カビ毒生産菌と非生産菌のゲノム情報を利用して、各カビ毒の生合成クラスター遺伝子あるいはその近傍の保存された遺伝子座間を PCR で増幅可能かどうかを検討した。*A. tubingensis* WU-2223L において、検討したカビ毒の生合成遺伝子クラスターについては欠失または非存在であることを確認した。以上より、*A. tubingensis* WU-2223L はカビ毒非生産性で安全性の高いクエン酸生産糸状菌であることを明らかにした。

[1] Kirimura, K. and Yoshioka, I., *Comprehensive Biotechnology*, (3rd ed.), Vol.3, 158-165 (2019).

Non-Production of Mycotoxins by a Citric Acid-Producing Filamentous Fungus Based on Genetic and Metabolite Analyses

Kano Okoshi¹, Isato Yoshioka¹, Hiroyuki Nakagawa², Kohtaro Kirimura¹

(¹Dept. Appl. Chem., Sch. Adv. Sci. Eng., Univ. of Waseda, ²Food Res. Inst., NARO)

P-80

フミン酸添加培養モデルが解明する糸状菌の土壌生態

宮崎つぐみ, 大泉太於, 中澤奈美, 梶尾俊介, 高谷直樹 (筑波大・生命環境・微生物サステイナビリティ研究センター)

実験室における糸状菌の環境適応については様々な研究が進められているが、自然環境中での代謝の詳細はほとんどわかっていない。本研究は、主要な土壌有機物であるフミン酸 (Humic acid, HA) をモデルとし、糸状菌に対する HA の役割を解明することで、糸状菌の土壌生態を明らかにすることを目的とした。

液体培地に HA を添加して土壌糸状菌 *Aspergillus nidulans* を培養したところ、菌類や一部の植物において発現する代替呼吸系 Alternative oxidase (AOX) 活性が上昇することを見出した。酢酸等の利用に関わる転写因子遺伝子 *acuK* と *acuM* をそれぞれ欠損させた遺伝子破壊株では、AOX 遺伝子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。また、HA の添加によって、抗酸化酵素の遺伝子発現が上昇し、細胞内活性酸素種 (ROS) の蓄積が低下した。HA は抗酸化酵素の活性化と ROS 低発生型の呼吸系である AOX の活性化を通して細胞内 ROS の蓄積を低下させると考えられた。これによる *A. nidulans* の酸化ストレスの緩和が、HA 存在下での指数増殖期の生育の増加に関与すると考えられる。また、HA の添加は定常期に見られる *A. nidulans* の自己溶菌を抑制した。プロテオーム解析および細胞外酵素の活性の測定の結果、HA は定常期に発現誘導される細胞壁分解酵素の生産を低下させることで自己溶菌を抑制し、定常期の生育を維持することが明らかになった。土壌を添加した場合にも AOX 活性は上昇し、*A. nidulans* 以外の 15 種の糸状菌においても HA による AOX の活性化が確認された。これは、土壌環境中では、多くの糸状菌の代謝が通常の実験室環境とは異なることを示唆する。

Soil ecology of filamentous fungi elucidated by humic acid model

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

(Faculty of Life and Environmental Sciences, Univ. of Tsukuba, Microbiology research center for sustainability)

P-81

クエン酸生産糸状菌 *Aspergillus tubingensis* WU-2223L におけるミトコンドリア膜局在型クエン酸-2-オキソグルタル酸輸送体遺伝子の破壊

郭宇歌, 吉岡育哲, 脇本紗梨, 桐村光太郎 (早大・先進理工・応化)

クエン酸は食品の酸味料や化学製品の原料として利用されている有用な化合物であり, 糸状菌 *Aspergillus niger* による発酵によって工業生産されている。演者らは, クエン酸高生産菌である *A. tubingensis* (以前は *A. niger*) WU-2223L のゲノム上に酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 由来のミトコンドリア膜局在型 2-オキソグルタル酸-クエン酸輸送体のホモログ遺伝子 (*cocA*) を見出し, クエン酸輸送に関係することを推定した。^[1] 本研究では, WU-2223L 株のクエン酸生産における *cocA* の役割を明らかにすることを目的として, その遺伝子破壊株を作製し, 表現型を解析した。WU-2223L 株の *cocA* 破壊株 DCOCA-1 株は, クエン酸を唯一の炭素源とする Czapek-Dox 最小寒天培地上で顕著な生育遅延を示した。さらに, DCOCA-1 株を用い, クエン酸発酵試験を行い, クエン酸生産量を測定した。親株である WU-2223L 株は 12 日間の培養で 120 g/L のグルコースから 63 g/L のクエン酸を生産するが, 同条件下での DCOCA-1 株は 35 g/L のクエン酸しか生産せず, 生産量は 44% 減少した。以上より, COCA をコードする遺伝子は *A. tubingensis* WU-2223L におけるミトコンドリアからサイトゾルへのクエン酸輸送に関する主要な輸送体であることを明らかにした。

[1] K.kirimura, et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., **83**, 1538-1546 (2019).

Disruption of the gene encoding mitochondrial citrate-oxoglutarate shuttle protein *Aspergillus tubingensis* WU-2223L

Yuge Guo, Isato Yoshioka, Sari Wakimoto, Kohtaro Kirimura

(Dept. Appl. Chem., Sch. Adv. Sci., Waseda Univ.)

P-82 (O-13)

グルコース代謝に基づく菌糸先端の多種分子同時ラマン分光マッピング解析

安田充¹, 竹下典男², 重藤真介¹ (¹関西学院大・理工, ²筑波大・生命環境)

糸状菌 *Aspergillus nidulans* はグルコースなどの炭素源を栄養として菌糸の先端を生長させる。この生長機構をグルコース代謝の観点から調べるため, 本研究ではタンパク質や脂質など様々な細胞内分子の分子構造情報をもたらすラマン分光法を利用する。さらに, 安定同位体標識法を併用することにより, 菌糸を破壊することなく, 代謝情報に基づいた先端生長機構の新たな知見の獲得が期待される。そこで, 本研究では安定同位体として D (重水素) または ¹³C で標識したグルコースの代謝に基づく菌糸先端の多種分子同時ラマン分光マッピング解析を試みた。D 標識グルコースを含む培地で *A. nidulans* を培養したとき, 還元型シトクロム *b/c* や脂質などを含む多種分子全体の分布を可視化することに成功した。特に, D 標識グルコースの分布は菌糸先端の縁に沿って局在していた。この局在は D 標識グルコースがグルコーストランスポーター等により菌糸先端から選択的に取り込まれたことを示唆する。一方, ¹³C 標識グルコースを用いた実験では, 培養時間の経過に伴い ¹³C をもつシトクロムが徐々に観測された。この ¹³C-シトクロムは ¹³C 標識グルコースの代謝によって生合成されたものである。またシトクロムはミトコンドリアに多く含まれているが, それはグルコース濃度の高い菌糸先端の縁よりも内側に多く分布していた。この結果は, 菌糸先端内部に ATP などのエネルギー源が豊富に存在することを示唆する。さらに, 菌糸先端は ¹²C や ¹³C をもつ有機分子の総数も多く, 酵素群が多量に存在することから, 代謝活性が高いと解釈できる。したがって, 先端部では生長に必要な物質が活発に合成されることで菌糸が生長すると推測される。以上より, 本研究で我々はラマン分光法が菌糸生長機構の理解に対して新たな視点から迫る有効なアプローチとなりうることを実証した。

Simultaneous Raman spectroscopic mapping analysis of multiple molecular species involved in glucose metabolism in fungal tips

Mitsuru Yasuda¹, Norio Takeshita², Shinsuke Shigeto¹

(¹Sch. Sci. Tech., Kwansai Gakuin Univ., ²Faculty Life and Environ. Sci., Univ. of Tsukuba)

P-83

Totivirus によるイネいもち病菌の物質産生の活性化

二宮章洋¹, 浦山俊一^{1,2}, 藤晋一³, 森山裕充⁴, 萩原大祐^{1,2} (¹筑波大・生命環境, ²筑波大・MiCS, ³秋田県大・生物資源科学, ⁴農工大院・農)

【目的】糸状菌のゲノム中には、通常の培養条件では発現しない二次代謝産物の生合成遺伝子(休眠遺伝子)が多く含まれている。これら休眠遺伝子の活性化は新たな有用物質の発見に繋がると期待されており、二次代謝活性化因子や異種発現系を用いて休眠遺伝子を発現させる手法が考案されてきた。我々は休眠遺伝子活性化をもたらす内在性因子として、長い進化の過程で糸状菌と共存を続けてきたウイルスに着目した。これまでに、環境中の糸状菌には高い頻度でウイルスが感染しており、一部のウイルスは宿主の形態や一次代謝に影響を与えることが報告されている。本研究では、モデルとしてイネいもち病菌 (*Magnaporthe oryzae*) を用いて、ウイルスが宿主の物質産生に与える影響を明らかにすることを目的とした。

【方法と結果】4種のウイルスが重感染したイネいもち病菌 *M. oryzae* APU10-199A(Toti⁺, Chryso⁺, Partiti⁺, Narna⁺)に対してウイルスフリー化処理をおこない、Toti, および Chryso が存在しない株 APU10-199A(T⁻, C⁻, P⁻, N⁻)を得た。これら2株を様々な条件下で培養して両者の二次代謝プロファイルと比較したところ、醤油白砂糖培地中で4重感染株のみが化合物 **1** を産生することが明らかになった。次に、菌糸接合によって、多様な感染プロファイルを示す複数のウイルス再感染株を APU10-199A(T⁻, C⁻, P⁺, N⁺)株から作出した。当該再感染株について、ウイルス感染プロファイルと **1** の産生の有無を比較した結果、Chryso, Partiti, および Narna の感染は **1** の産生に影響を及ぼさず、Toti の感染が **1** の産生を誘導することが示唆された。

