

The 20th Conference on

Fungal Genetics

and

Molecular Biology

第 20 回糸状菌分子生物学コンファレンス

2021 年 11 月 11 日 - 12 日

Zoom および Remo によるオンライン開催

糸状菌分子生物学研究会

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

目次

コンファレンスプログラム	2
発表演題および講演時間	3
海外招待講演要旨	13
シンポジウム講演要旨	14
口頭発表講演要旨	23
ポスター発表講演要旨	30
発表者索引	63
糸状菌分子生物学研究会会則	66
糸状菌分子生物学研究会運営委員名簿	67
糸状菌遺伝子研究会賛助会員	68

第 20 回糸状菌分子生物学コンファレンス

日時：2021年11月11日(木)-12日(金)

会場：Zoom および Remo によるオンライン開催

主催：糸状菌分子生物学研究会

協賛：糸状菌遺伝子研究会

11月11日(木)

10:25-10:30	開会の辞	〈 Zoom 〉
10:30-12:00	口頭発表 (0-1~0-7)	〈 Zoom 〉
12:00-13:30	昼食	
13:30-15:30	ポスター発表 (奇数番号)	〈 Remo 〉
15:30-15:40	休憩	
15:40-17:10	口頭発表 (0-8~0-14)	〈 Zoom 〉

11月12日(金)

10:00-12:00	ポスター発表 (偶数番号)	〈 Remo 〉
12:00-13:30	昼食	
13:30-16:15	シンポジウム	〈 Zoom 〉
16:15-16:30	休憩	
16:30-17:30	海外招待講演	〈 Zoom 〉
17:30-17:40	休憩	
17:40-18:20	総会・表彰式	〈 Zoom 〉
18:20-18:30	休憩	
18:30-20:00	懇親会・閉会の辞	〈 Remo 〉

発表演題および講演時間

11月12日(金) 16:30 - 17:30

海外招待講演

〔座長:有江 力(東京農工大学)〕

「Transposons drive adaptation in a clonally evolving fungal pathogen」

Departamento de Genética

Antonio Di Pietro

11月12日(金) 13:30 - 16:15

シンポジウム

「次の時代を切り拓く糸状菌研究」

〔座長:五味 勝也(東北大学)(S-1,2,3)、楠本 憲一(大阪大学)(S-4,5)〕

協賛:

東北大学 発酵微生物学寄附講座、大阪大学 麹菌育種工学寄附講座、
東京大学 醸造微生物学寄付講座、京都大学 糸状菌・環境インターフェイス工学講
座、筑波大学 糸状菌相互応答学講座

13:30-13:35

はじめに

五味 勝也(東北大学)

13:35-14:05

S-1 「糸状菌のポストゲノム型天然物探索研究」

浅井 禎吾(東北大学)

14:05-14:35

S-2 「植物共生糸状菌が秘める病原性の覚醒」

晝間 敬(東京大学)

14:35-15:05

S-3 「糸状菌環境インターフェイス研究」

吉見 啓(京都大学)

15:05-15:15 休憩

15:15-15:45

S-4 「生態システム理解を目指した糸状菌相互作用研究」

萩原 大祐(筑波大学)

15:45-16:15

S-5 「麹菌研究と糸状菌分子生物学の20年とこれから」

丸山 潤一(東京大学)

口頭発表 (O-1~O-7) 11月11日(木) 10:30 - 12:00

[座長: 田中瑞己 (O-1,2), 岩間亮 (O-3,4,5), 樋口裕次郎 (O-6,7)]

- 10:30 O-1 ゲノム編集技術を利用した大規模欠損による麹菌に特徴的な染色体領域の機能解析
知見悠太¹, 山口勝司², 齋藤直也¹, 片山琢也^{1,3}, 重信秀治², 丸山潤一^{1,3} (東大院・農生
科・応生工, ²基生研, ³東大・CRIIM)
- 10:42 O-2 麹菌そのもの, および麹菌含有食品のプレバイオティクス効果について
野村亮¹, 都築翔¹, 兒島孝明², 志水元亨¹, 加藤雅士¹ (名城大院・農, ²名大院・生命農
学)
- 10:54 O-3 ゲノム比較解析を用いた *Bipolaris maydis* 表面疎水性変異株の原因遺伝子の同定
佐波雅史, 吉田裕史, 吉見啓, 田中千尋 (京大院・農)
- 11:06 O-4 糸状菌 *Trichoderma reesei* の形態形成とセルラーゼ生産性の相関解析にむけた菌糸伸長制御マ
イクロ流体システムの開発
井谷綾花¹, 北原雪菜¹, 志田洋介¹, 大倉玲子², 若本祐一², 小笠原渉¹ (長岡技科大・生
物, ²東大・総合)
- 11:18 O-5 マイコウイルスが *Aspergillus flavus* の表現型に与える影響の普遍性を解明する
黒木美沙¹, 浦山俊一^{1,2}, 矢口貴志³, 萩原大祐^{1,2} (筑波大・生命環境, ²筑波大・MiCS,
³千葉大真菌)
- 11:30 O-6 マイクロ流体デバイスで示す外部環境に応じた糸状菌の伸長方向制御
山本里穂, 福田紗弓, 高谷直樹, 竹下典男 (筑波大学 微生物サステイナビリティ研究センター
(MiCS))
- 11:42 O-7 生体膜不飽和度が *Aspergillus nidulans* の生育に及ぼす影響
岩間亮^{1,2}, 堀内裕之^{1,2} (東大院・農生科・応生工, ²東大・微生物連携)

口頭発表 (O-8~O-14) 11月11日(木) 15:40 – 17:10

[座長: 加藤直樹 (O-8,9), 河内護之 (O-10,11,12), 枡尾俊介(O-13,14)]

- 15:40 O-8 麴菌ハイドロフォビン *RolA* の Langmuir 膜に特異的に吸着したポリエステラーゼ *CutL1* の可視化方法構築
齋藤有美¹, 寺内裕貴², 吉見啓³, 田中拓未⁴, 石崎裕也⁵, 三ツ石方也⁵, 藪浩^{6,7}, 阿部敬悦¹
(¹東北大院・農, ²京大院・地球環境学堂, ³京大院・農, ⁴農研機構・農環研, ⁵東北大院・工, ⁶東北大・WPI-AIMR, ⁷東北大・多元研)
- 15:52 O-9 *Aspergillus nidulans* 由来 CYP540A2 の新規電子伝達系の解明
鈴木康太, 門岡千尋, 枡尾俊介, 志水元享, 高谷直樹 (筑波大・生命環境・MiCS)
- 16:04 O-10 *Bipolaris maydis* における転写因子 *RPR1* の制御因子の探索
藤林悠希, 二神加奈恵, 竹山さわな, 辻健也, 陳帯娣, 吉見啓, 田中千尋 (京大院・農)
- 16:16 O-11 黒麴菌 *Aspergillus luchuensis* とその近縁種におけるアミラーゼ生産制御機構の解析
森瀬太一¹, 橋本渉¹, 渡部昭¹, 水谷治², 山田修³, 新谷尚弘¹, 五味勝也¹ (¹東北大院・農, ²琉球大・農, ³酒総研)
- 16:28 O-12 麴菌においてカーボンカタボライト抑制を制御する脱ユビキチン化酵素 *CreB* はユビキチンリガーゼアダプター *CreD* の転写誘導とタンパク質安定性を制御する
田中瑞己¹, 藤田翔貴², 河原崎泰昌³, 山形洋平¹, 新谷尚弘², 五味勝也² (¹東農工大院・農, ²東北大院・農, ³静岡県大・食栄)
- 16:40 O-13 *Aspergillus fumigatus* と感染ウイルスの dual-genomics による進化的な関係性の解析
千葉悠斗¹, 高橋弘喜², 楠屋陽子², 渡辺哲², 浦山俊一^{1,3}, 萩原大祐^{1,2,3} (¹筑波大・生命環境系, ²千葉大・真菌セ, ³筑波大・MiCS)
- 16:52 O-14 立体選択的[4+2]環化付加反応を触媒するデカリン合成酵素の阻害剤同定
加藤直樹^{1,2}, 藤山敬介³, 永野真吾³, 高橋俊二² (¹摂南大・農, ²理研・CSRS, ³鳥取大院工)

ポスター発表 11月11日(水) 13:30 – 15:30 (奇数番号)

11月12日(木) 10:00 – 12:00 (偶数番号)

(*は学生)

- *P-1 白色腐朽担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* 由来の新規ジオキシゲナーゼの機能・構造解析
加藤大志, 高橋泰志, 鈴木裕満, 加藤雅士, 志水元亨 (名城大院・農)
- *P-2 麹菌ハイドロフォビン RolA の Langmuir 膜に特異的に吸着したポリエステラーゼ CutL1 の可視化方法構築
齋藤有美¹, 寺内裕貴², 吉見啓³, 田中拓未⁴, 石崎裕也⁵, 三ツ石方也⁵, 藪浩^{6,7}, 阿部敬悦¹
(¹東北大院・農, ²京大院・地球環境学堂, ³京大院・農, ⁴農研機構・農環研, ⁵東北大院・工, ⁶東北大・WPI-AIMR, ⁷東北大・多元研)
- *P-3 白色腐朽担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* 由来の新規 flavin-containing monooxygenase の機能・構造解析
森玲香, 鈴木裕満, 加藤雅士, 志水元亨 (名城大院・農)
- *P-4 糸状菌における攪拌翼形状とタンパク質分泌生産の相関解析
小野太暉¹, 鈴木智大², 加戸悠³, 坪井宏和³, 坊垣隆之³, 幸田明生³, 辻野義雄⁴, 近藤昭彦⁴, 若井暁^{4,5}, 荻野千秋¹ (¹神戸大院・工, ²神戸大・工, ³大関総研, ⁴神戸大院・技イノベ, ⁵海洋研・超先鋭)
- *P-5 麹菌由来界面活性タンパク質 hydrophobin RolA の自己組織化膜の微細な表面構造解析
高橋尚央¹, 寺内裕貴², 吉見啓³, 田中拓未⁴, 石崎裕也⁵, 三ツ石方也⁵, 藪浩^{6,7}, 阿部敬悦¹
(¹東北大・農, ²京大院・地球環境学堂, ³京大院・農, ⁴農研機構・農環研, ⁵東北大院・工, ⁶東北大・WPI-AIMR, ⁷東北大・多元研)
- *P-6 *Aspergillus fumigatus* における α -マンノシド β -(1 \rightarrow 6)-ガラクトフラノース転移酵素群の機能解析
備瀬政晃¹, 田中大², 門岡千尋¹, 岡拓二¹ (¹崇城大院・工, ²東北医薬大・薬)
- *P-7 *Aspergillus nidulans* 由来 CYP540A2 の新規電子伝達系の解明
鈴木康太, 門岡千尋, 榊尾俊介, 志水元亨, 高谷直樹 (筑波大・生命環境・MiCS)
- *P-8 糸状菌 *Trichoderma asperellum* 由来糖質加水分解酵素および生産制御の研究
豊田稜介¹, 劉麗¹, 坂川絵里香¹, 中村華穂¹, 鈴木孝征^{1,3}, 金政真^{1,2} (¹中部大院・応生, ²中部大・環生科, ³中部大・応生化)
- *P-9 芳香族主鎖型ポリマー加水分解酵素の探索と機能解析
西岡利隆, 榊尾俊介, 老沼研一, 高谷直樹 (筑波大・生命環境系/MiCS)

