

目次

| | |
|-----------------------------------|----|
| コンファレンスプログラム | 1 |
| 発表演題及び講演時間 (11月8日午後) | 2 |
| (11月9日午前) | 4 |
| (11月9日午後) | 5 |
| シンポジウム講演要旨 | |
| S-1 Aspergilli における酵素生産制御機構の分子解析 | 7 |
| 塚越規弘 (名古屋大学大学院生命農学研究科) | |
| S-2 担子菌のリグニン分解特性 | 9 |
| 桑原正章・本田与一 | |
| (秋田県立大学木材高度加工研究所・京都大学木質科学研究所) | |
| S-3 植物病原菌類の分子遺伝学に関する研究の動向 | 11 |
| 日比忠明 (東京大学大学院農学生命科学研究科) | |
| S-4 麹菌ゲノム解析の現状について | 13 |
| 菊池 久 ((独)製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター) | |
| 口頭発表講演要旨 | 15 |
| ポスター発表講演要旨 | 29 |
| 人名索引 | 53 |
| 糸状菌分子生物学研究会会則 | 57 |
| 糸状菌分子生物学研究会運営委員名簿 | 58 |

第1回 糸状菌分子生物学コンファレンスプログラム

日時：平成13年11月8日(木)～9日(金)
会場：東京大学農学部弥生講堂（東京都文京区1-1-1）
主催：糸状菌分子生物学研究会
後援：糸状菌遺伝子研究会

11月8日（木）

- 13:00-13:10 総会
13:10-14:46 口頭発表（O-1～O-8）
14:46-15:00 休憩
15:00-16:00 ポスター発表（奇数番号）
16:00-18:20 シンポジウム
- S-1 Aspergilli における酵素生産制御機構の分子解析
塚越規弘（名古屋大学大学院生命農学研究科）
 - S-2 担子菌のリグニン分解特性
桑原正章・本田与一
（秋田県立大学木材高度加工研究所・京都大学木質科学研究所）
 - S-3 植物病原菌類の分子遺伝学に関する研究の動向
日比忠明（東京大学大学院農学生命科学研究科）
 - S-4 麹菌ゲノム解析の現状について
菊池 久（(独)製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター）
- 18:30- 懇親会（生協食堂）

11月9日（金）

- 9:30-11:30 口頭発表（O-9～O-18）
11:30-13:00 昼食
13:00-14:00 ポスター発表（偶数番号）
14:00-14:15 休憩
14:15-16:15 口頭発表（O-19～O-28）

11月8日 午後

シンポジウム 16:00~18:20

- 16:00 S-1 Aspergilliにおける酵素生産制御機構の分子解析
塚越規弘(名古屋大学大学院生命農学研究科)
- 16:35 S-2 担子菌のリグニン分解特性
桑原正章・本田与一(秋田県立大学木材高度加工研究所・京都大学木質科学研究所)
- 17:10 S-3 植物病原菌類の分子遺伝学に関する研究の動向
日比忠明(東京大学大学院農学生命科学研究科)
- 18:45 S-4 麹菌ゲノム解析の現状について
菊池 久((独)製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター)

口頭発表(O-1~O-8) 13:10~13:46

- 13:10 O-1 麹菌の固体培養特異的なマンノシダーゼ遺伝子の単離及び解析
赤尾 健、吉内くみ、矢原明典、篠田典子、山田 修、後藤邦康、秋田 修
(酒総研・微生物)
- 13:22 O-2 CPY-EGFPを利用した麹菌 *Aspergillus oryzae* の液胞タンパク missort 変異株の取得
大根田守、有岡 学、北本勝ひこ(東大院農生科・応生工)
- 13:34 O-3 麹菌 *Aspergillus oryzae* の新規トランスポゾン様配列(Aot1)とトランスポゼース遺伝子
田中尚子、五味勝也(東北大院農・応生化)、柏木 豊(食総研)
- 13:46 O-4 *Aspergillus nidulans*における GPI アンカー型キチナーゼ(ChiA)の機能の解析
山崎晴丈、堀内裕之、太田明德(東大院・農生科・応生工)
- 13:58 O-5 Asexual子のう菌 *Alternaria alternata*、*Fusarium oxysporum* および *Pyricularia grisea*
の交配型遺伝子
有江 力・加藤ハナ・金子 功¹・川部眞登・吉田隆延²・寺岡 徹
(農工大農・¹カリフォルニア大バークリー校・²東北農業研究センター)
- 14:10 O-6 イネいもち病菌の付着器形成に関与する遺伝子の探索と解析
齋藤憲一郎(農工大連農)、寺岡 徹(農工大農)、山口 勇(理研)、鎌倉高志(理研)
- 14:22 O-7 担子菌の有する優れた芳香族化合物分解能を支える分子機構
割石博之、一瀬博文、平塚宣博、田中浩雄(九大院農)
- 14:34 O-8 カルボキシ耐性マーカーを用いたシイタケ(*Lentinula edodes*)の形質転換
入江俊一*、佐藤利次*、齋藤久美子*、本田与一**、渡辺隆司**、桑原正章**、江井 仁*
(*岩手生工研、**京大木研)

ポスター発表(奇数番号) 15:00~16:00

- 15:00 P-1 糸状菌 *Aspergillus nidulans* のミオシン様ドメインを持つキチン合成酵素(CsmA)の
菌体内での存在状態、生産についての解析
竹下典男、堀内裕之、太田明德(東大院・農生科・応生工)
- P-3 冬虫夏草菌の交配型遺伝子
横山英之¹、伊東達雄²、河内一郎²、中谷善博²、氏田 稔²、原 彰²
(名城大・¹農学ハイテク、²生物化学)
- P-5 アスペルギルス属糸状菌の小胞体型1,2- α -マンノシダーゼ活性について
吉田 孝¹、加藤陽治²、浅田芳宏¹、中島 佑³
(¹弘前大農学生命、²弘前大教育、³東北大院農)
- P-7 紅麹菌 *Monascus anka* の形質転換系の開発
長島 直、板本明咲枝、寺崎容子*、穴澤秀治*(新日本化学、*協和発酵東京研究所)

- P-9 *Fusarium oxysporum* におけるアスパラギン酸プロテイナーゼ遺伝子のクローニングと遺伝子破壊
吉田隆延（東北農研センター）川部眞登（農工大農）有江 力（農工大農）
- P-11 スエヒロタケヘテロ三量体型G蛋白質 α サブユニット ScGP-A, ScGP-C の構成的活性型変異による子実体形成抑制
山岸賢治、木村俊之、鈴木雅博、新本洋士（東北農業研究センター）
- P-13 イチゴ黒斑病菌のAF 毒素生合成遺伝子クラスター
八田理恵子^{1*}・伊藤 芳¹・保崎佳嗣²・田中孝欣¹・高原浩之²・田中愛子¹・山本幹博²・秋光和也³・柘植尚志¹（¹名大院生農・²岡山大農・³香川大農・*現 岩手生工研）
- P-15 *Trichoderma reesei* 由来新規キシラナーゼ遺伝子(*xyn3*)のクローニングと誘導発現
岡田宏文、小笠原渉、野川優洋、森川 康（長岡技科大・生物）
- P-17 *Aspergillus nidulans* の *uvsC* 欠失系統におけるメチルメタンスルホン酸感受性の解析
水谷真也・夏目豊彰・伊藤靖夫（信大・理）
- P-19 プロテアーゼ低生産宿主 *Aspergillus niger* の開発
幸田明生、峰時俊貴、尾関健二、熊谷知栄子（大関総研）
- P-21 可溶性多糖 (Extracellular Soluble Polysaccharide: ESP)による白麹菌酵素の安定化と局在性への影響
岩下和裕、原田 直、下飯 仁、伊藤 清（酒総研）
- P-23 *Aspergillus oryzae* の生産する主要なキシラナーゼ XynG2 遺伝子プロモーター領域の解析
松岡寿保、木村哲哉、粟冠和郎、大宮邦雄（三重大生物資源）
- P-25 焼酎麹菌の α -L-アラビノフラノシダーゼ遺伝子の構造解析
小関卓也、奥田将生、荒巻 功、岩野君夫*、松澤 洋**
(独法・酒総研、秋田県立大・応生、青森大・工)
- P-27 *Aspergillus nidulans* アミラーゼ高生産変異株の解析
赤坂祐樹、佐藤綾子、勝山陽子、加藤直樹、加藤雅士、小林哲夫、塚越規弘
(名大院、生命農学)
- P-29 麹菌 *Aspergillus oryzae* の Tripeptidyl peptidase 遺伝子(*tpaA*)の単離と解析
金 鋒傑、有岡 学、北本勝ひこ（東大院農生科・応生工）
- P-31 *Aspergillus oryzae* 解糖系遺伝子 3'-phosphoglycerate kinase (PGK)のプロモーター領域の解析
佐野元昭、戸田智美、久田博元¹⁾、小川雅裕²⁾、高瀬久美子、大山晃弘³⁾、五味勝也⁴⁾、秋田 修⁵⁾、秦 洋二¹⁾、町田雅之（産業技術総合研究所、¹⁾月桂冠総合研究所、²⁾サッポロビール、³⁾アロカ(株)研究所、⁴⁾東北大、⁵⁾酒類総合研究所)
- P-33 麹菌 *Aspergillus oryzae* の液胞膜 ATPase 遺伝子の単離と解析
黒木 豊、中島春紫、北本勝ひこ（東大院農生科・応生工）
- P-35 Woronin body 形成に関与する *hex-1* 相同遺伝子の麹菌 *Aspergillus oryzae* からのクローニングと機能解析
丸山潤一、中島春紫、北本勝ひこ（東大院農生科・応生工）
- P-37 麹菌からのシデロフォア生産調節遺伝子(*sre*)の単離とその解析
渡辺久敬、佐藤利次、江井 仁（岩手生工研）
- P-39 *Aspergillus oryzae* アスパルティックプロテイナーゼ I (APase I)遺伝子のクローニング
加藤寛貴、横田正仁、竹内道雄（農工大・農・応生科）
- P-41 白麹菌 α -アミラーゼの発現様式
村島健司*、伊藤 清（酒類総研、*広大院・先端研）
- P-43 白色木材腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporum* のセルロース分解における菌体外糖代謝系について
（東大院農）川合理恵、五十嵐圭日子、鮫島正浩、（森林総研）石井 忠
- P-45 糸状菌 *Aspergillus nidulans eglA* 遺伝子のプロモーター解析
小島美沙子、加藤雅士、小林哲夫、塚越規弘（名大院・生命農学）
- P-47 *Penicillium* sp. TN-88 株由来エンドおよびエキソ型イヌリナーゼ遺伝子の解析と分子進化
秋元秀俊、森山 聡、中村豊彦、太田一良（宮崎大・農・応生科）

11月9日 午前

口頭発表 (O-9~O-18) 9:30~11:30

- 9:30 O-9 麹菌 *A. oryzae* のフコース特異的レクチンの解析と大量生産
石田博樹、森谷敏康、秦 洋二、川戸章嗣、杉並孝二、安部康久 (月桂冠)
- 9:42 O-10 麹菌 *A. oryzae* の P450nor 遺伝子の発現と解析
嘉屋正彦、松村憲吾、東田克也、秦 洋二、川戸章嗣、杉並孝二、安部康久、¹高谷直樹、²祥雲弘文 (月桂冠・総研、¹筑波大・応生化、²東大院・農・応生工)
- 9:54 O-11 糸状菌 *Fusarium oxysporum* の一酸化窒素還元酵素遺伝子(CYP55)の発現制御機構
高谷直樹、内村浩正、祥雲弘文* (筑波大・応生化、東大院・農・応生工*)
- 10:06 O-12 クエン酸生産糸状菌 *Aspergillus niger* におけるシアン非感受性呼吸系酵素遺伝子 (*aox1*) の破壊
桐村光太郎、宇田川史仁、木野邦器、宇佐美昭次 (早大・理工・応化)
- 10:18 O-13 新規 Zn 結合モチーフをもつ耐熱性デューテロリシン(DLN)遺伝子の大量発現系の構築
DLN の特異性、CoDLN のメタルセンター
土井ゆうこ、李 秉魯、池口雅道、大庭裕範*、生駒忠昭*、手老省三*、山内清語*、高橋幸資**、一島英治 (創価大学大学院工学研究科、*東北大学多元物質科学研究所、**東京農工大学農学部)
- 10:30 O-14 *Aspergillus saitoi* 1,2- α -D-マンノシダーゼの活性中心構造
多田羅洋太¹、藤田晃子²、李 秉魯¹、吉田 孝³、高橋幸資⁴、一島英治¹
(¹創価大院工、²醸造研、³東農工大農、⁴弘前大農学生命)
- 10:42 O-15 *Aspergillus nidulans* α -グルコシダーゼのアミラーゼ発現誘導への関与
加藤直樹、加藤雅士、小林哲夫、塚越規弘 (名大院・生命農学)
- 10:54 O-16 *Aspergillus nidulans* における USO1 相同遺伝子 (*usoA*) の解析
飯島 隆、中島春紫、北本勝ひこ (東大院農生科・応生工)
- 11:06 O-17 細胞質ダイニン重鎖のノックアウトと糸状菌の有糸分裂
井上 哲※ J. R. Aist (所属 コーネル大学植物病理学科、※東大・院・医・細胞生物)
- 11:18 O-18 *Aspergillus nidulans* および *Penicillium paxilli* の RAD51 ホモログ欠失系統における細胞外 DNA の組み込み様式
一岡大輔・夏目豊彰・伊藤靖夫 (信大・理)

11月9日 午後

口頭発表 (O-19~O-28) 14:15~16:15

- 14:15 O-19 白色腐朽担子菌のケミカルストレス応答
栗原宏征、割石博之*、田中浩雄* (九大院生資環・農*)
- 14:27 O-20 木材腐朽菌オオウズラタケのシュウ酸生合成と共役する新規炭素代謝機構
島田幹夫、服部武文、Erman Munir, Jeong J. Yoon, 時松敏明、西出辰徳、(京大木質研)
- 14:39 O-21 セロピオース脱水素酵素における分子内電子伝達機構の解析
(東大・農生科) 五十嵐圭日子、鮫島正浩、(日医大・一生化) 西野武士
- 14:51 O-22 イネいもち病菌における3量体Gタンパク質βサブユニットの機能
西村麻里江 (生物研), Jin-Rong Xu (Purdue University)
- 15:03 O-23 麹菌 *Aspergillus oryzae* の発芽分生子および分生子柄の核動態
石 一智、丸山潤一、中島春紫、北本勝ひこ (東大院農生科・応生工)
- 15:15 O-24 白麹菌のセルラーゼ・ヘミセルラーゼ及びその遺伝子
伊藤 清、*皆川 一 (酒類総研、*広大院・先端研)
- 15:27 O-25 タカアミラーゼA 遺伝子プロモーターを利用した醤油麹菌セルラーゼD 遺伝子の高発現
北本則行、松井淳子、安田 (吉野) 庄子、和久 豊* (愛知食工技、*ピオック)
- 15:39 O-26 麹菌キシラン・セルロース分解酵素に特異的な転写因子 AoXlnR の機能解析
丸井淳一郎・北本則行*・田中昭光**・加藤雅士・小林哲夫・塚越規弘
(名大院・生命農学、*愛知食品工技、**ヒゲタ醤油・研)
- 15:51 O-27 *Aspergillus oryzae* カルボキシペプチダーゼ (CPase) 遺伝子の多様性
横田正仁、竹内道雄 (農工大・農・応生科)
- 16:03 O-28 *Aspergillus aculeatus* 由来 *creA* 遺伝子のクローニング、発現、およびセロピオハイドロ
ラーゼI 遺伝子上流域における結合部位の解析
加藤朋子、北脇麻紀、川口剛司、炭谷順一、荒井基夫 (阪府大院・応生化、先端研)

ポスター発表 (偶数番号) 13:00~14:00

- 13:00 P-2 *Aspergillus nidulans* の分生子形成に及ぼすキチン合成酵素遺伝子破壊の影響
一宮維幸、堀内裕之、太田明德 (東大院・農生科・応生工)
- P-4 *Aspergillus niger* ATCC9642 由来イソプルラーゼにおける糖鎖の役割 (第4報)
明星裕美、古川貴章、柏木 豊*、殿塚隆史、西河 淳、坂野好幸
(農工大応生科、*独法食総研)
- P-6 *Aspergillus nidulans* の protein O-mannosyltransferase の構造機能解析
岡 拓二、濱口 哲、野中真由子、後藤正利、古川謙介 (九大院・生資環・生機科)
- P-8 *Aspergillus nidulans* の硝酸を利用した嫌氣的エネルギー代謝
高崎一人¹、高谷直樹¹、祥雲弘文² (¹筑波大・応生化、²東大院・農・応生工)
- P-10 固体培養特異的に発現する *glaB* 遺伝子プロモーターの転写因子解析
久田博元、佐野元昭*、石田博樹、秦 洋二、川戸章嗣、町田雅之*
(月桂冠・総研、*産総研)
- P-12 *Fusarium oxysporum* 由来フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ遺伝子のクローニングと
ランダム変異導入による基質特異性の変換
炭谷順一、藤原真紀、高橋 守*、古賀晋治*、芳陵一生*、高妻卓司*、川口剛司、
荒井基夫 (大阪府大院・応生化、先端研、*旭化成・診断薬研)
- P-14 トマトアルターナリア茎枯病菌の宿主特異的 AAL 毒素生合成に関与するポリケチド合成
酵素遺伝子
赤松 創・尾谷 浩・児玉基一郎 (鳥取大農)
- P-16 麹菌 CCAAT 結合複合体の分子解剖
田上新次郎・亀井健一・加藤雅士・小林哲夫・塚越規弘 (名大院・生命農学)

- P-18 麹菌用 gene trap ベクターによる形質転換
鈴木 聡、 柏木 豊 (独立行政法人 食品総合研究所<食総研>)
- P-20 清酒麹菌 (*Aspergillus oryzae*) の酸性フォスファターゼ生産と性質
藤田 仁, 山根雄一*, 福田 央**, 木崎康造**, 若林三郎**, 河本正次, 秋 庸裕,
重田征子, 小埜和久 (広大院・先端・生命機能, *(株)酔心山根本店, **酒総研)
- P-22 REMI 変異株を用いた *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* の病原性関連遺伝子の
探索と解析
川部眞登・水谷浩平・寺岡 徹・有江 力 (農工大農)
- P-24 *Aspergillus nidulans* 由来ヒスチジンキナーゼ遺伝子 (*tcsB*) 発現産物の機能解析
古川健太郎、勝野泰朗、阿部敬悦、中島 佑 (東北大院農・応生科)
- P-26 シイタケ子実体菌褶部の褐変現象の解析
佐藤利次、河田真樹、渡辺久敬、入江俊一、平野達也、齋藤久美子、神田勝弘、江井 仁
(岩手生工研)
- P-28 シイタケにおける外来遺伝子の発現
齋藤久美子、佐藤利次、河田真樹、平野達也、八重樫香、江井 仁 (岩手生工研)
- P-30 EGFP を用いた麹菌 *Aspergillus oryzae* の ER およびゴルジ体の可視化
菊池聡子, 丸山潤一, 中島春紫, 北本勝ひこ (東大院農生科・応生工)
- P-32 *Aspergillus oryzae* のカルシニューリン遺伝子 *cnaA* のストレス適応における役割
Praveen Rao Juvvadi, 有岡 学, 中島春紫, 北本勝ひこ (東大院農生科・応生工)
- P-34 Analysis on the Protein Secretion Pathway of *Aspergillus oryzae* Using EGFP Fusion
Protein
Kumiko Masai, Jun-ichi Maruyama, Harushi Nakajima & Katsuhiko Kitamoto
(Department of Biotechnology, University of Tokyo)
- P-36 *Aspergillus nidulans* における液胞形成関連遺伝子 *avaB* の解析
岡 真如、松田 豊、有岡 学、北本勝ひこ (東大院農生科・応生工)
- P-38 プロテオーム解析による麹菌の酵素生産・分泌条件の検討
長嶺一輝、伊藤 清 (酒類総研)
- P-40 *Aspergillus aculeatus* の新規セルロース分解酵素とその作用
高田悟郎*1・金澤成俊*1・土屋尊子*1・川口剛司*2・荒井基夫*2・何森 健*1
(香川大農*1・大阪府大院農*2)
- P-42 麹菌由来 kexin 様プロセッシング酵素の機能解析及び相互作用タンパク質の探索
水谷 治、野島 聡、山本盛真、山形洋平、阿部敬悦、中島 佑 (東北大・院農・分子酵素)
- P-44 酵母菌 *Pichia pastoris* において発現させたセロビオース脱水素酵素の性質
吉田 誠、大平 剛、五十嵐圭日子、長澤寛道、会田勝美、鯨島正浩 (東大院農)
- P-46 *Aspergillus oryzae* 由来 Pyrithiamine 耐性遺伝子 (*ptrA*) の利用
窪寺隆文、山下伸雄、西村 顕 (白鶴酒造・研究開発室)
- P-48 糸状菌キトサナーゼ遺伝子のクローニングと構造解析
下坂 誠、張 孝勇、宮澤 恭、小平律子、野川優洋、岡崎光雄*
(信州大・繊維・応生科, 信州大・遺伝子実験施設*)

Symposium

S-1

Aspergilli における酵素生産制御機構の分子解析

塚越規弘 (名古屋大学大学院生命農学研究科)

カビは炭素源としてグルコースのような単糖からオリゴ糖や多糖、各種有機酸、アルコール類など、窒素源としてアンモニウムやアミノ酸、プリン、アミド、硝酸、亜硝酸など幅広い有機物を利用する多数の代謝系を備えている。また、カビは「酵素の宝庫」といわれ、多数の実用酵素が実際に生産され、極めて応用価値の高い微生物群である。それぞれの代謝系や酵素生産系は環境に応答して複雑に制御されており、カビは多様な制御系の研究材料として好適である。さらに、カビの優れたタンパク質生産能を利用した異種タンパク質生産系の開発も注目をされている。

カビの中でも *Aspergillus nidulans* は完全合成培地に生育可能であり、また、有性世代および準有性世代があり、この生活環を利用して遺伝学的にも解析されている。これまでに多数の変異株が *A. nidulans* から分離され、多様な代謝系や制御系に関する遺伝学的知見が蓄積されている。最近では遺伝子工学的にもこれらの知見が分子レベルで証明されている。遺伝子発現制御系に関するこれまでの成果を総合すると、多くの遺伝子の発現は大別すると2種類の転写因子により転写レベルで制御されている。すなわち、1) ある特定の基質代謝に必要な遺伝子(群)のみを正に発現調節する転写因子(代謝経路特異的転写因子; Pathway-specific transcription factors)及び2)異なる代謝系に関わる多数の遺伝子の発現を正または負に調節したり、発現量を増大させたりする転写因子(広域転写因子; Wide domain transcription factors)の2種類である。

遺伝子発現の多くは代謝経路特異的転写因子および広域転写因子の両方で複雑に制御されている。例えば、*A. nidulans* はアセトアミドを炭素源としても窒素源としても利用できるが、その代謝に関わるアセトアミダーゼの遺伝子 (*amdS*) は本遺伝子にどちらかという特異的な *AmdR*, *FacB*, *AmdA* の3種類の制御因子関与で誘導され、さらに広域転写因子 *CreA*, *AreA*, *Hap complex* によって、負にも正にもまた転写量までも制御されている。麹菌の生産するタカアミラーゼ A は典型的な誘導酵素で、転写誘導因子 *SreB*/*AmyR* に仲介されて誘導され、カタボライト抑制を仲介する転写抑制因子 *CreA* により抑制され、転写促進因子 *Hap complex* により転写量が増大する。応用的には発現制御に関わるこれらの転写制御因子の機能特性を解明し、利用することから効率的な異種タンパク質生産技術の開発が期待される。

タカアミラーゼ A 遺伝子の発現誘導機構

1) 誘導剤の解析と α -グルコシダーゼ B (*AgdB*): 各種オリゴ糖のタカアミラーゼ A 遺伝子の誘導能を検討した結果、マルトース、コージピオース、イソマルトースなどが誘導能を示したが、イソマルトースは低濃度でしかも短時間でタカアミラーゼ A を最も効果的に誘導した。このことから、マルトースなど各種オリゴ糖はイソマルトースへ変換された後、あるいはイソマルトースを経由して、タカアミラーゼ A 遺伝子を誘導する可能性が考えられた。マルトースを基質としてイソマルトース合成酵素活性を検索した結果、イソマルトース合成酵素活性が *A. nidulans* の細胞抽出画分に検出されたので、本酵素を分離するとともに遺伝子をクローン化した。本酵素は 74 kDa と 55 kDa のヘテロ 2 量体で構成された糖転移活性の高い α -グルコシダーゼの一種であるが、これまでの α -グルコシダーゼ A と相同性が低く、 α -グルコシダーゼ B と命名した。*agdB* 遺伝子は 3 つの短いイントロンで分断された 3055 bp からなり、5' 側には 74 kDa のサブユニットが、3' 側には 55 kDa サブユニットがコードされていた。この遺伝子構造から α -グルコシダーゼ B は前駆体として合成され成熟過程でヘテロ 2 量体にプロセスされると推測される。現在、タカアミラ