Totivirus-induced activation of the metabolic production by a rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*

Akihiro Ninomiya¹, Syun-ichi Urayama^{1,2}, Shinichi Fuji³, Hiromitsu Moriyama⁴, Daisuke Hagiwara^{1,2}

(¹Fac. of Life & Env., Univ. of Tsukuba, ²MiCS, Univ. of Tsukuba, ³Fac. of Biores. Sci., Akita Pref. Univ., ⁴Grad. School of Agric., TUAT)

P-84

ウシグソヒトヨタケの傘形成に関わる Ich1 メチルトランスフェラーゼの基質探索

村口元, 田村駿介 (秋田県立大・生物資源)

ウシグソヒトヨタケ(*Coprinopsis cinerea*)の傘組織が形成されない発生突然変異体 (*ichijiku*) の原因遺伝子 *ich1* がコードしているタンパク質 (Ich1) は DNA 結合ドメインと α -メチルトランスフェラーゼ (oMT) ドメインを有している。Ich1 相同タンパク質は、担子菌類に広く保存されており、子実体形成の初期過程で重要な働きを担っていると思われる。本実験では、まず、His6-Tag や Halo-Tag を連結した Ich1 タンパク質を出芽酵母で発現させて、精製を試みている。*ich1-1* 突然変異体では、Ich1 タンパク質が作られていないために、Ich1-oMT の基質が蓄積しているものと予想し、*ich1-1* 突然変異体の傘組織のない子実体原基を集めてメタノール抽出や水抽出で基質含有候補液を調製した。Ich1-oMT のメチル基供与体は S-adenosyl methionine (SAM) であると思われるので、基質含有候補液中に基質があれば、Ich1-oMT が働いて、基質にメチル基が付加されるとともに、SAM からメチル基が取れた S-adenosyl homocysteine (SAH) が生成すると予想し、SAH 量の増加によって、Ich1-oMT 活性を測定できると考えた。そこで、種々の SAH 測定キットを使い、精製した Ich1 に SAM と基質含有候補液を加えた際に、SAH 量が増えるかどうかと調べようとしている。Coupling 酵素によって、SAH から ADP, ATP を作り、ルシフェリン・ルシフェラーゼによる発光を測定する系では、基質含有候補液中に、SAH や ADP が存在すると思われるため、Background の発光があるものの、精製した Ich1 酵素を添加したときに発光量は増加した。今後は、基質含有候補液を分画し、発光量増加を引き起こす成分を特定し、その中から Ich1 酵素の基質 (メチル基受容体) を特定していく予定である。

A search of a substrate of Ich1 o-methyltransferase of *Coprinopsis cinerea*

Hajime Muraguchi, Shunsuke Tamura

(Dept. of Bioresource, Akita Pref. Univ.)

P-85

糸状菌 *Acremonium persicinum* におけるシデロフォア型抗真菌化合物 ASP2397 の生産機構の解析

浅井良樹¹, 西村慎一^{1,2}, 平塚知成³, 河村優美³, 吉田稔^{1,2,3} (¹東大院農, ²東大 CRIIM, ³理研 CSRS)

微生物や植物は環境中から鉄を獲得するためにシデロフォアと呼ばれる低分子のキレーターを分泌する。細胞外に放出されたシデロフォアは三価の鉄をキレートし、トランスポーターにより細胞内に取り込まれ、細胞内で鉄を遊離する。ASP2397 は糸状菌 *Acremonium persicinum* MF-347833 が産生する、強力な抗真菌活性を持つ環状ヘキサペプチドである。その化学構造は糸状菌シデロフォアであるフェリクロームに酷似しており、異種真菌のシデロフォア輸送システムをハイジャックすることで細胞内に取り込まれ、殺菌活性を發揮していると予想される。ところが生産者も糸状菌であり、その生産調節機構や生理機能に興味を持たれる。本研究では ASP2397 の生合成遺伝子と自己耐性遺伝子の探索を行った。

まず ASP2397 の麹菌 *Aspergillus oryzae* に対する感受性を種々の培地を用いて試験したところ、鉄飢餓条件下でのみ生育阻害を示した。ところが *A. persicinum* MF-347833 には生育阻害を示さなかった。次に ASP2397 の産生条件を検討したところ、鉄飢餓条件下で ASP2397 が産生され、その多くが菌体外に分泌されていた。このとき ASP2397 を合成すると予想される非リボソームペプチド合成酵素(NRPS)の転写量は、鉄飢餓でない条件下での培養と比較して約 100 倍に上昇していた。興味深いことに当該 NRPS の周辺に存在する遺伝子の転写も鉄飢餓条件下で増加することが明らかになりつつある。現在、推定生合成遺伝子の破壊とトランスクリプトーム解析を計画しており、それらも合わせて発表する予定である。

Analysis of Biosynthesis Regulation of Siderophore-type Antifungal Agent ASP2397 Produced by Filamentous Fungus *Acremonium persicinum*

Yoshiki Asai¹, Shinichi Nishimura^{1,2}, Tomoshige Hiratsuka³, Yumi Kawamura³, Minoru Yoshida^{1,2,3}

(¹Dept. Biotechnol., ²CRIIM, The Univ. of Tokyo, ³RIKEN CSRS)

P-86

Aspergillus terreus のイタコン酸生産性に与える因子についての研究

柿崎徹也¹, 南智之¹, 浜田勇和¹, 江場祐貴², 林大三², 吉川侑太郎², 金政真^{1,2} (¹中部大院・応生, ²中部大・応生)

イタコン酸は、合成樹脂や接着剤等の工業原料として幅広く利用されている有機酸であり、工業生産にはもっぱら *A. terreus* が使用されている。我々は、これまでに本菌においてイタコン酸はシス・アコニット酸を基質としてシス・アコニット酸デカルボキシラーゼ (CAD) により生成されることを明らかにした。本菌のイタコン酸生産性は培地の pH, 金属イオンや塩類の濃度に影響されることが知られている。同属の *A. niger* では鉄イオン濃度を制限した培地においてクエン酸を多量に生産するが、鉄イオンの欠乏時にこれをキレートして効率よく細胞内に取り込むためであると考えられている。しかし、本菌を含めイタコン酸の生物学的機能は未解明である。そこで本研究では、イタコン酸がキレート剤として機能していると仮定し、金属イオンのイタコン酸生産性への影響を調べた。また、本菌のイタコン酸高生産性変異株の解析も行った。

本菌を、鉄や銅、コバルトを含む培地にて培養し、高速液体クロマトグラフィーを用いて培養液のイタコン酸濃度を定量した。その結果、本来イタコン酸の生産性が大幅に低下する中性条件において、コバルトイオンが存在する条件では培養液のイタコン酸濃度が増加した。また、野生株とイタコン酸高生産性変異株のゲノムを次世代シーケンサーにて比較解析したところ、クエン酸回路の代謝酵素遺伝子に変異があったことから、現在生化学的な解析を試みていることについて報告する。

Study on factors affecting itaconic acid productivity in *Aspergillus terreus*

Tetsuya Kakizaki¹, Tomoyuki Minami¹, Hayato Hamada¹, Yuki Eba², Daizo Hayashi², Yutaro Yoshikawa², Shin Kanamasa^{1,2}

(¹Grad. Sch. Biosci. Biotech. Chubu Univ., ²Col. Biosci. Biotech. Chubu Univ.)

P-87

Aspergillus nidulans の二次代謝とオルニチン代謝間における関連性解析

門岡千尋^{1,2}, 浅井禎吾³, 森一樹⁴, 奥津果優², 吉崎由美子^{1,2}, 高峯和則^{1,2}, 後藤正利^{1,5}, 玉置尚徳^{1,2}, 二神泰基^{1,2} (¹鹿児島大・連農, ²鹿児島大・農, ³東京大・総合文化, ⁴鹿児島高専・専攻科, ⁵佐賀大・農)

Aspergillus nidulans において、生育遅延と共に二次代謝が変化した株を取得し解析したところ、その原因がオルニチンカルバモイルトランスフェラーゼをコードする *argB* 遺伝子の変異 (*argB^{mut}*) である可能性を見出した。*ArgB* は、オルニチンからアルギニンの前駆体であるシトルリンの合成反応を触媒する酵素である。*argB^{mut}* は、1038 番目の G が A に変異し、活性中心のコード領域より上流に終止コドンが出現していた。

A. nidulans に *argB^{mut}* を導入した株 (*argB^{mut}* 株) は、アルギニン未添加培地において野生型の *argB* をもつコントロール株 (*argB^{wt}* 株) と比べて生育遅延を示すもののコロニーを形成した。一方、*argB^{mut}* の変異により生じた終止コドンよりも下流から本来の終止コドンまでを欠損させた株は、アルギニン未添加培地においてコロニーを形成しなかった。この結果から、*argB^{mut}* は機能を完全には失っておらず、変異により生じた終止コドンがリードスルーされることで低発現した可能性が考えられた。次に、二次代謝物を LC-MS/MS により解析した結果、*argB^{mut}* 株は *argB^{wt}* 株と比較してステリグマトシスチンの生産量が約 3% に低下し、オルセリン酸の生産量が約 8 倍増加した。さらに、*ArgB* の基質であるオルニチンの添加培地で培養した場合、*argB^{wt}* 株においても、ステリグマトシスチンの生産量が約 30% に低下し、オルセリン酸生産量が約 8 倍増加した。これらの結果より、オルニチンの蓄積が二次代謝に影響することが考えられ、*argB^{mut}* 株は *ArgB* の機能低下によりオルニチンが蓄積したために二次代謝生産が変化したと推察した。

Analysis of relationships between secondary metabolism and ornithine metabolism in *Aspergillus nidulans*

Chihiro Kadooka^{1,2}, Teigo Asai³, Kazuki Mori⁴, Kayu Okutsu², Yumiko Yoshizaki^{1,2}, Kazunori Takamine^{1,2}, Masatoshi Goto^{1,5}, Hisanori Tamaki^{1,2}, Taiki Futagami^{1,2}

(¹Unit. Grad. Sch. Agric. Sci. Kagoshima Univ., ²Fac. Agric., Kagoshima Univ., ³Grad. Sch. Arts & Sci., Univ. of Tokyo., ⁴Nat. Inst. Tech. Kagoshima Col., ⁵Fac. Agric., Saga Univ.)