- *P-10 ヒラタケ *rho1b* の過剰発現は *ccl1* 破壊株で観察されたセルロース分解酵素遺伝子の転写活性化を引き起こす
 奥田希実, 中沢威人, 堀井雅人, 呉紅麗, 河内護之, 坂本正弘, 本田与一 (京大院・農)
- *P-11 ヒラタケにおける *hap2* 遺伝子破壊が *mnp* および *vp* 遺伝子の転写に及ぼす影響の解析
 香山溪太, 中沢威人, 河内護之, 坂本正弘, 本田与一 (京大院・農)
- P-12 *Aspergillus* 属糸状菌の代謝耐性イソマルトースアナログによるアミラーゼ生産
 沼本穂¹, 平井剛², 高橋俊二³, 加藤直樹¹ (¹摂南大・農, ²九大院・薬, ³理研・CSRS)
- *P-13 黄麹菌 *Aspergillus oryzae* の転写因子 PrtR の解析
 沼澤里佳¹, 田中優花子², 西岡佐和子², 辻僚太郎², 山形洋平^{1,2} (¹農工大院・連合農学研究科, ²農工大院・応生化)
- *P-14 *Bipolaris maydis* における転写因子 RPR1 の制御因子の探索
 藤林悠希, 二神加奈恵, 竹山さわな, 辻健也, 陳帯娣, 吉見啓, 田中千尋 (京大院・農)
- *P-15 G protein-coupled receptors GprK and GprR regulate sclerotia formation through their GTPase-activating activity in *Aspergillus oryzae*
 Dong Min Kim¹, Manabu Arioka^{1,2} (¹Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo, ²CRIIM, UTokyo)
- P-16 麹菌においてカーボンカタボライト抑制を制御する脱ユビキチン化酵素 CreB はユビキチンリガーゼアダプターCreD の転写誘導とタンパク質安定性を制御する
 田中瑞己¹, 藤田翔貴², 河原崎泰昌³, 山形洋平¹, 新谷尚弘², 五味勝也² (¹東農工大院・農, ²東北大院・農, ³静県大・食栄)
- *P-17 黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* とその近縁種におけるアミラーゼ生産制御機構の解析
 森瀬太一¹, 橋本渉¹, 渡部昭¹, 水谷治², 山田修³, 新谷尚弘¹, 五味勝也¹ (¹東北大院・農, ²琉球大・農, ³酒総研)
- *P-18 Zn(II)₂Cys₆ transcription factors essential for sclerotia formation involve AmyR, a transcriptional activator of amyolytic genes, in *Aspergillus oryzae*
 Xueyan Sun¹, Haruka Minagawa¹, Takuya Katayama^{1,2}, Hiroya Oka³, Masahiro Ogawa⁴, Takaaki Kojima³, Hideo Nakano³, Katsuhiko Kitamoto⁵, Jun-ichi Maruyama^{1,2} (¹Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, ²CRIIM, UTokyo, ³Grad. Sch. Bioagric. Sci. Nagoya Univ., ⁴Noda Inst. Sci. Res., ⁵Nihon Pharmaceutical Univ.)
- *P-19 アカパンカビを用いた浸透圧シグナル攪乱剤及びステロール合成阻害剤に応答するルシフェラーゼアッセイの構築
 加藤志穂, 平井献士, 一石昭彦, 藤村真 (東洋大院・生命科)

*P-20 *Aspergillus nidulans* の sirtuin 阻害剤の探索

久保友汰, 小田倉里佳, 榊尾俊介, 高谷直樹 (筑波大・生命環境)

*P-21 イネいもち病菌 (*Pyricularia oryzae*)における交配型決定領域の機能解析

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

*P-22 糸状菌 *Aspergillus terreus* におけるイタコン酸生産制御機構についての研究

川尻康平¹, 浜田勇和¹, 柿崎徹也¹, 福井志帆¹, 金政真^{1,2} (¹中部大院・応生, ²中部大・環生科)

*P-23 アカパンカビのソルボース耐性 *col-26/amyR* 株のグルコース輸送体遺伝子発現とソルボース消費

平井献士, 加藤志穂, 一石昭彦, 藤村真 (東洋大院・生命科)

P-24 麹菌接種チーズ熟成における酵素活性

鈴木聡¹, 大森英之¹, 林田空¹, 野村将¹, 小林美穂¹, 萩達朗¹, 成田卓美¹, 富田理¹, 山下秀行², 荒川洋輔³, 三浦孝之⁴, 佐藤薫⁴, 楠本憲一¹ (¹農研機構, ²樋口松之助商店, ³蔵王酪農センター, ⁴日獣生科大)

*P-25 麹菌そのもの, および麹菌含有食品のプレバイオティクス効果について

野村亮¹, 都築翔¹, 兒島孝明², 志水元亨¹, 加藤雅士¹ (¹名城大院・農, ²名大院・生命農学)

*P-26 黒麹菌による 1-octen-3-ol 生産に対するリノール酸生合成遺伝子 *odeA* 破壊の影響

片岡涼輔¹, 坂口雅和², 渡邊泰祐^{1,2}, 山田修³, 荻原淳^{1,2} (¹日大院生資科・生資利用, ²日大生資科・生命化, ³酒総研)

*P-27 麹菌 *Aspergillus oryzae* 菌糸分散株の培養液混合特性とその酵素生産性への寄与

薄田隼弥¹, 武藤清明², 市川暉², 宮澤拳², 古明地敬介², 吉見啓^{3,4}, 加藤好一⁵, 阿部敬悦^{2,4}
(¹東北大・農, ²東北大院・農, ³京大院・農, ⁴東北大・未来研, ⁵佐竹化学・攪拌研)

*P-28 Improvement of Monacolin K Hyperproducing Mutant Strains in *Monascus purpureus* through Synchrotron Light Irradiation and Comparative Genome Analysis

Sittichoke Ketkaeo^{1,2}, Yukio Nagano^{1,3}, Shuichiro Baba^{1,2}, Kei Kimura^{1,2}, Taiki Futagami^{1,4}, Werasit Sanpamongkolchai⁵, Genta Kobayashi^{1,2}, Masatoshi Goto^{1,2} (¹United Grad. Sch. Agri. Sci., Kagoshima Univ., ²Fac. Agri., Saga Univ., ³Anal. Res. Cen. Exp. Sci., Saga Univ., ⁴Fac. Agri., Kagoshima Univ., ⁵Dept. Biotechnol., Kasetsart Univ.)

*P-29 ゲノム編集技術を利用した大規模欠損による麹菌に特徴的な染色体領域の機能解析

知見悠太¹, 山口勝司², 齋藤直也¹, 片山琢也^{1,3}, 重信秀治², 丸山潤一^{1,3} (¹東大院・農生科・応生工, ²基生研, ³東大・CRIIM)

- *P-30 **麹菌由来界面活性タンパク質 Hydrophobin RolA の自己組織化メカニズム解析**
井田大輝¹, 齋藤有美¹, 寺内裕貴², 吉見啓³, 田中拓未⁴, 石崎裕也⁵, 三ツ石方也⁵, 藪浩^{6,7}, 阿部敬悦¹ (¹東北大院・農, ²京大院・地球環境学堂, ³京大院・農, ⁴農研機構・農環研, ⁵東北大院・工, ⁶東北大・WPI-AIMR, ⁷東北大・多元研)
- *P-31 **麹菌におけるゲノム編集を利用した多重代謝遺伝子改変による異種天然物高生産系の構築**
齋藤直也¹, 片山琢也^{1,2}, 南篤志³, 及川英秋³, 丸山潤一^{1,2} (¹東大院・農生科・応生工, ²東大・微生物連携機構, ³北大院・理)
- *P-32 **糸状菌 *Trichoderma reesei* における CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集**
大武侑平¹, 志田洋介¹, 織田健², 岩下和裕², 小笠原渉¹ (¹長岡技科大・生物, ²酒類総研)
- *P-33 **黄麹菌 *Aspergillus oryzae* のエンドサイトーシス関連因子 AipA と AoAbp1 がエンドサイトーシスに及ぼす影響の解析**
日浅怜子, 竹川薫, 樋口裕次郎 (九大院・生資環)
- P-34 ***Aspergillus nidulans* におけるキチン合成酵素 ChsB の菌糸先端局在への AP-2 複合体の寄与**
金京運¹, 岩間亮^{1,2}, 堀内裕之^{1,2} (¹東大院・農生科・応生工, ²東大・微生物連携)
- *P-35 **糸状菌・細菌の相互作用における pH の影響と生態系における役割**
頼永萌々佳, 工藤凱門, Gayan Abeysinghe, 高谷直樹, 竹下典男 (筑波大・MiCS)
- *P-36 ***Aspergillus oryzae* における菌体内 metalloendopeptidase, insulysin ホモログの局在解析**
小川翠, 溝上哲哉, 鈴木遥香, 佐々木信光, 山形洋平 (農工大院・応生化)
- *P-37 **糸状菌 *Aspergillus nidulans* における Sec14 ファミリータンパク質の生理機能の解析**
楊淳児¹, 須澤徹生¹, 岩間亮^{1,2}, 福田良一^{1,2}, 堀内裕之^{1,2} (¹東大院・農生科・応生工, ²東大・微生物連携機構)
- *P-38 ***Aspergillus oryzae* のホスファチジルコリン合成関連遺伝子の機能解析**
須澤徹生¹, 岩間亮^{1,2}, 福田良一^{1,2}, 堀内裕之^{1,2} (¹東大院・農生科・応生工, ²東大・微生物連携機構)
- *P-39 **黄麹菌 *Aspergillus oryzae* の菌体外ペプチダーゼ PepO 及び OcpO 欠損が酸性ペプチダーゼ生産に与える影響**
佐藤光希子, 内平瑛子, 上野綾子, 田中瑞己, 山形洋平 (農工大院・応生化)
- *P-40 **黄麹菌 *Aspergillus oryzae* における egfp プローブを用いた smFISH による mRNA 局在解析**
守田湧貴, 竹川薫, 樋口裕次郎 (九大院・生資環・生命機能)

- P-41** マイコウイルスが *Aspergillus flavus* の表現型に与える影響の普遍性を解明する
黒木美沙¹, 浦山俊一^{1,2}, 矢口貴志³, 萩原大祐^{1,2} (筑波大・生命環境, ²筑波大・MiCS, ³千葉大真菌)
- *P-42** アスパラガス疫病菌に感染する *Phytophthora endornavirus* の完全長 cDNA クローン構築
作田康平¹, 内田景子², 福原敏行¹, 植松清次², 森山裕充¹ (農工大院・農, ²農工大・細胞分子)
- P-43** 子嚢殻形成における Kex2 切断反復タンパク質の役割
梅村舞子¹, 栗岩薫¹, 萩原大祐², 豊留孝仁³, 梶尾俊介², 高谷直樹², 矢口貴志⁴, 渡辺哲⁴, 亀井克彦⁴ (産総研・生物プロセス, ²筑波大・生命環境, ³帯広畜産大・獣医, ⁴千葉大・真菌センター)
- *P-44** 白色腐朽菌ヒラタケにおけるオートファジー機能欠損 *atg9* 破壊株の解析
樽林一皓, 中沢威人, 山本太一, 河内護之, 坂本正弘, 本田与一 (京大院・農)
- P-45** 生体膜不飽和度が *Aspergillus nidulans* の生育に及ぼす影響
岩間亮^{1,2}, 堀内裕之^{1,2} (東大院・農生科・応生工, ²東大・微生物連携)
- *P-46** マイクロ流体デバイスで示す外部環境に応じた糸状菌の伸長方向制御
山本里穂, 福田紗弓, 高谷直樹, 竹下典男 (筑波大学 微生物サステイナビリティ研究センター (MiCS))
- *P-47** 麹菌における核増加の分子機構
細田柊志¹, 安井瑞稀¹, 門岡千尋¹, 高谷直樹¹, 織田健², 竹下典男¹ (筑波大・生命環境系, ²酒総研)
- *P-48** 麹菌の同株どうしの対峙培養時における増殖抑制応答の解析
浜中祐弥¹, 齋藤直也¹, 片山琢也^{1,2}, 黒田裕樹³, 丸山潤一^{1,2} (東大院・農生科・応生工, ²東大・微生物連携機構, ³慶應大・環境情報)
- *P-49** 糸状菌 *Trichoderma reesei* の形態形成とセルラーゼ生産性の相関解析にむけた菌糸伸長制御マイクロ流体システムの開発
井谷綾花¹, 北原雪菜¹, 志田洋介¹, 大倉玲子², 若本祐一², 小笠原渉¹ (長岡技科大・生物, ²東大・総合)
- *P-50** 糸状菌における細胞外膜小胞産生能の普遍性
岩橋由佳¹, 浦山俊一^{2,3}, 梶尾俊介^{2,3}, 高谷直樹^{2,3}, 野村暢彦^{2,3}, 竹下典男^{2,3}, 豊福雅典^{2,3}, 萩原大祐^{2,3} (筑波大院・生命地球科学, ²筑波大・生命環境系, ³筑波大・MiCS)
- P-51** *Aspergillus fumigatus* の N-グリカンに存在する糖外鎖構造の生理的役割の解析
門岡千尋¹, 田中大², 岡拓二¹ (崇城大・生物生命, ²東北医薬大・薬)