ーゼ A 遺伝子の発現誘導における本酵素の役割を解析している。

2) 転写誘導因子 SREB/AmyR の解析 : タカアミラーゼ A 遺伝子の発現誘導を仲介するシスエレメントのプロモーター解析から、CGGAAATT 配列がスターチに応答してタカアミラーゼ A 遺伝子を誘導することが示され、この配列を SRE(Starch Responsive Element)と命名した。SRE は *A.oryzae* のアミラーゼ誘導因子 AmyR の結合配列の一つと完全に一致していたことから、SREB と AmyR は類似した因子と考え、*A. nidulans* から *amyR* ホモログをクローン化した。*A. nidulans* AmyR は *A. niger* 及び *A. oryzae* AmyR と 70%以上の相同性を示し、またその結合配列が SRE と同一ということから、SREB は *A. nidulans* の AmyR と同定した。さらに、*amyR* の破壊株はスターチやマルトースを炭素源として生育できず、誘導条件下でもタカアミラーゼ A を合成できないことなどから、SREB/AmyR はタカアミラーゼ A 遺伝子の転写誘導因子でと考えられた。SREB/AmyR は酵母のマルトース資化にかかわる遺伝子群の転写誘導因子 Mal63 と 5ヶ所で相同性が高く、これら相同領域の機能解析や *amyR* (*malA*) 変異株の変異点の解析から、SREB/AmyR の誘導シグナルの認識部位や転写活性化部位の特定を試みている。

タカアミラーゼ A 遺伝子の転写促進因子 CCAAT 結合因子 (Hap complex)

タカアミラーゼ A 遺伝子のプロモーター解析から転写量の増大に CCAAT 配列が重要な役割を果たすことが示され、CCAAT 結合因子の構造と機能の解明を試みている。CCAAT 結合因子は酵母で最初に発見され、Hap complex と呼ばれ、Hap2p/3p/4p/5p の 4 種類のサブユニットで構成されている。酵母では Hap2p/3p/5p のヘテロ 3 量体で CCAAT 配列へ結合し、Hap4p が転写を活性化するサブユニットであることが示されている。一方、糸状菌については 3 グループが *A. nidulans* の CCAAT 結合因子を解析し、タカアミラーゼ A、アセトアミダーゼ、イソペニシリン N 合成酵素遺伝子のプロモーターに結合する因子として、それぞれ AnCP, AnCF, PENR1 を同定したが、これらは同一因子であることが示されている。また、*A. oryzae* からも CCAAT 配列結合因子、AoCP、が解析されている。Aspergilli の CCAAT 結合因子は酵母 Hap complex のサブユニット Hap2p/3p/5p に類似した HapB/C/E の 3 種類のサブユニットで構成され、DNA 結合にはこれら 3 種類のサブユニットのみで十分であることが再構成実験で証明されている。また、AoCP の 3 種類のサブユニットは *A. nidulans* の AnCP サブユニットと機能的に互換可能であることが示されている。Hap complex 形成並びに DNA 結合に要求される最小領域について部分欠失サブユニット遺伝子を作製し検討した結果、高等真核生物、カビ、酵母の間で保存されている「コア領域」のみで十分であることが示された。しかし、転写促進には「コア領域」に加えて HapC の N 末領域と HapB の C 末領域が必要であった。酵母 Hap4p に相当する HapD サブユニットの存在は酵母以外ではその存在が不明であり、HapD 様遺伝子のクローン化が試みられ、これまでに *Kluyveromyces lactis* からのみ分離されているに過ぎない。また、両者間のアミノ酸配列の相同性は 43%と低い、N 末領域と C 末端領域に 11 アミノ酸と 16 アミノ酸からなる保存配列を有していた。最近、酵母の two hybrid 系を用いて糸状菌 Hap complex と相互作用する HapD 様の遺伝子を分離したが、本因子は N 末領域の 11 アミノ酸のみを保存していた。また、*Neurospora crassa* genomic DNA database にも類似遺伝子が存在している。

Hap complex で制御されるカビの分泌酵素遺伝子としては、タカアミラーゼ A 遺伝子を始めとして *A. nidulans* のセルラーゼ遺伝子 (*eglA*)、*T. reesei* のキシラナーゼ遺伝子 (*xyn1*, *xyn2*) 及びセロビオヒドラーゼ遺伝子 (*cbh2*) などをあげることができる。

Molecular analyses of regulatory mechanisms of enzyme production in aspergilli

Norihito Tsukagoshi

Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University

S-2

担子菌のリグニン分解特性

桑原正章¹⁾・本田与一²⁾

(秋田県立大学木材高度加工研究所¹⁾・京都大学木質科学研究所²⁾)

自然界においては、木質など、植物に由来する遺体は、環境中に存在する微生物群によって無機化される。分解過程で最初に作用するのは、腐生性の微生物群である。特に植物の細胞壁は担子菌を主体とする糸状菌によって先ず攻撃をうける分解と考えられる。植物の細胞壁はセルロースやヘミセルロースなどの多糖類やフェノール性ポリマーであるリグニンからなり、これらの成分はいずれも担子菌群によって分解される。成分のうち特にリグニンの分解能は担子菌の持つ得意な性質と考えられる。

本シンポジウムでは特にリグニンの分解に焦点をあて、担子菌とそれの生産する酵素によるリグニンの分解機構、リグニン分解酵素合成をコードする遺伝子の特質について紹介することにする。

1. リグニン分解性担子菌

リグニンを分解する活性の高い担子菌は白色(White rot fungi)と呼ばれる。しかし、これらの糸状菌はリグニンを炭素源およびエネルギー源として利用することはなく、セルロースやヘミセルロースなどの多糖類その他の低分子化合物を炭素源として利用すると考えられている。白色腐朽菌の種類は多く 600 種類にも達するともいわれている。また、*Pleurotus ostreatus* (ヒラタケ、シメジ)、*P. eryngii* (エリンジ)、*Lentinula (Lentinus) edodes* (シイタケ) など食用菌として人工栽培されている担子菌にも高いリグニン分解活性を示すものがある。

2. リグニン分解酵素

これまで、ラッカーゼ(Lac)、リグニンペルオキシダーゼ(LiP)およびマンガンペルオキシダーゼ(MnP)の 3 種類の酵素が分離されている。特に後 2 者については詳細な検討が行われている。これらの酵素の合成は、生産菌の培養条件などに依存する二次代謝と考えられている。すなわち、これら酵素は菌体の生育が停止した条件で生産されること、特に培地中の炭素源と窒素源の濃度が低下することが必要とされている。また、培養の気相の酸素濃度が高いことも必要とされている。さらに、MnP では培地中への Mn の添加により、また、LiP は二次代謝産物のペラトリルアルコールの添加によっても誘導される。しかし、酵素の合成の引き金になるのは何かについてはまだ明確な見解は提出されていない。これまで、30 以上の菌種においてこれらの酵素の生産が認められているが、LiP に比べ、MnP がより多くの担子菌で活性が検出されている。これらの酵素はそれぞれ複数のアイソザイムとして生産され、アイソザイムの生産パターンは菌の種類、培養条件により異なる。アイソザイムの持つ機能については明確にはなっていない。

一方、酵素反応機構については多くの知見が得られている。まず、これら酵素の反応の基本は基質から 1 電子を引き抜く 1 電子酸化反応である。LiP は非フェノール性基質からカチオンラジカルを生成し、MnP と Lac はフェノール性の基質からフェノキシラジカルを生成する。LiP と MnP はヘム鉄を活性中心に含む。これら酵素の強力な酸化反応により通常のペルオキシダーゼでは酸化の不可能な基質の酸化も可能となると考えられている。これらの酵素のうち MnP の反応ユニークで、直接の基質は Mn(II)であり、生成した Mn(III)が種々の基質を酸化する。しかし、近年 MnP には多様な分子形態が存在し、LiP のように、Mn(II)の非存在下でも酸化反応を示すことがわかってきている。

一方、酵素表面からヘムまで、どのようにして電子が到達するかという問題がある。LiP ではタンパク表層に W171 が存在し、これが基質の電子を受け取るものと考えられている。また、ある種の菌から得られる MnP においても W170 がタンパク表層で電子の受け渡しを行うものと考えられている。このように、LiP と MnP には当初考えられていたような厳密な区別がつかない反応も知られるようになってきている。塩基配列の解析においてもそれを裏付ける示唆が *Pleurotus ostreatus* や *P. eryngii* で得られている。LiP と MnP の中間的な構造を持つ MnP は Versatile MnP と呼ばれる場合がある。

さらに、酸化反応への低分子化合物の関与に関する知見が多く得られてきている。リグニンは植物細胞壁の二次壁全体にまた細胞間層に高濃度で分布している。リグニン分解酵素は菌体外酵素であることはポリマーを分解することに有利に働いている。しかし、酵素が細胞壁のマトリクスの中に直接進入し、周囲のリグニンを分解するとは考えにくい。LiP においてはペラトリルアルコールが、また MnP では Mn(II)のような

低分子化合物がメディエーターになって細胞壁中に入し、リグニンを酸化すると考えるときわめて好都合である。しかし、実際はこれだけでは説明がつかず、種々の低分子化合物からのラジカルの形成を伴う分解機構が提案されている。われわれは、不飽和脂肪酸が MnP により過酸化反応を受け、生成した過酸化ラジカルがリグニンを攻撃すること、また、このラジカルが細胞壁内で継続して生成する系を提案している。さらに、担子菌には種々の活性酸素ラジカルの生成系が知られており、リグニン分解への関与も想定されている。MnP は生体内では、種々の有機酸たとえば乳酸やシュウ酸などとキレートすることにより安定化する。

3. リグニン分解酵素遺伝子の構造と形質転換系の構築

上記3種類のリグニン分解酵素をコードする遺伝子は種々の白色腐朽菌からクローン化され、塩基配列が解析されている。また、アイソザイムに相当する塩基配列も明らかにされている。これらの配列においては、転写開始コードの上流にはタンパクの分泌を指示するシグナルペプチドをコードする配列が存在する。また、多数のイントロンを含む。一方、プロモーター領域には転写の調節に関与すると考えられるモチーフが存在する。すなわち、TATAA 配列、CCAAT 配列、cAMP 結合部位、SP-1 認識配列、芳香族化合物に対応する配列、heat shock element(HSE)、metal response element (MER)などである。HSE や MER が実際に発現することは、加熱条件下あるいは Mn 存在下で mRNA の合成が起こることにより確認されている。

一方、いくつかの白色腐朽菌で形質転換系が構築され、LiP あるいは MnP が発現している。LiP や MnP の大腸菌や酵母での発現も検討されている。しかし、これらの宿主で合成されるタンパクはヘムを含まないため、尿素存在下でヘミンを添加して活性のあるタンパクを再構築すること必要である。

タンパクの再構築を行う必要のない担子菌を宿主とする系については、Heterologous と Homologous の両方の系が検討されている。たとえば、*Phanerochaete chrysosporium* では Heterologous および Homologous の形質転換系が構築され、LiP と MnP の両酵素が発現している。また、*Coriolus hirsutus* (アラゲカワラタケ)、*Phlebia radia* などでも Homologous 発現系が得られている。一方、われわれは、食用担子菌である *Pleurotus ostreatus* の形質発現系を得ている。この系では、本菌のコハク酸脱水素酵素 Ip サブユニット遺伝子(sdi1)のクローン化を行い、この遺伝子に変異導入して得たカルボキシ耐性遺伝子(pTM1)を用いて安定な形質転換系を作成した。一方、本菌より MnP の主要アイソザイムをコードする遺伝子 mnp3 をクローン化し、sdi1 のプロモーター下流に mnp3 を連結し、それに sdi1 のターミネーターを連結して形質転換プラスミドを作成した。最終的に pTM1 の共存下で本プラスミドを *P. ostreatus* に導入して形質転換を得た。得られた形質転換体は野生株よりも高い MnP の生産能を示し、導入された mnp3 は野生株の mnp3 よりも培養の早期に発現した。

参考文献

(総説)

1. 渡辺隆司、桑原正章：リグニンの酵素分解、化学と生物, 38, 161-166 (2000)
2. 本田与一：きのこの遺伝子工学, 木材研究・資料, No. 32, 6-15 (1996)
3. 渡辺隆司：白色腐朽菌のフリーラジカル生成プロセス, No. 36, 34-50 (2000)
4. D. Cullenn: Recent advances on the molecular genetics of lygninolytic fungi, J. Biotechnol,273-289 (1997)
5. A.Hatakka: Biodegradation of lignin, in "Biopolymers " Vol. I, ed. M. Hofrichter and A.Steinbuchel, Wiley-VCH, p.129-180 (2000)
(*Pleurotus ostreatus* の形質発現に関する報告)
6. T. Irie et al: Homologous expression of recombinant manganese peroxidase genes in ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*, Appl. Microbiol. Biotechnol., 55, 566-570 (2001)

Characterization of Ligninolytic Activity of Basidiomycetes

KUWAHARA, Masaaki and HONDA, Yoichi (Wood Research Institute, Kyoto University)

植物病原菌類の分子遺伝学に関する研究の動向

日比忠明（東京大学大学院農学生命科学研究科、植物病理学研究室）

植物病原菌類は、従来、そのすべてが菌界に属するとされていたが、最近の生物8界説によれば、根こぶ病菌などは原生動物界ネコブカビ門に、べと病菌や疫病菌などはクロミスタ界卵菌門に、それ以外のすべての植物病原菌類は菌界に分類されることになった（柿嶋, 2001）。しかし、ここでは便宜上、従来の分類体系に従って話を進めることとする。

植物病原菌類のゲノム解析は、現在、国際的なプロジェクトによって、イネいもち病菌やトウモロコシごま葉枯病菌など数種の重要な病原菌類を対象に、高密度の染色体地図の作製、アカパンカビゲノムとの相同領域地図の作製、ゲノムの全塩基配列の決定などの解析作業が着実に進行しつつあり、すでにイネいもち病菌については米国企業でゲノムの全塩基配列の解読に成功している。

植物病原菌類の分子遺伝学的研究の主な目的としては、基礎分野では、1) 植物病原菌類の系統分類学的解析、2) 植物病原菌類の生殖ならびに病原性に関与する遺伝子の構造と機能の解析、3) 植物病原菌類の薬剤耐性に関与する遺伝子の構造と機能の解析、また、応用分野では、1) 植物病原菌類の遺伝子診断技術の開発、2) 植物病原菌類由来の遺伝子導入による耐病性トランスジェニック植物の開発などが、それぞれあげられる。このうち、ここでは、1) 病原性に関与する遺伝子、2) 薬剤耐性に関与する遺伝子に絞って、それらの構造と機能に関する研究の現状についてその概略をご紹介することにしたい。

病原性に関与する遺伝子

植物病原菌類の病原性に関与する遺伝子の研究は、植物の病害抵抗性に関与する遺伝子の研究と密接に関連しながら、現在、急激な展開を示している。病原性に関与する遺伝子としては、宿主に対する特異的あるいは非特異的な毒素の産生に関わる遺伝子、植物のクチン表層あるいは細胞壁などの分解に関わる酵素の遺伝子、発芽管・付着器・侵入菌糸あるいは吸器などの侵入器官の形態形成に関わる遺伝子、宿主が産生するファイトアンティシピンやファイトアレキシンなどの抗菌物質の解毒や排出に関わる遺伝子、宿主の抵抗性発現のシグナル伝達を阻害するサブレッサー遺伝子、逆に特異的エリシターを産生して宿主の真性抵抗性の発現を誘導する非病原性遺伝子、さらには病原性の変異に関わる可能性のあるトランスポゾンなどが含まれる。ここでは、比較的研究が進んでいるイネいもち病菌の病原性関連遺伝子の例を簡略にご紹介する。

イネいもち病菌は、胞子がイネの葉面上に接着して発芽した後、付着器を形成し、さらにこの付着器から膨圧によって侵入菌糸が突出・分化してイネ表皮を機械的に突き破ることによってイネ体内に侵入する。この後、イネいもち病菌のあるレースに対して感受性の品種では、その体内で旺盛な菌糸の伸長が行われ、やがて、菌糸から分化した分生子柄上に新たな胞子が形成される。一方、抵抗性の品種では、最初の侵入部位周辺の細胞に過敏死が生じ、以後の菌糸の伸長が阻止される（Zeigler *et al.*, 1995）。

こうしたイネいもち病菌の発育・分化に伴って各種の遺伝子が発現するが、付着器の分化誘導にはハイドロフォービン遺伝子 *MPG1* などが、付着器の形成に関わる細胞内シグナル伝達系には GTP 結合タンパク質遺伝子 *MAGB*、cAMP を合成するアデニル酸シクラーゼ遺伝子 *MAC1*、cAMP 依存性プロテインキナーゼ (PKA) 遺伝子 *CPKA*、MAP キナーゼ遺伝子 *PMK1* などが、また、付着器からの侵入菌糸の形成にはメ

ラニン合成系酵素遺伝子 *ALB1*, *BUF1*, *RSY1* およびその転写制御遺伝子 *PIG1*, テトラスパニン様タンパク質遺伝子 *PLS1*, P 型 ATP アーゼ遺伝子 *PDE1*, MAP キナーゼ遺伝子 *MPS1* などが、それぞれ関与していることが報告されている (Valent, 1997; Hamer & Talbot, 1998; 鎌倉ら, 2001)。しかし、それら遺伝子間相互の発現制御機構やシグナル伝達機構の全容については今後の解明に待たねばならない。

イネいもち病菌と植物種との間、あるいはイネいもち病菌のレースとイネ品種との間で、遺伝子対遺伝子の関係で宿主の真性抵抗性を誘導する非病原性遺伝子として、前者では 16kD タンパク質をコードする *PWL2*, 後者ではメタロプロテアーゼをコードする *AVR-Pita* などがクローニングされている (Valent *et al.*, 1995; Valent *et al.*, 2000)。このうち *AVR-Pita* に対応するイネの真性抵抗性遺伝子 *Pi-ta* は、ヌクレオチド結合サイト (NBS) とロイシンリッチ領域 (LRD) を含む細胞質内レセプタータンパク質をコードしており、*AVR-Pita* はこの *Pi-ta* の LRD と直接結合する (Valent *et al.*, 2000)。これによって、以降、一連のシグナル伝達系を経てプログラム細胞死が引き起こされ、その結果、イネの抵抗性が発現する。イネいもち病菌の病原性に関与する遺伝子としては、上記の他にも、ABC トランスポーター遺伝子 *ABC1* (Hamer *et al.*, 1999) など数多くの報告がある。また、トランスポゾンとしては、同方向の末端反復配列 (LTR) を持つレトロトランスポゾン *MAGGY*, 逆位の末端反復配列 (ITR) を持つトランスポゾン *Pot3* など数種が知られているが (土佐ら, 2000)、最近、*Pot3* の *AVR-Pita* への転位が病原性の変異を引き起こすことが示された (Valent *et al.*, 2001)。

薬剤耐性に関与する遺伝子

現在、農業の現場では薬剤耐性菌の蔓延がきわめて深刻な問題となっている。植物病原菌類における薬剤耐性機構としては、従来から、薬剤標的タンパク質の変異による耐性機構が知られており、著者らもカンキツ緑かび病菌のベンズイミダゾール剤耐性が、本剤の標的タンパク質である β -チューブリンの 198 番目あるいは 200 番目の 1 アミノ酸の置換によることを明らかにした。一方、著者らは薬剤標的タンパク質の過剰発現による耐性機構を新たに見いだすとともに、薬剤に対する基本的な耐性には薬剤を菌体外に排出する ABC トランスポーターが必須であることを証明した。すなわち、カンキツ緑かび病菌の DMI 剤耐性は本剤の標的酵素である P450-14 デメチラーゼの過剰発現によって起こり、さらにこの過剰発現は本遺伝子上流のプロモーター領域に存在する重複エンハンサーの転写促進作用によることが明らかにされた (Hamamoto *et al.*, 2000)。また、カンキツ緑かび病菌の ABC トランスポーター遺伝子 *PMR1* および *PMR5* についての遺伝子破壊実験から、*PMR1* が DMI 剤、オリゴマイシン、フロレチンなどの、*PMR5* がベンズイミダゾール剤、ジチアノン、レスベラトロールなどの、細胞外排出にそれぞれ必須で、本菌の各種薬剤や毒性物質に対する基本的な耐性を分担して決定している遺伝子であることが示された (Nakaune *et al.*, 1998)。現在、著者らはイネいもち病菌でも同様の ABC トランスポーター遺伝子 *ABC2* が各種の抗いもち病殺菌剤の細胞外排出に関与していることを明らかにしつつあるが、*ABC2* と病原性との関わりや ABC トランスポーターによる特異的な薬剤の認識と排出ならびに発現誘導の分子機構などについての詳細な解明は今後の課題である。

Molecular Genetics of Phytopathogenic Fungi.

Tadaaki HIBI : Laboratory of Plant Pathology, The University of Tokyo.

S-4

麹菌ゲノム解析の現状について

菊池 久（（独）製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター）

（１）独立行政法人製品評価技術基盤機構について

製品評価技術基盤機構（national institute of technology and evaluation、以下「NITE」という。）は本年４月に前身の通商産業省製品評価技術センターから独立行政法人に移行した組織である。NITEは国民・社会ニーズ、行政ニーズに即応し、技術的な評価分析を実施し、最新の技術情報を国民、産業界へ提供する知的基盤期間である。バイオテクノロジー分野、化学物質管理分野、適合性評価分野、人間生活福祉分野の４分野があり、東京渋谷区にある本所及び支所が北海道から九州まで９箇所設置され、全体の職員数は４１５名となっている。

NITEは、経済産業省の行政サービス実施部門であり、工業製品等に関する技術的な評価、分析及び調査研究等を行い、経済産業行政に必要な技術上の知見、ノウハウなどのうち、４分野について体系的に収集、評価、整理及び提供等を行っている。また、その技術能力を活用し、内外における取引の適正化・円滑化を図るため、経済産業省に係る法令に基づく認定・審査業務等を国際ルールに基づいて実施しているいわゆる政策実施部門の役割を果たしている。

（２）バイオテクノロジーセンターの業務について

バイオテクノロジーセンターは平成５年７月に発足し、現在、職員・臨時職員等総勢約８０名で業務を行っており、バイオテクノロジー産業を支える中核機関として、微生物を中心としたゲノム解析や生物遺伝情報の提供などを行うことにより、バイオ産業の創生・育成及びバイオ分野の研究支援に貢献することを目的としている。

特に我が国における微生物を中心とした中核的な生物遺伝資源機関として欧米並の体制を整備することを目指し、バイオテクノロジーの研究開発及びその事業化の基礎となる生物遺伝資源の探索、収集、分離、同定等を行い、それらを整理保存し、さらにゲム情報を付加した生物遺伝情報として広く提供することとしている。

現在、千葉県かずさアカデミアパーク内に施設を建築中であり、今年度末に完成し、平成１４年から本格的に業務を開始することとしている。

ゲノム解析については、キャピラリーシーケンサ３２台、平板ゲル型シーケンサ１８台を擁し、サンプル自動供給装置等による周辺機器の整備を行っているところある。

これまでに嫌気性超好熱古細菌、好気性超好熱古細菌、好酸性好熱菌、黄色ブドウ球菌等のゲノム解析を終了し、データ公開を行っている。現在、コリネ菌、放線菌、表皮ブドウ球菌、ブレビバチルス菌及び麹菌の解析を実施中である。

（３）麹菌ゲノム解析

a. 経緯

一昨年从去年にかけて、企業、研究機関等を対象に実施したゲノム解析対象生物のアンケート調査の結果、

最も要望が多かったのが麹菌であったこと、我が国では広く酒・味噌・醤油などの伝統産業に古くから利用されていること、タンパク質の分泌生産能力が高く多くの食品・医療産業で利用されていること、米国で Generally Regarded as Safe として認定されている安全性の高い微生物であること、以上よりゲノム解析が進み遺伝子情報が解明された場合、遺伝資源としても広範囲な分野で利用出来る可能性が高いこと等から、麹菌のゲノム解析を行うことを決定した。

欧米ではすでに麹菌近縁種のゲノム解析が実施されていることから、我が国の産業に広く使われている麹菌のゲノム解析が早急と必要と判断した。

b. ゲノム解析体制

N I T E 理事長の諮問機関であるバイオテクノロジー業務推進委員会（以下「委員会」という。）において麹菌のゲノム解析の実施が承認されたことを受け、平成13年7月13日から7月26日までの間公募を行った。その結果、16の企業、研究機関等で構成するコンソーシアムが結成され、（代表：財団法人日本醸造協会）ゲノム解析の共同研究の提案がなされた。提案書は委員会で審議し承認されたのちN I T E とコンソーシアムが共同研究契約を締結してゲノム解析を開始したところである。なお、ゲノムサイズが約35Mbpと大きくゲノム解析には技術的な困難が伴うことが予想されることと短期間に効率的にゲノム解析を終了させるためコンソーシアムとは別組織として麹菌ゲノム解析戦略会議を設置し、方針を練りながらゲノム解析を進めることとしている。

c. 共同研究の概要

共同研究の内容は①全ゲノム塩基配列の解析②ゲノム情報の利用に関する研究よりなる。①についてはショットガンライブラリーを構築し大量シーケンスを行う。またBAC等を用いた整列化ライブラリーを構築しコンティグのマッピングに利用する。さらにセントロメア及びテロメアなどのゲノム解析に重要な情報を収集・解析し解析された塩基配列にアノテーションを付加し、データベースを構築する。最終的にはデータベースは公開される。