P-88

糸状菌が生産する適合溶質に関する研究

榑野準希¹, 村田紋奈¹, 山下暁史¹, 山口大輝¹, 佐藤龍一², 小島千怜², 土谷敬多郎², 堤内要^{1,2}, 金政真^{1,2} (¹中部大院・応生, ²中部大・応生)

浸透圧ストレスは塩などが高濃度の環境や低水分活性環境に生物が暴露されることによって引き起こされ、細胞外に水が移動すると同時にホメオスタシスに必要な無機イオンの流出を促し、死に至らしめる。これを防ぐため、生物は様々な適合溶質 (compatible solute) を細胞に蓄積することで浸透圧耐性を実現している。原核生物では、好塩細菌 *Ectothiorhodospira halochloris* 等においてエクトイン (1,4,5,6-tetrahydro-2-methyl-4-pyrimidinecarboxylic acid) が適合溶質として知られている。エクトインは細胞外の塩濃度依存的に細胞内に蓄積されることで浸透圧耐性に貢献している。また、タンパク質や核酸等の生体高分子を安定化して細胞を保護する。エクトインは多くの細菌で報告されているが、糸状菌を含め真核微生物にエクトインは存在しないと考えられてきた。また、エクトインはその特性を活かして、タンパク質安定剤や化粧品添加物などに応用されている。我々は真核微生物の代謝物解析に取り組み、エクトインの存在を確認したことを発表する。

イタコン酸やスタチンの生産糸状菌である *Aspergillus terreus* の菌体を回収し、CE-MS により網羅的代謝物解析を行ったところ、真核微生物として初めてエクトインを発見した。高感度分析するために、重水素化したエクトインを新たに合成して LC-MS/MS 分析を試みた。日本酒や味噌などの和食に不可欠な麴の生産に用いられる麴菌 *Aspergillus oryzae* や酵母等についても並行して分析したので、併せて報告する。

Study on compatible solute produced by filamentous fungi

Junki Nagino¹, Ayana Murata¹, Akifumi Yamashita¹, Daiki Yamaguchi¹, Ryuichi Sato², Chisato Kojima², Keitaro Tsuchiya², Kaname Tsutsumiuchi^{1,2}, Shin Kanamasa^{1,2}

(¹Grad. Sch. Biosci. Biotech. Chubu Univ., ²Col. Biosci. Biotech. Chubu Univ.)

P-89

空間的・代謝的相互作用を介した細菌-糸状菌の新規相利共生戦略

久知良桃花¹, Gayan Abeysinghe¹, 榎尾俊介^{2,3}, 萩原大祐^{2,3}, 高谷直樹^{2,3}, 野村暢彦^{2,3}, 尾花望^{3,4}, 竹下典男^{2,3} (¹筑波大院・生命環境, ²筑波大・生命環境系, ³筑波大学・微生物サステイナビリティ研究センター, ⁴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、糸状菌及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。糸状菌用の固体最少培地上での共培養の様子を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・増殖する様子が観察され、菌糸の伸長に伴って *B. subtilis* が存在空間を拡大することが明らかとなった。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* のチアミン合成遺伝子欠損株 ($\Delta thiA$) と *B. subtilis* を共培養したところ、*A. nidulans* $\Delta thiA$ の生育阻害が *B. subtilis* により相補された。また、LC-MS-MRM 解析により、培養上清中および菌体中のチアミン量を測定したところ、*B. subtilis* が生産したチアミンを *A. nidulans* が取り込むことが示唆された。以上より、*B. subtilis* が *A. nidulans* の菌糸に沿って移動するという空間的相互作用と、*B. subtilis* が *A. nidulans* にチアミンを供給するという代謝的相互作用の両者によって、細菌・糸状菌複合体が生存空間と栄養を獲得するための新たな相利共生を生み出すことが明らかとなった。

A novel mutualism strategy between bacteria and fungi via spatial and metabolic interactions

Momoka Kuchira¹, Gayan Abeysinghe¹, Shunsuke Masuo^{2,3}, Daisuke Hagiwara^{2,3}, Naoki Takaya^{2,3}, Nobuhiko Nomura^{2,3}, Nozomu Obana^{3,4}, Norio Takeshita^{2,3}

(¹Grad. Life Environ. Sci., ²Fac. Life Environ. Sci., ³MiCS., ⁴TMRC Fac. Medicine., Univ. Tsukuba)

P-90

イチゴ炭疽病菌に感染するビクトリウイルスの全塩基配列の解析

岡田亮¹, 宮本拓也¹, 林可奈子¹, 小河原孝司¹, 森山裕充² (¹茨城農総セ・園研, ²農工大・農)

生物防除資材としての利用を目指して、イチゴの最重要病害の1つである炭疽病を引き起こす *Colletotrichum fructicola* より、二本鎖 RNA (dsRNA) を指標にマイコウイルスを探索した。その結果、菌株 IbSTR17007-1 から、約 5.0 kbp と約 2.4 kbp の 2 成分の dsRNA が見つかった。約 2.4 kbp の dsRNA は *C. fructicola* で多く感染が見られるミトウイルスであると考えられた。約 5.0 kbp の dsRNA は未知のウイルスであることが予想されたため、精製 dsRNA を鋳型として cDNA を合成し塩基配列を決定したところ、GC 含量が 60.1% で poly A 配列のない全長 5,165 塩基のウイルス様配列が得られた。同一フレーム上に連続して 2 つの ORF が見つかり、ORF1 は 757 アミノ酸からなる 80.4 kDa のタンパク質を、ORF2 は 837 アミノ酸からなる 91.8 kDa のタンパク質をコードしていることが示唆された。5'UTR は 313 nt, 3'UTR は 70 nt であった。BLAST サーチの結果、ORF1 はトチウイルスの外被タンパク質 (CP) モチーフが見つかり、*Tolypocladium cylindrosporum virus 1* (TcV1) と 80.6%、*Colletotrichum eremochloae totivirus 1* (CeTV1) と 73.4% の配列同一性を有していた。ORF2 は RNA 依存 RNA 合成酵素 4 (RdRp) のモチーフが見つかり、TcV1 と 69.5%、CeTV1 と 54.8% の配列同一性を有しており、いずれの ORF も芝草の炭疽病菌である *C. eremochloae* に感染する CeTV1 よりもダニの病原菌である *T. cylindrosporum* に感染する TcV1 に近縁であった。CP および RdRp の分子系統解析により、本ウイルスは dsRNA ウイルスのトチウイルス科ビクトリウイルス属のウイルスであることが示唆された。*C. fructicola* からのビクトリウイルスの報告は初めてであるため、本ウイルスを *Colletotrichum fructicola victorivirus 1* と命名したい。

Complete sequence of a victorivirus infecting the strawberry anthracnose fungus, *Colletotrichum fructicola*

Ryo Okada¹, Takuya Miyamoto¹, Kanako Hayashi¹, Takashi Ogawara¹, Hiromitsu Moriyama²

(¹Hort. Res. Inst., Ibaraki Agri. Cen., ²Fac. of Agri., Tokyo Univ. of Agri. and Tech.)

P-91

タンパク質合成阻害剤により生産誘導されるイネいもち病菌二次代謝産物の生理機能解析

古山祐貴^{1,2}, 本山高幸², 鎌倉高志¹, 長田裕之² (¹東理大院・応用生物, ²理研 CSRS・ケミカルバイオロジー)

【背景】当研究室での糸状菌二次代謝活性化化合物の探索過程において、タンパク質合成阻害剤である hygromycin B を致死濃度以下で処理することによりイネいもち病菌において pyriculol 類の生産が誘導されることが見いだされた。Pyriculol 類の生理機能は未だ不明である。生理機能解析の端緒として、いつ、どのようにして pyriculol 類が生産されているのかを解明するために、我々はこれまで pyriculol 類の生合成遺伝子の解析を行ってきた。一方で、hygromycin B が放線菌の生産物であることから、いもち病菌-放線菌間相互作用への pyriculol 類の関与が期待された。そこで今回は実際に放線菌によって pyriculol 類の生産が誘導されるのかを検証し、それらが放線菌との相互作用においてどのような役割を果たすのか解析を行った結果を報告する。