- *P-52 MSUD 抑制株を用いた子嚢内における CDC10 の局在解析
辻健也, 北出雄生, 吉見啓, 田中千尋 (京大院農)
- *P-53 ゲノム比較解析を用いた *Bipolaris maydis* 表面疎水性変異株の原因遺伝子の同定
佐波雅史, 吉田裕史, 吉見啓, 田中千尋 (京大院・農)
- *P-54 麹菌 *Aspergillus oryzae* における推定新規選択的オートファジー関連タンパク質の解析
西尾譲一郎, 高橋慶晃, 武田陽一, 菊間隆志 (立命館大・生物工)
- P-55 *Aspergillus fumigatus* と *Aspergillus nidulans* の共培養による抗菌性ジフェニルエーテルの産生誘導
三宮章洋^{1,2}, 浦山俊一^{1,3}, 萩原大祐^{1,3} (1筑波大・生命環境, 2東大院・農, 3筑波大・MiCS)
- P-56 立体選択的[4+2]環化付加反応を触媒するデカリン合成酵素の阻害剤同定
加藤直樹^{1,2}, 藤山敬介³, 永野真吾³, 高橋俊二² (1摂南大・農, 2理研・CSRS, 3鳥取大院工)
- *P-57 麹菌における分化制御因子の改変による異種天然物生産の向上
原中実穂¹, 齋藤直也¹, 片山琢也^{1,2}, 南篤志³, 及川英秋³, 丸山潤一^{1,2} (1東大院・農生科・応生工, 2東大・微生物連携機構, 3北大院・理)
- *P-58 糸状菌 *Aspergillus terreus* におけるエルゴチオネイン生合成に関する研究
林大三¹, 浜田勇和¹, 村田紋奈¹, 柿崎徹也¹, 鈴木孝征^{1,3}, 金政真^{1,2} (1中部大院・応生, 2中部大・環生科, 3中部大・応生化)
- *P-59 糸状菌 *Aspergillus nidulans* のアミノ酸代謝を介した一酸化窒素ストレス応答
天久まどか¹, 鈴木康太¹, 塚越まどか¹, 門岡千尋², 榎尾俊介¹, 高谷直樹¹ (1筑波大・生命環境, 2崇城大・生物生命)
- P-60 進化型 *FgTriI* 遺伝子を導入した *Fusarium graminearum* の生産するトリコテセン類の解析
前田一行^{1,2}, 中嶋佑一³, 小泉慶明⁴, 安藤直子⁴, 木村真³, 大里修一¹ (1明治大・農, 2明治大・研究知財, 3名大院・生命農, 4東洋大院・理工)
- *P-61 ナシ黒斑病菌に混合感染する二種のマイコウイルスの性状解析
丸山洋平¹, 千葉悠斗², 浦山俊一², 萩原大祐², 福原敏行¹, 森山裕充¹ (1農工大・農, 2筑波大・生命環境)
- P-62 不適応型炭疽病菌のシロイヌナズナに対する非親和性の差異に着目した重層的植物免疫の解析
入枝泰樹¹, 高野義孝² (1信大・学術院農, 2京大・院農)

- P-63** 植物非病原性 *Penicillium* 属菌を対象とした Fludioxonil および Iprodione 耐性株の探索
老木紗予子¹, 矢口貴志², 浦山俊一^{1,3}, 萩原大祐^{1,3} (筑波大・生命環境系,²千葉大・MMRC,³筑波大・MiCS)
- *P-64** *Aspergillus fumigatus* と感染ウイルスの dual-genomics による進化的な関係性の解析
千葉悠斗¹, 高橋弘喜², 楠屋陽子², 渡辺哲², 浦山俊一^{1,3}, 萩原大祐^{1,2,3} (筑波大・生命環境系,²千葉大・真菌セ,³筑波大・MiCS)
- *P-65** 菌類ウイルスが宿主糸状菌に与える影響の解析
池田彩乃¹, 千葉悠斗¹, 浦山俊一^{2,4}, 萩原大祐^{2,3,4} (筑波大院・生命地球科学,²筑波大・生命環境系,³千葉大・MMRC,⁴筑波大・MiCS)
- *P-66** イネいもち病菌における超低濃度酢酸による代謝スイッチングと感染特異的細胞分化機構
佐藤大元¹, 黒木美沙², 荒添貴之¹, 鎌倉高志¹ (東理大院・理工,²筑波大・生命環境)

Transposons drive adaptation in a clonally evolving fungal pathogen

Antonio Di Pietro

Departamento de Genética, Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario ceiA3,
Universidad de Córdoba, Córdoba, Spain

The genomes of many fungal pathogens are compartmentalized into conserved core and dynamic lineage-specific (LS) regions, which are enriched in transposable elements (TEs). TEs are widely regarded as drivers of adaptive evolution, but direct experimental evidence remains limited. Here we used an evolve and re-sequence approach to follow environmental adaptation in *Fusarium oxysporum*, a fungal pathogen that attacks more than 150 crops and causes deadly infections in immunocompromised humans. Serial passaging of a clonal isolate through tomato plants or axenic media plates resulted in rapid adaptation and increased fitness under the selection condition. Independent plate-passaged populations displayed recurrent evolutionary trajectories of sequential loss-of-function mutations leading to increased proliferation at the cost of reduced virulence. TE insertion variations (TIVs) accounted for more than half of the detected genetic variation and localized preferentially to sites of histone H3 lysine 27 trimethylation, a hallmark of LS regions. A significant fraction of TIVs was caused by Hormin, a non-autonomous miniature element derived from the hAT-type TE Hornet. These results suggest that TEs are a major driving force of adaptive evolution in this clonally evolving fungal pathogen and reveal fitness trade-offs between developmental programs favoring proliferation versus invasion.

Cristina López Díaz¹, Dilay Hazal Ayhan^{2,3}, Ana Rodríguez López¹, Isabel Okeke Infante¹, Vista Sohrab², Li-Jun Ma^{2,3}, Antonio Di Pietro^{1*}

(¹Departamento de Genética, Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario ceiA3, Universidad de Córdoba, Córdoba, Spain, ²Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Massachusetts Amherst, Amherst MA, USA • ³Molecular and Cellular Biology Graduate Program, University of Massachusetts Amherst)

糸状菌のポストゲノム型天然物探索研究

浅井禎吾

(東北大学大学院薬学研究科)

多様な天然物の生産能は、糸状菌の魅力の一つである。ペニシリンをはじめ、数多くの糸状菌天然物が医薬品として利用されてきた歴史を考慮しても、もっとも重要かつ魅力的な医薬資源である。さらに、ゲノム解読が進むにつれ、糸状菌のゲノム上にはこれまでに発見された天然物をはるかに凌駕する生合成遺伝子が存在することが示され、糸状菌の遺伝子資源は、新しい天然物や新しい生合成酵素の魅力的な探索資源とみなされており、これらをいかに利用するかが天然物化学研究の一つの課題となっている。

我々は、糸状菌のゲノム上に存在する遺伝子資源を活用し、新しい天然物を発見することを目的として研究を進めている。これまでに、エピジェネティック酵素阻害剤や植物ホルモン添加など生物活性物質を用いる手法や、化学変異とハイグロマイシン B 耐性選抜による二次代謝活性化株の作製法など、休眠遺伝子を活性化する方法について研究し、新しい天然物の発見を報告してきた^{1,2}。加えて、ゲノムマイニングと麹菌異種発現を組み合わせた天然物探索研究を実践している^{3,4}。本講演では、糸状菌の遺伝子資源を利用した天然物化学研究に関して、休眠遺伝子の活性化とゲノムマイニングと異種発現を基盤とする合成生物学的手法の2つのアプローチについて、最新の成果を踏まえて概説する。

引用文献

- 1: Asai, T.,* Taniguchi, T., Yamamoto, T., Monde, K., Oshima Y.* *Org. Lett.* 15, 4320 (2013).
- 2: Tsukada, K., Shinki, S., Kaneko, A., Murakami, K., Irie, K., Murai, M., Miyoshi, H., Dan, S., Kawaji, K., Hayashi, H., Kodama, E. N., Hori, A., Salim, E., Kuraishi, T., Hirata, N., Kanda, Y., Asai, T.* *Nature Commun.* 11, Article number: 1830 (2020).
- 3: Morishita, Y., Aoki, Y., Ito, M., Hagiwara, D., Torimaru, K., Morita, D., Kuroda, T., Fukano, H., Hoshino, Y., Suzuki, M., Taniguchi, T., Mori, Keiji., Asai, T.* *Org. Lett.* 22, 5876 (2020).

Post-genomic natural product discovery from filamentous fungi

Teigo Asai

(Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University)

ご略歴

- 2005年 3月 東京工業大学 理学部 化学科 卒業
- 2007年 3月 東京工業大学 大学院理工学研究科 物質科学専攻 修士課程 修了
- 2009年 7月 東北大学 大学院薬学研究科 助手
- 2011年 3月 博士 (理学) 東京工業大学 大学院理工学研究科 物質科学専攻
- 2011年 4月 東北大学 大学院薬学研究科 助教
- 2016年 3月 東京大学 大学院総合文化研究科 准教授 (PI)
- 2019年 10月 東北大学 大学院薬学研究科 教授 (PI)

植物共生糸状菌が秘める病原性の覚醒

晝間敬

(東京大学大学院総合文化研究科)

植物と相互作用する共生糸状菌は貧栄養環境で植物に栄養を供給するなど植物の生存に欠かせない役割を担っている。シロイヌナズナなどのアブラナ科植物には菌根菌などの共生糸状菌が感染しないことが知られており、重要なパートナーを欠いたアブラナ科植物がどのように様々な環境に適応してきたかについては不明であった。私たちが発見した糸状菌 *Colletotrichum tofieldiae* (Ct) は、シロイヌナズナなどのアブラナ科植物に貧栄養環境でリンを供給し植物成長を促す共生菌である。興味深いことに、近縁の病原型 *Colletotrichum* 属菌との比較ゲノム解析により、この共生糸状菌 Ct のゲノムの中にも病原性関連遺伝子群が眠っていることが明らかになっている。今回、それらの中で二次代謝物であるセスキテルペンの合成酵素遺伝子群が特定の環境で活性化すると共生菌 Ct が病原性を発揮し植物の成長を著しく阻害してしまうことを見いだした。さらには、これらの病原性因子が系統的に離れた植物感染糸状菌のゲノムでしばしば発見されたことから、多様な植物感染糸状菌が本因子群を病原性発揮時に活用している可能性が示唆された。以上から、Ct のような共生糸状菌の有効活用のためには、共生菌による植物成長促進機構を解明することに加え、共生糸状菌も潜在的に有する病原性の制御機構も同時に明らかにしていく必要があると考えている。本シンポジウムでは、以上の考えのもとになる私たちの研究話題を紹介したい。

引用文献

- 1: Hiruma et al., Cell 2016 doi:10.1016/j.cell.2016.02.028.
- 2: Hacquard et al., Nat Commun 2016 doi: 10.1038/ncomms11362.
- 3: Hiruma et al., Curr Opin Plant Biol. 2018 doi: 10.1016/j.pbi.2018.04.009.