②については麹菌のゲノム情報を利用して、特異性などに高い品質を有するDNAチップを設計・作成する。また発酵過程などにおける全遺伝発現の発現プロファイルの予測の情報基盤を整備し転写制御情報を解析し、人工的な高機能プロモーターの構築に利用する。さらに麹菌全タンパク質について、プロテオーム解析を行いゲノム情報を利用して遺伝子との対応付けを行う。

最終的には麹菌の実用化遺伝子について、ゲノム科学的視点からの検討を行い、産業への実用化を目指す。

Current progress of *Aspergillus oryzae* genome analysis

Hisashi Kikuchi (Director-General, Biotechnology Center, National Institute of Technology and Evaluation)

Oral Session

O-1

麹菌の固体培養特異的なマンノシダーゼ遺伝子の単離及び解析

赤尾 健、吉内くみ、矢原明典、篠田典子、山田 修、後藤邦康、秋田 修（酒総研・微生物）

固体培養時の麹菌が示す諸性質の発現機構は興味深い問題である。固体培養特異的に転写を受ける数十個の遺伝子断片を AOS シリーズとして取得している¹⁾。このうちの AOS22 は、*A.saitoi* の 1,2- α -mannosidase 遺伝子である msdS などとアミノ酸レベルで高い相同性を有し、固体培養時の他、比較的タンパク分泌量が多いとされる液体培養後期においても転写が認められた。本配列の由来する遺伝子が、N 結合型糖鎖のプロセッシングを通じて、分泌タンパクの成熟過程に関与する可能性が考えられたので、遺伝子構造を決定するとともに、機能や発現に関して更に検討を加えることとした。

まず、AOS22 をプローブとして EST データベース、フェージライブラリーを利用して遺伝子全長を取得し、構造を決定した。その結果、アミノ酸レベルで近縁種の 1,2- α -mannosidase (class I α -mannosidase) と比較したところ、全域にわたり活性残基などを含めて高い相同性を示したため、本遺伝子を *manA* と命名した。*manA* 産物は 510aa 残基から成り、N 末端側に一カ所の膜貫通領域を持つと推定された。

更に最小培地での液体培養において *manA* の転写と培養上清中のタンパク量の経時変化をより詳細に調べたところ、培養 2 日以降で *manA* の転写が認められ、また上清中のタンパク量も漸増傾向にあった。

また、*manA* ORF を *amyB* プロモーター下流に結合した後に麹菌に導入した強制発現株を造成し、活性の確認も行っている。

1) 赤尾、生物工学会 2000 年度大会講演要旨集 p.300

Cloning and analysis of *manA* that encodes mannosidase-like protein from *Aspergillus oryzae*

Takeshi Akao, Kumi Yoshiuchi, Akinori Yahara, Noriko Shinoda, Osamu Yamada, Kuniyasu, Goto, Osamu Akita (National Research Institute of Brewing)

O-2

CPY-EGFP を利用した麹菌 *Aspergillus oryzae* の液胞タンパク missort 変異株の取得

大根田守, 有岡 学, 北本勝ひこ (東大院農生科・応生工)

【目的】液胞には生体高分子の加水分解に働く多種類の酵素が含まれている。これらの酵素を細胞外に分泌生産させることができれば、液胞酵素の効率的な産業利用が期待できる。本研究では、酵素生産の宿主として有用な麹菌 *Aspergillus oryzae* において、EGFP の蛍光を指標として液胞タンパク missort 変異株を取得することを目的とする。

【方法及び結果】酵母の VPS (Vacuolar Protein Sorting) 変異株には液胞内を酸性化できないものが含まれている。そこで、EGFP 蛍光が酸性下において著しく低下する性質を利用して¹⁾、液胞内 pH 調節変異株の取得を試みた。*A. nidulans* 由来の液胞タンパク CPY (Carboxypeptidase Y) と EGFP との融合遺伝子の発現株の分生子を変異処理し、寒天培地上にコロニーを形成させた。そこから分生子を回収して FACS 解析を行い、EGFP 蛍光の強い分生子を分取した。この操作を繰り返して強い蛍光の分生子を濃縮し、single colony を単離した。これらの変異株に関して表現型の解析を行ったところ、培地の pH などの条件によって野性株とは異なる生育、菌糸形態、EGFP 蛍光の局在を示すものや、野性株に比べて多くの EGFP 蛍光を分泌するものが含まれていた。また、培地中に CPY-EGFP を分泌する変異株を直接単離する方法も試みており、これらにより得られた株についても液胞タンパク局在性などの表現型の解析を報告する。

1) 大根田ら、日本農芸化学会 2001 年度大会講演要旨集, p125

Isolation of Vacuolar Protein Sorting Mutants in *Aspergillus oryzae* Using CPY-EGFP

Mamoru Ohneda, Manabu Arioka, Katsuhiko Kitamoto (Dept. Biotechnol., Univ. Tokyo)

O-3

麹菌 *Aspergillus oryzae* の新規トランスポゾン様配列 (*AotI*) とトランスポゼース遺伝子

田中尚子、五味勝也 (東北大院農・応生化)、柏木 豊 (食総研)

我々はすでに麹菌 *A. oryzae* において、 α -アミラーゼ (*amyA*) のプロモーター上流に黒麹菌 *A. niger* のトランスポゾン (*TanI*) に高いホモロジーを示す *TaoI* 配列を見出した。しかし、*TaoI* に存在するトランスポゼース様遺伝子は、コード領域に stop codon が 7ヶ所存在しており pseudogene であると考えられた。今回、新たに麹菌 EST (Expressed sequence tag) データベースから *A. niger* の異なるトランスポゾン (*AntI*) のトランスポゼースにホモロジーの高い部分配列が見出だされた。EST データベース中に見出されたことから発現し機能していると考えられたので、この新規トランスポゼースを含むトランスポゾンを取得しその構造解析を行った。EST クローンをプローブとしてサザン解析を行ったところ、*A. oryzae* RIB40 では 2 コピー存在していることがわかった。また、同じプローブを用いてプラークハイブリダイゼーションを行い、得られたポジティブクローンの約 5.0-kb の塩基配列を決定した。その結果、*AntI* とは異なり、トランスポゼース遺伝子 (*tnpA*) が Terminal inverted repeat を有するトランスポゾン様配列 (*AotI*) の外側に存在しているという興味深い構造であることがわかった。

Novel transposon-like element (*AotI*) and a transposase-encoding gene (*tnpA*) of *Aspergillus oryzae*

Naoko Tanaka, Katsuya Gomi (Division of Life Science, Graduate school of Agricultural Science, Tohoku University)

Yutaka Kashiwagi (National Food Research Institute)

O-4

Aspergillus nidulans における GPI アンカー型キチナーゼ (ChiA) の機能の解析

山崎晴丈、堀内裕之、太田明德 (東大院・農生科・応生工)

糸状菌 *Aspergillus nidulans* の細胞壁の主要構成成分の一つであるキチンは、菌糸状の形態形成・維持を行う上で重要な役割を果たしていると考えられている。我々はこれまでに、*A. nidulans* における形態形成・維持機構の解明を目的として、キチナーゼに注目してきた。*A. nidulans* の菌類型キチナーゼ ChiA は、961 アミノ酸よりなる蛋白質であり、N 末端の分泌シグナル、それに続く菌類型キチナーゼによく保存された触媒部位、C 末端側約 620 アミノ酸のセリン、スレオニン、プロリンに富む領域 (STP 領域) からなる。*chiA* と栄養要求性マーカーとして用いられる *pyrG* との二重変異株の解析から、ChiA は低浸透圧下において菌糸先端生長に重要な役割を担っていることが示唆されていた。また、ChiA を *alcA(p)* の制御下で高発現させた株では、野生型株に比べ菌体内のキチナーゼ活性が高いことから、ChiA がキチナーゼ活性を有することが示唆された。しかしながら、ChiA のキチナーゼ活性に必須と考えられるアミノ酸残基のうちの一つを変換したものを野生型の ChiA の代わりに発現させた株でも、先述した *chiA* の破壊株のような表現型は示さなかったことから、ChiA のキチナーゼ活性は、菌糸生長に必須ではないことが示唆された。また、ChiA と GFP との融合蛋白質は、主に菌糸隔壁及び分岐点に局在することが明らかとなった。さらに、ChiA と GFP との融合蛋白質は Triton X-114 処理で detergent phase に存在するが、phospholipase C 処理後では aqueous phase に移動することから、ChiA は GPI アンカーの付加を受けていることが示唆された。これらのことから、ChiA は GPI アンカーを介して菌糸隔壁及び分岐点に局在化することが示唆された。

Functional analysis of the GPI anchored chitinase (ChiA) of *Aspergillus nidulans*

Harutake Yamazaki, Hiroyuki Horiuchi and Akinori Ohta (Dept. Biotechnol., Univ. Tokyo)

O-5

Asexual 子のう菌 *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum* および *Pyricularia grisea* の交配型遺伝子

有江 力・加藤ハナ・金子 功¹・川部眞登・吉田隆延²・寺岡 徹（農工大農・¹カリフォルニア大パークリー校・²東北農業研究センター）

交配不完全性 (asexual) 子のう菌である *Alternaria alternata* (ナシ黒斑病等の病原菌)、*Fusarium oxysporum* (トマト萎凋病等の病原菌) および *Pyricularia grisea* (完全世代: *Magnaporthe grisea*, 日本産イネいもち病菌の菌株同士は交配が知られていない) から、菌株の交配型決定と共に、交配初期に機能する交配型遺伝子 (MAT) 領域を取得し、その構造・発現・機能を近縁ヘテロタリック種のものと比較・解析した。これら3種の asexual 子のう菌とも、交配型遺伝子領域を保持し、その上に交配型遺伝子をコードしていた。その遺伝子構造は近縁交配可能株と類似していた。また、*A. alternata* および *F. oxysporum* では交配型遺伝子が発現していることが確認され、さらに、*Cochliobolus heterostrophus* での他家発現により *A. alternata* の交配型遺伝子の機能性が保存されていることが示された。

Mating-Type Genes in Asexual Ascomycetes, *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum* and *Pyricularia grisea*
Tsutomu Arie, Hana Kato, Isao Kaneko¹, Masato Kawabe, Takanobu Yoshida² and Tohru Teraoka (Tokyo Univ. of Agriculture and Technology, 1California Univ. at Berkeley, 2National Agricultural Research Center Tohoku Region)

O-6

イネいもち病菌の付着器形成に関与する遺伝子の探索と解析

齋藤憲一郎（農工大連農）、寺岡 徹（農工大農）、山口 勇（理研）、鎌倉高志（理研）

イネいもち病菌の宿主への侵入に必須である付着器形成に関する分子生物学的解析を行うため、本菌の付着器形成条件下で発現する遺伝子を cDNA サブトラクション法により濃縮し、ライブラリー化した。ライブラリー中のクローンから既知配列との相同性および RT-PCR による発現特異性を調べ、優先的に解析するクローンを選択した。その中のひとつクローン A4 について遺伝子破壊株を作出して機能解析を試みたところ、取得した遺伝子破壊株は付着器形成を誘導する人工基質上での付着器形成能を欠損していた。しかし、植物体上では付着器を形成し、病原性も喪失していなかった。本遺伝子の推定 ORF を決定し、既知遺伝子との相同性を検索したところ、全体的な相同性をもつ配列は見出せなかったが、キチン結合モチーフが認められたことから、本遺伝子を *CBPI* (Chitin Binding Protein) と命名した。本遺伝子の付着器形成誘導に関わる機能推定のため、遺伝子破壊株についての形質の調査ならびに分子生物学的手法を用いた解析を行った。

Cloning and Analysis of Genes Related with Appressorium Differentiation in Rice Blast Fungus

K. Saitoh (Tokyo Univ. Agri. and Tech.), T. Teraoka (TUAT), I. Yamaguchi (RIKEN) and T. Kamakura (RIKEN)

O-7

担子菌の有する優れた芳香族化合物分解能を支える分子機構

割石博之、一瀬博文、平塚宣博、田中浩雄（九大院農）

白色腐朽担子菌は、地球上で最も難分解性芳香族ポリマーであるリグニンを単独で無機化できる唯一の生物である。それゆえ、リグニン分解を可能とする、他の生物にはない分子機構を有しているはずである。これまでの研究から、白色腐朽菌が細胞外酵素として、リグニンペルオキシダーゼ・マンガンペルオキシダーゼ・ラッカーゼといった非特異的に芳香族化合物を一電子酸化する酵素が単離され、不定形高分子であるリグニンを効率よく酸化する機構として理解されている。しかし、このラジカル反応を介して生じるリグニン分解断片は非常に多岐にわたることになる。これら低分子量芳香族化合物の詳細な代謝経路については不明な点も多い。我々は、これまでに 40 を越える低分子量芳香族化合物の詳細な代謝経路を明らかにし、担子菌が優れた分子認識能とそれに応答した代謝機構を有することを推定している。特に、高度に制御された細胞内代謝応答に、他の微生物では考えられないほど多くのシトクローム P450 分子種が関与する可能性が示唆された。近年、一部公開の始まった担子菌ゲノムプロジェクト (DOE/JGI) の結果もあわせ、我々がこれまでに明らかにしてきた担子菌 P450 モノオキシゲナーゼ系の解析結果を紹介する。

Molecular Mechanism involving P450 Systems for Fungal Degradation of Aromatic Compounds

Hiroyuki Wariishi, Hirofumi Ichinose, Nobuhiro Hiratsuka, & Hiroo Tanaka (Kyushu University)

O-8

カルボキシ耐性マーカーを用いたシイタケ(*Lentinula edodes*)の形質転換

入江俊一*、佐藤利次*、齋藤久美子*、本田与一**、渡辺隆司**、桑原正章**、江井 仁* (*岩手生工研、**京大木研)

シイタケは我が国における重要な食用キノコであり、ダイオキシン等の難分解性の環境汚染物質を分解することのできる白色腐朽菌の一種である。詳細なシイタケの性質解析のためには遺伝子工学的実験手法の開発が重要であり、特に形質転換系の開発は急務である。既に我々はハイグロマシ B 耐性遺伝子を選択マーカーとして用いたシイタケ形質転換系を確立しているが、より多くの実験手法を適用するためには複数の選択マーカーが必要である。一方、我々はヒラタケ iron-sulfur protein (Ip) subunit 遺伝子由来のカルボキシ耐性遺伝子を選択マーカーとして用いたヒラタケの形質転換についても成功している。しかしながら、この耐性遺伝子を用いることではシイタケの形質転換を成功させることはできなかった。そこで、シイタケから Ip subunit 遺伝子をクローン化し、それを用いてシイタケ由来のカルボキシ耐性遺伝子を構築した。新たに得られたカルボキシ耐性遺伝子を用いることでシイタケを従来よりも高効率で形質転換することができた。

Transformation of *Lentinula edodes* using carboxin resistant marker

Toshikazu IRIE*, Toshitsugu SATO*, Kumiko SAITO, Yoichi HONDA**, Takashi WATANABE**, Masaaki KUWAHARA** and Hitoshi ENEI* (*Iwate Biotechnol. Res. Center and **Wood Res. Inst., Kyoto Univ.)

O-9

麹菌 *A. oryzae* のフコース特異的レクチンの解析と大量生産

石田博樹、森谷敏康、秦 洋二、川戸章嗣、杉並孝二、安部康久 (月桂冠)

麹菌 *A. oryzae* は、鉄制限培養条件下において鉄キレート物質であるフェリクリシン固定化カラムとアフィニティーを示す蛋白質を生産する。本蛋白質の部分アミノ酸配列を決定し、これをもとに遺伝子クローニングを行った。本蛋白質は310アミノ酸残基をコードしており、4つのイントロンに分断されており、ヒドロキサンタケのフコースレクチンと約26%の相同性を示した。麹菌での組み換え生産で得られた蛋白質の解析から本遺伝子はL-フコース特異的レクチンをコードしており、*fleA* と命名した。本レクチンは臨床試薬としての応用性が高いことから麹菌での高発現系の構築を試みた。*fleA* 遺伝子を麹菌の高発現プロモーター *melO* を用いて *A. oryzae* の液体培養において発現させた結果、本遺伝子産物を宿主麹菌の菌体内に主要蛋白質として大量に蓄積させることに成功した。さらなる生産量の増加のために菌体外への分泌生産も試みた。*glaB* 由来のシグナルペプチド配列のみを用いることにより、液体培養、固体培養ともに目的のレクチンの分泌生産が確認できた。組み換え生産した蛋白質についてレクチン活性を検討したところ、L-フコースに特異的に結合し、マンノース、シアル酸には微弱ながら結合活性が認められた。さらに組み換え蛋白質をカラムに固定化し、本レクチン蛋白質のフコース含有複合糖鎖への結合能を検討した結果、 α -1,2結合に対しては結合能が極めて弱い、他の結合には同等の結合力が確認された。これらの結果から、麹菌由来フコース特異的レクチンを、臨床分野など幅広い分野へ大量に供給することが可能と期待できる。

Overproduction and characterization of an *A. oryzae* fucose-specific lectin

Hiroki Ishida, Toshiyasu Moritani, Yoji Hata, Akitsugu Kawato, Koji Suginami, Yashuhisa Abe (Gekkeikan sake.co.ltd.)

O-10

麹菌 *A. oryzae* の P450nor 遺伝子の発現と解析

嘉屋正彦、松村憲吾、東田克也、秦 洋二、川戸章嗣、杉並孝二、安部康久、¹高谷直樹、²祥雲弘文 (月桂冠・総研、¹筑波大・応生化、²東大院・農・応生工)

脱窒菌である *Fusarium oxysporum* の cytochrome P450nor 遺伝子(CYP55A1)は、脱窒及び細胞内 NO 除去に関与している。我々は麹菌 *Aspergillus oryzae* の EST ライブラリー中より CYP55A1 遺伝子と相同性の高いクローンを検索し、これをプローブとしてゲノムライブラリーから麹菌の cytochromeP450nor 遺伝子 (CYP55A5) をクローニングした。この遺伝子には408aaをコードするORFが存在していた。またCYP55A5遺伝子のプロモーター領域には、硝酸呼吸系に関与するシス因子 NirA とと思われる配列が存在し、本遺伝子が硝酸などの窒素源代謝に関与していることが示唆された。*F. oxysporum* と *A. oryzae* の P450nor 遺伝子のホモロジーはアミノ酸レベルで59%であり、一次構造より麹菌の P450nor は nor2 タイプの酵素であることが推定された。本遺伝子を高発現する麹菌を作製し、本酵素の大量発現を試みた。酵素の精製を行い、諸性質の検討を行ったところ、本酵素は NADH、NADPH の両方を補酵素として利用できるタイプの酵素 (nor2) であり、NADH のみを補酵素として利用する *Fusarium* 酵素(nor1)とは異なる性質を有していた。

Cloning and molecular analysis of the P450nor gene of *Aspergillus oryzae*

Masahiko Kaya, Kengo Matumura, Katuya Higashida, Yoji Hata, Akitsugu Kawato, Koji Suginami, Yashuhisa Abe, ¹Naoki Takaya, ²Hirohumi Shoun (Gekkeikan sake.co.ltd., ¹Institute of Applied Biochemistry, University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki., ²Department of Biotechnology, Graduate School of Agricultural and Life Sciences.)

O-11

糸状菌 *Fusarium oxysporum* の一酸化窒素還元酵素遺伝子(CYP55)の発現制御機構

高谷直樹、内村浩正、祥雲弘文* (筑波大・応生化、東大院・農・応生工*)

(目的) *Fusarium oxysporum* は、硝酸塩を異化的に代謝し亜酸化窒素ガスを生成する性質(脱窒能)をもつ生物として、真核生物としては初めて発見され、我々によって解析が進められている。一方、この反応過程において、シトクロム P450nor (CYP55)は、代謝中間産物である一酸化窒素 (NO) の還元に必要な NO 還元酵素であり、NO による傷害から細胞を守る機能を持つ。一連の硝酸代謝系は、低酸素条件下で硝酸塩により誘導される。本報告では、CYP55 遺伝子の転写制御機構についての最近の知見を述べる。

(方法と結果) 過塩素酸耐性を指標に単離した硝酸同化系の転写制御因子の欠損変異株および、大腸菌 *lacZ* 遺伝子を利用した CYP55 遺伝子プロモーターの機能領域の解析を行った。その結果、CYP55 の硝酸による発現誘導には、*Aspergillus nidulans* で知られる硝酸同化系の正の転写調節因子 NirA の結合配列と類似の配列が寄与することが示された。これは、硝酸の異化と同化とが共通の因子で発現制御されることを示唆する。これに対して、CYP55 の発現はアンモニアで抑制されない点で、硝酸同化系とは異なる。一方、好気条件下での CYP55 の発現抑制は、酵母で知られる酸素による転写抑制因子 Rox1p の結合配列と類似の配列によることが示された。*F. oxysporum* は、これら 2 つの因子によって CYP55 の発現を制御すると考えられる。

Transcriptional control of nitric oxide reductase gene (CYP55) in the fungal denitrifier *Fusarium oxysporum*

Naoki Takaya, Hiromasa Uchimura, Hirofumi Shoun* (Applied Biochemistry, University of Tsukuba, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo*)

O-12

クエン酸生産糸状菌 *Aspergillus niger* におけるシアン非感受性呼吸系酵素遺伝子 (*aox1*) の破壊

桐村光太郎、宇田川史仁、木野邦器、宇佐美昭次 (早大・理工・応化)

クエン酸生産糸状菌 *A. niger* WU-2223L のミトコンドリア内には、シトクロム鎖の他にシアンおよびアンチマイシン A に非感受性でサリチルヒドロキسام酸 (SHAM) に感受性の呼吸系が存在する。^{1,2)}しかも、培養液への SHAM の添加により菌体の生育は阻害されずにクエン酸生産量が激減する。²⁾また、演者らは当該呼吸系を触媒する酵素 alternative oxidase の遺伝子もクローニングした。¹⁾本研究では、当該酵素遺伝子 (*aox1*) 破壊株を作成しクエン酸生産に対する影響を明らかにした。

既にクローニングした全長 2856bp の *A. niger* 染色体遺伝子 *aox1* より活性発現に必要と考えられる部位を欠失させた遺伝子破壊用プラスミドを用いて、PEG 法により *A. niger* WU-2223L *pyrG* 株の形質転換を行った。得られた形質転換株について、サザン解析等により *aox1* の破壊を確認した。取得した遺伝子破壊株 $\Delta aox1-1$ について、シアン非感受性呼吸の消失とクエン酸生産量の著しい低下を明らかにした。

1) K. Kirimura et al., *Curr. Gent.*, 34, 472-477 (1999)

2) K. Kirimura et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 64, 2034-2039 (2000)

Disruption of the cyanide-insensitive alternative oxidase gene (*aox1*) in the citric acid-producing *Aspergillus niger*.

Kohtaro Kirimura, Fumihito Udagawa, Kuniki Kino, Shoji Usami (Dept. Appl. Chem., School of Science & Engineer., Waseda Univ.)