【方法・結果】 Hygromycin B と同様にタンパク質合成阻害剤である cycloheximide がイネいもち病菌の pyriculol 類生産を誘導することが確認されたため、cycloheximide 生産菌でありモデル放線菌である *Streptomyces griseus* を以降使用した。FDY 液体培地における *S. griseus* との混合培養によりイネいもち病菌の pyriculol 類生産が誘導されたことから、*S. griseus* が実際に pyriculol 類の生産を誘導することが示された。次に、イネいもち病菌において pyriculol 類生合成に必須である PKS 遺伝子の破壊株 ($\Delta pyr1$ 株) を用いて、PDA 培地にて *S. griseus* との対置培養を行った。野生型株の場合と比較して、 $\Delta pyr1$ 株では *S. griseus* に対する生育阻害作用の緩和が認められた。また、培地抽出液を分析した結果、野生型株の場合でのみ pyriculol 類の生産が確認された。これらのことから、pyriculol 類が *S. griseus* に対し生育阻害活性を有することが示唆された。

Functional analysis of secondary metabolites of the rice blast fungus induced by protein synthesis inhibitors

Yuuki Furuyama^{1,2}, Takayuki Motoyama², Takashi Kamakura¹, Hiroyuki Osada²

(¹Tokyo Univ. of science, ²Chem. Biol., RIKEN CSRS)

P-92

シロイヌナズナ表皮葉緑体の移動は炭疽病菌の付着器侵入に対する抵抗性に関与する

入枝泰樹¹, 高野義孝² (¹信大・学術院農, ²京大・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する病原糸状菌である。我々は、シロイヌナズナに感染できない不適応型炭疽病菌を接種した際に、表皮細胞の葉緑体が表層側に出現する現象 (表皮葉緑体応答) を発見している。昨年度の大会では、炭疽病菌の付着器侵入に対して抵抗性が低下する *pen2* 変異体で本応答が強くなること、および葉肉細胞葉緑体の光定位運動関連因子 CHUP1 が本応答を負に制御し、付着器侵入に対する抵抗性に関与することを報告した。今回、光定位運動の別の制御因子 *JAC1* について追加解析を実施した。その結果、*jac1* 変異体が野生型植物と同程度の表皮葉緑体応答を示す一方で、*JAC1* 過剰発現体は、*chup1* 変異体と同様に、常に表皮葉緑体が表層側で観察される表現型を示した。これらの結果は、表皮葉緑体応答が細胞内移動に起因することを強く示唆する。また、本応答の誘導には炭疽病菌の付着器を介した貫穿糸形成が必須であることを見出していたため、貫穿糸突出孔に集積する分泌型感染因子 (エフェクター) の蛍光レポーター株を用いて、炭疽病菌の細胞外分泌活性と表皮葉緑体応答の関係を解析した。その結果、*pen2* 変異体上では貫穿糸突出孔へのエフェクター集積が野生型植物より強いことが明らかとなった。さらに、炭疽病菌の細胞外分泌活性が低下した変異株は、貫穿糸突出孔におけるエフェクター集積の低下とともに表皮葉緑体応答の誘導能低下を示した。以上より、シロイヌナズナの表皮細胞では、不適応型炭疽病菌の貫穿糸分泌物に応答して葉緑体が移動し、侵入抵抗性に寄与する可能性が考えられた。

Epidermal chloroplast movement is involved in resistance to appressorium-mediated invasion by *Colletotrichum* fungi in *Arabidopsis thaliana*

Hiroki Irieda¹, Yoshitaka Takano²

(¹Acad. Assembly, Inst. Agric., Shinshu Univ., ²Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

P-93

FLDS 法によるヒト病原糸状菌に潜伏する RNA ウイルスの網羅的探索

千葉悠斗¹, 浦山俊一^{2,3}, 矢口貴志⁴, 萩原大祐^{2,3,4} (筑波大院・生命環境,²筑波大・生命環境系,³筑波大・MiCS,⁴千葉大・真菌セ)

菌類には広く RNA ウイルスが感染しており, NGS 解析の普及に伴い, その多様性の理解は大きな進展を見せている。植物病原菌には, 宿主の病原性を低下させるウイルスの存在が知られており, 新たな植物防除法の確立を目指し, 精力的に RNA ウイルスの探索が行われてきた。一方, ヒト病原糸状菌では NGS を用いた大規模なウイルス探索は行われておらず, RNA ウイルスの多様性や病原性との関連に関する理解は限られている。そこで本研究では, ヒト病原菌 *Aspergillus fumigatus* とその近縁種計 156 株を対象に, NGS を用いた大規模な RNA ウイルス探索を進めた。従来の RNA-seq 解析では原理上検出できないウイルス遺伝子も検出可能な fragmented and primer ligated dsRNA sequencing (FLDS)法を用い, より深度のある探索を行った。

探索の結果, 感染株 17 株から 12 種の RNA ウイルスを見出した。そのうちの 8 種のウイルスは複製酵素 (RdRp) のアミノ酸配列相同性から新規ウイルス種であると推定された。その中には, 既存の科(ウイルスの高次分類区分)に属しないと考えられる新規性の高いウイルスも含まれていた。これに加えて, 既知ウイルスであっても従来の探索では見逃されてきたウイルス遺伝子が検出されており, 当該ウイルスが属するウイルス科のゲノム進化を考察する手がかりを得た。以上のことから, 本研究ではヒト病原糸状菌における RNA ウイルス多様性の理解を拡張した。この知見は菌類ウイルスについては RNA ウイルスの多様性や進化の理解に貢献することが期待される。今後は取得したウイルス感染株を用いて, その機能の解析を行う予定である。

RNA virus diversity in human pathogenic fungi revealed by a comprehensive non-retro RNA virus surveillance method.

Yuto Chiba¹, Syun-ich Urayama^{2,3}, Takashi Yaguchi⁴, Daisuke Hagiwara^{2,3,4}

(¹Grad. Life Environ. Sci., ²Fac. Life Environ. Sci., ³MiCS, Univ. of Tsukuba., ⁴MMRC, Chiba Univ.)

P-94

ウリ類炭疽病菌のアルギニン生合成遺伝子 ARG5,6 は病原性と防御応答の回避に関与する

前島孝年司, 藤井聡, 小玉紗代, 久保康之 (京府大院・生環)

植物病原糸状菌のアルギニン生合成能が病原性に関与することが報告されているが, 感染時にアルギニンが果たす役割については知られていない。我々はウリ類炭疽病菌の病原性欠損株 fa3822 を取得し, その変異遺伝子として出芽酵母のアルギニン生合成遺伝子 ARG5,6 と相同性を示す ARG5,6 を同定した。本研究ではアルギニン生合成が関与する病原性発現メカニズムを解明することを目的として ARG5,6 の機能解析を行った。

arg5,6 破壊株は生育にアルギニン要求性を示し, ARG5,6 がアルギニン生合成に関与することが確認された。宿主葉上で arg5,6 破壊株は付着器を形成したが, 宿主侵入に欠損を示し, 病斑を形成しなかった。また, セルロース膜上においても侵入菌糸伸長に遅延が見られた。これらのことから, arg5,6 破壊株はアルギニン欠乏により感染行動が抑制された可能性が考えられた。次に, arg5,6 破壊株は有傷葉でほとんど病斑を形成しなかった一方で, 熱処理により防御応答を攪乱した有傷葉では病原性を強く示した。さらに, 宿主防御応答により生成されることが知られている活性酸素 H₂O₂ に対する感受性を検討した結果, arg5,6 破壊株は野生株よりも強い感受性を示した。また, 野生株はアルギニン添加により H₂O₂ 耐性が増大した。これらの結果から, arg5,6 破壊株の宿主内伸展は宿主防御応答により抑制されており, 本菌はアルギニンを利用して活性酸素に対する耐性を高めている可能性が考えられた。以上より, ARG5,6 は本菌の感染時に必要なアルギニン生合成および宿主内伸展時に宿主防御応答の回避に関与することが示唆された。

An arginine biosynthetic gene ARG5,6 is involved in pathogenesis and avoidance of host defence responses in *Colletotrichum orbiculare*.

Takatoshi Maejima, Satoshi Fujii, Sayo Kodama, Yasuyuki Kubo

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

P-95 (O-8)

生態系における糸状菌・細菌の相互作用

工藤凱門, Gayan Dakshitha, 梶尾俊介, 高谷直樹, 竹下典男 (筑波大・生命環境系・MiCS)

多種多様な微生物は、様々な環境に普遍的に存在し、生態系サービスや農業などにおいて重要な役割を果たしている。土壌中において糸状菌と細菌は主要な微生物であり、相互に影響を与えながらその機能を発揮していることが明らかになっている。土壌のように水分の限られた環境中では、糸状菌の菌糸の上を細菌が移動し、菌糸は細菌の道として利用されることが知られている (Fungal highway)。糸状菌・細菌間の相互作用を解明することは、これら生態系での役割の理解とこれらの利用制御に繋がる。本研究は、生態系における糸状菌と細菌の相互作用とその役割を明らかにすることを目的とする。まず、土壌に生存することが知られる糸状菌 40 種と細菌 30 種を選抜し、それぞれの組み合わせの共培養を解析することで、糸状菌・細菌の相互作用における親和性の違いや多様性を検討した。表現型の特徴的な組み合わせについては、質量分析により産生物質の違いを解析している。また、環境土壌サンプルから、糸状菌の菌糸上を細菌が移動しているものをスクリーニングした。現在までに、8 組の糸状菌・細菌の組み合わせを得ており、そのうち 4 組では共培養により糸状菌の生長が促進された。このうち 1 組はチアミンを介した相利共生が予想され、残りの 3 組はチアミン以外の物質を介して糸状菌の生長を促進していることが示唆された。今後、トランスクリプトーム解析と質量分析解析により、両者の相互作用に関わる物質を探索する。