Pathogenesis awakening in a plant-associated beneficial fungus

Kei Hiruma

(Dept. Arts and Sciences, Multi-Disciplinary Sciences, Univ. of Tokyo)

ご略歴

2007年 京都大学農学部資源生物科学科 卒業

2009年 京都大学大学院農学研究科応用生物科学専攻修士課程 修了

2012年 京都大学大学院農学研究科応用生物科学専攻博士課程 修了 博士 (農学)

2012-2014年 日本学術振興会海外特別研究員

(ドイツ, マックスプランク植物育種学研究所, Paul Schulze-Lefert グループ)

2014-2020年 10月 奈良先端科学技術大学院大学 助教

2016-2020年 JST さきがけ研究員 (兼任)

2020年 11月-現在 東京大学総合文化研究科 准教授

糸状菌環境インターフェイス研究

吉見啓

(京都大学大学院農学研究科 糸状菌・環境インターフェイス工学講座)

糸状菌は、菌糸を発達させ固体基質へ効率よく侵入する。糸状菌による固体攻略は、まず菌と固体との接触から始まる。それ故、この糸状菌と環境のインターフェイスで展開される生物反応こそが、糸状菌たる生き様を決定づける基本原理と言える。本寄附講座では、糸状菌による外界（特に固体基質）の認識と侵襲の基本メカニズム解明を切り口として、多様な生態を持つ「糸状菌」という生き様の基本原理を詳らかにし、革新的な応用技術に繋がる学術研究を展開する。本講演では、講座開設からこれまでの約2年間で進めてきた、糸状菌の固体接着に関わる物質の探索・評価について、現状の成果と展望を紹介する。

菌糸表面疎水性に関わる因子の探索

糸状菌の菌糸表面における疎水性は、基質への接着や吸着に関わる重要な要素である。糸状菌類では、分泌タンパク質であるヒドロフォビン (HFBs) が菌糸表面の疎水性に寄与する例が多く知られている。そこで、まずトウモロコシごま葉枯病菌 (*Bipolaris maydis*) における4つの推定 HFBs (Hyp1~Hyp4) の機能に焦点を当て、それぞれの単独欠失株を造成、表現型を解析した。その結果、いずれの菌株も菌糸の濡れ性・病原性において、野生型株との顕著な差を示さなかった¹。一方、*B. maydis* において、表面疎水性に異常を示す変異体 (DO2N20-86 株および R2-4-8a-wet 株) が、自然発生的あるいは変異原処理により得られていた。これらの菌株について、変異遺伝子を同定するため、ゲノムシーケンスと子孫株を用いた連鎖解析を行なった。その結果、DO2N20-86 株については、NRPS4 (non-ribosomal peptide synthetase 4) 遺伝子上の多型が表面疎水性に寄与していることが判明した。NRPS4 欠失株は表面疎水性を失うことが数種の菌で報告されており²、本菌の菌糸疎水性は NRPS4 を介して付与されることが示唆された。現在、R2-4-8a-wet 株についても、変異遺伝子の同定を進めている。

基質特異的に発現する低分子量分泌タンパク質 (SSPs) の探索

糸状菌は固体基質を攻略する際、基質分解酵素とともに、低分子量分泌タンパク質 (small secreted proteins; SSPs) を多数分泌する。例えば、麴菌は生分解性ポリエステル分解の際、HFB (RolA) を分泌し、基質分解酵素をリクルートして分解を促進する³。一方、RolA に見られる酵素リクルート能に類似した機能が、他の SSPs と基質分解酵素においても成立するか否かは不明である。そこで、麴菌や *B. maydis*、ヒラタケ (*Pleurotus ostreatus*) を供試し、基質特異的に分泌される SSPs を探索、その機能 (酵素リクルート能の有無、その普遍性・多様性) を検証しようと考えた。現状では、麴菌においてキシラン特異的に分泌される SSPs として、HFBs (RolA および HypB) 、新規 SSP (SspA) を見出しており⁴、それらのさらなる機能解析を進めている。

細胞表層多糖の機能解析

糸状菌の固体攻略において、細胞表層多糖 (細胞壁多糖や分泌多糖) の特性は極めて重要だと考えられる。そこで、*B. maydis* において、主に多糖より構成される細胞外マトリク

ス (ECM) を欠損した菌株を探索した。その結果, *B. maydis* のランダム突然変異株から, 墨汁染色性の異なる ECM 不全株を獲得した。現在, 連鎖解析とゲノムシーケンスにより変異遺伝子の同定を進めるとともに, 分泌多糖の比較解析に取り組んでいる。一方, 担子菌ヒラタケ *P. ostreatus* において, α -1,3-グルカンの合成に関わる *Ags1* を同定し解析を進めている。*Aspergillus* 属では, α -1,3-グルカン欠損時は液体培養で菌糸分散性を示すが, ヒラタケでは菌糸分散性は見られなかった。このように, 担子菌と子囊菌では細胞表層構造が異なることが示唆され, その違いを明らかにすべく現在研究を進行中である。

次の時代へ向けて

本寄附講座では, 糸状菌と基質・環境との界面の科学に総合的に挑むことにより, 革新的な物質生産の為にバイオプロセス開発を加速させる研究展開を目指している。例えば, リグノセルロース糖化発酵のボトルネックを解消させ, 極めて効率的なバイオリファインリー技術へと発展させるなど, 人類的な重要問題の解決につながるバイオ産業の新展開に繋げていきたいと考えている。

引用文献

- 1: 吉田ら, R2年度 日本植物病理学会関西西部会講演要旨
- 2: Turgeon et al., *Mycol. Res.* 112: 200-206, 2008
- 3: Takahashi et al., *Mol. Microbiol.* 57: 1780-96, 2005
- 4: 寺内ら, R3年度 日本菌学会講演要旨

Study on the environmental interface of filamentous fungi

Akira Yoshimi

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

ご略歴

- 1999年 滋賀県立大学環境科学部卒業
- 2001年 京都大学大学院農学研究科修士課程 (地域環境科学専攻) 修了
- 2006年 京都大学大学院農学研究科博士課程 (地域環境科学専攻) 修了 (農学博士)
- 2006年 東北大学未来科学技術共同研究センター 産学官連携研究員
- 2010年 株式会社ファームラボ 技術部研究員
- 2013年 東北大学未来科学技術共同研究センター 助教
- 2017年 東北大学未来科学技術共同研究センター 准教授
- 2019年 京都大学大学院農学研究科 特定准教授

生態システム理解を目指した糸状菌相互作用研究

萩原大祐

(筑波大学生命環境系/微生物サステナビリティ研究センター
糸状菌相互応答学講座)

1. はじめに

生物の生理学的な理解は、その構成因子である遺伝子、タンパク質、化合物、およびそれらの集積であるオミクス解析により牽引され、飛躍的に進展した。糸状菌研究においても、2003年のアカパンカビのゲノム情報公開を端緒にポストゲノム研究が展開され、様々な基盤的で有用な知見がもたらされた。2010年代には、ゲノム解読技術が劇的に向上し、今では2000株以上の真菌ゲノム情報が、公共データベースから利用可能になっている⁽¹⁾。ゲノム研究の加速は、特定の菌種内における多様性の理解レベルを深め、発酵特性や病原性など、糸状菌に関わる産業や農業、医療の発展に大きく貢献している。一方で、それらの理解の先にある、あるいは純粋な知的好奇心から生まれてくる、自然界における微生物コミュニティ（社会）がどのような生物で構成され、どのように関わり合い、どう制御することができるのかという、より根源的な問いにも向き合う状況が整ったと言える。ゲノム解析に象徴される「個の微生物学」から、自然環境での振る舞い（社会行動）を分子レベルで理解する「微生物（分子）生態学」へと、研究の解像度を落とすことなく展開していくことが、これからの糸状菌分子生物学研究のフロンティアではないかと考えている。

このような研究の展開を目指す上で、橋渡しになると考えるのが、生物間相互作用研究である。複雑な生態系を生物同士の繋がりに分解し、単純化した形で理解していく。とは言え、植物や動物に病原菌が感染する相互作用は、精力的に研究が進められている。私たちが着目するのは、いわば名も無き相互作用であり、そこに新たな価値や原理を見出し、高次な生態系システムの理解に繋がることを期待している。このような未解析の相互作用を実験室で効率的に解析するために、複数の微生物を相互作用させる共培養法や、一部の生態系を切り出し制御するマイクロコズム培養法を活用する。本シンポジウムでは、発酵研究所寄附講座として、開設以来進めてきた相互作用研究の一端を紹介する。

2. 共培養による糸状菌二次代謝生産誘導

糸状菌は天然物の重要な供給源である。糸状菌のゲノムには、これまでに見出された糸状菌由来代謝物の数をはるかに凌ぐ二次代謝物生合成遺伝子が備わっており、未利用の代謝物が数多く存在すると予想されている。共培養法は、これらの休眠二次代謝物を簡便に探索する戦略の一つとして利用価値が高い。私たちのグループでは、モデルケースとして、複数の *Aspergillus* 属菌を共培養し、生産誘導する化合物を探索したところ、*A. niger* が生産する黄色色素や、*A. nidulans* が生産するジフェニルエーテル類が見つかった。いずれの化合物についても、その生合成遺伝子クラスターを明らかにし、遺伝子発現レベルで応答制御されていることを確認した。色素生合成遺伝子クラスターは、*A. niger* の近縁種の他に、*Penicillium* 属菌も保持しており、応答機構がどの程度保存されているのか興味深い。

共培養系では菌糸同士の物理的な相互作用に着目しているが、内的な相互作用についても解析を進めている。すなわち、糸状菌に感染するマイコウイルスによる、宿主の二次代謝に及ぼす影響についてである。これまでに、Totivirus の感染が、イネいもち病菌のテヌ

アズン酸の産生誘導を引き起こすことを見出しており⁽²⁾、現在はその対象を広げ、化合物代謝プロファイルがマイコウイルスにより変動するケースを、大規模に探索している。

3. 化学的な生物間相互作用

抗生物質に代表される天然の生物活性物質は、化学的な相互作用を通じて、生態系の生物構成に大きく寄与すると考えられている。そこで、抗菌性天然化合物に対する糸状菌の応答や、糸状菌が生産する抗菌化合物が及ぼす生態系への影響に着目した研究を進めている。

一般的に植物は、揮発性有機化合物類など多様な抗菌物質を産生しており、精油成分にも多くの抗菌化合物が含まれる。その代表としてファルネソールは、ポストハーベスト予防薬や新たな天然抗菌剤としての利用が見込まれている。糸状菌細胞のファルネソール応答は複数の菌種で調べられているが、詳細な分子機構は不明なままである。私たちのグループでは、*A. oryzae* の転写因子破壊株ライブラリーによる探索から、薬剤応答の機能で知られる AtrR がヒットし、その制御下にある ABC トランスポーターが、ファルネソール応答に寄与することを見出した。また *Penicillium* 属菌を対象に、ファルネソールなどの天然抗菌剤処理に応答して、産生誘導される糸状菌二次代謝物を探索した。現在までに、複数の化合物が誘導される結果を得ている。

4. 微生物群集によるバイオマス分解

糸状菌は優れたバイオマス分解能を示し、地球上の物質循環に不可欠な存在である。自然環境中で分解されるバイオマスは、多種多様な菌が混在する複合的な環境となり、微生物の社会行動を研究する上で興味深い対象となる。分解の過程で、複数の分解菌の間でどのような相互作用（分担、競合、共存、共創など）が存在するかを明らかにし、分子レベルでの理解を目指している。

現在、稲もみ殻を培養基質としたマイクロコズム培養を進めている。もみ殻に付随している土着の微生物コミュニティに対して、外部から *Trichoderma reesei* を導入（植菌）してインキュベートすると、バイオマス分解が促進される。しかしコミュニティ内において、*T. reesei* が占める割合は低く (<5%) 推移し、バイオマス分解に関連する遺伝子群の発現は強く抑制されていた。一方で、真菌叢解析から *Chaetomiaceae* 科が優占していること、メタトランスクリプトーム解析から、それらの菌が主に分解酵素群を生産していることなどが示唆された。従って、微生物群集内で共存する菌同士でも、分解機構が抑制または誘導と、異なる状態にあることが具体的に見えてきた。何がその機能の発現を決定するのか、菌間で順位があるのかなど、今後は分子的な解析を進めていく。

5. まとめ

生物を理解する上で、ゲノムは設計図であると言われてきた。糸状菌研究者が 20 年近く前に手に入れたこの宝の地図が、研究の視界を大きく広げ、糸状菌分子生物学の発展に貢献した。今日の生態システム理解を目指した研究の場合、遺伝子の集積であればメタゲノム、生物の集まりと捉えれば群集構造が、設計図に該当する。すでにこれらの大掛かりな地図は手元にあり、再びフロンティアが眼前に広がっている。この新たなフィールドを切り拓く上で、糸状菌相互作用研究が大きな足がかりとなり、行く道を示してくれると考えている。

引用文献

1: Mycocosm HP (<https://mycocosm.jgi.doe.gov/mycocosm/home/releases?flt=>)

2: Ninomiya et al., *Front. Microbiol.*, 11:1641 (2020)

Road to understanding of ecosystem through fungal interaction researches

Daisuke Hagiwara

(MiCS, Univ. of Tsukuba)

ご略歴

2000年 早稲田大学 理工学部 卒業

2006年 名古屋大学大学院 生命農学研究科 修了 博士（農学）

2007年 東北大学 未来科学技術共同研究センター 学振特別研究員 PD

2010年 中央大学 理工学部 機構助教・株式会社デンソー NEDO 博士研究員

2011年 千葉大学 真菌医学研究センター 特任助教

2017年 筑波大学 生命環境系 准教授

麹菌研究と糸状菌分子生物学の 20 年とこれから

丸山潤一

(東京大学大学院農学生命科学研究科 醸造微生物学(キッコーマン)寄付講座,
東京大学微生物科学イノベーション連携研究機構)

糸状菌分子生物学研究会が創立されてコンファレンスが始まった 2001 年, 演者は麹菌を研究するポスドクとして歩み始めた。それからの 20 年間に様々な解析技術が目覚ましく進歩し, 研究へのアプローチが変わり続けている。糸状菌研究が発展するにつれて一般からの注目や研究環境も変わり, そのなかで演者は寄付講座を担当するまでになった。本講演では演者の麹菌研究の新たな展開を紹介しつつ, 糸状菌研究者として次の時代に向けた期待を述べたい。