O-13

新規 Zn 結合モチーフをもつ耐熱性デューテロリシン(DLN)遺伝子の大量発現系の構築、DLN の特異性、CoDLN のメタルセンター

土井ゆうこ、李 秉魯、池口雅道、大庭裕範*、生駒忠昭*、手老省三*、山内清語*、高橋幸資**、一島英治（創価大学大学院工学研究科、*東北大学多元物質科学研究所、**東京農工大学農学部）

DLN(EC 3.4.24.39)は、*Aspergillus oryzae* が分泌生産する亜鉛金属プロテアーゼであり、分子質量は 19.8 kDa で 3 つの S-S 結合を有し、100℃処理後、かなりの残存活性がある。現在までに大腸菌や酵母を宿主に発現されているが、今回 *Aspergillus saitoi* を宿主とした大量発現系の構築を行った。DLN の亜鉛の配位環境を部位特異的変異によって調べたところ、アスブジンシンと命名した HEXXH+D からなる新規の亜鉛結合モチーフが発見され His¹²⁸、His¹³²、Asp¹⁶⁴ の配位子が確認された。さらに亜鉛イオンをコバルトに置換した DLN(CoDLN)による EPR の測定を行ったところ、歪んだ四面体構造を持つ高スピンコバルト(II) (S=3/2) のジオメトリーが明らかにされた。DLN の基質特異性について、低分子合成基質を用いて詳細に調べたところ、塩基性アミノ酸が 2 つ連なったペプチドの C 末端側に特異性があるプロプロテインコンバターゼ様基質特異性を示すことが明らかにされた。

Overexpression and specificity of deuterolysin (DLN) with a new zinc binding motif and metal-center of CoDLN

Yuko Doi, Byung Rho Lee, Masamichi Ikeguchi, Yasunori Ohba*, Tadaaki Ikoma*, Shozo Tero*, Seigo Yamauchi*, Koji Takahashi**and Eiji Ichishima

(Department of Bioengineering, Graduate School of Soka University, *Institute of Multidisciplinary Research for Advanced Materials, Tohoku University, **Department of Applied Biological Science, Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology)

O-14

Aspergillus saitoi 1,2- α -D-マンノシダーゼの活性中心構造

多田羅洋太¹、藤田晃子²、李 秉魯¹、吉田 孝³、高橋幸資⁴、一島英治¹（¹創価大院工、²醸造研、³東農工大農、⁴弘前大農学生命）

α -マンノシダーゼは糖タンパク質の糖鎖のプロセッシングをする酵素として重要な機能を持つ。糸状菌 *Aspergillus saitoi* の 1,2- α -マンノシダーゼ MSD 遺伝子 (*msdS*) を *A. oryzae* を宿主として発現させ、またこれに部位特異的変異を加えることによって活性部位の構造について検討した。すでに酵母の発現系で発現した変異酵素の活性中心のアミノ酸残基については調べられているが、発現量が少ないという問題があった。そこで今回は大量発現系として注目される麹菌を用いて変異酵素を発現し検討を加えた。

変異は 1,2- α -マンノシダーゼのカルボキシル基を持つアミノ酸残基を対象にして行った。*A. oryzae* を宿主として発現した変異酵素の活性を Man₆GlcNAc₂-PA により測定した。この結果 Glu124Gln、Glu273Gln、Glu504Gln の変異酵素はそれぞれ活性はほとんど見られなかった。また、*A. saitoi* 1,2- α -マンノシダーゼは従来金属イオンを持たないと考えられていたが、原子吸光による解析の結果、分子 1 mol あたり 1 g 原子の活性に必須の Ca²⁺イオンを持つことがわかった。それぞれの変異酵素について同様に原子吸光を行った結果、Ca²⁺イオンを持たなかった。

部位特異的変異実験から、1,2- α -マンノシダーゼの酸性アミノ酸残基の役割として、活性中心における触媒残基と Ca²⁺イオンのリガンドについて考察する。

The structure of catalytic center of 1,2- α -D-mannosidase from *Aspergillus saitoi*

¹Y. Tatara, ²A. Fujita, ¹B.R. Lee, ³T. Yosida, ⁴K. Takahashi, ¹E. Ichishima (¹Graduate School of Eng., Soka Univ., ²Res. Inst. Brewing, ³Dept. of Appl. Biol. Sci., Tokyo Univ. of Agric. Technol., ⁴Fac. of Agric. Life Sci., Hirosaki Univ.)

O-15

Aspergillus nidulans α -グルコシダーゼのアミラーゼ発現誘導への関与

加藤直樹、加藤雅士、小林哲夫、塚越規弘（名大院・生命農学）

Aspergillus 属におけるアミラーゼ遺伝子の発現は、マルトースを始めとした様々なオリゴ糖により誘導される。なかでもイソマルトースは最も優れた誘導能を有しており、低濃度（3 μ M）でも十分にアミラーゼ生産を誘導する。マルトースによるアミラーゼ発現誘導は α -グルコシダーゼ阻害剤の添加により阻害されるが、イソマルトースはその影響を受けない。これはマルトースによる誘導には α -グルコシダーゼ活性が必要であり、その糖転移活性によりマルトースがイソマルトースに変換されることを示唆している。糖転移活性を指標にその変換を担う酵素を精製し、それをコードする遺伝子をクローン化した。本酵素は強力な糖転移活性を有し、系統解析により新規の α -グルコシダーゼであることが明らかとなった。この α -グルコシダーゼ *agdB* の他に、*A. nidulans* は *amyR*、*amyA* とクラスターを形成している *agdA* を有している。 α -グルコシダーゼのアミラーゼ発現誘導への関与について検討を行うために、*agdA*、*agdB* 遺伝子破壊株、および二重遺伝子破壊株を作製し、遺伝子破壊のアミラーゼ発現誘導能に与える影響について報告する予定である。

Involvement of α -glucosidases in amylase induction in *Aspergillus nidulans*

Naoki Kato, Masashi Kato, Tetsuo Kobayashi, and Norihiro Tsukagoshi (Department of Biological Mechanisms and Functions, Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University)

O-16

Aspergillus nidulans における *USO1* 相同遺伝子 (*usoA*) の解析

飯島 隆、中島春紫、北本勝ひこ（東大院農生科・応生工）

【目的】 *Aspergillus* 属をはじめとする糸状菌は有用物質生産の宿主として注目されているが、蛋白質の細胞内輸送については解析は進んでいない。酵母 *S.cerevisiae* の *USO1* 遺伝子は ER-Golgi 間の小胞輸送に必須の遺伝子である。演者らは、糸状菌における細胞内蛋白質輸送機構を解析する目的で *A.nidulans* から *USO1* ホモログをコードする *usoA* 遺伝子を単離した。さらに、*usoA* 条件発現株を作成し、*usoA* 遺伝子の機能解析を行った。

【方法と結果】 *usoA* 遺伝子のプロモーターを *alcA* プロモーターに置換し、培地中の C 源により *usoA* 遺伝子の発現が制御される変異株を作成した。この変異株は *usoA* 抑制条件下では生育しなかったことから、*usoA* 遺伝子は必須遺伝子と考えられた。また、*usoA* 誘導培地で生育した株を *usoA* 抑制条件下に移したところ、菌糸が多分岐になるとともに、先端成長が阻害され、菌糸先端が膨れ上がる異常な形態が観察された。

Cloning and characterization of the *uso1* homologue gene *usoA* in *Aspergillus nidulans*

Takashi IJIMA, Harushi NAKAJIMA, Katsuhiko KITAMOTO

(Department of Biotechnology, the University of Tokyo)

O-17

細胞質ダイニン重鎖のノックアウトと糸状菌の有糸分裂

井上 哲※ J. R. Aist (所属 コーネル大学植物病理学科、※東大・院・医・細胞生物)

細胞質ダイニンは、微小管に附随する2本の重鎖とダイナクチンを含む数個のコンポーネントからなるタンパク質複合体で、糸状菌の菌糸内では、核の移動と分布に働く分子モーターとして知られている。有糸分裂における細胞質ダイニンの役割を調べるため、PCR で得た 1.1kb の DNA フラグメントにマーカーとしてハイグロマイシン耐性遺伝子を挿入し、相同組み換えによって 13kb の細胞質ダイニン重鎖遺伝子をノックアウトした *Nectria haematococca* (無性世代 *Fusarium solani*) の変異株を得た。

上記変異株の生体菌糸中の有糸分裂を位相差及び、微分干渉式ビデオ顕微鏡下で観察したところ、後期 B での両極の移動(紡錘体の伸長)速度が野生株(7.1um)の約半分(3.6um)であり、さらに、レーザーメスで紡錘体を切断する実験結果から細胞質ダイニンは、糸状菌の有糸分裂では、後期 B で、両極を星状体微小管を通して核外から引く力に関与することが証明された。また、微小管の間接蛍光抗体染色法の実験結果から、星状体微小管の形成にも関与していることが示唆された。

Knock Out of Cytoplasmic Dynein Heavy Chain and Mitosis of Filamentous Fungi

Satoshi Inoue*, J. R. Aist (Dept of Plant Path, Cornell University, *Dept of Cell Biol, University of Tokyo)

O-18

Aspergillus nidulans および *Penicillium paxilli* の *RAD51* ホモログ欠失系統における細胞外 DNA の組み込み様式

一岡大輔・夏目豊彰・伊藤靖夫 (信大・理)

A. nidulans および *P. paxilli* における、形質転換時の細胞外 DNA の染色体への組み込み機構を解析するために、出芽酵母 *RAD51* のホモログの欠失系統をそれぞれ構築した。本遺伝子の産物は、減数分裂時および DNA 二重鎖切断(DSB)部位の組み換え修復時に、DNA 鎖間の相同性の検索に主要な役割を果たす。*A. nidulans* では、欠失系統において *argB* 座における 1.7-kb 断片の相同組み込みが観察されなかった。また、異所的組み込みの結果、染色体上の複数部位に組み込みが起こった形質転換体数が有意に増加した。*P. paxilli* でも、アセトアミド利用性を選択マーカーとした異所的組み込みの場合、欠失系統において、複数部位に組み込みが起こった割合が有意に増加した。また、この時、逆方向反復配列と同方向反復配列が同程度の頻度で観察された。ジェネティシン耐性をマーカーとした場合、欠失系統において、同方向反復配列の形成頻度が有意に低下した。以前の知見ともあわせ、*RAD51* ホモログが相同的組み込みおよび異所的組み込みに関与すること、染色体上の二重鎖切断が細胞外 DNA の組み込みの主要な基質であることについて議論する。

Extra-cellular DNA integration in a null mutant of yeast *RAD51* homologue in *Aspergillus nidulans* and *Penicillium paxilli*.

Ichioka, D., Nastume, T., and Itoh, Y. (Shinshu Univ., Fac. Science)

O-19

白色腐朽担子菌のケミカルストレス応答

栗原宏征、割石博之*、田中浩雄*（九大院生資環・農*）

白色腐朽担子菌は優れた代謝変換能を有し、種々の芳香族性環境汚染物質を分解することで知られている。今回、dibenzo-*p*-dioxin をケミカルストレスとし、担子菌のストレス応答機構を追跡した。その結果、ダイオキシンストレスに対し、リグニンペルオキシダーゼ活性の増加、並びに転写レベルでの誘導が確認された。また、ベラトリルアルコール合成量の増加も確認され、LiP 活性の増加を引き起こした一因であることが明らかとなった。さらに、ディファレンシャルディスプレイ法によるストレス誘導性遺伝子の網羅的解析を行った結果、様々な既知タンパク質と高い相同性を示す遺伝子断片が同定された。キノンレダクターゼと高い相同性を示す遺伝子断片が同定されたことから、ダイオキシン分解系との関与が示唆された。ダイオキシン以外の化合物による発現誘導を検討したところ、本遺伝子はキノンに対して強く誘導されることが明らかとなった。また、他の担子菌由来 MnSOD と高い相同性を示す遺伝子断片も同時に同定された。5' RACE 法により完全長塩基配列を決定し、大腸菌/pET システムにてタンパク質の発現を行った結果、25 kDa の活性型のタンパク質として発現していることが SOD 活性染色により確認された。

Chemical stress responsible actions found in white-rot fungus exposed to dibenzo-*p*-dioxin

Hiroiyuki Kurihara, Hiroyuki Wariishi, & Hiroo Tanaka (Kyushu University)

O-20

木材腐朽菌オオウズラタケのシュウ酸生合成と共役する新規炭素代謝機構

島田幹夫、服部武文、Erman Munir, Jeong J. Yoon, 時松敏明、西出辰徳、(京大木質研)

木材腐朽菌はシュウ酸を合成し分解する白色腐朽菌とシュウ酸を集積する褐色腐朽菌に2大別される。この相違点は両者のリグニン分解能力の相違点とも関連して進化学的な関心と呼ぶものである。一方、シュウ酸生合成が腐朽菌の子実体形成時の炭素代謝とも関連する可能性があり、興味深い。このような観点から、褐色腐朽菌オオウズラタケのシュウ酸生合成酵素系とTCA回路との関係を調べて行くうちに、通説に反して、グルコース抑制を受けないグリオキシル酸回路が存在することを発見した。共役するこれら2つの回路は新規な炭素代謝機構としてシュウ酸生合成を支え、エネルギーを生成しているメカニズムが解明された【1】。調節鍵酵素としてイソクエン酸リアーゼ(ICL)が特に重要な役割を果たすが、ICLと新規 flavohemoprotein glyoxylate dehydrogenase の cDNA クローニングを試みているのでその結果についても若干報告する。

【1】 E.Munir, J. J. Yoon, T.Tokimatsu, T.Hattori, M.Shimada,: Proc.Natl.Acad.Sci. USA (2001) (Sept. issue).

A New Mechanism for Carbon Metabolism Coupling with Oxalate Biosynthesis in Wood -Rotting Fungi

M.Shimada, T.Hattori,E.Munir,,J.J.,Yoon, T.Tokimatsu, and T.Nishide (Wood Research Institute, Kyoto University).

O-21

セロビオース脱水素酵素における分子内電子伝達機構の解析

(東大・農生科) 五十嵐圭日子, 鮫島正浩, (日医大・一生化) 西野武士

多くの糸状菌はセルロース分解過程において、セルラーゼと総称されるセルロース加水分解酵素群と共にセロビオース脱水素酵素 (CDH) という酸化還元酵素を菌体外に生産する。CDH は補欠分子族としてフラビンとヘムを含むフラボヘム蛋白質で、セロビオースおよびセロオリゴ糖の還元末端を酸化してラク톤を生成する反応を触媒し、その反応と共役して比較的酸化還元電位の高い様々な化合物を電子受容体として利用することが知られている。しかし、CDH による基質の酸化と電子受容体の還元という一連の反応においてその反応速度は pH や電子受容体の種類などに大きく依存しており、その原因として二つの補欠分子族間における電子伝達速度が関与していると考えられている。そこで本研究では CDH 分子内におけるフラビンとヘムの酸化還元電位を酸化還元滴定およびサイクリックボルタメトリーによって測定するとともに、前定常状態における補欠分子族の還元速度をストップフロー分光光度計によって測定し、CDH の酸化還元反応機構を詳細に解析した。

Mechanism of intra-molecular electron transfer in cellobiose dehydrogenase

(University of Tokyo) Kiyohiko Igarashi, Masahiro Samejima, (Nippon Medical School) Takeshi Nishino

O-22

イネいもち病菌における 3 量体 G タンパク質 β サブユニットの機能

西村麻里江 (生物研), Jin-Rong Xu (Purdue University)

イネいもち病菌は孢子からイネ上で発芽管を伸ばし、その先端に付着器を形成し、ここからイネ細胞へ侵入する。付着器形成はいもち病菌が表面の疎水性や堅さを認識することにより開始されると考えられている。

真核生物では細胞外情報の細胞内への伝達には細胞膜に存在する 3 量体 G タンパク質 ($G\alpha$, $G\beta$, $G\gamma$) を介して行われ、外来のシグナル物質が細胞表面のレセプターに結合すると下流で $G\alpha$ と $G\beta \cdot \gamma$ 複合体に解離され活性型となる。いもち病菌において MAP キナーゼ (*PMK1*) は付着器形成開始を正に制御していることが知られているが、上流でこれを制御している因子については明らかになっていない。そこで、我々は $G\beta \cdot \gamma$ が出芽酵母同様、MAP キナーゼカスケードを制御している可能性について検討した。PCR でクローニングしてきた $G\beta$ 遺伝子を用いたノックアウトコンストラクトにより 2 種類の $G\beta$ ミュータントを作製し、その形質について解析を行ったところ、これらのミュータントは *Aspergillus nidulans* の $G\beta$ 変異株 (*SfaD* mutant) と同様に発達した気中菌糸をつくった。また、これらのミュータントでは疎水面上で 24 時間培養しても付着器形成がみられず、*pmk1* 変異株と同様の形質を示した。これらのことから、いもち病菌において $G\beta \cdot \gamma$ 複合体が *PMK1* pathway を正に制御しており、付着器形成開始シグナルを伝達していると考えられる。

Characterization of β subunit of heterotrimeric G protein in *Magnaporthe grisea*.

Marie Nishimura (National Institute of Agrobiological Sciences, Japan) and Jin-Rong Xu (Purdue University, USA)

O-23

麹菌 *Aspergillus oryzae* の発芽分生子および分生子柄の核動態

石 一智、丸山潤一、中島春紫、北本勝ひこ (東大院農生科・応生工)

【目的】糸状菌において、核の運搬は、分生子形成および菌糸の極性成長に重要である。糸状菌のモデル生物とされる *A.nidulans* は単核の分生子を形成し、その核の挙動はよく研究されている。麹菌 *A. oryzae* は、多核の分生子を形成する。その多核分生子の発芽および多核の分生子を形成している分生子柄の核の挙動についての報告はほとんどない。本研究では、これらの核動態を解析した。

【方法および結果】*A. oryzae* において HistoneH2B::EGFP 融合タンパク質を発現することで、核を可視化した株を用いた(Maruyama *et al.*, 2001)。様々な核数の分生子の発芽を経時的に観察し、核動態を追跡した。これにより、多核の分生子が、核分裂を伴うことなく、発芽管を形成することが観察された。さらに、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、分生子柄中の連続する分生子中の核を可視化したところ、これらの分生子も多核であることが確認された。現在、FACS を用いて、単核分生子のみを形成する変異株の取得を試みている。Maruyama *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**(7), 1504-1510, 2001

Nuclear movement during germination and conidiation in *Aspergillus oryzae*Kazutomo Ishi, Jun-ichi Maruyama, Harushi Nakajima, Katsuhiko Kitamoto(Department of Biotechnology, The University of Tokyo)

O-24

白麹菌のセルラーゼ・ヘミセルラーゼ及びその遺伝子

伊藤 清、*皆川 一 (酒類総研、*広大院・先端研)

【目的】セルロース・ヘミセルロースは地球上で最も多く存在する有機物質であり、バイオマス資源として注目され、利用開発が研究されている。また、これらの多糖は、穀物細胞壁中にも多量に存在し、原料の有効利用を低下させている。従って、資源を有効に利用するためには、セルラーゼ・ヘミセルラーゼの利用が効果的であると考えられる。既に、白麹菌 (*Aspergillus kawachii* IFO4308) から多数のセルラーゼ・ヘミセルラーゼ遺伝子をクローニングしているが、これらの概要について報告する。

【方法と結果】キシラナーゼについては、酵素を精製し、これに対する抗体を作成した後、イムノスクリーニングを行い、3種類の遺伝子 (xynA, xynB, xynC) をクローニングしている。エンドグルカナーゼについては、セルロース結合ドメイン (CBD) をコードする DNA フラグメントを PCR でクローニングし、これをプローブとして、エンドグルカナーゼ A (eglA) 遺伝子をクローニングし、さらに eglA の cDNA をプローブとして、cDNA 及び染色体 DNA ライブラリーのスクリーニングを行った。cDNA については合計5種類 (eglA, B, C, D, E)、染色体 DNA についても対応するものをクローニングした。また、この他にも、別のエンドグルカナーゼ・セロピオハイドロラーゼ・キシロシダーゼ等をクローニングしている。

Cellulase and hemicellulase genes of white koji mold (*Aspergillus kawachii*)

Kiyoshi Ito and Hajime Minakawa (Res. Inst. of Brewing, Hiroshima University)

O-25

タカアミラーゼ A 遺伝子プロモーターを利用した醤油麹菌セルラーゼ D 遺伝子の高発現

北本則行、松井淳子、安田（吉野）庄子、和久 豊*（愛知食工技、*ピオック）

醤油麹菌 *Aspergillus oryzae* のペクチン分解酵素やセルロース分解酵素は、醤油諸味の粘度低下をもたらす、圧搾性を高めることが知られている。我々は、これらの酵素の醤油原料分解特性を解明し、より優れた醤油麹菌を作り出すことを最終的な目的として、その遺伝子群の解析を行っている。醤油麹菌 *A. oryzae* KBN616 株の遺伝子ライブラリーより新たにクローニングされたセルラーゼ D 遺伝子は、1486 bp の長さで 2 個のイントロンが存在していると考えられた。本遺伝子には 454 個のアミノ酸がコードされており、そのアミノ酸配列は既知の CBHI のアミノ酸配列と約 60% の相同性が認められた。タカアミラーゼ A 遺伝子プロモーターを用いてセルラーゼ D 遺伝子を発現させたところ、デンプンを炭素源とする培地で高い CBHI 活性を示す形質転換株が得られた。

本研究は、文部科学省の平成 12 年度科学振興調整費による「地域先導研究：カビの酵素高生産能を利用した環境調和型工業プロセス技術の基盤研究」の一環として行ったものである。

Overexpression of the *A. oryzae* cellulase D gene under the control of the Taka-amylase A gene promoter

Noriyuki Kitamoto, Junko Matsui, Shoko Yoshino-Yasuda, Yutaka Wagu*, (Food Research Institute, Aichi Prefectural Government, *Bio'c)

O-26

麹菌キシラン・セルロース分解酵素に特異的な転写因子 AoXlnR の機能解析

丸井淳一郎・北本則行*・田中昭光**・加藤雅士・小林哲夫・塚越規弘（名大院・生命農学 *愛知食品工技* *ヒゲタ醤油・研）

麹菌 *Aspergillus oryzae* は、我が国の発酵工業において重要な役割を果たし、アミラーゼ、キシラナーゼ等、様々な菌体外酵素の分泌能力に優れた有用微生物である。AoXlnR (*A. oryzae* XlnR) は、*A. oryzae* キシラナーゼ遺伝子 *xynF1* の誘導発現に必須の因子として単離された。971 アミノ酸からなる推定 105 kDa の同因子は N 末端側領域に典型的な Zn₂Cys₆ 型 DNA 結合ドメインを有し、*A. niger* XlnR と 77.5% の同一性を示す。

MalE-AoXlnR 融合タンパク質を用いたゲルシフトアッセイから AoXlnR は *xynF1* 遺伝子プロモーター内の高親和性、低親和性の二か所の部位にそれぞれ独立して結合することが明らかとなった。更に *xynF1::lacZ* 融合遺伝子を用いた *in vivo* 解析より、これら二か所の AoXlnR 結合部位はいずれも細胞内で独立して機能し、高親和性結合部位が *xynF1* のキシランによる誘導発現のために、より重要であることを明らかにした。また、*AoxlnR* 遺伝子破壊株を用いたノーザン解析の結果、麹菌に存在する複数のキシラン分解酵素遺伝子及びセルラーゼ遺伝子の誘導発現能が消失したことから、AoXlnR はキシラン、セルロースなどの植物細胞壁構成多糖の分解酵素遺伝子群の誘導発現に広く機能する重要な転写因子であることが示唆された。

Functional analysis of the xylanolytic and cellulolytic transcriptional activator, AoXlnR, in *Aspergillus oryzae*

Junichiro Marui, Noriyuki Kitamoto*, Akimitsu Tanaka**, Masashi Kato, Testuo Kobayashi, and Norihiro Tsukagoshi (Department of Biological Mechanisms and Functions, Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University., *Food Reserch Institute, Aichi Prefectural Government., **R&D Department, Higeta Shoyu Co., Ltd.)