Fungal-bacterial interactions in ecosystems

Gamon Kudo, Gayan Dakshitha, Shunsuke Masuo, Naoki Takaya, Norio Takeshita

(MiCS, Univ. of Tsukuba)

P-96

生立木が生産する生体防御物質に対する病原性木材腐朽菌の分解メカニズムの解析

松本壘¹, 堀千明¹, 宮本敏澄², 重富健吾², 佐野雄三², 大井俊彦¹, 松本謙一郎¹ (¹北大院工, ²北大院農)

ベッコウタケ(*Perenniporia fraxinea*, Pfr)は生立木(生きた樹木)に寄生することができる珍しい木材腐朽菌である。一方、多くの木材腐朽菌は、生立木による生体防御が働くため寄生できないと考えられている。生立木は菌の侵入に対して、自らの細胞の中にポリフェノールなどの植物防御物質を蓄積し、反応帯と呼ばれる組織を形成する。本研究では、植物生体防御物質の同定とこれら物質が Pfr の菌糸成長および分解酵素生産へ及ぼす影響を明らかにし、木材腐朽菌と植物の間に存在する相互関係の一端を解明する事を目的とした。

Pfr 感染例の多いニセアカシアに反応帯を形成させ、70%アセトンで抽出を行った。HPLC を用いて反応帯抽出物を解析したところ、加水分解性タンニン的一种であるタンニン酸の増加がみられた。反応帯抽出物とタンニン酸をプレート上のディスクに滴下し、菌の生育を観察した。生立木に感染しないと考えられている *Phanerochaete chrysosporium* (Pch)が反応体抽出物から成長阻害を受けた一方、Pfr はどちらの条件においても菌糸を成長させた。Pfr が反応体抽出物およびタンニン酸に対する耐性があることが示唆された。耐性に寄与する酵素を探索するため、タンニン酸を添加して液体培養を行い、Pfr の菌体外酵素についてプロテオーム解析を行った。その結果、タンニン酸濃度の増加とともにラッカーゼの発現の上昇がみられ、ラッカーゼの関与が示唆された。ラッカーゼとタンニン酸の反応の解析を行うため、菌体外酵素または市販ラッカーゼとタンニン酸を *in vitro* の系で反応させると、どちらにおいても難溶性の沈殿が生じた。以上より、ニセアカシアが防御物質として生産するタンニン酸に対して Pfr 由来のラッカーゼが無毒化に関与していると予測された。

Molecular mechanism of detoxifying defensive substances in biological defense of living tree by wood pathogen

Ruy Matsumoto¹, Chiaki Hori¹, Toshizumi Miyamoto², Kengo Shigetomi², Yuzou Sano², Toshihiko Ooi¹, Ken'ichiro

Matsumoto¹

(¹Hokkaido Univ. Dept Eng., ²Hokkaido Univ. Dept. Agr.)

P-97 (O-7)

Investigation of the relationships between the genetic diversity and the heterogeneity of adaptation pattern in *Aspergillus fumigatus*

Cai Bian¹, Yoko Kusuya¹, Daisuke Hagiwara², Akira Watanabe¹, Hiroki Takahashi^{1,3}

(¹MMRC, Chiba Univ., ²Life Env. Sci., Univ. Tsukuba, ³MCRC, Chiba Univ.)

Aspergillus fumigatus is a major cause of invasive fungal infection in human being. It is considered that the adaptation ability of *A. fumigatus* could be involved in the pathogenicity. We previously investigated clinical strains isolated from eleven patients, and confirmed the phenotypic changes during the infection such as antifungal resistance and cell wall integrity. Interestingly, 40% and 60% of the isolates showed higher and lower tolerance to cell wall stress, respectively, compared with the previously isolated strain, which suggested that the adaptation trajectory during infection was heterogeneous. Also, we didn't find conserved genetic variants like SNPs raised during the infection among strains investigated. Here the phylogenetic analysis based on the whole genome SNPs was performed to address the relationships between the genomic background and adaptation patterns of the strains. Our study is expected to contribute to the characterization and genetic mechanism of the adaptation of *A. fumigatus* in human lung.

P-98

ウリ類炭疽病菌のII型ホスファチジン酸ホスファターゼ *CoPAP2* は細胞壁ストレス応答および病原性に関与する

小玉紗代¹, 榎谷美衣奈¹, 竹山さわな¹, 豊田裕実¹, 西内巧², 久保康之¹ (¹京府大院・生環, ²金沢大・学際センター)

これまでにウリ類炭疽病菌の病原性因子 Type II phosphatidate phosphatase *CoPAP2* が宿主防御応答の回避に関与することを報告した。*CoPAP2* は出芽酵母の小胞体におけるタンパク質の N-グリコシル化に必要な脱リン酸化酵素 *Cax4* と相同性を示したことから, まず *CoPAP2* の細胞内局在を観察した。その結果, *CoPAP2* は小胞体マーカーと共局在を示し, 小胞体膜で機能することが示された。さらに, *CoPAP2* の脂質リン酸結合モチーフのアミノ酸点変異株は *copap2* 破壊株と同様に病原性が低下した。従って, このモチーフは *CoPAP2* の病原性における機能に必要であり, *CoPAP2* が脂質脱リン酸化酵素として機能する可能性が示唆された。次に, 付着器侵入時のトランスクリプトーム解析を行った結果, *copap2* 破壊株では WSC (cell wall integrity and stress response component) ドメインを持つ遺伝子の発現が抑制されていた。WSC は他菌において細胞壁完全性およびストレス応答への関与が報告されており, *CoPAP2* が付着器侵入時のストレスに応じた細胞壁再構成に寄与する可能性が考えられた。そこで, 細胞壁成分に結合するカルコフロールホワイトおよびコンゴレッドに対する感受性を評価した。その結果, *copap2* 破壊株は野生株よりも高い感受性を示した。以上より, *CoPAP2* は細胞壁ストレスに応じた本菌の細胞壁修飾への関与を介して病原性に寄与している可能性が示唆された。

Type II phosphatidate phosphatase *CoPAP2* is involved in cell wall stress response and pathogenesis of *Colletotrichum orbiculare*

Sayo Kodama¹, Miina Sakakiya¹, Sawana Takeyama¹, Yuumi Toyoda¹, Takumi Nishiuchi², Yasuyuki Kubo¹

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

P-99

Aspergillus fumigatus 銅耐性株の取得とその特性解析

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および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* が宿主へ持続的に感染するためにも、宿主内の銅濃度を感知し、細胞内の銅濃度を恒常的に維持する必要があると考えられている。我々は、銅恒常性機構に迫るために、臨床分離株の中から、銅感受性株を選抜した。次に、それらを材料として、高濃度の銅環境下での継代培養を実施し、銅耐性を示す株の作出を試みた。その結果、高濃度の銅を添加した培地上で、多くの株において生育または孢子形成能の増加が観察され、銅耐性株へと変化していることが示された。これまでの研究により、*A. fumigatus* においても適切な量の銅が必要とされ、過不足の状態では生育および孢子形成に大きく影響することが明らかとなっている。今回得られた耐性化株は、栄養豊富で銅をほとんど含まない PDA 培地においても、生育速度や孢子形成能の変化が観察され、銅恒常性機構に変化が生じたと考えられる。長期培養によって生じた形質の変化を調べるとともに、銅耐性化前後での RNA-seq によって、どのような遺伝子群が変化したのかの解析をすすめた。本発表では、これらのデータから得られた知見を報告したい。

Isolation and characterization of copper-resistant strain from *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-100 (O-6)

ウリ類炭疽病菌の病原性に関与する転写因子遺伝子 *CoCYS3* の機能解析

森瑞希, 小玉紗代, 久保康之 (京都府立大・生命環境)

植物病原糸状菌においていくつかの転写因子は、宿主への感染行動に関わる遺伝子の発現を制御することによって、宿主への感染に重要な役割を果たしているが、病原性に関与する転写因子の機能解析は十分ではない。本研究では、ウリ科植物に壊死病斑を引き起こすウリ類炭疽病菌において病原性に関与する新規転写因子を探索するために、病原性欠損変異株 PDM-13 の変異遺伝子として regulatory protein cystathionine gamma-lyase3 をコードする *CoCYS3* を同定した。*CoCYS3* には、Basic leucine zipper (bZIP) ドメインが保存されており、*Neurospora crassa* において硫黄代謝酵素の転写制御に関与する *Cys-3* と相同性を示した。*CoCYS3* 破壊株を作出し、キュウリ子葉上において接種試験を行った結果、 $\Delta cocys3$ は野生株と比較して侵入菌糸形成率が低下し、病斑をほとんど形成しなかった。さらに、*CoCYS3* が付着器形成に関与するのか検討するために、セルロース膜上での付着器侵入を観察した結果、 $\Delta cocys3$ は付着器形成率、侵入菌糸形成率および侵入菌糸長が野生株と比較して低下した。以上の結果から、*CoCYS3* はウリ類炭疽病菌の病原性および侵入器官の形態形成に関与することが示唆された。

Functional analysis of a transcription factor gene *CoCYS3* involved in pathogenicity of *Colletotrichum orbiculare*.