多細胞生物としての麹菌の生物学研究

演者は 20 年前に麹菌における GFP を利用した細胞生物学解析を進めるなかで, 糸状菌が多細胞であることに着目し, 隣接する細胞が隔壁孔を介して連絡する細胞間連絡を研究テーマとした。しかし当時は, 糸状菌特異的なオルガネラ Woronin body を中心としたアカパンカビの研究の知見を利用したものであった。近年の各種微生物のゲノム情報の蓄積を背景に, 単細胞の酵母に代わり多細胞の糸状菌に存在する遺伝子の比較ゲノム探索により, 隔壁形成の新規制御因子を同定した¹。これを発展させて糸状菌特異的な機能未知タンパク質の網羅的局在スクリーニングをもとに, 細胞間連絡の制御因子を多数発見した²。

糸状菌特異的な細胞融合メカニズムの解明

有性世代が発見されていない麹菌において有性生殖を見いだすための研究を進めるなかで, 麹菌が細胞融合を行う能力を約 60 年ぶりに再発見した³。そして, 糸状菌の細胞融合の研究についてもアカパンカビの研究が牽引していた。演者は 10 年ほど前にドイツで行ったプロテオーム解析から, 細胞融合に必要な MAP キナーゼと相互作用するタンパク質を同定した。当時は機能未知であり解析は困難を極めたが, 偶然に名古屋大学の竹本大吾博士が牧草共生糸状菌 *Epichloë festucae* から発見していた細胞融合制御因子 NsiA⁴ と同一であることがわかり, これをきっかけに糸状菌特有の細胞融合の制御機構を明らかにした⁵。

ゲノム編集による麹菌研究の新たな発展

ゲノム編集のなかでも CRISPR/Cas9 は, 幅広い生物種で安価で効率的な遺伝子改変を可能にする技術をもたらした。演者らは麹菌においてゲノム編集を導入することで, 日本酒・醤油・味噌など多様な製造用途の実用株の遺伝的性質の解析を効率化した⁶。例として, 麹菌株間で細胞融合に伴う不和合性があることを見いだしていたが³, ゲノム編集を利用して多数の麹菌株を対象に解析した結果, 不和合性が異なる株系統で起こる傾向があることを明らかにした⁷。

さらに, 演者らがゲノム編集をもとに開発した効率的な多重遺伝子改変技術⁶は, 麹菌の新たな用途である異種天然物生産に効果的であることが示され^{8,9,10}, 実用株を含めた麹菌の産業的育種に威力を発揮することが期待される。

おわりに

糸状菌研究において 20 年前には使用していた GFP がいまや手軽な研究ツールとなった一方、その間にゲノム・プロテオーム・次世代シーケンサーと続くバイオインフォマティクスが台頭し発展してきた。近年のゲノム編集の出現は、ゲノム情報と一体となる遺伝子機能研究やそれにもとづいた機能開発の可能性を広げることになった。今後さらに現れる解析技術とともに、麹菌に限らず多様な糸状菌における糸状菌分子生物学の次の時代の発展がもたらされることを期待したい。

引用文献

- 1: Mamun *et al.* (2020) *Mol. Microbiol.* 113, 964–982.
- 2: Mamun ら, 2020年度日本農芸化学会大会, 3A12p15.
- 3: Okabe *et al.* (2018) *Sci. Rep.* 8, 2922.
- 4: Tanaka *et al.* (2020) *Mol. Microbiol.* 114, 626–640.
- 5: Katayama *et al.* (2021) *Mol. Microbiol.* 115, 723–738.
- 6: Katayama *et al.* (2019) *Appl. Environ. Microbiol.* 85, e01896-18.
- 7: Lu ら, 2021年度日本農芸化学会大会, 4C03-04.
- 8: Nagamine *et al.* (2019) *Appl. Environ. Microbiol.* 85, e00409-19.
- 9: Liu *et al.* (2019) *J. Am. Chem. Soc.* 141, 15519-15523.
- 10: 齋藤ら, 2021 年度日本農芸化学会大会, 2B04-03.

Koji-mold research in the past 20 years and future with Fungal Molecular Biology

Jun-ichi Maruyama

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

ご略歴

- 1996 年 東京大学農学部農芸化学科 卒業
- 2001 年 東京大学大学院農学生命科学研究科 農学博士取得
- 2001 年 東京大学大学院農学生命科学研究科 研究員
- 2001 年 東京大学大学院農学生命科学研究科 助教
- この間, 2010 年 Georg-August-Universität Göttingen (ドイツ) 客員研究員
- 2016 年 東京大学大学院農学生命科学研究科 特任准教授
- 2021 年 東京大学大学院農学生命科学研究科 特任教授

O-1 (P-29)

ゲノム編集技術を利用した大規模欠損による麹菌に特徴的な染色体領域の機能解析

知見悠太¹, 山口勝司², 齋藤直也¹, 片山琢也^{1,3}, 重信秀治², 丸山潤一^{1,3} (東大院・農生科・応生工,
²基生研, ³東大・CRIIM)

麹菌 *Aspergillus oryzae* は日本の醸造微生物であり、高い酵素活性を示すなどの特性を有し、日本酒・醤油・味噌などの用途に応じて多様な実用株が存在する。近年、次世代シーケンサーを利用して多数の *A. oryzae* 実用株のゲノム配列が報告されてきているなか、染色体レベルの大規模な領域の違いについて十分な比較はなされていない。本研究では、*A. oryzae* の株ごとのゲノム情報比較から特徴的な染色体領域を探索、ゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 システムを利用して大規模欠損による機能解析を行った。

ロングリードシーケンスにより得られた *A. oryzae* 株の染色体構造を比較した結果、株間で異なる染色体に位置する約 120 kb の領域を見いだした。また、これと相同性を示す染色体領域について、*A. oryzae* および醤油麹菌 *Aspergillus sojae* の多くの株が有するのに対し、それぞれの祖先とされる *Aspergillus flavus* および *Aspergillus parasiticus* の株の大部分には存在しないことがわかった。以上の結果から、見いだした特徴的な染色体領域が日本の醸造微生物としての特性に関係する可能性が考えられた。そこで、特徴的な染色体領域の機能を調べるため大規模欠損を行った。染色体構造レベルの改変にはゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 システムを用いることで、長さが 100 kb を超える領域の大規模欠損に成功した。現在、取得した大規模欠損株において酵素生産能などの醸造特性に関する影響を解析している。

Functional analysis of a chromosomal region mainly found in *Aspergillus oryzae* strains by genome editing

Yuta Chiken¹, Katsushi Yamaguchi², Naoya Saito¹, Takuya Katayama^{1,3}, Shuji Shigenobu², Jun-ichi Maruyama^{1,3}

(¹Dept of Biotechnol, The University of Tokyo, ²NIBB, ³CRIIM, UTokyo)

O-2 (P-25)

麹菌そのもの、および麹菌含有食品のプレバイオティクス効果について

野村亮¹, 都築翔¹, 児島孝明², 志水元亨¹, 加藤雅士¹ (名城大院・農, ²名大院・生命農学)

【緒言】麹菌は、清酒、醤油、味噌、甘酒、塩麹の製造など、我が国の発酵・醸造産業にとって不可欠の存在である。麹菌が生産する種々の酵素や代謝産物は、これらの発酵食品に味や香りを付与するだけでなく、それらの摂取を通じて我々ヒトに様々な健康効果をもたらすことが明らかになってきている。しかしながら、麹菌そのものの摂取が宿主にどのような影響を及ぼすのかは、ほとんど解明されていない。本研究では、麹菌そのもの、および麹菌を含有した食品の摂取が宿主の腸内環境に及ぼす影響について検討した。

【方法・結果】麹菌の摂取が腸内細菌叢にどのような影響を及ぼすかを明らかにするために、生きた麹菌の孢子および加熱滅菌した麹菌の孢子 5.0×10^4 個をそれぞれマウスに 14 日間毎日経口投与した。メタゲノム解析の結果、麹菌の生死に係らず、麹菌の孢子を摂取することで Firmicutes 門 (Erysipelotrichaceae 科) の細菌の割合が減少し、Actinobacteria 門 (Bifidobacterium 属) の細菌の割合が 2 倍増加した。これまでに、Erysipelotrichaceae 科細菌の増加が腸炎を引き起こし、Bifidobacterium 属細菌が生産する短鎖脂肪酸が大腸炎を緩和すると報告されている。そこで次に、麹菌の摂取が大腸炎を緩和するかを検討した。デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) を用いて人為的に大腸炎を誘発させたマウスに、生きた麹菌の孢子および加熱滅菌した麹菌の孢子 (5.0×10^4 個; 0.13 mg) を 19 日間毎日投与したところ、それらを投与しないマウス (コントロール) と比較して大腸炎による大腸の萎縮や組織の損傷が改善された。また、麹菌孢子から調製した細胞壁画分 (0.10 mg) を投与することでも同様に大腸炎が緩和された。さらに、麹菌を含有する食品 0.4% を含む餌を大腸炎マウスに摂取させたところ、同様に大腸炎が緩和された。以上の結果から、麹菌とその細胞壁画分、ならびに麹菌を含有した食品がプレバイオティクスとして利用できることが示された。

Prebiotic effect of *Aspergillus oryzae* and fermented foods containing *A. oryzae*

Ryo Nomura¹, Sho Tsuzuki¹, Takaaki Kojima², Motoyuki Shimizu¹, Masashi Kato¹

(¹ Grad. Sch. Agric., Meijo Univ., ² Grad. Sch. Bioagric., Sci., Nagoya Univ.)

O-3 (P-53)

ゲノム比較解析を用いた *Bipolaris maydis* 表面疎水性変異株の原因遺伝子の同定

佐波雅史, 吉田裕史, 吉見啓, 田中千尋 (京大院・農)

多くの糸状菌で菌糸の表面疎水性に関与する物質として hydrophobin が知られており, 気中菌糸の形成や菌糸と疎水面との接着を媒介する役割を担うと考えられている。しかし, トウモロコシごま葉枯病菌 *Bipolaris maydis* においては, hydrophobin の欠失が表面疎水性に影響する事例は見出されておらず, 本菌が疎水性を帯びるメカニズムは不明な点が多い。これまでに当研究室では, 表面疎水性を欠いた (wetable 型) 変異体である DO2N20-86 株 (以下, 86 株) および R2-4-8a-wet 株 (以下, R2 株) が得られている。本研究ではこれらの株の疎水性要因を遺伝学的に解析することを目的とした。まず, 野生株との交配試験を行い子孫の分離比を調べたところ, 両株とも wettable 型と野生型で 1 対 1 に分離したことから, どちらの株も 1 遺伝子が変異したことで表面疎水性が失われたことが示唆された。続いて, 両株子孫の wettable 型株 2 株, 野生型株 1 株をシーケンスし得られた配列とリファレンスゲノムとの比較を行い, それぞれの株に見出された特異的な多型の中から ORF 上の多型を抽出した。さらに, 86 株と野生株の交配による子孫株を用いて, 抽出した多型と wettable 型の間での連鎖解析を行った。その結果, NRPS4 (nonribosomal peptide synthetase 4) 上の多型が wettable 型と連鎖していることが判明した。NRPS4 を欠失した株は表面疎水性を失うことが本菌を含む数種の菌で報告されている。一方, R2 株については NRPS4 上に多型が見出されなかったため, 86 株とは異なる未知因子が原因で疎水性が失われたと考えられる。現在, R2 株と野生株の交配による子孫株を用いて連鎖解析を行うことで, 表面疎水性変異の原因遺伝子の同定を進めている。

Identification of causal genes which are involved in hydrophobicity in *Bipolaris maydis* by whole genome comparison

Masafumi Saba, Hiroshi Yoshida, Akira Yoshimi, Chihiro Tanaka

(Grad. School of Agriculture, Kyoto Univ.)