O-27

Aspergillus oryzae カルボキシペプチダーゼ (CPase) 遺伝子の多様性

横田正仁、竹内道雄 (農工大・農・応生科)

[目的] *A.oryzae* IAM2640 は、液体培養では高分子型 CPase O、固体培養では低分子型 CPase O-1、O-2 を生産する。しかし、これまでこれがプロセッシングによるものなのか、遺伝子レベルでの多様性なのかは不明であった。本研究では、低分子型 CPase 遺伝子をクローン化し、低分子型 CPase の構造を明らかにするとともに、既にクローン化されている高分子型 CPase O と比較することにより、*A.oryzae* における CPase の遺伝子レベルでの多様性を明らかにすることを目的とする。

[方法と結果] *A.oryzae* CPase I cDNA の配列¹⁾ をもとにプライマーを作製し、*A.oryzae* IAM2640 の gDNA を鋳型として PCR を行ったところ 800bp の増幅断片が認められた。その増幅断片と CPase O 遺伝子はサザンブロットによりハイブリダイズしないことが確認された。その結果、*A.oryzae* CPase は遺伝子レベルで多様性を示していることが明らかになった。この増幅断片をプローブとしてプラークハイブリダイゼーションによりゲノミックライブラリーをスクリーニングした結果、10000 個のうち 3 個の陽性クローンを得た。現在、その塩基配列決定を試みている。 1) Alexander et al., Appl.Env.Microbiol.,65,3298-3309(1999)

Multiple forms of carboxypeptidase genes from *Aspergillus oryzae*

Masahito Yokota and Michio Takeuchi (Tokyo University of Agriculture and Technology)

O-28

Aspergillus aculeatus 由来 *creA* 遺伝子のクローニング，発現，およびセロビオハイドロラーゼ I 遺伝子上流域における結合部位の解析

加藤朋子，北脇麻紀，川口剛司，炭谷順一，荒井基夫 (阪府大院・応生化，先端研)

Aspergillus aculeatus のセルラーゼ遺伝子はグルコースにより転写が著しく抑制される。糸状菌のカタボライト抑制は負の制御因子である CREA により調節されていることから、このセルラーゼ遺伝子の制御機構においても CREA が関与していると考えられる。今回はこの制御機構を明らかにするため、*A.aculeatus* の *creA* 遺伝子をクローニングし、大腸菌で発現させた。さらに得られた CREA を用いて *A.aculeatus* セルラーゼの一つであるセロビオハイドロラーゼ I 遺伝子 (*cbhI*) 上流域における CREA 結合部位を解析した。

A.aculeatus の *creA* 遺伝子は 431 アミノ酸残基 (分子量 46,312) よりなる蛋白質をコードする 1,293 bp のイントロンを含まない ORF から成り、その推定アミノ酸配列は *A.nidulans*, *A.niger* の CREA とそれぞれ 83%, 91% と高い相同性が示された。また N 末端側には 2 つの Zinc finger ドメイン、A/T-rich な配列を有していることが分かった。Zinc finger ドメインのみを大腸菌発現ベクター pGEX4T-2 を利用して GST 融合蛋白質として発現させ、Glutathione Sepharose 4B により電気泳動的に均一に精製した。精製した GST-CREA を用いて *cbhI* 遺伝子上流におけるゲルシフト解析を行った結果、*cbhI* 遺伝子上流 1.6 kb に存在する 9 つの CREA 結合コンセンサス配列のうち -586, -445, -384 の 3 箇所に CREA が強く結合することが明らかとなった。

Cloning and expression of *Aspergillus aculeatus creA* gene, and its binding to the promoter region of cellobiohydrolase I gene

Tomoko Kato, Maki Kitawaki, Takashi Kawaguchi, Jun-ichi Sumitani, Motoo Arai (Graduate School of Agriculture and Biological Sciences, and Research Institute of Advanced Science and Technology, Osaka Prefecture University)

Poster Session

P-1

糸状菌 *Aspergillus nidulans* のミオシン様ドメインを持つキチン合成酵素 (CsmA) の菌体内での存在状態、生産についての解析

竹下典男、堀内裕之、太田明德 (東大院・農生科・応生工)

キチンは糸状菌の細胞壁の主要構成成分の1つであり、その生合成は形態の形成、維持に関わると考えられる。*A. nidulans* のキチン合成酵素をコードする遺伝子の1つである *csmA* (chitin synthase with a myosin motor-like domain) はキチン合成酵素ドメインのN末端側にミオシン様ドメインを持つ1852アミノ酸からなる特異な構造をしたタンパク質をコードしている。*csmA* の破壊株では菌糸の途中が膨らむ balloon の形成、菌糸の中に新たに菌糸が生じる菌糸内菌糸の形成、低浸透圧感受性などが観察される。本研究は CsmA のタンパク質レベルでの存在状態、生産パターンについての解析を目的とし、*csmA* の ORF の C 末端に 9xHA の tag を繋いだ形のタンパク質 (CsmA::9xHA) を発現する株を作製した。HA に対する抗体で western 解析をおこなったところ予想される約 210 kDa の位置にバンドが見られた。CsmA::9xHA の細胞内での分画を行ったところ膜画分にあることが示され、Glycopeptidase F 処理で糖鎖の付加が示されたことから、分泌経路によって輸送されることが示唆された。CsmA::9xHA の菌体内での生産は低浸透圧培地で上昇することが示され、northern 解析の結果よりこの上昇は転写レベルにおいても制御を受けていることが示唆された。

Characterization of CsmA (chitin synthase with a myosin motor-like domain) of *Aspergillus nidulans*

Norio Takeshita, Hiroyuki Horiuchi, and Akinori Ohta (Dept. Biotechnol., Univ. Tokyo)

P-2

Aspergillus nidulans の分生子形成に及ぼすキチン合成酵素遺伝子破壊の影響

一宮維幸、堀内裕之、太田明德 (東大院・農生科・応生工)

キチンは糸状菌の細胞壁の主成分の1つであり、その生合成は形態の維持、再構成に重要である。当研究室では現在までに *A. nidulans* から5種のキチン合成酵素遺伝子 (*chsA-D*, *csmA*) を単離している。*chsA chsC* 二重遺伝子破壊株 (AC 株) では分生子柄の形態異常、及び分生子形成効率の低下が観察されていた。分生子形成に関わる転写因子をコードする遺伝子として知られている *brlA* のある種の変異株、および *medA* の変異株の分生子柄も類似の形態を示すことから、野生型株、*brlA* 変異株、*medA* 変異株での *chsA*、*chsC* の発現を *lacZ* をレポーターとして解析した。その結果 *chsC* の発現量は *brlA* 変異株において低下していたが、*chsA* の発現量にはいずれの株でも大きな差はみられなかった。一方、*medA*、*brlA* の転写量は AC 株では野生型株に比べて減少していた。また AC 株の菌糸細胞壁および隔壁構造には異常がみられた。以上の結果から細胞壁合成の異常が *brlA* や *medA* の転写に影響を与え、分生子柄形成を抑制している可能性が考えられた。出芽酵母においては細胞壁構造の異常を感知し応答する機構が存在する。この機構に関わる *PKC1* の *A. nidulans* ホモログと考えられる遺伝子の部分断片を現在までに取得しており、この遺伝子と AC 株の表現型との関連について検討している。

Double disruption of class I and II chitin synthase genes causes defects in conidiation.

Masayuki Ichinomiya, Hiroyuki Horiuchi, and Akinori Ohta (Dept. Biotechnol., Univ. Tokyo)

P-3

冬虫夏草菌の交配型遺伝子

横山英之¹、伊東達雄²、河内一郎²、中谷善博²、氏田 稔²、原 彰² (名城大・¹農学ハイテク、²生物化学)

【目的】冬虫夏草菌を用いた有用物質生産における問題点として、子嚢果や分生子柄を、大量に生産することが困難な点があげられる。生殖機構の解明は、有用物質生産等の応用面だけではなく、完全体と不完全体の関係を明らかにする基礎的側面からも期待される。

本研究は、冬虫夏草菌の生殖機構の解明を目的として、まず冬虫夏草菌の交配型遺伝子の検討を行った。

【方法と結果】冬虫夏草菌の属する *Euscomycetes* において、接合型や接合後の分化を制御する2つのタンパク質 MAT1 と MAT2 をコードする遺伝子 *MAT-1* と *MAT-2* が報告されている。既知の MAT1 および MAT2 において保存されているアミノ酸配列を基にして degenerate プライマーを合成し、冬虫夏草菌 *Isaria japonica* の染色体 DNA を鋳型とした PCR を行った。PCR 産物の塩基配列を決定した結果、*I. japonica* BCMU IJ12 株は *MAT-2* を、*I. japonica* BCMU IJ19 株は *MAT-1* を保持することが明らかになった。

以上の結果から、冬虫夏草菌においても MAT1 および MAT2 が存在する事が明らかになり、これらのタンパク質によって交配型や交配後の分化が制御されていることが示唆された。

Mating-type genes of *Isaria japonica*

Eiji Yokoyama¹, Tatsuo Ito², Ichiro Kawachi², Yoshihiro Nakatani², Minoru Ujita², Akira Hara²

(¹The Agricultural High-Tech Research Center, ²Laboratory of Biological Chemistry, Meijo University)

P-4

Aspergillus niger ATCC9642 由来イソプルラナーゼにおける糖鎖の役割 (第4報)

明星裕美、古川貴章、柏木 豊*、殿塚隆史、西河 淳、坂野好幸 (農工大応生科、*独法食総研)

Aspergillus niger ATCC9642 の生産するイソプルラナーゼ (IPU) は多糖プルランに作用しイソパノースを遊離する酵素である。これまでに *Aspergillus oryzae* M-2-3 およびメタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* GS115 における発現系が構築されている(それぞれ IPU-AO、IPU-PP)。電気泳動の移動度より IPU-AO は *A. niger* 由来 IPU の約2倍、IPU-PP は約3倍の糖含量があることが示された。IPU-AO と *A. niger* 由来 IPU の性質を比較した結果、糖含量が反応速度に影響を与えることが既に示されている。本研究は IPU-AO と IPU-PP の比較から、糖含量の増加が IPU へ与える影響を調べ、糖鎖の役割に関する知見を深めることを目的としている。そのために IPU-PP の安定な発現および精製条件を検討し、現在は諸性質を調べている。

Aoki, H., Yopi & Sakano, Y. (1997) *Biochem. J.* **323**, 757-764.

Padmajanti, A., Tonozuka, T. & Sakano, Y. (2000) *J. Appl. Glycosci.* **47**, 287-292.

The role of glycochains for the activity of Isopullulanase from *Aspergillus niger* ATCC9642.

Hiroshi Akeboshi, Takaaki Furukawa, Yutaka Kashiwagi*, Takashi Tonozuka, Atsushi Nishikawa & Yoshiyuki Sakano (Department of Applied Science, Tokyo University of Agriculture and Technology, * National Food Research Institute)

P-5

アスペルギルス属糸状菌の小胞体型 1,2- α -マンノシダーゼ活性について

吉田 孝¹、加藤陽治²、浅田芳宏¹、中島 佑³ (¹弘前大農学生命、²弘前大教育、³東北大院農)

Aspergillus oryze の菌糸よりミクロソーム画分を調製し、界面活性剤存在下でピリジルアミノ化した高マンノース基質 (Man9GlcNAc2-PA) に作用させたところ、マンノース 1 残基を失った Man8GlcNAc2-PA が蓄積した。HPLC による分析から、この Man8 糖鎖は B 型アイソマー (Man8B) である事が明らかとなった。長時間反応後も反応液中の主要生成物は Man8B 型糖鎖であった。このマンノシダーゼ活性による高マンノース基質のトリミングは最適 pH が 7.0 であり、反応にカルシウムイオンを必要とした。本活性はグリコシダーゼ阻害剤キフネンシンにより阻害され、IC50 は 0.1 マイクロモル以下であった。これらの結果から、本酵素活性はヒトおよび酵母の小胞体に存在する ER- α -マンノシダーゼと同じタイプのものであると考えられた。*Aspergillus* や *Penicillium* などの糸状菌は、Man9GlcNAc2 を Man5GlcNAc2 にまでトリミングする 1,2- α -マンノシダーゼを持っている事が既に知られている。これよりアスペルギルス属等の糸状菌は動物細胞と同様に、高マンノース型糖鎖に対する作用様式の異なる 2 種類の 1,2- α -マンノシダーゼを用いて糖鎖プロセッシングを行なっている可能性が示された。

ER-like 1,2- α -mannosidase from a microsomal preparation of *Aspergillus oryzae*

T Yoshida, Y Kato[†], Y Asada, and T Nakajima^{††} (Faculty of Agriculture and Life Science, and [†]Faculty of Education, Hirosaki University, ^{††}Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, Japan)

P-6

Aspergillus nidulans の protein O-mannosyltransferase の構造機能解析

岡 拓二、濱口 哲、野中真由子、後藤正利、古川謙介 (九大院・生資環・生機科)

【目的】マンノース O-型糖鎖は、タンパク質修飾に不可欠なものであり、小胞体に局在する膜貫通型タンパク質 protein O-D-mannosyltransferase (Pmt) によってペプチド鎖の Ser / Thr 残基に付加される。酵母 *Saccharomyces cerevisiae* における O-型糖鎖はマンノースが最大で 5 残基まで直鎖状に伸長するのに対し、*Aspergillus* 属麹菌においては、1 ~ 3 残基のマンノースが α 1,2-結合しているが、 α 1,3- 及び α 1,6-結合による分岐構造も認められる。本報では、酵母とは異なる麹菌の O-型糖鎖合成機構の解明を目的として O-型糖鎖合成の初発酵素である *pmt* の構造解析及び機能解析を行った。

【方法及び結果】*A. nidulans* から *pmt* と推定される遺伝子 (*pmtA*) をクローン化した。*pmtA* は 740 アミノ酸をコードしていた。また、既知の PMT 中では酵母 Pmt2p とそれぞれ 55.3 % と最も高い相同性を示した。ハイドロパシープロット解析の結果、酵母 Pmt2p と疎水性プロファイルが酷似していた。また、Pmt 配列中央部には大きな親水性ドメインが存在していた。*pmtA* 破壊株は、マンノースルトランスフェラーゼ活性が減少した。また、菌糸の途中が膨らむバルーン構造を示し、分生子形成能が低下した。

Structural and functional analyses of protein O-mannosyltransferase from *Aspergillus nidulans*.

○Takuji Oka, Tetsu Hamaguchi, Mayuko Nonaka, Masatoshi Goto, Kensuke Furukawa

P-7

紅麴菌 *Monascus anka* の形質転換系の開発

長島 直、板本明咲枝、寺崎容子*、穴澤秀治* (新日本化学、*協和発酵 東京研究所)

【目的】紅麴菌(*Monascus* 属糸状菌)は紅色系の色素を著量生産し、古来より中国、台湾などで醸造用麴、着色香料の生産菌として用いられており、紅酒、紅乳腐などに利用されている。日本でも沖縄で”とうふう”と呼ばれる食品の製造に使用されてきた安全な菌株である。また紅麴は消化を助け、血行を良くする漢方生薬として古来より広く愛用されている。これは紅麴菌が産生する生理活性物質が血圧降下作用およびコレステロールの生合成を抑制する効能を有するからである。

黄麴菌(*A. oryzae*)と同様、長い間食用とされてきた極めて安全な糸状菌である紅麴菌(モナスカス属菌)の形質転換については全く知られていない。今回、紅麴菌、*Monascus anka* の形質転換系を確立し、その系を用いての異種遺伝子の発現を検討したので報告する。

【方法と結果】*Monascus anka* IFO30873 のアクティブな斜面培地に 0.01 % (v/v) ツイーン 80 を添加し、分生子を集めた。それを選択平板培地 (3 % スクロース、10 mM グルタミン酸、0.2 % KH_2PO_4 、0.05 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.05 % KCl、470 mM KClO_3 、pH 5.5) に撒き、28℃で 15-20 日間培養した。生育してきた数株を選択し、硝酸、亜硝酸、グルタミン酸、プロリン、ヒポキサンチン、硫酸アンモニウム等の N 源をそれぞれ含む平板培地に移植し、その生育性を検討した。結果、選択した株 (2-30-4 株) は亜硝酸、グルタミン酸、プロリン、ヒポキサンチン、硫酸アンモニウムを N 源として資化したが、硝酸は資化できず、取得した株は硝酸還元酵素が欠損 (*niaD*) していると推測された。さらに 2-30-4 株を宿主とし、*A. oryzae* の *niaD* をマーカー遺伝子として形質転換したところ、形質転換株が得られたことより、2-30-4 株は形質転換の宿主として使用できると判断した。次に、*M. anka* より硝酸還元酵素をコードする遺伝子 (*niaD*) のクローニングを行った。常法に従い *M. anka* のゲノムライブラリーを作製し、*A. oryzae* の *niaD* 遺伝子断片をプローブとしてスクリーニングを行ったところ、8 個のポジティブクローンが得られた。その遺伝子断片の塩基配列を決定した結果、硝酸還元酵素をコードしていると推測された。本遺伝子を *M. anka* 2-30-4 株 (*niaD*) に導入したところ、homologous に導入されていることが確認された。

本形質転換系を用いて *Aspergillus niger* のフィターゼ遺伝子 (*phyA*) の発現を検討した。結果、形質転換株はコントロール株に比べて最大 60 倍のフィターゼを高生産した。

Transformation of *Monascus anka* with the homologous nitrate reductase encoding gene (*niaD*)

Tadashi Nagashima, Misaki Itamoto, Yoko Terasaki, Hideharu Anazawa (Shin Nihon Chemical, Kyowa Hakko)

P-8

Aspergillus nidulans の硝酸を利用した嫌氣的エネルギー代謝

高崎一人¹、高谷直樹¹、祥雲弘文² (¹筑波大・応生化、²東大院・農・応生工)

【目的】本研究室において、*Fusarium oxysporum* が嫌気条件下でエタノールの酢酸への酸化に伴い硝酸をアンモニアに還元し生育することが発見された。この現象は細菌において知られているのみであり、従来好氣的微生物と考えられている真菌がこのような嫌氣的な異化的硝酸還元能を持つことは非常に興味深い。本研究では遺伝学的解析が容易である *A. nidulans* を用い、その異化的硝酸還元系の構成成分を解析した。

【方法および結果】*A. nidulans* FGSC A26 (野生株) をエタノールを唯一の炭素源として嫌気培養したところ、経時的に培地中の硝酸が還元されアンモニアと酢酸が生成した。また、この反応に伴って菌体の増殖が見られた。また、硝酸還元酵素 (*NiaD*) または亜硝酸還元酵素 (*NiiA*) 遺伝子の変異株を用い同様に検討したところ、各変異が硝酸のアンモニアへの還元を抑制することが示された。以上の結果は *A. nidulans* の異化的硝酸還元系に硝酸同化系酵素が関与することを示唆する。一方 *A. nidulans* では、エタノールは、アセトアルデヒド、酢酸、acetyl-CoA を経て同化されることが知られている。野生株と比較して alcohol dehydrogenase の正の発現制御因子 (*alcR*) や acetyl-CoA synthetase (*facA*) 遺伝子の変異株では、酢酸とアンモニアの生成が減少したことから、本代謝系へのエタノール同化系の関与が示唆された。現在、aldehyde dehydrogenase (*aldA*) の関与についても検討中である。

A novel anaerobic nitrate reducing metabolism by *Aspergillus nidulans*

Kazuto Takasaki, Naoki Takaya, Hirofumi Shoun* (Applied Biochemistry, University of Tsukuba, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo*)

P-9

***Fusarium oxysporum* におけるアスパラギン酸プロテイナーゼ遺伝子のクローニングと遺伝子破壊**

吉田隆延（東北農研センター）川部眞登（農工大農）有江 力（農工大農）

キャベツ萎黄病の病原菌である *Fusarium oxysporum* f.sp. *conglutinans* の病原性関連遺伝子を解析するため、REMI (Restriction Enzyme Mediated Integration) 法により約 1,500 菌株の形質転換体を作製し、3 菌株の病原性欠損変異株を得た。その中の 1 株 REMI10 を解析したところ、他の糸状菌で報告されているアスパラギン酸プロテイナーゼ遺伝子と相同性が高い遺伝子 *fap1* の内部に形質転換ベクターが挿入されていることが解った。そこで、*fap1* をコスミドライブラリーよりクローニングし、5'及び3'RACE、RT-PCR を用いて遺伝子構造を決定した。アスパラギン酸プロテイナーゼは他の植物病原菌において、病原性に関与していると推測されているため、*fap1* 遺伝子破壊ベクターを構築し、二点間相同組換えにより遺伝子破壊を行った。しかし、得られた *fap1* 破壊株はキャベツへの病原性を欠損しなかった。これより、*fap1* は病原性に必須ではなく、REMI 10 は REMI 法による形質転換の際に染色体に他の変異が起こり、病原性が欠損したと推測される。

Cloning and disruption of a homolog of fungal aspartic proteinase genes from *Fusarium oxysporum*

Takanobu Yoshida (National Agricultural Research Center for Tohoku Region), Masato Kawabe (Tokyo University of Agriculture and Technology), Tsutomu Arie (Tokyo University of Agriculture and Technology)

P-10

固体培養特異的に発現する *glab* 遺伝子プロモーターの転写因子解析

久田博元、佐野元昭*、石田博樹、秦 洋二、川戸章嗣、町田雅之*（月桂冠・総研、*産総研）

麹菌 *Aspergillus oryzae* は様々な酵素を分泌し、産業上重要な微生物である。大半の酵素は固体培養法により生産されるが、当培養法における発現制御機構についてはほとんど解析がなされていない。そこで、固体培養特異的に発現する *glab* 遺伝子に注目し、転写因子についてゲルシフト解析を行ったので報告する。

はじめに *glab* 遺伝子が発現する固体培養から、WCE (whole cell extracts) の調製を試みた。様々な破碎法を試みたところ、ガラスビーズによる破碎法が最適であった。プロモーターの GUS レポーター解析から¹⁾、制御に関与するとされる領域 Region A (GC-box と HSE を含む) と Region C (Region IIIa 類似配列含む) のプローブを作成し、ゲルシフト解析を行ったところ、Region A のみシフトバンドが検出された。このシフトバンドは液体培養から調製した WCE では検出されなかったことから、この因子は固体培養時のみに発現していることが判明した。このことは *glab* 遺伝子の固体培養特異的発現が転写制御因子レベルで制御されていることを示唆している。現在、フットプリント法により結合領域の特定を試みている。

1) Ishida, et. al., *Curr., Genet.*, 37, 373-379 (2000)

Analysis of regulatory factors for the *glab* promoter from *Aspergillus oryzae*

Hiroto Hisada, Motoaki Sano*, Hiroki Ishida, Yoji Hata, Akitsugu Kawato, Masayuki Machida* (Gekkeikan Sake Co., Ltd., *AIST)

P-11

スエヒロタケヘテロ三量体型G蛋白質 α サブユニット ScGP-A, ScGP-C の構成的活性型変異による子実体形成抑制

山岸賢治、木村俊之、鈴木雅博、新本洋士（東北農業研究センター）

糸状菌において、ヘテロ三量体型Gタンパク質 α サブユニットは接合、病原性発現などに深く関与している。Homobasidiomycete であるスエヒロタケにおいては現在数種の遺伝子の存在が報告されており、接合フェロモンレセプターとのリンク、青色光受容への関与などが推定されているが、分子生物学的にその機能を実証した例は少ない。そこで、スエヒロタケにおける三量体型Gタンパク質 α サブユニットの個別の機能を解析するため、各遺伝子（ScGP-A,B, C）の特定の Gln 残基を Arg 残基に置換し、構成的活性型変異遺伝子を作成した。スエヒロタケハイドロフォービン Sc3、GPDH 遺伝子のプロモーターを用いてスエヒロタケ内で発現させたところ、ScGP-A,ScGP-C 変異遺伝子を強く発現している株において、子実体形成が強く抑制された。この観察は、ScGP-A,ScGP-C 遺伝子が、子実体形成を抑制する機能があることを示唆している。

Suppression of the fruit-body formation by constitutively active mutation of heterotrimeric G protein alpha subunit ScGP-A and ScGP-C in homobasidiomycete, *Schizophyllum commune*.

Kenji Yamagishi, Toshiyuki Kimura, Masahiro Suzuki, and Hiroshi Shinmoto (National Agricultural Research Center for Tohoku Region)

P-12

Fusarium oxysporum 由来フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ遺伝子のクローニングとランダム変異導入による基質特異性の変換

炭谷順一、藤原真紀、高橋 守*、古賀晋治*、芳陵一生*、高妻卓司*、川口剛司、荒井基夫
(大阪府大院・応生化、先端研、*旭化成・診断薬研)

【目的】糖化アミノ酸オキシダーゼ (FOD) は血液中の糖化タンパクを測定する診断薬として有用な酵素である。血液中の主な糖化タンパクとして糖化アルブミンおよび糖化ヘモグロビンが挙げられるが、前者は糖化リジン (FK)、後者は糖化バリリン (FV) を含んでいる。*F. oxysporum* 由来 FOD は、その両者に反応性を示すが、どちらか一方にのみ作用すれば、糖化アルブミンもしくは糖化ヘモグロビンを特異的に測定することができる。そこで、FOD 遺伝子をクローニングし、大腸菌において発現させ、ランダムに変異を導入して基質特異性を変化させることを試みた。

【方法と結果】部分アミノ酸配列を基に FOD 遺伝子をクローニングした。FOD 遺伝子は 52 bp のイントロンを1つ含む 1378 bp からなり、441 アミノ酸残基をコードすることがわかった。アミノ酸配列を解析した結果、本 FOD は *Aspergillus fumigatus* 由来のものと 50.7%、*A. terreus* 由来のものと 50.6%、*Penicillium janthinellum* 由来のものと 35.0% のホモロジーがあり、N末端領域には FAD-binding motif、C末端領域にはサルコシンオキシダーゼの活性部位と相同性のある領域が存在することがわかった。大腸菌における発現を検討したところ、trc promoter 制御下で 25°C で培養することにより活性発現に成功した。Taq polymerase のミスリーディングを誘発させた PCR にて FOD 遺伝子にランダムに変異を導入し、FV にほとんど作用しない変異酵素 (K373R) を取得した。さらにこの部位 (K373) での最適置換アミノ酸を同定するために部位特異的ランダム変異を行い、得られた 5 種類の変異酵素について諸性質を検討した。

Improvement of substrate specificity of fructosyl amino acid oxidase from *Fusarium oxysporum*.