Mizuki Mori, Sayo Kodama, Yasuyuki Kubo

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

P-101 (O-5)

青枯病菌の真菌寄生はクオラムセンシング機構によって制御される

松尾匠馬¹, 村井勇太¹, 曳地康史², 甲斐建次¹ (¹ 阪府大院・生命環境, ² 高知大・農)

植物病原細菌として有名な青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum*) は, *Fusarium* 属と *Aspergillus* 属の真菌に対して厚壁胞子を誘導し, その胞子内に寄生する。我々は, 青枯病菌が産生するリポペプチド *ralstonin* 類を単離・構造決定し, それらが真菌の厚壁胞子誘導因子であることを明らかにしている。また, 青枯病菌のナス科植物に対する病原性は, 菌密度に依存した遺伝子調節機構であるクオラムセンシング (QS) により制御されている。そこで, 青枯病菌の真菌寄生においても, QS 機構が重要な役割を担うという仮説を立て, 本研究ではこの仮説の検証を行った。

はじめに, 青枯病菌に GFP 発現ベクターを導入し, 真菌寄生率を評価できるアッセイ系を構築した。本法を用いれば, 誘導された厚壁胞子内の GFP 蛍光で寄生の有無と定量的な寄生率の算出が可能であることが分かった。続いて, 同定した *ralstonin* 類が唯一の厚壁胞子誘導因子がどうかを調べるため, 生合成遺伝子 *rmyA* の欠損株 ($\Delta rmyA$) を作製した。 $\Delta rmyA$ と *F. oxysporum* を寒天培地上で対峙培養したところ, 厚壁胞子の誘導は起こらず, 真菌寄生も確認できなかった。ここに, 精製した *ralstonin* を添加すると, 厚壁胞子誘導と真菌寄生が回復した。続いて, QS シグナル分子合成酵素遺伝子 *phcB* の欠損株 ($\Delta phcB$) と *F. oxysporum* を対峙培養したところ, 厚壁胞子形成と真菌寄生のいずれも起こらなかった。*Ralstonin* 類の産生は, QS に制御されている。そこで, *ralstonin* 類を本実験系に処理したところ, *F. oxysporum* の厚壁胞子は誘導されたが, 寄生の回復は観察されなかった。つまり, QS によって制御される *ralstonin* 類以外の因子も, 青枯病菌の真菌寄生に必須であることが示唆された。以上の結果より, 青枯病菌が真菌に寄生する過程においても, 植物感染時と同様, QS 機構が重要な役割を担うことを世界で初めて明らかにした。

Quorum sensing-dependent invasion of *Ralstonia solanacearum* into *Fusarium oxysporum* chlamydospores

Shoma Matsuo¹, Yuta Murai¹, Yasufumi Hikichi², Kenji Kai¹

(¹Osaka Prefecture University, ²Kochi University)

P-102

白癬菌が産生する抗生物質の同定とその生合成遺伝子の解析

増田圭恭¹, 二宮章洋², 矢口貴志³, 浦山俊一^{2,4}, 萩原大祐^{2,4} (¹ 筑波大院・生命環境, ² 筑波大・生命環境系, ³ 千葉大・真菌センター, ⁴ 筑波大学微生物サステイナビリティ研究センター)

病原性糸状菌の感染過程において, 宿主を覆う常在菌との接触は避けられない。しかし, 病原菌と常在菌の相互作用に関する知見は乏しい。本研究では, 白癬菌を対象に皮膚常在菌との競合に影響すると考えられる抗菌活性を示す物質を探索した。白癬の主要な起因菌 *Trichophyton rubrum* をサブロー寒天培地で3週間培養し, その培養抽出物を抗菌試験に供した結果, グラム陽性細菌および *Candida albicans* に活性を示した。抽出物からの精製および標品との比較から, 活性物質は *viomellein* であると同定した。*viomellein* は肝腎毒性, 抗グラム陽性細菌活性を示す赤色素化合物であり, 今回初めて白癬菌による産生が明らかになった。同時に, 構造的に *viomellein* に類似した *xanthomegnin* の産生も認められたが, その産生量はごくわずかであった。続いて, 白癬菌臨床株5種30株を対象に, *viomellein* の産生能を解析したところ, *Trichophyton* 属3種では産生が認められ, *Microsporum* 属2種では産生が認められなかった。

次に *viomellein*/*xanthomegnin* 生合成遺伝子の特定を目指し, 産生条件および非産生条件でトランスクリプトーム比較解析を行った。二次代謝産物の骨格遺伝子 (NRPS, PKS) のうち5つの遺伝子において, 発現と化合物産生との間に相関が認められた。そこで, CRISPER/Cas9法により候補遺伝子のノックアウトを試みたところ, *viomellein* を作らない株が複数得られた。現在これらの株の遺伝子構造を解析しており, 目的の生合成遺伝子であるか確認中である。

Identification of antibiotics produced by *Trichophyton rubrum* and analysis of the biosynthetic gene

Keisuke Masuda¹, Akihiro Ninomiya², Takashi Yaguchi³, Shun-ichi Urayama^{2,4}, Daisuke Hagiwara^{2,4}

(¹Grad. Life Environ. Sci, ²Fac. Life Environ. Sci, ³MMRC, Chiba Univ., ⁴MiCS., Univ. of Tsukuba)

P-103

トマト葉かび病菌の 2 種類の *SdhC* 変異 (T78I, N85K) と各種 SDHI 殺菌剤感受性

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

ミトコンドリア電子伝達系の複合体 II は 4 種類のコハク酸脱水素酵素サブユニット(*SdhA* から *D*)で構成されており, SDHI 剤の標的となっている。初期の SDHI 剤は担子菌専用剤であったが, 子嚢菌にも活性を示す第三世代であるボスカリドの発見が契機となり, 現在 23 種類の化合物を有する主要殺菌剤である。しかし, 多くの植物病原菌において *SdhB* に H272Y/R 変異をもつボスカリド耐性菌が出現している。同変異を持つ株に抗菌活性を示す新しい SDHI 剤が開発されているが, *SdhC* や *SdhD* にも SDHI 剤耐性変異が報告されており, 化合物の構造と交差耐性との関係に不明の点が多い。本研究では, トマトの重要病害である葉かび病菌からボスカリド耐性株が分離されたことを受け, 変異の同定を行った。ボスカリド耐性株は, 高度耐性と中等度耐性の二種類に分類された。いずれの耐性株も *SdhB* に変異は認められなかったが, *SdhC* に 2 種類のアミノ酸置換が同定された。*SdhC* の N85K 変異を持つ株は高度耐性を示し, T78I 変異を持つ株が中等度耐性を示すことが明らかになった。これらのアミノ酸置換は, 植物病原菌の圃場分離株では未報告のボスカリド耐性変異であった。そこで, 各種 SDHI 剤に対する感受性を比較したところ, N85K 変異株はフルオピラムにも耐性を示したが, T78I 変異株はフルオピラムに感受性を示した。両変異株とも第四世代の SDHI 剤といわれているイソフエタミドには感受性が認められた。

Identification of two types of SDHI-resistance mutations within *SdhC* gene in *Fulvia fulva*

Ryoko Satake¹, Kenshi Hirai¹, Hideki Watanabe², Makoto Fujimura¹

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

P-104

卵菌 *Phytophthora infestans* RIO kinase-like 遺伝子の機能解析

谷修治¹, 西尾尚堯¹, 炭谷順一¹, Howard S. Judelson², 川口剛司¹ (¹阪府大院・生環科, ²UC Riverside, USA)

【目的】卵菌 *Phytophthora infestans* が無性世代で形成する遊走子嚢は, 低温の水中で遊走子を放出する。遊走子は植物上でシストを形成し, シストから伸長した発芽管の先端に形成した付着器を介して宿主植物に感染する。我々は, この形態変化を伴った植物感染機構を解明することを目的としている。

【方法・結果】土壌より単離した放線菌の培養液から, シスト発芽を阻害する化合物として β -rubromycin を同定した。RNA seq (n=1) により β -rubromycin 存在下でシスト発芽時に発現量が変動する遺伝子を探索後, 定量 RT-PCR により遺伝子の発現量 (n=3) を解析した。発現量が変動した遺伝子の中から, serine/threonine protein kinase の RIO kinase に相同性の高い 4 種の遺伝子の発現がいずれも β -rubromycin 存在下で亢進すること, 特に PITG_04584 の発現が β -rubromycin 存在下で約 60 倍と大きく亢進することを見出した。また, RIO kinase は真核生物に広く保存されているものの, PITG_04584 の相同遺伝子は卵菌類にのみ見出されることに着目して, まず PITG_04584 の機能を解析した。PITG_04584 遺伝子の発現が亢進した高発現株, および減少したサイレンシング株を 3 株ずつ作出し, 各株における形質を観察した。いずれの株においても固体培地上での菌糸伸長, 遊走子嚢形成率に影響はなかった。一方 PITG_04584 高発現株およびサイレンシング株では, 遊走子形成時に細胞質分裂が正常に起きないこと, 膨張した形態の付着器が形成されることが観察された。また PITG_04584 高発現株では, シスト発芽率が有意に低下した。以上の結果より, PITG_04584 が低温条件下での形態形成に関与していることが遺伝学的に示された。

Functional analysis of RIO kinase-like gene in *Phytophthora infestans*

Shuji Tani¹, Naotaka Nishio¹, Jun-ichi Sumitani¹, Howard S. Judelson², Takashi Kawaguchi¹

(¹Osaka Prefecture Univ., ²UC Riverside, USA)

P-105

***Bipolaris maydis* における殺菌剤耐性関連因子 Prp24 の機能解析**

下村未紀¹, 住田卓也¹, 泉津弘佑², 田中千尋¹ (¹京大院・農, ²滋賀県大・環)