O-4 (P-49)

糸状菌 *Trichoderma reesei* の形態形成とセルラーゼ生産性の相関解析にむけた菌糸伸長制御マイクロ流体システムの開発

井谷綾花¹, 北原雪菜¹, 志田洋介¹, 大倉玲子², 若本祐一², 小笠原渉¹ (¹長岡技科大・生物, ²東大・総合)

糸状菌 *Trichoderma reesei* は微生物で最大の酵素分泌量を誇る微生物として古くから研究されている。長年, 酵素生産と形態に何らかの関連があることが示唆されていたが, 広範にわたる分岐など糸状菌特有の形態により, 相関関係を調査することは困難であった。本研究では, *T. reesei* の菌糸形態と酵素生産との相関性を明らかにするため, 観察流路入り口に設置した狭窄構造に胞子をトラップすることにより, 流路へ伸びる単一の菌糸の伸長観察を可能とする PDMS マイクロ流体デバイスを作製した。これにより異なる培養基質での菌糸伸長の挙動の違いや, 培養基質切り替え時の菌糸動体などを定量的に表すことが可能となった。さらに, マイクロ流体デバイス内での酵素生産を検出するため, 4-MUC (4-Methylumbelliferyl-beta-D-cellobioside) を用いたセルラーゼ検出方法を考案した。これらを組み合わせることで, 菌糸伸長と酵素生産の挙動を同時に観察することが可能となった。今後は, 開発したマイクロ流体デバイスおよび 4-MUC を用いたセルラーゼ検出系を用いて酵素生産性に関連する菌糸形態の更なる調査を行う。

この成果は, 国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) の助成事業 (JPNP19001) の結果得られたものです。

Development of a microfluidic system to control mycelial elongation for the correlation between morphogenesis and cellulase productivity in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*

Ayaka Itani¹, Yukina Kitahara¹, Yosuke Shida¹, Reiko Okura², Yuichi Wakamoto², Wataru Ogasawara¹

(¹Nagaoka Univ. of Technology, ²The Univ. of Tokyo, Art and Science)

O-5 (P-41)

マイコウイルスが *Aspergillus flavus* の表現型に与える影響の普遍性を解明する

黒木美沙¹, 浦山俊一^{1,2}, 矢口貴志³, 萩原大祐^{1,2} (¹筑波大・生命環境, ²筑波大・MiCS, ³千葉大真菌)

環境中から単離された糸状菌には一定の割合でマイコウイルスが感染している。そのほとんどは不顕性だと考えられてきたが、近年、マイコウイルスの感染により宿主の培養性状や遺伝子発現が変化するという報告が増えている。これらの報告は、特定の宿主-ウイルスの間で観察されたもので、宿主に対するウイルスの普遍的な影響であるか判別できない。ウイルスの宿主への影響の理解が深まれば、ウイルスにより糸状菌のもつ特性を人為的に増幅・抑制することが可能となり、糸状菌の活用範囲は今以上に広がると考えられる。そこで本研究では、*Aspergillus flavus* を研究対象とし、多様なウイルス種の探索と、それらの宿主に対する影響を網羅的に解析し並列に評価することで、ウイルス機能の体系的な理解を目指す。

アスペルギルス症患者や土壌などから単離された 72 株の *A. flavus* 野生株のうち 7 株でマイコウイルスの感染を確認した。検出されたウイルス種は 6 種で、7 株の *A. flavus* のうち 3 株には共通のウイルス種が感染していた。ウイルス保持株からウイルスを除去したウイルスフリー株をそれぞれ作出し、生育速度、菌糸形態、形成胞子数、胞子形態、共培養での抗菌活性、代謝化合物などの表現型を観察した。一部の株では、ウイルス感染により生育速度や形成胞子数が変化することがわかった。また、ほとんどの株で代謝化合物の変化が見られ、特にアフラトキシンやシクロピアゾン酸などの重要なカビ毒の生産量に大きな変化が見られる株もあった。複数の *A. flavus* 菌株-ウイルス種セットで比較すると、変化のあった化合物種は株により異なっており、その株やウイルス種により表現型への影響が大きく異なることがわかった。今後は、表現型に変化の見られた条件で RNA-seq を行い、ウイルス感染株と非感染株での比較を行うとともに、自然宿主ではない菌株へのウイルスの導入を検討していく予定である。

Exploring mycovirus's general effect on phenotype of *Aspergillus flavus*.

Misa Kuroki¹, Shun-ichi Urayama^{1,2}, Takashi Yaguchi³, Daisuke Hagiwara^{1,2}

(¹Fac. of Life and Env. Sci., Univ. of Tsukuba, ²MiCS, Univ. of Tsukuba, ³MMRC, Chiba Univ.)

O-6 (P-46)

マイクロ流体デバイスで示す外部環境に応じた糸状菌の伸長方向制御

山本里穂, 福田紗弓, 高谷直樹, 竹下典男 (筑波大学 微生物サステイナビリティ研究センター (MiCS))

糸状菌は菌糸と呼ばれる管状の細胞の先端を伸ばして生長し、先端生長と分岐によりネットワーク状の菌糸体を形成します。生長の際、多くの酵素を細胞外に分泌して有機物を分解し、栄養を吸収します。糸状菌はより良い環境を探すため、外部シグナルを感知して菌糸の生長速度や方向、分岐を制御する「屈性」を示すと考えられていますが、その機構はほとんど明らかになっていません。

本研究では菌糸の栄養源に対する屈性を細胞レベルで調べるために目的に合わせたマイクロ流体デバイスを構築し、液体培地を流した流路内で糸状菌を培養しながら、顕微鏡で菌糸生長の観察を行いました。デバイスの 2 つの入り口から出口に向かって異なる溶液を適当な速さで流すと、溶液が合流した流路では 2 つの溶液が混ざることなく、2 層に分かれます。このうち、一方の培養液は炭素源、窒素源などを含み、他方は含まないように設定して菌糸を生育させ、その伸長速度、方向変化、分岐を測定しました。

ライブイメージングの結果、*Aspergillus nidulans* の菌糸が培地中に含まれる栄養源や特定の pH に対してその方向に向かう屈性を示すことを初めて明らかにしました。菌糸はグルコースやリン酸、ミネラルに対して正の屈性を示し、一方で硝酸イオンやアンモニウムイオンに対しては、それを避けるように生長する負の屈性を示しました。さらに低 pH に対して顕著な屈性を示すことが明らかとなり、形質膜上にあるプロトンポンプをコードする *pmaA* のノックダウン株ではその屈性が見られなくなりました。植物病原糸状菌である *Fusarium oxysporum* でも同様に解析を行ったところ、屈性が見られるものの、*A. nidulans* と異なる応答を示しました。糸状菌の屈性の理解と制御は、菌糸状の生長様式と密接に関連するバイオ産業や医学、農業分野への貢献が期待されます。

Analysis of hyphal chemotropism using microfluidic devices

Riho Yamamoto, Sayumi Fukuda, Naoki Takaya, Norio Takeshita

(Tsukuba Univ. MiCS)

O-7 (P-45)

生体膜不飽和度が *Aspergillus nidulans* の生育に及ぼす影響

岩間亮^{1,2}, 堀内裕之^{1,2} (¹東大院・農生科・応生工, ²東大・微生物連携)

生体膜は細胞を外界と区画化する主要な構成要素の一つであり, その大部分はリン脂質二重層が占めている。リン脂質の構造は極性頭部と疎水性尾部に大きく分けられるが, 尾部は多様な脂肪酸から構成されている。これら脂肪酸鎖の不飽和度は, 生体膜の重要な物性の一つである膜流動性に関わるなど, 厳密に制御される必要がある。モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* のゲノムには, Δ^9 デサチュラーゼをコードする *sdeA* (AN6731), *sdeB* (AN4135), Δ^{12} デサチュラーゼをコードする *odeA* (AN1037), *odeB* (AN7204) が存在し, *sdeA* 破壊株や *odeA* 破壊株は生育が遅延し, 分生子形成数が低下することが知られている (1, 2)。しかしながら, これらの表現型がどのようにして生じるのかについては解明されていない。

糸状菌の分生子発芽や生育への生体膜不飽和度の寄与を理解するため, 我々はこれら不飽和化酵素遺伝子の破壊株を様々な温度で培養し, その表現型を詳細に解析した。これまでの報告と異なり, *sdeA* 破壊株は高温 (37°C, 42°C) での分生子発芽率と生育が著しく低下する一方で, 低温 (20°C) では高温ほどの顕著な表現型が見られないことが示された。また我々は, *sdeA* 破壊株を親株として高温で生育がある程度回復した変異株を取得した。本発表では, *sdeA*, *sdeB*, *odeA*, *odeB* の各破壊株に加え, 取得した変異株に関して, 細胞形態の解析, リン脂質の網羅的解析, 各不飽和化酵素遺伝子の転写解析から得られた結果を基に, 糸状菌生体膜における脂肪酸不飽和度変化の意義について議論する。

1) Wilson, R.A., et al. (2004). *Fungal Genet. Biol.* **41**, 501; 2) Calvo, A.M., et al. (2001). *J. Biol. Chem.* **276**, 25766.

Effects of biomembrane unsaturation on the growth of *Aspergillus nidulans*

Ryo Iwama^{1,2}, Hiroyuki Horiuchi^{1,2}

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

O-8 (P-2)

麴菌ハイドロフォビン RolA の Langmuir 膜に特異的に吸着したポリエステラーゼ CutL1 の可視化方法構築

齋藤有美¹, 寺内裕貴², 吉見啓³, 田中拓未⁴, 石崎裕也⁵, 三ツ石方也⁵, 藪浩^{6,7}, 阿部敬悦¹ (¹東北大院・農, ²京大院・地球環境学堂, ³京大院・農, ⁴農研機構・農環研, ⁵東北大院・工, ⁶東北大・WPI-AIMR, ⁷東北大・多元研)

黄麴菌 *Aspergillus oryzae* 由来の界面活性タンパク質 hydrophobin RolA^[1] は界面で自己組織化し薄膜を形成する^[2]。RolA は生分解性ポリエステル PBSA に吸着後, 分解酵素 polyesterase CutL1 をリクルートし分解促進する^[1,3]。一方, RolA 層下の PBSA 表面へ CutL1 が到達する分子機構は不明である。本研究では, Langmuir 膜 (L 膜) 作製法^[2] を踏襲し作製した RolA L 膜 に対し CutL1 を反応させ, CutL1 の可視化方法の構築を行った。まず, L 膜転写基板を CutL1 溶液に浸漬し, CutL1 の存在を発色基質 pNP-butyrates の分解産物の吸光度で確認した。この結果, CutL1 作用基板は分解活性があり CutL1 の存在が示された。次に原子間力顕微鏡で L 膜上の CutL1 可視化を試みた。親水化基板+RolA L 膜には CutL1 と思しき無数の粒状物体が見られ, 疎水化基板+RolA L 膜には, CutL1 長時間浸漬又は高濃度で粒状物体が見られた。現在, 粒状物体が CutL1 かを検証する為, 蛍光修飾等による RolA L 膜基板上 CutL1 の直接検出を試みている。 [1] Takahashi T. et al., *Mol. Microbiol.* (2005); [2] Terauchi Y. et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (2020); [3] Takahashi T. et al., *Mol. Microbiol.* (2015).

Visualization of polyesterase CutL1 to Langmuir membrane of hydrophobin RolA derived *Aspergillus oryzae*.

Yumi Saito¹, Yuki Terauchi², Akira Yoshimi³, Takumi Tanaka⁴, Yuya Ishizaki⁵, Masaya Mitsuishi⁵, Hiroshi Yabu^{6,7}, Keietsu Abe¹

(¹Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., ²Grad. Sch. Glob. Env. Stud., Kyoto Univ., ³Grad. Sch. Agric., Kyoto

Univ., ⁴NARO・NIAES, ⁵Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ., ⁶WPI-AIMR, Tohoku Univ., ⁷IMRAM, Tohoku Univ.)