Jun-ichi Sumitani, Maki Fujiwara, Mamoru Takahashi*, Shinji Koga*, Issei Yoshioka*, Takuji Kozuma*, Takashi Kawaguchi, and Motoo Arai (Div. Appl. Biol. Chem., Grad. Sch. Agric. and Biol. Sci., and Res. Inst. Adv. Sci. Technol., Osaka Pref. Univ. *Dept. Diagnostics Res. & Dev., Asahi Chemical Industry Co., Ltd)

P-13

イチゴ黒斑病菌の AF 毒素生合成遺伝子クラスター

八田理恵子^{1*}・伊藤 芳¹・保崎佳嗣²・田中孝欣¹・高原浩之²・田中愛子¹・山本幹博²・秋光和也³・
柘植尚志¹ (¹名古屋大農・²岡山大農・³香川大農・*現 岩手生工研)

Alternaria alternata には、宿主特異的毒素（宿主植物にのみ毒性を示す第2次代謝産物）を生産する7種の病原型 (pathotype) が存在する。先に、遺伝子タギング法を用いて、ナシ黒斑病菌の宿主特異的 AK 毒素生合成遺伝子クラスターを単離し、6 遺伝子 (AKT 遺伝子群) を同定した。さらに、サザンブロット解析によって、これらのうち5 遺伝子がイチゴ黒斑病菌 (AF 毒素生産菌) とタンゼリン brown spot 菌 (ACT 毒素生産菌) にも存在することを見出した。なお、これら3 病原菌の毒素には共通な部分構造として 9,10-epoxy-8-hydroxy-9-methyl-decatrienoic acid が存在する。本研究では、AKT 遺伝子をプローブとして、イチゴ黒斑病菌のゲノム DNA コスミドライブラリーを選抜し、AKT 相同配列を含むクローンを単離した。ひとつのクローン (約 40 kb) の構造解析によって、6 つの推定読み枠 (ORF) を検出した。これらのうち3 つの ORF の塩基配列は、AKT1、AKTR および AKT3 と 90% 一致し、それぞれ AFT1-1、AFTR-1、AFT3-1 と命名した。一方、他の ORF はナシ黒斑病菌の遺伝子クラスターからは見出されていない新規な ORF であり、そのうちの1つはイチゴ黒斑病菌にのみ存在する AF 毒素生合成に不可欠な遺伝子 (AFTS1 と命名) であることを確認した。また、AFT 遺伝子群の染色体分布と AF 毒素欠損変異株の解析によって、AFT 遺伝子クラスターが CD (conditionally dispensable) 染色体に分布することを見出した。

The gene cluster involved in AF-toxin biosynthesis of the Strawberry pathotype of *Alternaria alternata*

R. Hatta¹, K. Ito¹, Y. Hosaki², T. Tanaka¹, H. Takahara², A. Tanaka¹, M. Yamamoto², K. Akimitsu³ and T. Tsuge¹
(¹ Nagoya Univ., ² Okayama Univ., ³ Kagawa Univ.)

P-14

トマトアルターナリア茎枯病菌の宿主特異的 AAL 毒素生合成に関与するポリケチド合成酵素遺伝子

赤松 創・尾谷 浩・児玉基一郎 (鳥取大農)

トマトアルターナリア茎枯病菌 (茎枯病菌) は、宿主特異的 AAL 毒素を生産する。本毒素は、直鎖状のスフィンゴシン様構造を有することより、その生合成過程におけるポリケチド合成酵素 (PKS) の関与が考えられる。そこで、糸状菌および細菌より単離された PKS 遺伝子のβ-ケトアシル合成酵素 (KS) の部分配列を増幅するように設計された縮重 PCR プライマーを用いて、茎枯病菌から AAL 毒素生合成に関与する遺伝子の単離を試みた。得られた PCR 産物の塩基配列を決定した結果、1 つのクローンが、AAL 毒素類縁体であり、*Gibberella moniliformis* により生産されるマイコトキシンであるフモニシンの生合成に関与する PKS 遺伝子 *FUM5* と高い相同性を有していた。本 PCR 産物をプローブとして各種 *A. alternata* のゲノム DNA に対してサザン解析を行ったところ、茎枯病菌においてのみシグナルが検出された。さらに、本 PKS 遺伝子を用いた遺伝子ターゲティングにより、本遺伝子が毒素生産および病原性発現に必要であることが明らかとなった。そこで、本 DNA 断片をプローブとして茎枯病菌野生株のゲノムライブラリーをスクリーニングし、糸状菌の PKS 遺伝子において一般的に見い出される KS、AT、DH、ER、KR、ACP の6 ドメインを有する I 型の PKS 遺伝子 *AALPKS* を同定した。さらに、病原性および非病原性 *A. alternata* 菌株の染色体のバルスフィールドゲル電気泳動による解析の結果、*AALPKS* は、茎枯病菌のみが特異的に保有する 1.0 -Mb の小型染色体に座乗していることが明らかとなった。

A Polyketide Synthase Gene Required for Biosynthesis of Host-Specific AAL-Toxin in *Alternaria alternata* Tomato Pathotype

Hajime Akamatsu, Hiroshi Otani and Motoichiro Kodama (Faculty of Agriculture, Tottori University)

P-15

***Trichoderma reesei* 由来新規キシラナーゼ遺伝子(*xyn3*)のクローニングと誘導発現**

岡田宏文、小笠原渉、野川優洋、森川 康 (長岡技科大・生物)

我々は、糸状菌 *Trichoderma reesei* セルラーゼ高生産株 PC-3-7 において、これまでに存在が知られている XYN I および XYN II とは異なる新規キシラナーゼ (XYN III) を見出し、精製後諸性質を明らかにしてきた。今回さらに *xyn3* 遺伝子のゲノム DNA および cDNA を単離しその塩基配列を解析したところ、XYN III は遺伝子内に 3 つのイントロンを持ちグリコシドハイドrolラーゼファミリー 10 に属するキシラナーゼに高い相同性を示すことが明らかになった。*xyn3* をプローブとしてノーザン解析を行ったところ、PC-3-7 株においては主にセルラーゼの誘導物質であるソホロース、ソルボースおよびアピセルでは発現が認められたが、XYN I および XYN II の特異的誘導物質であるキシロース、キシロオリゴマーおよびキシランでは全く発現していないことが明らかとなった。また、PC-3-7 株の親株である QM9414 株においてはサザン解析で遺伝子の存在は確認されたもののノーザン解析では上記誘導物質いずれでも発現していなかった。このことから *xyn3* は *T. reesei* におけるセルラーゼおよびキシラナーゼの誘導発現制御機構を解析するための最適なモデルとなりうることを期待される。

Molecular cloning and inductive expression of a novel xylanase from *Trichoderma reesei*

Hirofumi Okada, Wataru Ogasawara, Masahiro Nogawa, Yasushi Morikawa (Dep. Bioeng., Nagaoka Univ. Technol.)

P-16

麹菌 CCAAT 結合複合体の分子解剖

田上新次郎・亀井健一・加藤雅士・小林哲夫・塚越規弘 (名大院・生命農学)

CCAAT 配列結合因子は、真核生物において、多数の遺伝子の発現量を増大させる転写促進因子であることが知られている。我々はこれまでに、麹菌 *Aspergillus oryzae* から CCAAT 配列結合因子(Hap 複合体)のサブユニット遺伝子 *AohapB,C,E* を分離し、リコンビナントサブユニットを用いた解析より、麹菌 Hap 複合体は、AoHapB,C,E からなる 3 量体として DNA 結合能を有することを明らかにしてきた。各サブユニットは、酵母から哺乳類に至るまで、高度に保存された領域(コア領域)を有しており、この領域は複合体の形成及び DNA 結合に必須の領域であると考えられている。AoHapB,C,E のコア領域に含まれない領域の、DNA 結合能、転写促進能への関与を解析したので報告する。

部分欠失各サブユニットを大腸菌内で過剰発現させ精製した。この標品を用い、Hap 複合体を再構成し *in vitro* における DNA 結合能を解析した。その結果、各サブユニットのコア領域さえあれば DNA 結合活性を有することが明らかとなった。また *in vivo* における機能解析を行うため、*A. nidulans hapB* 欠失株、*hapC* 欠失株、*hapE* 欠失株それぞれに *AohapB,C,E* の全長及び部分欠失 cDNA を導入した株の、Endo- β -1,4-glucanaseA(EG-A)活性を指標に各サブユニットの転写活性化能に関与している領域を解析した。その結果、AoHapB の C 末側領域、及び、AoHapC の N 末側領域に、麹菌 Hap 複合体の転写促進機能保持に重要な領域が存在することが示唆された。

Molecular dissection of *Aspergillus oryzae* CCAAT-binding complex

Shinjiro Tanoue, Kenichi Kamei, Masashi Kato, Tetsuo Kobayashi, and Norihiro, Tsukagoshi

(Department of Biological Mechanisms and Functions, Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University)

P-17

Aspergillus nidulans の *uvsC* 欠失系統におけるメチルメタンスルホン酸感受性の解析 水谷真也・夏目豊彰・伊藤靖夫 (信大・理)

A. nidulans における、形質転換時の細胞外 DNA の染色体への組み込み機構を解析するために、出芽酵母 *RAD51* のホモログ、*uvsC* の欠失系統を構築した。本遺伝子の産物は、減数分裂時および DNA 二重鎖切断 (DSB) 部位の組み換え修復時に、DNA 鎖間の相同性の検索に主要な役割を果たす。△*uvsC* 系統の表現型を確認するために、メチルメタンスルホン酸 (MMS) に対する感受性を検定した。MMS はアルキル化剤であるが、本剤による DNA 損傷の修復は、遺伝学的に DSB 修復系と強く連鎖していることが知られている。△*uvsC* 系統では、最小培地上でのコロニー形成時に強い感受性が認められたが、分生子の発芽 (極性成長) は MMS の影響を受けなかった。すなわち、△*uvsC* 系統では、MMS 存在下でも極性成長への移行は起こるものの、その後の菌糸伸長が阻害された。この時、発芽した分生子では、*nimH11/bimE7*, *nimU24/bimE7* 二重変異株と同様に、多くの場合、核は 1 個で菌糸中に位置していた。*A. nidulans* では、富および貧栄養条件において、核の分裂と極性成長への移行の協調性に対し、異なった制御機構が存在することが知られている。△*uvsC* 系統についても、MMS 存在下における、これらの協調性の制御機構について、現在、検討を行っている。

Methyl methanesulfonate sensitivity of an *Aspergillus nidulans uvsC* null mutant.

Mizutani, S., Natsume, T., and Itoh, Y (Shinshu Univ., Fac. Science)

P-18

麹菌用 gene trap ベクターによる形質転換

鈴木 聡、 柏木 豊 (独立行政法人 食品総合研究所<食総研>)

麹菌の遺伝子関連研究では EST 解析が行われ、ゲノムシーケンスの解析が進みつつある。このため遺伝子機能解析が急務となっている。遺伝学的マーカーが確立されていない麹菌において、gene trap 法は機能未知遺伝子を単離、解析する有効な方法の一つとして挙げられるが、糸状菌での実施例は少ない。そこで我々は、麹菌用の 2 種類の gene trap ベクター、pPTR-EGFP 及び pUsCdelPA を新たに作成した。pPTR-EGFP は選抜マーカーとして *ptrA* (Takara)、及びレポーターとして *egfp* (Clontech) を保持する。*egfp* は宿主で発現するプロモーターを欠き、5'側には splice acceptor 配列を挿入した。また、PolyA trap ベクター pUsCdelPA は選抜マーカーとして 3'側制御配列を欠いた *sC* (酒総研) を持つ。麹菌に対して pPTR-EGFP を用いた REMI 法による形質転換の結果約 300 の薬剤耐性株が得られた。任意に選択した変異株のプラスミド挿入部位をサザンハイブリダイゼーションにより確認したところ挿入は non-homologous に起こっており一ヶ所 1 コピー挿入の株が見られた。また 19 株の形質転換株において EGFP によるものと考えられる蛍光が蛍光顕微鏡にて観察された。以上より、今回作成した gene trap ベクター系は麹菌において有効に作用することが示唆された。今後は観察された蛍光が EGFP に由来することの確認、trap された遺伝子のクローニングを行うとともにさらなる変異株を取得する。

Transformation of *Aspergillus oryzae* using new gene trap vector

Satoshi Suzuki, Yutaka Kashiwagi (NFRI)

P-19

プロテアーゼ低生産宿主 *Aspergillus niger* の開発

幸田明生、峰時俊貴、尾関健二、熊谷知栄子（大関総研）

【目的】アスペルギルス属は分泌生産能力が高く、タンパク質生産宿主として非常に重要である。高等生物由来異種タンパク質の生産についても多くの報告があるが、一般的にその生産量は非常に低い。その原因の一つとして、培地中における生産物の分解が指摘されている。さて、我々は既に Region III を用いたタンパク質高発現システムを開発しており、糸状菌由来のタンパク質について良好な結果を得ている¹⁾。今回は、本システムによる異種タンパク質の生産を目指すにあたり、*A.niger* におけるプロテアーゼ低生産宿主を取得した。

【方法及び結果】*A.niger* における主要な酸性プロテアーゼ遺伝子 (*pepA*) のコード領域にある Bal I サイトに、大腸菌のブレオマイシン耐性遺伝子（選択マーカー）を挿入した変異遺伝子を作製し、*A.niger*ND48 に導入した。得られた *pepA* 破壊株 (*A.niger*ND48prt42) の菌体外酸性プロテアーゼ活性は、親株の約 15% に低下していた。さらに、*A.niger*ND48prt42 に変異処理を施し、約 10000 株についてスクリーニングしたところ、カゼインを含むプレートにおいて全くハローの形成されない株が得られ、誘導条件下における液体培養での菌体外酸性プロテアーゼ活性は親株の 1% 以下まで低下していた。また、本株のアミラーゼ生産性は親株と同等の値を示すことから、分泌経路自体がダメージを受けた結果ではないと推察され、異種タンパク質の生産宿主として有効であることが予想された。

1) 峰時俊貴：化学と生物, 12, 831 (2000)

Development of the mutants with low proteolytic activity in *Aspergillus niger*

Akio Koda, Toshitaka Minetoki, Kenji Ozeki, Chieko Kumagai

P-20

清酒麹菌 (*Aspergillus oryzae*) の酸性フォスファターゼ生産と性質

藤田 仁, 山根雄一*, 福田 央**, 木崎康造**, 若林三郎**, 河本正次, 秋 庸裕, 重田征子, 小埜和久
(広大院・先端・生命機能, *(株)酔心山根本店, **酒総研)

【目的】酸性フォスファターゼやフィターゼといった無機リン酸遊離酵素が清酒醪の並行複発酵を促進することが知られている。そこで本研究では、清酒麹菌 (*Aspergillus oryzae*) が生産する種々の酸性フォスファターゼ (ACP) の生産条件及び諸性質を検討し、清酒醸造におけるそれらの役割について論じる。

【方法及び結果】*A. oryzae* RIB-128 を供試菌株とし、Czapek-Dox 培地を基本培地として液体培養を行った。ACP 活性は、p-ニトロフェニル(PNP)リン酸を基質とし、pH 4、30 °C で 1 時間に 1 μ mol の PNP を遊離する酵素量を 1 単位とした。培地組成を最適化する事により、72 時間の培養で 6.1 単位/ml の ACP を生産した。これら ACP は、3 種が存在しており、各 ACP は異なる pH 反応性を示した。また各 ACP の生産開始時期は異なっており、培養環境に密接に関連していることが示唆された。

Production and properties of acid phosphatase produced by *Aspergillus oryzae*.

Jin Fujita, Yu-ichi Yamane*, Hisashi Fukusa**, Yasuzo Kizaki**, Saburo Wakabayashi**, Seiji Kawamoto, Tsunehiro Aki, Seiko Shigeta, Kazuhisa Ono. (Det. Mol. Biotech., ADSM, Hiroshima Univ., *Suishin Yamane Honten Co.Ltd., Nat. Res. Ins. Brewig)

P-21

可溶性多糖 (Extracellular Soluble Polysaccharide: ESP)による白麹菌酵素の安定化と局在性への影響

岩下和裕、原田 直、下飯 仁、伊藤 清 (酒総研)

【目的】 これまでに、白麹菌 (*Aspergillus kawachii*) が生産する可溶性多糖 (ESP) は、 β -グルコシダーゼを安定化するとともに、本酵素の局在性にも関与することが明らかとなっている。これは、麹菌の酵素生産および酵素の性質を考える上で非常に重要であるものと思われる。そこで本研究では、ESP の与える影響について、他の白麹菌分泌酵素について検討を行ったので報告する。【方法と結果】 β -グルコシダーゼは、*bglA* によりコードされ、液体培養では細胞壁型として菌体細胞壁中に、固体培養では遊離型として培地中に検出される。そこで β -グルコシダーゼと同様、培養条件により局在性が変動する酵素活性について検索したところ、多数の酵素活性が同様の挙動を示した。その中から、まず α -グルコシダーゼを精製し検討を行ったところ、 β -グルコシダーゼ同様、非常に不安定であった。これに対し、ESP を添加すると本酵素は安定に保たれた。また、精製 α -グルコシダーゼは細胞壁多糖画分への吸着活性を示したが、この活性はESP の添加により阻害された。以上のことから、ESP は β -グルコシダーゼ以外の白麹菌酵素の安定性および局在性にも関与していることが明らかとなった。同様の作用は、白麹菌 α -グルコシダーゼについても観察された。

The extracellular soluble polysaccharide (ESP) from *Aspergillus kawachii* improves the stability of extracellular enzymes and is involved in their localization.

Kazuhiro Iwashita, Nao Harada, Hitoshi Shimoi, Kiyosi Ito

P-22

REMI 変異株を用いた *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* の病原性関連遺伝子の探索と解析

川部眞登・水谷浩平・寺岡 徹・有江 力 (農工大農)

トマト萎ちょう病菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* は土壌伝染性であるため防除困難な重要病原菌である。本菌の病原性発現機構はほとんど解明されていないため、糸状菌に対して有効な形質転換株作出法である Restriction Enzyme-Mediated Integration (REMI 法) (Schiestl *et al.* 1991)により作出した病原性変異株を用いて、病原性関連遺伝子を取得、病原性発現機構を解析することを試みている。本法による形質転換にはハイグロマイシンB耐性遺伝子をもつpCSN43を *Hind* III等で直鎖化して用い、合計約1500株の形質転換株を得た。そのうち5株がトマトに対する病原性を喪失、もしくは弱病原性の変異株であった。うち2株 (r120 および r579) の pCSN43 挿入部位周辺領域について、それぞれ約5 kbの塩基配列を決定した。r120 および r579 の pCSN43 挿入部位にはそれぞれ、*unk1*、*rmt1* (仮称) 遺伝子の存在が推定され、*unk1* についてはPDA培地上での野生株培養菌体の全RNAを鋳型としたRT-PCRにより発現も確認された。

Study on pathogenicity related-gene of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* using REMI mutants

M. Kawabe, K. Mizutani, T. Teraoka and T. Arie (Tokyo University of Agriculture and Technology)

P-23

Aspergillus oryzae の生産する主要なキシラナーゼ XynG2 遺伝子プロモーター領域の解析

松岡寿保、木村哲哉、栗冠和郎、大宮邦雄（三重大生物資源）

【目的】産業上重要な *Aspergillus oryzae* はキシランを主要な炭素源としたときに、複数のキシラン分解酵素を生産することが知られている。我々はこれらの中で主要なキシラナーゼをコードする *xynG2* 遺伝子を単離している。*A. oryzae* における *xynG2* の発現制御機構における重要なシス領域の同定を行った。

【方法及び結果】*xynG2* のプロモーター上にはキシラン存在下でキシラナーゼ発現を正に制御する転写因子 XlnR のコンセンサス配列が 2 個存在していた。この配列の相互関係を明らかにするために、それぞれのコンセンサス配列に変異を入れた *xynG2* のプロモーターを作成した。このプロモーターと大腸菌 β -グルクロニダーゼ (GUS) 遺伝子をつないだ融合遺伝子を *A. oryzae* NiaD 遺伝子をマーカーとし、*A. oryzae* NiaD⁻ 株に導入した形質転換体について各種培養条件での GUS 活性を検討した。その結果 fructose を炭素源とした培養では GUS 発現は見られなかったが、xylan を炭素源とした培養では GUS 発現において顕著な違いが示された。この結果より正の制御には下流の XlnR 結合配列のほうが影響が大きいことが分かった。さらにこのプロモーターを用いて XlnR 融合タンパクを用いたゲルシフト実験を行ったが、変異による結合性の違いは見られなかった。この結果より融合タンパク質を用いた in vitro の実験では転写因子のアフィニティーの違いを見ることは難しいことが考えられた。

Promoter analysis of the *xynG2* gene from *Aspergillus oryzae*

T.Matsuoka, T.Kimura, K.Sakka and K.Ohmiya (Faculty of Bioresources, Mie University)

P-24

Aspergillus nidulans 由来ヒスチジinkinナーゼ遺伝子 (*tcsB*) 発現産物の機能解析

古川健太郎、勝野泰朗、阿部敬悦、中島 佑（東北大院農・応生科）

A. nidulans の EST データベースをもとに単離した *tcsB* 遺伝子の発現産物 (TcsBp) は、二成分性情報伝達系を構成するキナーゼドメインとレスポンスレギュレータードメインの二つを併せ持つハイブリッド型ヒスチジinkinナーゼであると推定された。酵母の浸透圧センサーヒスチジinkinナーゼ Sln1p と構造的相同性が高いことから、類似の生物学的機能を有すると考えられた。温度感受性 *sln1-ts* 変異を持つ酵母において TcsBp を発現させた結果、機能相補性が認められた。推定リン酸化部位の His⁵⁵² 残基及び Asp⁹⁸⁹ 残基のアミノ酸置換変異体は機能相補しなかったことから、TcsBp はヒスチジinkinナーゼであることが確認された。また、浸透圧ストレスシグナルを HOG1 MAPK カスケードに伝達不可能な酵母 *sln1Δ sho1Δ* 株において TcsBp を発現させた結果、高浸透圧条件下で生育が認められたことから、TcsBp は浸透圧センサー機能を持つことが示唆された。次いで、*A. nidulans* における TcsBp の機能を調べるために *tcsB* 遺伝子破壊株を取得した。この破壊株は、酵母 *sln1Δ* 変異株とは異なり、致死ではないことから、*A. nidulans* の浸透圧調節システム関連の MAPK カスケードは酵母よりも複雑であることが示唆された。

Functional analysis of a gene, *tcsB*, encoding a histidine kinase from *Aspergillus nidulans*

Kentaro Furukawa, Yasuaki Katsuno, Keietsu Abe, and Tasuku Nakajima (Tohoku Univ, Grad. Sch. Agri. Sci.)

P-25

焼酎麹菌の α -L-アラビノフラノシダーゼ遺伝子の構造解析

小関卓也、奥田将生、荒巻 功、岩野君夫*、松澤 洋** (独法・酒総研、秋田県立大・応生、青森大・工)

【目的】酒類原料穀物は細胞壁の溶解により、その利用率が向上する。植物細胞壁アラビノキシランの分解にはキシラナーゼ、キシロシダーゼなどの基本骨格を分解する酵素のほかに、側鎖を分解する α -L-アラビノフラノシダーゼ、アセチルキシランエステラーゼ、フェルロイルエステラーゼ、 α -グルクロニダーゼなどの酵素も必要とされている。キシランの側鎖がキシラン分解に及ぼす影響とそれを分解する酵素群の役割について明らかにすることを目的とし、焼酎麹菌 *Aspergillus awamori* F04033 および *Aspergillus kawachi* F04308 の α -L-アラビノフラノシダーゼについて検討を行った。

【方法および結果】両菌株の α -L-アラビノフラノシダーゼは、L-アラビノースやL-アラビトールで誘導生産され、グルコースで抑制された。両菌株から2種類ずつの α -L-アラビノフラノシダーゼを精製し、諸性質を検討した。N-末端アミノ酸配列および *A. niger* のそれぞれの酵素遺伝子の情報を元にプライマーを合成し、染色体 DNA を鋳型としてPCRを行った。得られた断片の塩基配列に基づいてさらにプライマーを合成し、Inverse PCR 法により両菌株の2つの酵素遺伝子の塩基配列を決定した。2つの酵素はグリコシルヒドロラーゼファミリー51 および 54 に属する α -L-アラビノフラノシダーゼであることが示唆された。2つの酵素遺伝子の発現様式について現在解析を行っている。

Analysis of two α -L-arabinofuranosidase genes from *Aspergillus kawachii* and *Aspergillus awamori*

Takuya Koseki, Masaki Okuda, Isao Aramaki, Kimio Iwano*, Hiroshi Matsuzawa**

(Natl. Res. Inst. Brewing, *Dept. Biotech., Akita Prefectural Univ., **Dept. Biosci. Biotech, Aomori Univ.)

P-26

シイタケ子実体菌褶部の褐変現象の解析

佐藤利次、河田真樹、渡辺久敬、入江俊一、平野達也、齋藤久美子、神田勝弘、江井 仁 (岩手生工研)

我々は、褐変しにくい保存性の高いシイタケの育種を目的に、シイタケ子実体菌褶部の褐変現象について解析を行っている。この褐変物質はメラニンと考えられていることから、本研究ではメラニン合成の初期反応に関与しているチロシナーゼとラッカーゼに注目し、解析を行った。はじめに両酵素活性と褐変との関係を、部分変性 SDS-PAGE の活性染色により検討した。その結果、チロシナーゼ活性とラッカーゼ活性は、保存中に上昇していることが明らかとなり、褐変との相関関係が認められた。次に両酵素遺伝子をクローニングしたところ、チロシナーゼ遺伝子 (*tyr*) は1種類が単離され、ラッカーゼ遺伝子は *lcc1*, *lcc2*, *lcc3* の3種類が単離された。それぞれの遺伝子に関して、ノーザン解析を行ったところ、*tyr* と *lcc2* が子実体保存中にその転写が上昇していることが明らかとなった。以上の結果から、これらの酵素が保存中に de novo 合成されて活性が上昇することが、褐変の原因になっていることが示唆された。現在、チロシナーゼ遺伝子 cDNA 断片のアンチセンス鎖を発現させるベクターを構築し、シイタケに導入して解析を行っている。

Molecular analysis of browning mechanism in the gill of *Lentinula edodes* fruit-bodies.