植物病原糸状菌は様々な環境ストレスに対応するために情報伝達系システムを有している。中でも、浸透圧シグナル伝達経路は一部の農薬（ジカルボキシイミド剤、フェニルピロール剤）の作用機構に関連していることが知られている。*Bipolaris maydis* が浸透圧や殺菌剤を感知し、応答する機構は、Ssk1 経路と Skn7 経路から成り立っている。当研究室では浸透圧シグナル伝達経路に関する遺伝子に変異が生じている Dic3 株を作成し、Dic3 株は Skn7 経路に関与しており、さらに Dic3 株で変異が生じている遺伝子は Prp24 である事を明らかにした。Prp24 は酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において RNA スプライシングに関わる生存に必須な遺伝子である。酵母以外の真核生物 Prp24 ホモログには HAT 配列が存在し、Dic3 株突然変異はこの HAT 配列上に存在している。しかし、ほとんどの真核生物において Prp24 の機能解析は進んでいない。そこで、本研究では *Bipolaris maydis* において Skn7 経路における Prp24 の役割を明らかにする事を目指した。

今回、Yeast-two-hybrid 法により Skn7 と Prp24 は相互作用しており、対して、Dic3 型変異を入れた Prp24 は Skn7 との結合が野生型に比べて著しく弱くなる事が明らかになった。以上より、Prp24 は高浸透圧ストレス応答や殺菌剤作用において Skn7 と結合して働いており、HAT 配列上にある Dic3 株突然変異は Skn7 との結合において重要であると考えられる。さらに、SART3(ヒト Prp24 ホモログ)と相互作用するスプライソーム構成タンパク質 Prp3 と Prp24 は相互作用する事が明らかになり、酵母やヒトと同様に *Bipolaris maydis* においても Prp24 はスプライソームに関与する事が示唆された。

Analysis of fungicide resistance-related factors Prp24 in *Bipolaris maydis*

Minori Shimomura¹, Takuya Sumita¹, Kosuke Izumitsu², Chihiro Tanaka¹

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

P-106

3D Visualization of Conidial Mitochondria of *Pyricularia oryzae*

Muhammad Akhid Syib'li, Ayumi Abe, Teruo Sone

(Graduate School of Agriculture, Hokkaido University)

Pyricularia oryzae is phytopathogenic fungi that would be able to make serious devastation not only in rice plant but also in many cereal plants. Controlling strategy using fungicide with mitochondria target such as QoI is still becoming a promising method in the field-scale application. However, in some cases currently, *P. oryzae* success to survive and thrive through mutation in the mitochondria against QoI. One of the important biological steps for the dispersion of mutants is the distribution of mutated-mitochondria into conidia. For example, if the number of mitochondria incorporated into conidia is small, there should be a strong bottle neck effect for the distribution. Therefore, it is essential to be able to visualize mitochondria accurately. Hence, we provide here the 3D visualization of the conidial mitochondrial structure of *P. oryzae*, as a result of transformation of wildtype strain using citrate synthase (CitA)-GFP and generated images by laser-scanning confocal microscopy and also Mitograph (Viana et al. 2015) software. Our result suggests that the mitochondrial morphology can be varied for baby, young and mature conidia and these 3D images still need further analysis such as quantification of mitochondrial volume.

Viana, MP, Lim S, Rafelski, SM. (2015) Quantifying Mitochondrial Content in Living Cells. In E. Paluch (Ed.), *Biophysical Methods in Cell Biology* **125**: 77-93.

P-107

Function of Regulatory Gene *LaeA* Ortholog in Appressorium Formation of rice blast fungus *Pyricularia oryzae*

Pradabrat Prajanket, Vu Thi Kim Chi, Jun Arai, Worawan Sornkom, Ayumi Abe, Teruo Sone

(Graduate School of Agriculture, Hokkaido University)

Pyricularia oryzae is the rice blast fungus that threaten global rice production in the past decades until present. A global regulator of pathogenic ascomycete fungi including rice blast fungus that has been studied extensively in secondary metabolism and morphological development is *LaeA*. However, the role of *LaeA* for appressorium formation remains unclear. In this study, we purposed to study the function of the regulatory gene, *LaeA* of *P. oryzae*. Deletion mutant, Ina86-137 $\Delta lig4\Delta laeA$ and its complementation strain were constructed and investigate the effect of *LaeA* on fungal pathogenicity. Wild type and complementation strains exhibited high percentage of appressorium formation in killed onion epidermis but Ina86-137 $\Delta lig4\Delta laeA$ showed decrease in appressorium formation. However, result of spraying inoculation and intact rice sheath assay showed that all fungal strains can cause the lesions on rice's leaves and formed appressoria in rice's tissue. These results suggest that *LaeA* might related with appressorium formation on non-host surface. Moreover, the deletion of *LaeA* does not effect for fungal pathogenicity in rice plant.

P-108

新規殺菌剤ターゲットに関わるゲラニルゲラニル被修飾遺伝子群の探索および解析

重吉沙衣¹, 藤林悠希², 津國桃花², 宮川恒³, 田中千尋³, 入江俊一¹, 鈴木一実¹, 泉津弘佑¹ (¹滋賀県大院・環境, ²滋賀県大・環境, ³京大院・農)

私たちはこれまでに、新規抗菌化合物 Tolnifanide の作用点を全ゲノム比較手法に基づいて特定することを目的に研究を進めてきた。Tolnifanide は *Alternaria* 属や *Bipolaris* 属などのプレオスポラ目菌に卓効を示し、菌糸の先端に棍棒状肥大を引き起こすユニークな作用性をもつ。前回のコンファレンスにおいて、Tolnifanide の作用点は Geranylgeranyl transferase (GGT1) であることを分子遺伝学的に実証した。GGT1 は糸状菌に対する新たな殺菌剤開発の有望なターゲットと考えられるが、GGT1 が阻害されることによってなぜ致死性もたらされるのかはよくわかっていない。GGT1 はタンパク質のプレニル化修飾を担う酵素であり、Tolnifanide の致死性には修飾を受ける下流のタンパク質群が関わっていると予測される。

そこで、5種の糸状菌(トウモロコシごま葉枯病菌, イネいもち病菌, ウリ類炭疽病菌, 灰色かび病菌, *Aspergillus nidulans*) の全遺伝子の中から GGT1 の修飾を受けると推測される-CaaL の配列を持つ遺伝子を探索し、系統解析を行った。その結果、糸状菌で保存されている遺伝子は全部で 8 個 (*RHO1*, *RHO2*, *RHO4*, *CDC42*, *RAC1*, *RSR1*, *RAS2*, *MUB1*) 存在した。これらの遺伝子群のうち、*RHO1* および *RAC1* の 2 遺伝子の-CaaL 配列をファルネシルトランスフェラーゼ認識配列 (-CaaM) に置換するとトルニファニドに弱い耐性を示し、*RHO1* と *RAC1* の阻害が Tolnifanide の致死性に関与することが示唆された。さらに現在、GGT1 の下流因子と推測される 8 種の遺伝子の破壊試験を試み、GGT1 阻害による影響を細部にわたり解析を進めている。

Analysis of the genes encoded for geranylgeranylated proteins, which associated with novel fungicidal activity..

Sae Shige-yoshi¹, Yuki Fujibayashi², Moka Tsukuni², Hisashi Miyagawa³, Chihiro Tanaka³, Toshikazu Irie¹, Kazumi Suzuki¹, Kosuke Izumitsu¹

(¹Grad. Sch. of Env. Sci., Univ. of Shiga pref., ²Sch. of Env. Sci., Univ. of Shiga pref., ³Grad. Sch. of Agr., Kyoto Univ.)

発表者索引

A

Akira Watanabe 31, 86
Ayumi Abe 90, 91

C

Cai Bian 31, 86, 87
Choong-Soo YUN.. 59

D

Daidi Chen 72, 73
Daisuke Hagiwara . 31,
86
Dong Min Kim 50

G

Gayan Abeysinghe . 82
Gayan Dakshitha... 31,
85
Gerhard H. Braus ... 56

H

Hiroki Takahashi... 31,
86
Hongli Wu..... 29, 67
Howard S. Judelson 89

J

Jun Arai 91
Jun-ichi Maruyama 56,
57

K

Katsuhiko Kitamoto 56

M

M. Abdulla Al Mamun
..... 57
Manabu Arioka 50
Muhammad Akhid
Syib'li 90

N

Nobuyuki Honma 40

O

Ozgur Bayram 56

P

Pradabrat Prajanket 91

Q

Qiushi Li..... 39

S

Shugo Nakamura ... 57
Silai Zhang 33, 70, 76

T

Takuya Katayama . 56,
57
Teruo Sone 90, 91

V

Vu Thi Kim Chi 91

W

Wataru Ogasawara
..... 40
Wei Cao 57
Worawan Sornkom. 91

X

Xuan Chinh Luu 40

Y

Yoko Kusuya... 31, 86
Yosuke Shida 40
Yue Chen 56
Yuge Guo 78
Yukina Kitahara 40

あ

浅井禎吾 81
浅井良樹 80
麻田恭彦 55
東洗希 76
阿部郁朗 35, 42
阿部敬悦 . 36, 43, 47,

62

荒木康子 35, 42
荒添貴之 54
有江力 54
淡川孝義 35, 42
安藤晃規 74, 76
安藤裕人 68

い

石井一夫 67
石川真衣 59
石川雄樹 41
石田博樹 46
泉津弘佑 . 34, 43, 73,
90, 91

泉実 60
和泉自泰 74, 76
市川響太郎 57
伊藤考太郎 35, 42
井上大志 66
今村友紀 55
入枝泰樹 48, 83
入江俊一 .. 34, 43, 91
岩下和裕 69, 70
岩橋由佳 .. 37, 51, 52

う

上地敬子 36, 49
上野このみ 74, 75
上元優 45
白田佳弘 32, 58
内田百岳 54
浦山俊一 . 28, 37, 51,
52, 63, 79, 84, 88