O-9 (P-7)

Aspergillus nidulans 由来 CYP540A2 の新規電子伝達系の解明

鈴木康太, 門岡千尋, 梶尾俊介, 志水元享, 高谷直樹 (筑波大・生命環境・MiCS)

Cytochrome P450 (P450) は微生物から植物, 動物まで生物界に広く分布する一群のヘムタンパク質であり, 還元・一酸化炭素結合型が 450 nm 付近に吸収極大を示す。P450 はモノオキシゲナーゼとして機能するが, この反応には, P450 のヘムに配位した酸素分子を活性化するために還元酵素が P450 へ電子を伝達する必要である。Cytochrome *b₅* (cyt *b₅*) を介した P450 への電子伝達は, 一般的に NAD(P)H, cyt *b₅* 還元酵素 (*b₅r*), cyt *b₅* を経ることが知られている。我々は, *Aspergillus nidulans* のゲノム上に, cyt *b₅* と *b₅r* の融合タンパク質(*b₅/b₅r*) をコードする遺伝子を発見した。また, これは推定 P450 (CYP540A2) 遺伝子とゲノム上で隣接していた。本研究では, この *b₅/b₅r* が CYP540A2 の還元酵素として機能することを酵素学的に示した。

CYP540A2 と *b₅/b₅r* の組換えタンパク質を調製し, SDS-PAGE 上で単一になるまで精製した。これらはそれぞれ P450 と cyt *b₅* に典型的な可視吸収スペクトルを示した。これらを混合したものをゲルろ過カラムに供したところ, それぞれにはない新たなピークが検出されたことから, 両者が複合体を形成することが示された。CYP540A2 と *b₅/b₅r* の混合液に NADH と一酸化炭素を添加したところ, 446 nm に吸収極大が見られた。ヘム結合部位のアミノ酸変異を導入した *b₅/b₅r* を用いて同様の実験を行ったところ, 酸化型の P450 が観察された。以上の結果から, NADH から *b₅/b₅r* の cyt *b₅* ドメインのヘムを介して CYP540A2 に電子が伝達されることが明らかとなった。この一連の反応によって, 短鎖脂肪酸が水酸化されることも示された。本発見は, *b₅/b₅r* による P450 への電子伝達とそれに伴う水酸化反応の初めての例である。

Identification of the novel electron transfer system of *Aspergillus nidulans* CYP540A2

Kota Suzuki, Chihiro Kadooka, Shunsuke Masuo, Motoyuki Shimizu, Naoki Takaya

(Faculty of Life Env. Sci./ MiCS, Univ. Tsukuba)

O-10 (P-14)

Bipolaris maydis における転写因子 RPR1 の制御因子の探索

藤林悠希, 二神加奈恵, 竹山さわな, 辻健也, 陳帯娣, 吉見啓, 田中千尋 (京大院・農)

B. maydis のヘム生合成に関わる Hydroxymethylbilane Synthase 遺伝子の変異株 (*pol2*) は, 殺菌剤ポリオキシンに対する耐性化, ポリケチド化合物である Emodin や未同定赤色色素蓄積など多相的な表現型を示す。我々はこの多相遺伝子に関わるさらなる因子として, *pol2* 株由来の突然変異株から Zn₂Cys₆ 型転写因子をコードする遺伝子 *RPR1* を見出した。*RPR1* の破壊により *pol2* 株の薬剤耐性ならびに菌叢の赤褐色呈色が失われること, *RPR1* の発現量は野生型株では極めて低いながら *pol2* 遺伝子存在下で高発現し, 色素合成に関わる *PKS21* や *PKS19* の発現を正に制御することから, 本転写因子がこれらの多面的な表現型を直接支配しているものと考えられる。しかし, *pol2* 突然変異がどのようにして *RPR1* の発現を制御するかは不明である。我々はさらなるスクリーニングから *RPR1* の C 末領域欠損突然変異が, *pol2* 非依存的にその発現が上昇し, ポリオキシン耐性化および菌叢の赤褐色化を引き起こすことを見つけた。一般に Zn₂Cys₆ 型転写因子ではホモ二量体の形成や他のタンパク質との相互作用によって下流の遺伝子発現を制御することから, *RPR1* の C 末端への制御因子の結合が *RPR1* の発現を制御しているのではないかと仮説を立て, 現在「*RPR1* 制御因子の探索」を試みている。相互作用する因子を探索するために, N 末端 FLAG 融合 *RPR1* を持つ株の作出を行った。FLAG 融合 *RPR1* の機能を確認するために, *pol2 alb3* 株から *RPR1* を破壊して白い菌叢になった *pol2 alb3 ΔRPR1* 株に対して N 末端 FLAG 融合 *RPR1* を導入し, 赤褐色に戻ることを確認した。同様に野生型株に対しても *RPR1* を破壊した後, N 末端 FLAG 融合 *RPR1* 導入株を作出した。現在, FLAG 抗体での *RPR1* 検出が可能か調査している。今後, 免疫沈降を行い, *RPR1* および相互作用因子の回収を試みる予定である。

Exploration of regulatory factors of a transcription factor RPR1 in *Bipolaris maydis*

Yuki Fujibayashi, Kanae Futagami, Sawana Takeyama, Kenya Tsuji, Daidi Chen, Akira Yoshimi, Chihiro Tanaka

(Grad. School of Agriculture, Kyoto Univ.)

O-11 (P-17)

黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* とその近縁種におけるアミラーゼ生産制御機構の解析

森瀬太一¹, 橋本渉¹, 渡部昭¹, 水谷治², 山田修³, 新谷尚弘¹, 五味勝也¹ (¹東北大院・農, ²琉球大・農, ³酒総研)

産業上重要なアミラーゼの遺伝子発現制御機構に関する研究はこれまで主に黄麹菌 *Aspergillus oryzae* やモデルカビ *A. nidulans* で行われてきた。一方、未解明であった黒麹菌 *A. luchuensis* についても明らかになりつつある。黒麹菌と上記2種とではアミラーゼ遺伝子およびそれらの発現を制御する転写因子 AmyR の発現様式が異なる可能性を示唆する結果が得られている。また、*A. niger* は黒麹菌の近縁種でクエン酸やグルコアミラーゼなどの産業用酵素剤の生産に利用されている。そこで本研究では、上記の可能性の検証に加えて、*A. niger* についてアミラーゼ関連遺伝子の発現および AmyR の機能を調べることで、*Aspergillus* 属 *Nigri* 節におけるアミラーゼ遺伝子発現制御機構を比較することとした。

イソマルトースを含む培地で培養した黒麹菌および *A. niger* から抽出した全 RNA を qRT-PCR に用いることで、アミラーゼ関連遺伝子 (α -アミラーゼ *amyA*, *amyC*, α -グルコシダーゼ *agdA*, グルコアミラーゼ *glaA*, 耐酸性 α -アミラーゼ *asaA/aamA*, 転写因子 *amyR*) の発現を調べた。黒麹菌ではアミラーゼ遺伝子の発現誘導が遅く起こることが再確認された一方で、*A. niger* では黄麹菌と同様、誘導開始後早い段階で遺伝子発現が見られた。このことより、*A. niger* のアミラーゼ遺伝子発現様式は黒麹菌よりも黄麹菌に似ていることが考えられた。さらに興味深いことに、*amyA* は黄麹菌、黒麹菌および *A. niger* で同一のアミノ酸配列の α -アミラーゼをコードしているが、黄麹菌では誘導発現、黒麹菌では構成的発現、*A. niger* では非発現というように、種間で発現の様式が全く異なっていた。そこでこれらの発現の様式の違いを明らかにするため、AmyR の細胞内局在などの特性や *amyR* 自身の発現様式について解析を進めているところである。

Analysis of amylase production regulatory mechanisms in *Aspergillus luchuensis* and its related species

Taichi Morise¹, Wataru Hashimoto¹, Akira Watanabe¹, Osamu Mizutani², Osamu Yamada³, Takahiro Shintani¹, Katsuya Gomi¹

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

O-12 (P-16)

麹菌においてカーボンカタボライト抑制を制御する脱ユビキチン化酵素 CreB はユビキチンリガーゼアダプター CreD の転写誘導とタンパク質安定性を制御する

田中瑞己¹, 藤田翔貴², 河原崎泰昌³, 山形洋平¹, 新谷尚弘², 五味勝也² (¹東農工大院・農, ²東北大院・農, ³静岡県・食栄)

糸状菌におけるカーボンカタボライト抑制制御因子として、脱ユビキチン化酵素 CreB とユビキチンリガーゼアダプターとして働くアレクチン様タンパク質 CreD が同定されている。出芽酵母においては、アレクチン様タンパク質がユビキチン化され、脱ユビキチン化酵素がその安定化に関与することが報告されている。しかし、CreB はそれらの脱ユビキチン化酵素とは相同性が低く、その機能は不明である。本研究では、麹菌における CreD の発現量制御への CreB の関与について解析した。

炭素源が CreD の発現量に与える影響を調べた結果、野生株ではグルコース存在下で *creD* の転写産物量と翻訳産物量がそれぞれ増加した。一方、*creB* 破壊株においては、グルコース存在下における CreD タンパク質量が著しく減少し、*creD* の発現誘導も抑制された。このことから、CreB はグルコースによる *creD* の転写発現誘導の制御に関与していることが示唆された。また、CreD タンパク質の安定性を調べた結果、*creB* 破壊株ではグルコース添加後の CreD の安定性が著しく低下した。このことから、CreB はグルコース存在下における CreD タンパク質の安定化にも関与していることが示された。以上の結果から、CreB はグルコース存在下における CreD の発現量を転写レベルとタンパク質レベルで二重に制御していることが示唆された。

The deubiquitinating enzyme CreB regulates gene expression and protein stability of CreD in *Aspergillus oryzae*

Mizuki Tanaka¹, Shoki Fujita², Yasuaki Kawarasaki³, Yohei Yamagata¹, Takahiro Shintani², Katsuya Gomi²

(¹Tokyo Univ. of Agri. and Tech., ²Tohoku Univ., ³Univ. of Shizuoka)

O-13 (P-64)

Aspergillus fumigatus と感染ウイルスの dual-genomics による進化的な関係性の解析

千葉悠斗¹, 高橋弘喜², 楠屋陽子², 渡辺哲², 浦山俊一^{1,3}, 萩原大祐^{1,2,3} (¹筑波大・生命環境系, ²千葉大・真菌セ, ³筑波大・MiCS)

菌類には多種多様なウイルス(菌類ウイルス)が比較的高い割合で感染しており, その多くは細胞外伝播経路を持たず細胞の分裂や融合によって伝播するプラスミド様の伝播形式を有している。このようなウイルスの機能に関して近年少しずつ理解が進みつつあるが, 宿主集団中でどのように維持され, 進化してきたのかほとんど理解されていない。そこで本研究では, 単一の糸状菌種を対象として感染ウイルスと宿主の両者のゲノム情報を体系的に収集し, その比較から, ウイルスと宿主の間にある進化的な関係性を明らかにすることを目指した。

166株の病原真菌 *Aspergillus fumigatus* を対象にウイルス探索を行い, 14菌株から8種19株のウイルス配列を検出した。これら全てのウイルスゲノムに加え, ウイルス保有宿主14菌株及び非保有株のうち104菌株のゲノムを決定した。ゲノム情報をもとに宿主の系統解析を行うと, ウイルス保有株は系統樹上でランダムに位置し, 宿主の進化系統によらずウイルス感染が起こっていることが示唆された。また, 同種のウイルスが複数菌株で検出されたセットを対象に, ウイルスと宿主のゲノム系統樹を比較すると, 両者の系統的位置関係が一致しなかったため, ウイルスと宿主株が非平行的に進化したことが示唆された。このことは, 進化の過程で異なる宿主菌株間で水平伝播のようなウイルス移動イベントが発生した可能性が考えられる。本研究の結果から, *A. fumigatus* 集団内のウイルスの感染動態が明らかとなった。今後はウイルスゲノムの多様性を詳細に解析することで, 菌類ウイルス-宿主間の感染維持機構の謎に迫りたい。

Dual-genomics unveiling host-mycovirus relationship in *Aspergillus fumigatus*.

Yuto Chiba¹, Hiroki Takahashi², Yoko Kusuya², Akira Watanabe², Syun-ichi Urayama^{1,3}, Daisuke Hagiwara^{1,2,3}

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

O-14 (P-56)

立体選択的[4+2]環化付加反応を触媒するデカリン合成酵素の阻害剤同定

加藤直樹^{1,2}, 藤山敬介³, 永野真吾³, 高橋俊二² (¹摂南大・農, ²理研・CSRS, ³鳥取大院工)

糸状菌の生産する抗ウイルス物質エキセチンとその鏡像異性類縁体フォマセチンの生合成経路において, デカリン合成酵素 Fsa2 および Phm7 は立体選択的[4+2]環化付加反応(ディールスアルダー反応)を触媒する。その機能と構造の相関を明らかにすることは, 反応メカニズムの理解とそれに基づく酵素の機能改変に不可欠である。本酵素ファミリーは, 既知のディールスアルダー反応を触媒する酵素とは同姓性を示さず, その機能に補因子を必要としない。酵素の活性中心の特定が困難であることが予想されたため, 酵素の結晶構造解析と並行してリガンドの探索を行った。本発表では, リガンド探索と取得した阻害剤を用いた解析結果について報告する。

Phm7の基質および産物と類似した部分構造を有する市販の小分子化合物を対象に, thermofluor アッセイならびに microscale thermophoresis アッセイによる Phm7 リガンドのスクリーニングを行った。その結果, *p*-menthane 誘導体の1つが親和性は低いものの Phm7 および Fsa2 に結合することを見出した。フォマセチン生産菌 *Pyrenochaetopsis* sp. RK10-F058 株に由来する *phm7* 欠失株の菌糸から細胞抽出液を用いた *in vitro* 酵素アッセイ系を用いることで, この化合物が濃度依存的に酵素活性を阻害すること, 培養液に添加することでフォマセチン, エキセチンの生産を阻害することを確認した。次いで, 本化合物と Phm7 との共結晶構造解析を行った。酵素を構成する2つのβ-ドメイン間のポケットに化合物が結合しており, そのポケットが活性中心であることが示唆された。

Identification of an inhibitor of decalin synthases that catalyze stereospecific [4+2] cycloaddition

Naoki Kato^{1,2}, Keisuke Fujiyama³, Shingo Nagano³, Shunji Takahashi²

(¹Fac. of Agric., Setsunan Univ., ²RIKEN CSRS, ³Tottori Univ.)