Toshitsugu Sato, Maki Kawata, Hisayuki Watanabe, Toshikazu Irie, Tatuya Hirano, Kumiko Saito, Katsuhiro Kanda and Hitoshi Enei (Iwate Biotech. Res. Center)

P-27

Aspergillus nidulans アミラーゼ高生産変異株の解析

赤坂祐樹、佐藤綾子、勝山陽子、加藤直樹、加藤雅士、小林哲夫、塚越規弘（名大院、生命農学）

Aspergillus nidulans アミラーゼ高生産変異株である AHP1102 は野生株と比べて約 10 倍のアミラーゼ活性を有しており、小コロニーを形成する特徴を持つ。本変異株が生産するアミラーゼの N-末端アミノ酸配列の解析から、*amyB* 遺伝子産物の生産量が顕著に増加していることが明らかとなった。Competitive PCR により *amyB* mRNA の発現量を定量した結果、野生株と変異株で差が見られなかったことから、アミラーゼ生産量の違いは転写後の段階で起こっていることが示唆された。

コロニーサイズ、アミラーゼ活性を指標としてショットガンクローニングを行い、AHP1102 の変異を相補する遺伝子を取得した。本遺伝子は全長 1340 bp からなり、それぞれ 54 base からなる二つのイントロンを有していた。本遺伝子産物は 410 アミノ酸からなり、相同性検索の結果、*Saccharomyces cerevisiae* の SUN family protein と高い相同性を示したことから、本遺伝子を *sunA* と命名した。

Characterization of an amylase hyper-producing mutant of *A. nidulans*.

Yuki Akasaka, Ayako Sato, Yoko Katsuyama, Naoki Kato, Masashi Kato, Tetsuo Kobayashi, Norihiro Tsukagoshi
(Dept. of Biological Mechanisms and Functions, Grad. Sch. of Bioagricultural Sciences, Nagoya Univ.)

P-28

シイタケにおける外来遺伝子の発現

齋藤久美子、佐藤利次、河田真樹、平野達也、八重樫香、江井 仁（岩手生工研）

我々はこれまで、シイタケにおいて構成的に発現する遺伝子として解糖系のキーエンザイムであるグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子 (*gpd*) およびキチン合成酵素遺伝子 (*chs*) を単離し、これらのプロモーターを利用した発現ベクターがそれぞれシイタケの形質転換において有用であることを報告した。そこで、2 つの遺伝子プロモーターと薬剤耐性遺伝子 (*hph*, *bar*) をタンデムに組み合わせた外来遺伝子発現ベクター (pChG-*bar*) を構築し、シイタケに導入して得られた形質転換体の解析を行った。REMI 法による形質転換の結果、1 次選抜のハイグロマイシン B 耐性株はコントロールベクターの pLCHS-*hph* と同程度の効率で得られた。さらにビアラフォスで 2 次選抜を行ったところ、耐性株の割合は 1 次選抜株の約 44% に減少したものの、両薬剤に対する耐性株が得られた。導入遺伝子の発現を RT-PCR により調べた結果、8 株中 5 株に *bar* の発現が認められ、さらに培地中にビアラフォスを添加することで発現誘導されるクローンもみられた。以上の結果から、pChG ベクターがシイタケにおける外来遺伝子の発現に有用である可能性が示された。また、外来遺伝子として DsRed およびシイタケ由来ラッカーゼ 1 遺伝子 (*lcc1*) を挿入した pChG ベクターを構築し、これらによるシイタケの形質転換体について解析を行ったので報告する。

Transgene expression in edible basidiomycete *Lentinula edodes*.

Kumiko Saito, Toshitsugu Sato, Maki Kawata, Tatsuya Hirano, Kaori Yaegashi and Hitoshi Enei (Iwate Biotech. Res. Center)

P-29

麹菌 *Aspergillus oryzae* の Tripeptidyl peptidase 遺伝子(*tppA*)の単離と解析

金 鋒傑、有岡 学、北本勝ひこ (東大院農生科・応生工)

【目的】 Tripeptidyl peptidase(TPP)は蛋白質の N 末端から tripeptides を切り出す酵素であり、ヒトやマウスではリソゾームに局在し、生体内蛋白質の分解に重要な役割を果たしている。本研究では *Aspergillus oryzae* から TPP をコードしている遺伝子のクローニングを行い、この酵素の機能と酵素学的性質の解析を目的とした。

【方法及び結果】 *A.oryzae* の EST データベースを元にプライマーを設計し、*A.oryzae* ゲノム DNA に対して PCR を行い、約 350bp のフラグメントを得た。このフラグメントをプローブとして、*A.oryzae* ゲノムライブラリーからプラークハイブリダイゼーションを行い、得られたクローンについて塩基配列を決定した。cDNA の塩基配列との比較から、*A.oryzae* の *tppA* 遺伝子は 2 つのイントロンを含み、600 アミノ酸からなる蛋白質をコードすることが示された。*S.cerevisiae* に *tppA* cDNA を発現させたところ、酵素活性の上昇が認められた。また、TppA-EGFP を発現する酵母では液胞に蛍光が観察された。現在、麹菌において TPP の細胞内局在、高発現及び破壊株の作製を行っている。

Cloning and characterization of Tripeptidyl peptidase(*tppA*)gene from *A.oryzae*

Jin Fengjie, Manabu Arioka, Katsuhiko Kitamoto (Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo)

P-30

EGFP を用いた麹菌 *Aspergillus oryzae* の ER およびゴルジ体の可視化

菊池聡子、丸山潤一、中島春紫、北本勝ひこ (東大院農生科・応生工)

【目的】 真核細胞のタンパク質分泌経路において、ER は合成されたタンパク質の立体構造の形成および修飾、ゴルジ体は ER から送られてきたタンパク質の修飾や選別を行うオルガネラである。本研究では、異種タンパク質生産の宿主として注目されている麹菌 *A. oryzae* の生細胞における ER およびゴルジ体の動態を明らかにすることを目的として、これらのオルガネラの可視化を試みた。

【方法と結果】 *A. oryzae* の BiP をコードする遺伝子 *bipA* と *egfp* の融合遺伝子 *bipA-egfp* を作成し、*amyB* プロモーターに連結して *A. oryzae* *niaD300* 株 (*niaD*) に導入したところ、菌糸内に網目状の構造からなる蛍光が観察された。経時的に観察したところ、この構造体の流動が観察された。また、*A. oryzae* EST database を検索したところ、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の *SED5*、およびヒトの *STX5*、ラットの *STX5* の一部と高い相同性を示す約 400bp の断片を発見した。この配列を元にプローブを作成し、*A. oryzae* genome library から *SED5* ホモログをコードする遺伝子を単離し、現在 *egfp* との融合遺伝子の導入によるゴルジ体の可視化を試みている。

Visualization of ER and Golgi Apparatus in *Aspergillus oryzae* by Expression of EGFP

Satoko KIKUCHI, Jun-ichi MARUYAMA, Harushi NAKAJIMA, Katsuhiko KITAMOTO
(Department of Biotechnology, The University of Tokyo)

P-31

Aspergillus oryzae 解糖系遺伝子 3'-phosphoglycerate kinase (PGK) のプロモーター領域の解析

佐野元昭、戸田智美、久田博元¹⁾、小川雅裕²⁾、高瀬久美子、大山晃弘³⁾、五味勝也⁴⁾、秋田 修⁵⁾、秦 洋二¹⁾、町田雅之 (産業技術総合研究所、¹⁾月桂冠総合研究所、²⁾サッポロビール、³⁾アロカ(株)研究所、⁴⁾東北大、⁵⁾酒類総合研究所)

麹菌 *Aspergillus oryzae* は日本の発酵産業で幅広く利用されているが、遺伝子発現の柔軟な制御や高発現プロモーターの構築など、転写制御の研究は重要である。我々は既に、解糖系遺伝子 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gpd*) のプロモーター解析を行い発現調節に重要な領域を決定している¹⁾。そこで今回、以前の解析²⁾で *gpd* 遺伝子と発現パターンが同じであることが分かっている *pgk* 遺伝子に着目して、*pgk* 遺伝子のプロモーター領域の解析を行ったので報告する。

まず、モチーフ解析を行うために *A. niger* の *pgkA* 遺伝子のプロモーター配列の決定を行い、*A. oryzae*, *A. niger* の *pgkA*, *gpdA* 4つの遺伝子プロモーター領域を MEME プログラムを使用してモチーフ検索を行った。その結果、複数のコンセンサス配列から特に共通性の高い3ヶ所の領域を選択し、*A. oryzae* *pgkA* のプロモーターに含まれるこれら3ヶ所の領域を用いてゲルシフト解析を行った。その結果、2ヶ所の領域でシフトバンドが認められ、このシフトした領域を欠損させ GUS をレポーター遺伝子として解析を行ったところ、開始コドン上流の-184 から-155 nt が PGK の発現に関与する重要な領域であることが判明した。また、この領域は GPD でも発現に関与する領域であり、PGK と GPD でこの領域に関与する転写調節因子は同一であることが強く示唆された。

- 1) International Symposium on Molecular Biology of Filamentous Fungi, Aspergilli p45
- 2) K. Nakajima, et al. (2000) *Curr. Genet.*, 37, 322-327.

Analysis of the *pgkA* promoter from *Aspergillus oryzae*

Motoaki Sano, Tomomi Toda, Hiromoto Hisada¹⁾, Masahiro Ogawa²⁾, Kumiko Takase, Akihiro Ooyama³⁾, Katsuya Gomi⁴⁾, Osamu Akita⁵⁾, Yoji Hata¹⁾, Masayuki Machida (AIST, ¹⁾Gekkeikan Co., Ltd, ²⁾Sapporo Breweries, ³⁾Aloka Ltd, ⁴⁾Tohoku Univ., ⁵⁾NRIB)

P-32

Aspergillus oryzae のカルシニューリン遺伝子 *cnaA* のストレス適応における役割

Praveen Rao Juvvadi, 有岡 学、中島春繁、北本勝ひこ (東大院農生科・応生工)

カルモジュリン依存性フォスファターゼであるカルシニューリンは、酵母では pH 恒常性の維持およびストレス適応に関与すると考えられている。糸状菌では菌糸生長への関与が知られているが、アルカリ性および塩ストレスへの適応における役割はほとんど明らかになっていない。*A. oryzae* から単離したカルシニューリンの触媒サブユニット遺伝子 *cnaA* には、3つのイントロンが含まれており、カルモジュリン結合ドメインを有する514アミノ酸のタンパク質がコードされていた。予想される CnaA タンパク質のアミノ酸配列は、*A. nidulans*、ヒト、酵母のカルシニューリン A とそれぞれ92%、67%、58%の相同性を示した。*cnaA* 遺伝子の cDNA の発現により、酵母のカルシニューリン欠損変異株 ($\Delta cnp1 \Delta cnp2$) のアルカリ性および高塩濃度存在下における生育感受性が相補された。また、*cnaA* 遺伝子を *amyB* プロモーターにより過剰発現させた *A. oryzae* 株は、アルカリ性および高塩濃度培地における生育が向上するとともに、カルシニューリンを標的とする免疫抑制剤 FK506 への耐性が増大することが観察された。

A putative role of *cnaA* the gene encoding the catalytic subunit of calcineurin from *Aspergillus oryzae* in stress adaptation

Praveen Rao Juvvadi, Manabu Arioka, Harushi Nakajima, and Katsuhiko Kitamoto

(Dept. of Biotechnology, The University of Tokyo)

P-33

麹菌 *Aspergillus oryzae* の液胞膜 ATPase 遺伝子の単離と解析

黒木 豊、中島春紫、北本勝ひこ（東大院農生科・応生工）

【目的】 *A. oryzae* のゲノム解析の一環として、種々の培養条件下で発現している遺伝子を検討する目的で Expressed Sequence Tags(EST)解析が進められてきた。演者らは、*A. oryzae* のアルカリ性環境下における発現遺伝子について解析を行い¹⁾、液胞膜 ATPase をコードする遺伝子のクローニングを行った^{2,3)}。酵母 *S. cerevisiae* の V-ATPase V₁ subunit A(Vma1p)は ATP の結合部位を持つ触媒サブユニットであり、V₀ subunit c(Vma3p)は液胞内部の酸性化に関与する疎水性の 4 回膜貫通タンパク質である。これらの遺伝子の破壊株は共にアルカリ性環境で生育できなくなることが知られている。

【方法と結果】 *A. oryzae* RIB40 をアルカリ条件下(pH10)で cDNA ライブラリーを構築し、約 1000 クローンにつき 5'末端側から塩基配列の決定を行ったところ、複数の V-ATPase V₁ subunit A, V₀ subunit c 遺伝子と相同性のある配列が見いだされた。この cDNA をプローブとして、*A. oryzae* ゲノムライブラリーから プラークハイブリダイゼーションを行い、それぞれ得られたクローンについて塩基配列を決定した。*vmaA* と *vmaC* それぞれ対応する cDNA の全長を *S. cerevisiae* の *vma1*, *vma3* 破壊株において発現させたところ、アルカリ条件下での生育阻害の相補が観察された。また、それぞれ *A. oryzae* における遺伝子破壊株を作製し、その表現型を観察したところ *vmaA*, *vmaC* 破壊株ともアルカリ培地上での生育遅延や菌糸形態の変化、液胞の形態変化などが観察された。

1)黒木ら、日本生物工学会 2000 年度大会講演要旨集、p. 173

2)黒木ら、日本生物工学会 2001 年度大会講演要旨集、p. 229

3)黒木ら、日本農芸化学会 2001 年度大会講演要旨集、p. 364

Cloning and characterization of vacuolar membrane ATPase genes from *A. oryzae*

Yutaka Kuroki, Harushi Nakajima, Katsuhiko Kitamoto, (Dept. Biotechnol., Univ. Tokyo)

P-34

Analysis on the Protein Secretion Pathway of *Aspergillus oryzae* Using EGFP Fusion Protein

Kumiko Masai, Jun-ichi Maruyama, Harushi Nakajima & Katsuhiko Kitamoto

(Department of Biotechnology, University of Tokyo)

【Objective】 *Aspergillus oryzae* has a long-standing reputation as a secretory "machine" in the production of *sake*, *miso*, and soy sauce. However, little is understood about the molecular process of the secretory machinery. Hence, further knowledge of the secretory pathway of *A. oryzae* and its enhancement for higher production are of much interest to the Japanese industry. The objective of this study is to visualize the secretion pattern of the fusion protein RNaseT1-EGFP when *A. oryzae* is subjected to conditions of stress and addition of protein pathway inhibitors.

【Method & Results】 Conidia of *A. oryzae* strain NRG1, expressing the fusion protein RntA-EGFP, were inoculated on DPY (coverslip culture) or modified CD (liquid culture) medium. After the cultures were grown over night, conditions of stress were applied. Brefeldin A, cytochalasin A or nocodazole was added to the coverslip culture; other coverslip cultures were subjected to cold or heat shock; and mycelia in liquid cultures were transferred to media with the appropriate starvation conditions. Post treatment, the resulting fluorescence patterns were observed under the fluorescent microscope over time. Generally, EGFP lit at the tips and in the supernatant previous to the treatments. Distinct patterns appeared inside hyphae and the distribution, location and shapes of fluorescence varied with the treatment applied. The addition of brefeldin A caused ring-like structures that were predicted to be the ER. Furthermore, small immobile vesicles were retained inside the hyphae in cytochalasin A treated mycelia. Fluorescence was also found inside vacuoles when mycelia were exposed to cold or heat shock. Consequently, these observations would expand the knowledge of this organism in the protein production industry. In addition, the effects of nutritional stress on the secretion process will be further discussed.

P-35

Woronin body 形成に關与する *hex-1* 相同遺伝子の麴菌 *Aspergillus oryzae* からのクローニングと機能解析

丸山潤一、中島春紫、北本勝ひこ（東大院農生科・応生工）

【目的】 Woronin body は子囊菌類や不完全菌類の隔壁近傍に見られる構造であり、菌糸が損傷を受けた際、隔壁孔をふさぎ、溶菌が隣接する細胞に伝播するのを防ぐ働きをしている。麴菌は醸造や酵素生産において自己消化することが経験的に知られているが、その分子機構は全く解析されていない。そこで、*A. oryzae* の Woronin body の機能とその溶菌の制御機構の解析を試みた。

【方法と結果】 *A. oryzae* EST ライブラリーを検索した結果、*Neurospora crassa* の Woronin body 形成に關与する *hex-1* 遺伝子と相同なシークエンスが存在した。この配列をもとに、ゲノムならびに cDNA ライブラリーより、遺伝子と cDNA を取得した。シークエンスの結果、遺伝子産物は 176 アミノ酸からなると推定され、C 末に PTS1 (peroxisome targeting signal) 配列が存在した。現在、クローニングした遺伝子の機能を明らかにするため、遺伝子破壊株の作成と、EGFP との融合による局在の解析を行っている。

Cloning and characterization of *hex-1* homologue involved in Woronin body of *Aspergillus oryzae*.

Jun-ichi MARUYAMA, Harushi NAKAJIMA and Katsuhiko KITAMOTO

(Department of Biotechnology, The University of Tokyo)

P-36

Aspergillus nidulans における液胞形成関連遺伝子 *avaB* の解析

岡 真如、松田 豊、有岡 学、北本勝ひこ（東大院農生科・応生工）

【目的】 糸状菌が菌糸生長する際の細胞伸長には、液胞による膨圧調節が重要であると推定される。酵母 *S. cerevisiae* における液胞形成関連タンパク質 Vam6/Vps39 は、液胞形成の最終ステップである、ホモタイプな融合を促進する tethering の役割を果たしている。また、この *vam6* 変異株は液胞タンパク質の輸送に欠陥を示すとともに、液胞形態の異常も示す。そこで演者らは液胞形態の変化が糸状菌の生育に与える変化を調べ、その機能を明らかにすることを目的とし、*A. nidulans* から Vam6 ホモログをコードする遺伝子を単離し、その解析を行った。

【方法及び結果】 *A. nidulans* ゲノムプロジェクトの EST database を検索したところ、VAM6 の一部と高い相同性を示す約 600bp の cDNA 断片が見出された。この配列を元にプローブを作製し、*A. nidulans* genome library から VAM6 ホモログをコードすると思われる遺伝子を単離した。この遺伝子の破壊株を作製したところ、細分化した液胞が観察されたため、*avaB* (*Aspergillus nidulans* Vacuolar morphology) と命名した。

酵母において Vam6 は低分子量 GTPase である Vam4/Ypt7 の GEF として働くことが知られている。糸状菌においても同じ機構が存在するか確かめるため、Vam4 ホモログである AvaA と AvaB の機能的関係について現在調べている。

Cloning and Characterization of *avaB*, a Gene for Vacuolar Morphology, in *Aspergillus nidulans*

Masanao OKA, Yutaka MATSUDA, Manabu ARIOKA, Katsuhiko KITAMOTO

(Department of Biotechnology, The University of Tokyo)

P-37

麹菌からのシデロフォア生産調節遺伝子(*sre*)の単離とその解析

○渡辺久敬、佐藤利次、江井 仁 (岩手生工研)

麹菌(*A.oryzae*)はシデロフォア的一种であるフェリクシンを鉄欠乏時に誘導的に分泌することが知られているが、この物質は清酒の潜在的な着色原因となっている。最近、シデロフォア合成系を転写レベルで制御する因子 (SRE) の遺伝子が *N.crassa* および *A.nidulans* で相次いで単離され、麹菌でのフェリクシン生産抑制の手段としての利用が期待された。そこで、我々は、麹菌からの同遺伝子ホモログの単離を行うとともに、同遺伝子の機能解析を行った。既知の配列情報をもとに作成したデジェネレートプライマーを用いて、PCRにより *A.nidulans sreA* と高い相同性を示す部分 cDNA 断片を得た。この断片をもとに RACE 法により完全長 cDNA を、vectorette PCR 法によりプロモーターおよびターミネーター領域を含むゲノム DNA 断片を単離した。単離した麹菌のシデロフォア生産抑制遺伝子(*sreAo*)の推定アミノ酸配列には、*sre* ホモログに共通して認められる、2つの Zn finger motif と Cystein rich region が存在した。麹菌の *sreAo* と *A.nidulans sreA* とのアミノ酸レベルでの相同性は 69.5%であった。また、*sreAo* 破壊株は、鉄イオンの有無に関わらず恒常的にフェリクシンを分泌するように性質が変化した。

Cloning and characterization of siderophore regulator element gene (*sre*) from *Aspergillus oryzae*.

Hisayuki Watanabe, Toshitsugu Sato and Hitoshi Enei (Iwate Biotech. Res. Center)

P-38

プロテオーム解析による麹菌の酵素生産・分泌条件の検討

長嶺一輝、伊藤 清 (酒類総研)

【目的】醸造における麹菌の役割は主に酵素の分泌生産であり、また麹菌による異種タンパク質生産においても、分泌タンパク質の高生産・高分泌が重要なキーポイントとなる。しかし、麹菌の酵素生産は培養条件や菌株により大きく変化するので、醸造等の技術を高度化するには、酵素の生産・分泌条件を詳細に検討しておかなければならない。このための一助とするために、麹菌分泌タンパク質のプロテオーム解析を行った。

【方法と結果】菌株としては、清酒麹菌 (*Aspergillus oryzae* RIB40)、醤油麹菌 (*A. oryzae* KBN616)、焼酎麹菌 (*A. kawachii* IFO 4308) を用いた。液体培養ではフスマ抽出液を培地として用い、振とう培養を行った。固体培養ではフスマを培地として用い、恒温恒湿機中で製麹を行った。酵素は 0.5%NaCl を含む酢酸緩衝液で抽出し、硫酸沈殿を行った。プロテオーム解析は、常法通りの 2次元電気泳動により行った。麹菌による酵素の生産・分泌は培養条件により大きく変化し、培地組成により変化することは勿論のこと、固体培地と液体培地、培地 pH 等により大きく変化した。また、菌株による差も大きかった。

Studies on the enzyme production by koji molds from the aspects of proteome analysis

Kazuki Nagamine and Kiyoshi Ito (Res. Inst. of Brewing)

P-39

Aspergillus oryzae アスパルティックプロテイナーゼ I (APase I) 遺伝子のクローン化 加藤寛貴、横田正仁、竹内道雄 (農工大・農・応生科)

【目的】 *Aspergillus oryzae* var. *globosus* M-9 は、2種類のアスパルティックプロテイナーゼ(APase) I・IIを産生することが知られている。しかし2種のAPase間の構造および機能の差異は未だ解明されていない。本研究では、未知のAPase I 遺伝子がAPase II とは異なる遺伝子にコードされているのかを明らかにするとともにこの遺伝子をクローン化し、既知のAPase II 遺伝子と比較することを目的としている。

【方法と結果】 *A. oryzae* M-9 APase II 遺伝子の塩基配列¹⁾をもとにプライマーを作製、*A. oryzae* M-9 のgDNAを鋳型とし、PCRを試行した。得られた増幅断片をpUC118にサブクローン化した。APase II 遺伝子をプローブとしてサザンブロットを行った結果、増幅断片はAPase II 遺伝子とハイブリダイズしなかった。以上の結果から、得られた増幅断片は、APase II とは異なるものであることが確認された。現在、このAPase I と推定される遺伝子について、その塩基配列の解析を行っている。

1) Takeuchi M et.al. Adv Exp Med Biol.1995;362:577-80

Molecular cloning of an aspartic proteinase I gene from *Aspergillus oryzae*

Hiroataka Kato, Masahito Yokota and Michio Takeuchi (Tokyo University of Agriculture and Technology)

P-40

Aspergillus aculeatus の新規セルロース分解酵素とその作用

高田悟郎*¹・金澤成俊*¹・土屋尊子*¹・川口剛司*²・荒井基夫*²・何森 健*¹ (香川大農*¹・大阪府大院農*²)

セルロースなどのバイオマス資源を糖化する能力が高い糸状菌 *Aspergillus aculeatus* が培養上清に生産する酵素剤であるアクセラーゼは、様々な成分の多糖分解酵素を含むために農産廃棄物や食品廃棄物、家庭生ごみなどの資源ゴミに適用でき、酵素反応後に生成する単糖は様々な方面に再資源化できることから、ごみを微生物で処理する前の処理に有望であると考えられる。そこで、本菌が廃棄物を分解する際に生産する蛋白質をプロファイルし、新規のセルロース分解酵素の解析と役割を調べることにした。

まず、培養条件や炭素源を様々にかえて培養し、その培養液および培養液中のセルロース結合画分を二次元電気泳動に供した。次に、既知の酵素のバンドを除いた主要なバンドのN末端アミノ酸配列を決定した。セルロースに結合する4種類の蛋白質のうち、2種類はN末端がブロックされて解析できなかった。1種類はファミリー10に属するキシラーゼ、残りの1種類はファミリー7に属するセルラーゼと相同性があった。さらに、後者のセルラーゼについて解析を進めた。すなわちCBHI-2は、本菌のファミリー7の酵素であるCBHIと約60%のアミノ酸配列の相同性があった。CBHIが *A.niger* のCbhBと最も高い相同性を示すのに対し、CBHI-2は *A.niger* のCbhAとCBDの有無を除き、最も高い相同性を示した。

A New Cellulolytic Enzyme of *Aspergillus aculeatus* and Its Role.