え

江沢辰広 19
江場祐貴 80

お

及川英秋 45
大泉太於 77
大井俊彦 85

大越佳乃 77

大島敏明 41
太田一良 .. 37, 53, 60
大西康夫 28, 63
大沼広宜 61
大東功承 58
小笠原渉 49
岡拓二 37, 53, 60
尾形慎 62
岡田亮 82
小川順 74, 76
小川真弘 42
小河原孝司 82
荻野千秋 .. 33, 70, 76
荻原淳 38
奥田希実 68
奥津果優 .. 29, 64, 81
刑部敬史 67
長田裕之 . 33, 59, 75,
83

織田健 69, 70
尾花望 82

か

甲斐建次 30, 88
甲斐万紀子 37, 53
柿崎徹也 80
郭宇歌 78
片岡涼輔 38
片山琢也 45, 56
加藤雅士 .. 32, 61, 62
門岡千尋 .. 29, 64, 81
金井宗良 41
金政真 80, 81
兼松周作 .. 37, 51, 52
鎌倉高志 54, 83
上嶋実咲 44
上條順也 74
河内護之 28, 63
川口剛司 66, 89
川崎真由 59
河村優美 80

- 河原崎泰昌.....28, 64
菅英一郎.....44
- き
- 菊間隆志.....53
菊松風大.....47
岸野重信.....74, 76
北潔.....35, 42
喜多光徹.....54
北出雄生.....73
北原雪菜.....49
木村哲哉.....71, 74
桐村光太郎.....44, 77,
78
- く
- 楠屋陽子.....87
久知良桃花.....82
工藤凱門.....31, 85
工藤健央.....48
國武絵美.....71, 74
窪寺隆文.....58
久保康之..30, 84, 86,
87
倉橋敦.....41
黒田裕樹.....46
- こ
- 呉紅麗.....29, 67
小泉亜未.....62
小島千怜.....81
小関卓也.....57, 59
小高敦史.....46
小玉紗代..30, 84, 86,
87
後藤正利..29, 64, 81
小西高裕.....54
小林哲夫.....71, 74
五味勝也..28, 51, 55,
60, 63, 64, 66
小山泰二.....42, 44
近藤明彦..33, 70, 76
近藤永治.....68
- さ
- 齋藤直也.....45
齊藤亮太.....70
酒井杏匠..32, 61, 62
榊谷美衣奈.....86
阪本鷹行..74, 75, 76
坂本正弘..29, 67, 68
坂本裕一.....67
櫻川拓.....33, 76
櫻谷英治..74, 75, 76
佐々木駿祐.....41
佐々木信光.....52
佐竹諒子.....65, 89
佐藤志穂.....67
佐藤駿.....63
佐藤良勝.....35, 38
佐藤龍一.....81
佐野元昭.....62
佐野雄三.....85
澤田和美.....66
- し
- 塩野義人.....57, 59
重藤真介.....34, 78
重富健吾.....85
重吉沙衣..34, 43, 91
志田洋介.....49
島田良美.....76
清水公德.....28, 63
志水元亨..32, 61, 62
下村未紀.....90
十一浩典.....72
白石敦士.....71
白坂憲章.....40, 61
新谷尚弘..51, 55, 60,
63, 66
- す
- 菅原由香.....56
杉山優子.....63
鈴木一実..34, 43, 91
鈴木康太.....69
鈴木遥.....52
- 住田卓也.....73, 90
炭谷順一.....66, 89
- せ
- 妹尾啓史.....28, 63
芹澤知子.....65
- そ
- 相馬悠希.....74, 76
- た
- 平良東紀.....36, 49
高田歩未.....48
高田万里奈.....28, 63
高野義孝.....83
高橋弘喜.....87
高橋慶晃.....53
高峯和則..29, 64, 81
高谷直樹..31, 35, 37,
38, 50, 51, 52, 65,
69, 77, 82, 85
竹内道雄.....52
竹川薫.....39, 47, 48
竹下典男..31, 34, 35,
37, 38, 50, 51, 52,
65, 78, 82, 85
武末和穂.....48
武田陽一.....53
竹中敦紀.....29, 67
竹本大吾.....22
竹山さわな.....72, 73,
86
田崎三香子.....69
田代綾子.....54
多田日菜子.....55
田中拓未.....43
田中千尋..34, 43, 72,
73, 90, 91
田中瑞己..28, 55, 63,
64
田中優花子.....72
田中大.....60
谷口大樹.....49
谷修治.....66, 89
- 玉井萌子.....45
玉置尚徳..29, 64, 81
玉野孝一.....44
田村駿介.....79
田村具博.....44
- ち
- 千葉悠斗.....84
千原由莉亜.....37, 53,
60
張斯来.....33, 70, 76
陳帶娣.....72, 73
- つ
- 津國桃花.....91
辻健也.....73
辻僚太郎.....72
津田修吾.....58
土谷敬多郎.....81
堤内要.....81
堤浩子.....46, 70
津村亮輔.....66
- て
- 寺内裕貴.....43
寺岡徹.....54
- と
- 渡嘉敷直杏.....36, 45,
49
十倉充範.....32, 58
戸所健彦.....46
外山博英.....45
豊島快幸.....41
豊田裕実.....86
豊福雅典..37, 51, 52
- な
- 中川博之.....77
中沢威人..29, 67, 68
中澤奈美.....77
中島佑.....36, 47
中島春紫.....68
永野真吾.....59
中村恵理.....29, 64

- 中村和弘 76
 椰野準希 81
 成澤才彦 21
- に
- 西内巧 86
 西岡佐和子 72
 西尾尚堯 89
 西村慎一 80
 西本一希 59
 二宮章洋 79, 88
- の
- 野川俊彦 33, 75
 野口愛佳 75
 野坂亮仁 54
 野村暢彦 .37, 51, 52,
 82
- は
- 萩原大祐 .28, 37, 51,
 52, 63, 79, 82, 84,
 87, 88
- 橋本渉 51
 秦洋二 46, 70
 浜田勇和 80
 浜中祐弥 46
 林可奈子 82
 林大三 80
 林梨咲 38
 原爽太郎 39
 原佑介 46
 坂東弘樹 46
 馬場健史 74, 76
- ひ
- 曳地康史 30, 88
 樋口絵莉香 54
 樋口裕次郎 39, 47,
 48
 日野智也 59
 平井献士 65, 89
 平塚知成 80
- 平山朋美 40
 広瀬大 27
 廣田瑠花 59
 広畑修二 58
- ふ
- 深田寛朗 32, 58
 福田紗弓 35, 38
 福田泰久 40, 61
 福田良一 42
 藤井聡 84
 藤井力 41
 藤ヶ崎礼夏 54
 藤晋一 79
 藤田翔貴 55
 藤林悠希 91
 藤村真 65, 89
 二神加奈恵 73
 二神泰基 ..29, 64, 81
 古川隆紀 49
 古山祐貴 83
- へ
- 別役重行 65
 辺彩 87
- ほ
- 堀井雅人 68
 堀内裕之 42
 堀千明 85
 本田与一 ..29, 67, 68
- ま
- 前島孝年司 84
 前田和穂 34, 43
 前田浩 71
 梶尾俊介 .31, 37, 51,
 52, 65, 69, 77, 82,
 85
 増田圭恭 88
 増田駿 58
 松岡太郎 41
 松尾匠馬 30, 88
- 松崎素道 35, 42
 松本謙一郎 85
 松本壘 85
 丸山潤一 ..45, 50, 56
- み
- 水谷治 36, 45, 49, 51
 溝上哲哉 52
 三ツ石方也 43
 南篤志 45
 南智之 80
 宮川恒 72, 91
 宮崎つぐみ 77
 宮澤拳 36, 47, 62
 宮下正弘 72
 宮本拓也 82
 宮本敏澄 85
- む
- 村井勇太 30, 88
 村川直美 74, 75
 村口元 79
 村田紋奈 81
- も
- 本山高幸 .33, 59, 75,
 83
 森一樹 29, 64, 81
 守田湧貴 ..37, 47, 53
 森瑞希 30, 87
 森山裕充 .25, 37, 51,
 79, 82
 森玲香 32, 62
- や
- 矢口貴志 ..84, 87, 88
 安井瑞稀 50
 安田充 34, 78
 安中優太 44
 柳沢直樹 35, 38
 矢野成和 62
 矢萩大貴 32, 58
 藪浩 43
- 山内隆寛 58
 山形洋平 ..52, 71, 72
 山川結 68
 山口大輝 81
 山下暁史 81
 山下伸雄 58
 山田修 38, 51
- ゆ
- 湯谷智 73
 弓場一輝 69
 尹忠鉄 59
- よ
- 吉岡育哲 ..44, 77, 78
 吉川侑太朗 80
 吉崎由美子 29, 64,
 81
 吉澤和将 49
 吉田彩花 57
 吉田エリカ 32, 58
 吉田裕史 73
 吉田稔 80
 吉永良平 52
 吉見啓 36, 43, 47, 62
 吉矢拓 58
- り
- 李秋実 39
- わ
- ワイズ里沙 32, 61,
 62
 若井暁 33, 70, 76
 脇本紗梨 44, 78
 渡部昭 51, 60
 渡邊彰 55
 渡部潤 41
 渡邊泰祐 38
 渡辺秀樹 89
 和田悠作 69

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 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
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 国立研究開発法人 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
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
株式会社雪国まいたけ

第 19 回糸状菌分子生物学コンファレンス要旨集

令和 1 年 10 月 11 日 印刷

令和 1 年 10 月 11 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