Takata G., Kanazawa S., Tsuchiya T., Kawaguchi T.*, Arai M.*, and Izumori K. (Faculty of Agriculture, Kagawa University and Graduate School of Agriculture, Osaka Prefecture University*)

P-41

白麹菌 α -アミラーゼの発現様式

村島健司*、伊藤 清 (酒類総研、*広大院・先端研)

【目的】白麹菌(*Aspergillus kawachii*)では、耐酸性 α -アミラーゼとタカアミラーゼ類似の α -アミラーゼ(中性 α -アミラーゼ)の遺伝子が発現しているが、これらの発現様式は黄麹菌 (*A. oryzae*)のそれとは異なることを既に報告している。今回、遺伝子・タンパク質レベルで詳細に、発現様式の解析を行ったので報告する。

【方法と結果】ノーザン解析、レポーター遺伝子(GUS)解析及び耐酸性 α -アミラーゼ抗体を用いたウェスタン解析を行った。耐酸性 α -アミラーゼは、固体培養特異的に発現するが、液体培養で酵素活性がほとんど検出されないにもかかわらず、マルトースを炭素源とした時には、強い転写のシグナルが確認され、また GUS 活性も非常に高いレベルを示した。しかし、細胞内外に耐酸性 α -アミラーゼタンパク質は検出されなかった。従って、本遺伝子の固体培養特異的発現は、翻訳以降のいずれかのレベルでの制御によることが示唆された。中性 α -アミラーゼは、マルトース・デンプンのほかグリセロールでも発現するが、これはプロモーター領域中の、region I と呼ばれる部分が欠失していることが原因であると推定している。現在この点について、deletion 実験等を行って確認している。

Characterization of α -amylase genes from an industrial fungus *Aspergillus kawachii*

Kenji Murashima, Kiyoshi Ito (Res. Inst. of Brewing, Hiroshima University)

P-42

麹菌由来 *kexin* 様プロセッシング酵素の機能解析及び相互作用タンパク質の探索

水谷 治、野島 聡、山本盛真、山形洋平、阿部敬悦、中島 佑 (東北大・院農・分子酵素)

麹菌などの *Aspergillus* 属は、タンパク質分泌能が高く、有用物質生産の宿主として注目されている。本研究では、未だ明らかになっていない麹菌の分泌タンパク質のプロセッシング機構を解明するために、サチライシン様プロセッシング酵素の機能解析、欠損株の取得、及びその欠損株を用いたプロセッシング酵素と相互作用するタンパク質の解析を行っている。

麹菌 EST データベースよりサチライシン様プロセッシング酵素のクローニングを行い、*kexB* と名付けた。改良プロモーターの下流に本遺伝子を挿入した高発現ベクターを用いた形質転換により高発現株を取得し、その膜タンパク質画分から塩基性アミノ酸対を含む合成ペプチドを加水分解する活性を確認した。また、ピリチアミン耐性遺伝子を含む pPTRI ベクターに *kexB* を導入したプラスミドを用いて、*kexB* 欠損株を取得した。さらに欠損株を用いて DNA マイクロアレイ、2 次元電気泳動によるプロテオーム解析から本プロセッシング酵素の影響下にあるタンパク質の発現について検討する。

Functional analysis of *kexin*-like processing enzyme from *Aspergillus oryzae* and identification of its target proteins.

Osamu Mizutani, Akira Nojima, Morimasa Yamamoto, Youhei Yamagata, Keietsu Abe, Tasuku Nakajima (Tohoku Univ., Grad.Sch.Agric.Sci., Lab.Mol.Enzy.)

P-43

白色木材腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* のセルロース分解における菌体外糖代謝系について

(東大院農) 川合理恵、五十嵐圭日子、鮫島正浩、(森林総研) 石井 忠

白色木材腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* は、セルロース分解過程において、セルラーゼ、セロビオース脱水素酵素(CDH)、 β -グルコシダーゼ(BGL)などの酵素を菌体外に分泌することが知られている。しかし、既往の研究においては、可溶性糖の代謝と菌体外で生産されるこれらの酵素活性との関係については述べられていない。そこで本研究では、セルロース分解過程にある *P. chrysosporium* の液体培地に中間生成物として考えられる可溶性糖を添加し、菌体外液中のセルラーゼ、CDH、BGL 活性の変化、可溶性糖の同定とその量の変化、培地の pH 等について経日的に調べた。その結果、BGL 活性は他の二つの酵素と全く異なる挙動を示した。さらに、培地中に BGL が十分に機能できるほどのセロビオースが蓄積してこなかったことから、セルロース分解において、菌体外 BGL が関与していないセロビオース代謝経路の存在が示唆された。

Extracellular metabolism of soluble sugars in cellulose degradation by the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*

(The University of Tokyo) Rie Kawai, Kiyohiko Igarashi, Masahiro Samejima, (Forestry and Forest Products Research Institute) Tadashi Ishii

P-44

酵母菌 *Pichia pastoris* において発現させたセロビオース脱水素酵素の性質

吉田 誠、大平 剛、五十嵐圭日子、長澤寛道、会田勝美、鮫島正浩 (東大院農)

白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* 由来のセロビオース脱水素酵素(CDH)をコードする cDNA を発現ベクター pPIC9K を用いて、メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* に形質転換した。得られた形質転換体を発現培地で 4 日間培養し、培地から得た菌体外液の CDH 活性を測定したところ、1800 U/L(79 mg/L 相当の CDH)が検出された。これは野生株の培養系で得られる CDH 活性よりも高い値であった。組換え体 CDH を電気泳動的に単一になるまで精製した後、スペクトル分析、基質に対する反応速度論的解析、セルロースへの吸着能の測定を行ったところ、それらの特性は野生 CDH とほぼ一致した。

Properties of cellobiose dehydrogenase expressed by the yeast *Pichia pastoris*

Makoto Yoshida, Ohira Tsuyoshi, Kiyohiko Igarashi, Hiromichi Nagasawa, Aida Katsumi, Masahiro Samejima (University of Tokyo)

P-45

糸状菌 *Aspergillus nidulans* *eglA* 遺伝子のプロモーター解析

小島美沙子、加藤雅士、小林哲夫、塚越規弘（名大院・生命農学）

【目的】 *A. nidulans* における endo-1,4- β -glucanase 遺伝子 (*eglA*) の発現は、CMC、セロビオースにより誘導され、グルコースにより抑制される。*eglA* プロモーターには広域転写活性化因子 HAP complex の結合配列 (CCAAT box)、*Trichoderma reesei* のセルラーゼ遺伝子発現に關与する GTAATA box 類似配列、キシラン分解酵素遺伝子群の転写活性化因子 XlnR の結合配列や、炭素源抑制を支配する転写抑制因子 CREA の結合配列が存在する。しかし *eglA* プロモーター上での機能は明らでない。本報告ではこれらの機能解析ならびに新規機能配列の同定を試みた。

【方法と結果】 *A. oryzae* 由来タカアミラーゼ A 遺伝子 (*taaG2*) をレポーターとし、*eglA* プロモーター活性を検出した。上記結合配列が欠失・変異した *eglA* プロモーターをもつ融合遺伝子が *A. nidulans* の *argB* 座位に 1 コピーで導入された株を用い *eglA* 誘導・非誘導条件下でアミラーゼ活性を測定した。CCAAT box の変異はプロモーター活性の低下を引き起こし、この配列が転写を正に制御することが示唆された。XlnR 結合配列、GTAATA box の変異はプロモーター活性に影響を与えなかった。また 5' 順次欠失プロモーターの解析の結果、転写開始点上流 - 230 付近の配列の欠失により著しい転写活性化能の減少が観察され、新規制御配列の存在が示唆された。

Promoter analysis of the *eglA* gene of *Aspergillus nidulans*

Misako Kojima, Masashi Kato, Tetsuo Kobayashi, Norihiro Tsukagoshi (Department of Biological Mechanisms and Functions, Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University)

P-46

Aspergillus oryzae 由来 Pyriithiamine 耐性遺伝子 (*ptrA*) の利用

窪寺隆文、山下伸雄、西村 顕（白鶴酒造・研究開発室）

麹菌 *Aspergillus oryzae* の Pyriithiamine (PT) 耐性変異株より単離した耐性遺伝子 *ptrA* は *A. oryzae* の野生株を宿主とした形質転換マーカーとして有用であり¹⁾、本遺伝子を利用した *A. oryzae* および *A. nidulans* 形質転換用ベクターが実用化に至っている。今回、*A. oryzae* 以外の糸状菌株を対象に *ptrA* の適用可能性を検討した。PT の最少生育阻害濃度を測定した結果、*A. niger*, *A. kawachii*, *A. sojae*, *A. terreus*, *A. fumigatus*, *Trichoderma reesei* は 0.1 mg/l 以下であり、*A. oryzae* と同様、PT に対して高い感受性を示した。一方、*Penicillium citrinum*, *Fusarium solani* は PT 10 mg/l 存在下においても抵抗性を示した。次に PT 感受性を示した *A. kawachii*, *A. terreus*, *A. fumigatus*, *Trichoderma reesei* についてプロトプラスト作成等の形質転換条件を検討し、*ptrA* を含む組込型または遊離型ベクターで形質転換した。その結果、全ての菌株において PT 耐性を指標に形質転換体を選抜することが可能であった。このことから *ptrA* は PT 感受性を示す各種糸状菌株の形質転換マーカーとしても幅広く適用可能と考えられる²⁾。

1) Kubodera, T et al. : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64** (7)1416(2000)

2) 窪寺ら 日本農芸化学会 2001 年度大会講演要旨集 p115

Application of pyriithiamin resistance gene (*ptrA*) from *Aspergillus oryzae*.

Kubodera Takafumi, Yamashita Nobuo, Nishimura Akira (Hakutsuru SAKE Brewing co. Ltd.)

P-47

***Penicillium* sp. TN-88 株由来エンドおよびエキソ型イヌリナーゼ遺伝子の解析と分子進化**

秋元秀俊、森山 聡、中村豊彦、太田一良（宮崎大・農・応生科）

〔目的〕糸状菌 *Penicillium* sp. TN-88 株は多糖イヌリンの存在下でのみ誘導的にイヌリナーゼを菌体外に産生する。本報では、作用様式と基質特異性の異なるエンド型とエキソ型のイヌリナーゼをそれぞれコードする遺伝子 *inuC* と *inuD* の ORF と上流域を解析し、併せて両遺伝子の分子進化について考察した。

〔方法・結果〕*inuC* 遺伝子はイントロンを含まず、アミノ酸 515 残基のタンパク質をコードした。*inuD* 遺伝子は 59 bp のイントロンを 1 ヶ所保有し、アミノ酸 702 残基のタンパク質をコードした。両遺伝子上流域には、麹菌アミラーゼ遺伝子で報告されている starch-responsive element (5'-GGAAATT-3') が *inuC* では 3 ヶ所、*inuD* では 1 ヶ所、カタボライト抑制に関与するタンパク質 CreA の結合部位 (5'-SYGGRG-3') が *inuC* では 1 ヶ所、*inuD* では 5 ヶ所存在した。近隣結合法により推定アミノ酸配列をもとに作成した分子系統樹は、エンド型イヌリナーゼは細菌レバナーゼに、エキソ型イヌリナーゼは麹菌由来のフルクトース転移酵素にそれぞれ近縁であることを示し、同一菌株由来の関連酵素遺伝子でありながら起源が異なることが示唆された。

Characterization and molecular evolution of endo- and exoinulinase genes from *Penicillium* sp. strain TN-88

Hidetoshi Akimoto, Satoshi, Moriyama, Toyohiko Nakamura, Kazuyoshi Ohta (Dept. Biochem. Appl. Biosci., Miyazaki Univ.)

P-48

糸状菌キトサナーゼ遺伝子のクローニングと構造解析

下坂 誠, 張 孝勇, 宮澤 恭, 小平律子, 野川優洋, 岡崎光雄*

(信州大・繊維・応生科, 信州大・遺伝子実験施設*)

〔緒言〕キチンは糸状菌細胞壁を構成する主要な多糖であるが、一部の菌類では細胞壁キチンが脱アセチル化を受けてキトサンが生じている。この脱アセチル化の意義、およびこれらの株が作るキトサナーゼの役割は不明である。我々は植物病原菌 *Fusarium solani* および麹菌 *Aspergillus oryzae* が細胞外に分泌するキトサナーゼの酵素学的性質を調べるとともに遺伝子を単離することによりアミノ酸一次配列を決定した。これら糸状菌キトサナーゼにおける一次配列の相同性から活性ドメインの構造を推定するとともに、キトサナーゼの局在性とその役割について明らかにすることを目的としている。

〔結果と考察〕*A. oryzae* キトサナーゼのアミノ酸配列は *F. solani* の配列と 45% の相同性を示した。糸状菌キトサナーゼの一次配列は互いに保存されており、細菌キトサナーゼとは起源を異にすることが明らかとなった。これら糸状菌キトサナーゼに対して、糖質加水分解酵素ファミリー 75 の分類が提唱された。*F. solani* キトサナーゼ cDNA の大腸菌における発現系を構築した。インビトロ変異導入法を用いて、糸状菌キトサナーゼにおいてよく保存されている 3 つのグルタミン酸残基をグルタミンに変換した。その結果、169 番目の Glu を Gln に置換した場合のみ活性が完全に消失したことから、この Glu 残基が活性中心のひとつと推定できた。

Cloning and Characterization of Chitosanase Genes from Filamentous Fungi

Makoto Shimosaka, Xiao-Yong Zhang, Takashi Miyazawa, Ritsuko Kodaira, Masahiro Nogawa, and Mitsuo Okazaki* (Department of Applied Biology, Faculty of Textile Science and Technology, and *Gene Research Center, Shinshu University)

人名索引

| | | | |
|---------------------------|----------------|------------|--------------------|
| J. R. Aist..... | 25 | 伊藤靖夫..... | 25, 40 |
| Praveen Rao Juvvadi | 47 | 井上 哲..... | 25 |
| Erman Munir..... | 26 | 入江俊一..... | 20, 44 |
| Jin-Rong Xu..... | 27 | 岩下和裕..... | 42 |
| Jeong J. Yoon | 26 | 岩野君夫..... | 44 |
| 会田勝美..... | 53 | 宇佐美昭次..... | 22 |
| 赤尾 健..... | 17 | 氏田 稔..... | 33 |
| 赤坂祐樹..... | 45 | 宇田川史仁..... | 22 |
| 赤松 創..... | 38 | 内村浩正..... | 22 |
| 秋 庸裕..... | 41 | 江井 仁..... | 20, 44, 45, 50 |
| 秋田 修..... | 17, 47 | 太田明德..... | 18, 32 |
| 秋光和也..... | 38 | 太田一良..... | 55 |
| 秋元秀俊..... | 55 | 大根田守..... | 17 |
| 明星裕美..... | 33 | 大庭裕範..... | 23 |
| 浅田芳宏..... | 34 | 大平 剛..... | 53 |
| 穴澤秀治..... | 35 | 大宮邦雄..... | 43 |
| 阿部敬悦..... | 43, 52 | 大山晃弘..... | 47 |
| 安部康久..... | 21 | 岡 拓二..... | 34 |
| 荒井基夫..... | 30, 37, 51 | 岡 真如..... | 49 |
| 荒卷 功..... | 44 | 岡崎光雄..... | 55 |
| 有江 力..... | 19, 36, 42 | 小笠原涉..... | 39 |
| 有岡 学..... | 17, 46, 47, 49 | 岡田宏文..... | 39 |
| 飯島 隆..... | 24 | 小川雅裕..... | 47 |
| 五十嵐圭日子..... | 27, 53 | 奥田将生..... | 44 |
| 池口雅道..... | 23 | 尾関健二..... | 41 |
| 生駒忠昭..... | 23 | 尾谷 浩..... | 38 |
| 石 一智..... | 28 | 小埜和久..... | 41 |
| 石井 忠..... | 53 | 柏木 豊..... | 18, 33, 40 |
| 石田博樹..... | 21, 36 | 勝野泰朗..... | 43 |
| 板本明咲枝..... | 35 | 勝山陽子..... | 45 |
| 一岡大輔..... | 25 | 加藤朋子..... | 30 |
| 一島英治..... | 23 | 加藤直樹..... | 24, 45 |
| 一瀬博文..... | 20 | 加藤八才..... | 19 |
| 伊藤 芳..... | 38 | 加藤寛貴..... | 51 |
| 伊藤 清..... | 28, 42, 50, 52 | 加藤雅士..... | 24, 29, 39, 45, 54 |
| 伊東達雄..... | 33 | 加藤陽治..... | 34 |

| | | | |
|-------------|----------------------------|-------------|--------------------|
| 金澤成俊 | 51 | 後藤正利 | 34 |
| 金子 功 | 19 | 小林哲夫 | 24, 29, 39, 45, 54 |
| 鎌倉高志 | 19 | 五味勝也 | 18, 47 |
| 亀井健一 | 39 | 齋藤久美子 | 20, 44, 45 |
| 嘉屋正彦 | 21 | 齋藤憲一郎 | 19 |
| 川合理恵 | 53 | 坂野好幸 | 33 |
| 川口剛司 | 30, 37, 51 | 栗冠和郎 | 43 |
| 河田真樹 | 44, 45 | 佐藤綾子 | 45 |
| 河内一郎 | 33 | 佐藤利次 | 20, 44, 45, 50 |
| 川戸章嗣 | 21, 36 | 佐野元昭 | 36, 47 |
| 川部眞登 | 19, 36, 42 | 鮫島正浩 | 27, 53 |
| 河本正次 | 41 | 重田征子 | 41 |
| 神田勝弘 | 44 | 篠田典子 | 17 |
| 菊池聡子 | 46 | 島田幹夫 | 26 |
| 菊池 久 | 14 | 下飯 仁 | 42 |
| 木崎康造 | 41 | 下坂 誠 | 55 |
| 北本勝ひこ | 17, 24, 28, 46, 47, 48, 49 | 祥雲弘文 | 21, 22, 35 |
| 北本則行 | 29 | 新本洋士 | 37 |
| 北脇麻紀 | 30 | 杉並孝二 | 21 |
| 木野邦器 | 22 | 鈴木 聡 | 40 |
| 木村哲哉 | 43 | 鈴木雅博 | 37 |
| 木村俊之 | 37 | 炭谷順一 | 30, 37 |
| 桐村光太郎 | 22 | 高崎一人 | 35 |
| 金 鋒傑 | 46 | 高瀬久美子 | 47 |
| 窪寺隆文 | 54 | 高田悟郎 | 51 |
| 熊谷知栄子 | 41 | 高橋幸資 | 23 |
| 栗原宏征 | 26 | 高橋 守 | 37 |
| 黒木 豊 | 48 | 高原浩之 | 38 |
| 桑原正章 | 10, 20 | 高谷直樹 | 21, 22, 35 |
| 幸田明生 | 41 | 竹内道雄 | 30, 51 |
| 古賀晋治 | 37 | 竹下典男 | 32 |
| 小島美沙子 | 54 | 多田羅洋太 | 23 |
| 高妻卓司 | 37 | 田中愛子 | 38 |
| 小関卓也 | 44 | 田中昭光 | 29 |
| 小平律子 | 55 | 田中孝欣 | 38 |
| 児玉基一朗 | 38 | 田中尚子 | 18 |
| 後藤邦康 | 17 | 田中浩雄 | 20, 26 |

| | | | |
|-------------|------------------------|-------------|----------------|
| 田上新次郎 | 39 | 平塚宣博 | 20 |
| 張 孝勇 | 55 | 平野達也 | 44, 45 |
| 塚越規弘 | 8, 24, 29, 39, 45, 54 | 福田 央 | 41 |
| 柘植尚志 | 38 | 藤田晃子 | 23 |
| 土屋尊子 | 51 | 藤田 仁 | 41 |
| 寺岡 徹 | 19, 42 | 藤原真紀 | 37 |
| 寺崎容子 | 35 | 古川謙介 | 34 |
| 手老省三 | 23 | 古川健太郎 | 43 |
| 土井ゆうこ | 23 | 古川貴章 | 33 |
| 時松敏明 | 26 | 保崎佳嗣 | 38 |
| 戸田智美 | 47 | 堀内裕之 | 18, 32 |
| 殿塚隆史 | 33 | 本田与一 | 10, 20 |
| 長澤寛道 | 53 | 正井久美子 | 48 |
| 中島 佑 | 34, 43, 52 | 町田雅之 | 36, 47 |
| 長島 直 | 35 | 松井淳子 | 29 |
| 中島春紫 | 24, 28, 46, 47, 48, 49 | 松岡寿保 | 43 |
| 中谷善博 | 33 | 松澤 洋 | 44 |
| 長嶺一輝 | 50 | 松田 豊 | 49 |
| 中村豊彦 | 55 | 松村憲吾 | 21 |
| 夏目豊彰 | 25, 40 | 丸井淳一朗 | 29 |
| 西河 淳 | 33 | 丸山潤一 | 28, 46, 48, 49 |
| 西出辰徳 | 26 | 水谷 治 | 52 |
| 西野武士 | 27 | 水谷浩平 | 42 |
| 西村 顕 | 54 | 水谷真也 | 40 |
| 西村麻里江 | 27 | 皆川 一 | 28 |
| 野川優洋 | 39, 55 | 峰時俊貴 | 41 |
| 野島 聡 | 52 | 宮澤 恭 | 55 |
| 野中真由子 | 34 | 村島健司 | 52 |
| 秦 洋二 | 21, 36, 47 | 森川 康 | 39 |
| 八田理恵子 | 38 | 森谷敏康 | 21 |
| 服部武文 | 26 | 森山 聡 | 55 |
| 濱口 哲 | 34 | 八重樫香 | 45 |
| 原 彰 | 33 | 安田庄子 | 29 |
| 原田 直 | 42 | 矢原明典 | 17 |
| 東田克也 | 21 | 山内清語 | 23 |
| 久田博元 | 36, 47 | 山形洋平 | 52 |
| 日比忠明 | 12 | 山岸賢治 | 37 |

| | | | |
|------------|--------|------------|--------|
| 山口 勇 | 19 | 芳陵一生 | 37 |
| 山崎晴丈 | 18 | 吉田 孝 | 23, 34 |
| 山下伸雄 | 54 | 吉田隆延 | 19, 36 |
| 山田 修 | 17 | 吉田 誠 | 53 |
| 山根雄一 | 41 | 李 秉魯 | 23 |
| 山本幹博 | 38 | 若林三郎 | 41 |
| 山本盛真 | 52 | 和久 豊 | 29 |
| 横田正仁 | 30, 51 | 渡辺隆司 | 20 |
| 横山英之 | 33 | 渡辺久敬 | 44, 50 |
| 吉内くみ | 17 | 割石博之 | 20, 26 |

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) 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. 本会の事務年度は研究会の開催準備開始から「次期」研究会の開催準備開始直前までとする。
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。

糸状菌分子生物学研究会運営委員会名簿

会 長

北本 勝ひこ

東京大学大学院農学生命科学研究科（〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1）

運営委員

秋田 修

独立行政法人酒類総合研究所（〒739-0046 広島県東広島市鏡山 3-7-1）

五味 勝也

東北大学大学院農学研究科（〒981-8555 仙台市青葉区堤通雨宮町 1-1）

鮫島 正浩

東京大学大学院農学生命科学研究科（〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1）

会計担当

有江 力

東京農工大学農学部（〒183-8509 東京都府中市幸町 3-5-8）

竹内 道雄

東京農工大学農学部（〒183-8509 東京都府中市幸町 3-5-8）

編集担当

小林 哲夫

名古屋大学大学院生命農学研究科（〒464-8601 名古屋市千種区不老町）

広報担当

川口 剛司

大阪府立大学大学院農学生命科学研究科（〒599-8531 大阪府堺市学園町 1-1）

庶務担当

堀内 裕之

東京大学大学院農学生命科学研究科（〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1）

第1回糸状菌分子生物学コンファレンス要旨集

平成13年11月7日印刷

平成13年11月7日発行

発行者 糸状菌分子生物学研究会

編集者 小林哲夫

〒464-8601 名古屋市千種区不老町

名古屋大学大学院生命農学研究科