* P-1

白色腐朽担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* 由来の新規ジオキシゲナーゼの機能・構造解析

加藤大志, 高橋泰志, 鈴木裕満, 加藤雅士, 志水元亨 (名城大院・農)

【緒言】白色腐朽菌は難分解性芳香族高分子であるリグニンを単独かつ完全に分解することができる。リグニンは、白色腐朽菌によって種々のリグニンフラグメントへ低分子化され、菌体内へ取り込まれることが知られているが、リグニンフラグメントの分解経路およびそれらの変換酵素については完全に解明されていない。そこで、代表的なリグニンフラグメントであるバニリンを添加した培地で白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* を生育させ、生産された細胞外タンパク質を網羅的に解析した。その結果、複数のタンパク質がバニリン誘導的に発現した。その中で、アミノ酸配列からジオキシゲナーゼであると推定されたタンパク質 (Putative dioxygenase) を見出した。本研究では Putative dioxygenase (PD) の機能及び構造を解析した。

【方法・結果】*P. chrysosporium* 由来の PD に His タグを付加したリコンビナントタンパク質を調製した。リコンビナント PD と種々のリグニンフラグメントを反応させ、反応生成物を GC-MS にて解析したところ、バニリン酸およびシリンガ酸の脱炭酸産物である Methoxyhydroquinone (MHQ) および Dimethoxyhydroquinone (DMHQ) を環開裂することが分かった。MHQ に対する活性が最も高いことから、本酵素を Methoxyhydroquinone dioxygenase (MHQD) と命名した。本研究から、白色腐朽菌において従来から提唱されていた 1, 2,4-Trihydroxybenzene を経由する代謝経路とは異なる、新たなリグニンフラグメントの環開裂経路の存在が示唆された。現在 MHQD の X 線結晶構造解析を行うとともに、MHQD の触媒に重要なアミノ酸残基を特定している。

Functional and structural analysis of a novel dioxygenase from *Phanerochaete chrysosporium*

Hiroyuki Kato, Yasushi Takahashi, Hiromitsu Suzuki, Masashi Kato, Motoyuki Shimizu

(Fac of Agric, Univ. of Meijo)

* P-2 (O-8)

麹菌ハイドロフォビン RolA の Langmuir 膜に特異的に吸着したポリエステラーゼ CutL1 の可視化方法構築

齋藤有美¹, 寺内裕貴², 吉見啓³, 田中拓未⁴, 石崎裕也⁵, 三ツ石方也⁵, 藪浩^{6,7}, 阿部敬悦¹ (¹ 東北大院・農, ² 京大院・地球環境学堂, ³ 京大院・農, ⁴ 農研機構・農環研, ⁵ 東北大院・工, ⁶ 東北大・WPI-AIMR, ⁷ 東北大・多元研)

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* 由来の界面活性タンパク質 hydrophobin RolA^[1] は界面で自己組織化し薄膜を形成する^[2]。RolA は生分解性ポリエステル PBSA に吸着後、分解酵素 polyesterase CutL1 をリクルートし分解促進する^[1,3]。一方、RolA 層下の PBSA 表面へ CutL1 が到達する分子機構は不明である。本研究では、Langmuir 膜 (L 膜) 作製法^[2] を踏襲し作製した RolA L 膜 に対し CutL1 を反応させ、CutL1 の可視化方法の構築を行った。まず、L 膜転写基板を CutL1 溶液に浸漬し、CutL1 の存在を発色基質 pNP-butyrate の分解産物の吸光度で確認した。この結果、CutL1 作用基板は分解活性があり CutL1 の存在が示された。次に原子間力顕微鏡で L 膜上の CutL1 可視化を試みた。親水化基板+RolA L 膜には CutL1 と思しき無数の粒状物体が見られ、疎水化基板+RolA L 膜には、CutL1 長時間浸漬又は高濃度で粒状物体が見られた。現在、粒状物体が CutL1 かを検証する為、蛍光修飾等による RolA L 膜基板上 CutL1 の直接検出を試みている。 [1] Takahashi T. et al., *Mol. Microbiol.* (2005); [2] Terauchi Y. et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (2020); [3] Takahashi T. et al., *Mol. Microbiol.* (2015).

Visualization of polyesterase CutL1 to Langmuir membrane of hydrophobin RolA derived *Aspergillus oryzae*.

Yumi Saito¹, Yuki Terauchi², Akira Yoshimi³, Takumi Tanaka⁴, Yuya Ishizaki⁵, Masaya Mitsuishi⁵, Hiroshi Yabu^{6,7}, Keietsu Abe¹

(¹ Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., ² Grad. Sch. Glob. Env. Stud., Kyoto Univ., ³ Grad. Sch. Agric., Kyoto

Univ., ⁴ NARO・NIAES, ⁵ Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ., ⁶ WPI-AIMR, Tohoku Univ., ⁷ IMRAM, Tohoku Univ.)

* P-3

白色腐朽担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* 由来の新規 flavin-containing monooxygenase の機能・構造解析

森玲香, 鈴木裕満, 加藤雅士, 志水元亨 (名城大院・農)

【緒言】白色腐朽担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* は、細胞外に分泌するリグニン分解酵素によって不定形芳香族高分子であるリグニンをリグニンフラグメントへ低分子化後、それらを細胞内に取込み分解する。しかし、リグニンフラグメントの分解に関与する酵素の詳細は未だ明らかになっていない。代表的なリグニンフラグメントである Vanillic acid (VA) は、脱炭酸・脱メトキシ化を経て環開裂されると推定されている。40年前の先行研究では、*P. chrysosporium* の細胞破砕液に NADPH を添加すると VA を脱炭酸すると報告されていることから、VA の脱炭酸には補酵素として NADPH を用いる酵素が関与すると考えられた。芳香族化合物の変換に関与する酵素としてモノオキシゲナーゼが知られており、中でも Flavin-containing monooxygenase (FMO) は補酵素として NADPH を用いることから、*P. chrysosporium* 由来の FMO をターゲットに VA の脱炭酸酵素の探索と機能解析を行った。

【方法・結果】*P. chrysosporium* のゲノム中にコードされている 59 種の FMO の中から VA を基質にする可能性のある FMO を 11 種選抜し、その中の 4 種の機能を解析した。その結果、FMO11 が VA, Syringic acid (SA) を脱炭酸することが明らかとなり、世界で初めて VA, SA の酸化的脱炭酸を触媒する酵素 FMO11 を見出すことができた。現在、FMO11 の機能と構造の詳細を解明するため、X-線結晶構造解析を進めている。

Functional and structural analysis of a novel flavin monooxygenase from white-rot fungi *Phanerochaete chrysosporium*

Reini Mori, Hiromitsu Suzuki, Masashi Kato, Motoyuki Shimizu

(Fac of Agric, Univ. of Meijo)

* P-4

糸状菌における攪拌翼形状とタンパク質分泌生産の相関解析

小野太暉¹, 鈴木智大², 加戸悠³, 坪井宏和³, 坊垣隆之³, 幸田明生³, 辻野義雄⁴, 近藤昭彦⁴, 若井暁^{4,5}, 荻野千秋¹ (¹神戸大院・工, ²神戸大・工, ³大関総研, ⁴神戸大院・技イノベ, ⁵海洋研・超先鋭)

工業的なバイオプロセスにおいて、攪拌操作は微生物の培養環境における不均一性を小さくするための非常に重要な操作である。しかしながら、汎用的に使われるディスクタービンを用いると高い均一性を確立するために高速回転が必要となり、高いせん断応力が生じ、糸状菌のような形状の微生物細胞には損傷を生じてしまう。大型攪拌翼はせん断応力の低下に寄与する可能性があるが、その混合特性がどのように糸状菌の酵素生産に影響を及ぼすのか調べた研究例は少ない。そこで、本研究では酸化還元酵素を分泌生産する *Aspergillus niger* をモデル評価系として用い、攪拌翼によるタンパク質の分泌生産への影響の相関関係を検討する。ディスクタービン翼に加えて、大型翼である MaxBlend (MB) 翼や Fullzone (FZ) 翼を用いた培養を行い、酵素の分泌生産性を評価した。3つの攪拌翼を同回転数条件下で培養の比較検討した結果、それぞれの攪拌翼で異なる酵素生産が確認された。中でも FZ 翼を用いた培養では、最終酵素濃度約 1.5 g/L を示し、ディスクタービン翼を用いた培養よりも約 2 倍の酵素生産量を示した。これは FZ 翼の混合特性により糸状菌を傷つけずに生産物が蓄積し、高粘度になった培地を均一に混合することができたためと考えられる。

Correlation analysis of stirring blade shape and secreted protein production in filamentous fungi

Taiki Ono¹, Tomohiro Suzuki², Haruka Kado³, Hirokazu Tsuboi³, Takayuki Bogaki³, Akio Koda³, Yoshio Tsujino⁴, Akihiko Kondo⁴, Satoshi Wakai^{4,5}, Chiaki Ogino¹

(¹ Grad. Sch. Eng, Kobe Univ., ² Fac. Eng., Kobe Univ., ³ Gen. Res. Lab., Ozeki Corp., ⁴ Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., ⁵ X-star, JAMSTEC)

* P-5

麴菌由来界面活性タンパク質 hydrophobin RolA の自己組織化膜の微細な表面構造解析

高橋尚央¹, 寺内裕貴², 吉見啓³, 田中拓未⁴, 石崎裕也⁵, 三ツ石方也⁵, 藪浩^{6,7}, 阿部敬悦¹ (¹東北大・農, ²京大院・地球環境学堂, ³京大院・農, ⁴農研機構・農環研, ⁵東北大院・工, ⁶東北大・WPI-AIMR, ⁷東北大・多元研)

麴菌 *Aspergillus oryzae* の分泌する界面活性タンパク質 hydrophobin RolA は PBSA(Polybutylene succinate-co-adipate)に吸着した後、自己組織化膜と呼ばれる rodlet 状の膜構造を形成している。また、固体表面上の RolA は PBSA 分解酵素 cutinase CutL1 と相互作用して CutL1 を PBSA 表面に濃縮し、PBSA の分解効率を上昇させている。一方、RolA の自己組織化膜の詳細な構造や物理化学的特性、自己組織化膜と cutinase との相互作用メカニズムは未だ不明な点が多い。現在までに我々は、L 膜法 (Langmuir 膜)での気液界面での RolA 自己組織化膜の再現・制御、AFM (Atomic Force Microscope)での構造観察を行い、hydrophobin RolA の気液界面での膜構造モデルを明らかにしてきた⁽¹⁾。

本報告では、RolA の自己組織化構造を AFM に加えて SEM・TEM で観察し、異なる視点で構造を評価した。さらに、L 膜法を利用しない、液滴法による自己組織化構造の形成に成功した。液滴法では、複数の rodlet が集合した線状平行構造がランダムに整列した薄膜が観察された。(1) Yuki Terauchi et al, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (2020)

Detailed Surface structure analysis of self-assembled structure of *Aspergillus oryzae* hydrophobin RolA.

Nao Takahashi¹, Yuki Terauchi², Akira Yoshimi³, Takumi Tanaka⁴, Yuya Ishizaki⁵, Masaya Mitsuishi⁵, Hiroshi Yabu^{6,7}, Keietsu Abe¹

(¹Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., ²Grad. Sch. Glob. Env. Stud., Kyoto Univ., ³Grad. Sch. Agric., Kyoto

Univ., ⁴NARO・NIAES, ⁵Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ., ⁶WPI-AIMR, Tohoku Univ., ⁷IMRAM, Tohoku Univ.)

* P-6

Aspergillus fumigatus における α -マンノシド β -(1→6)-ガラクトフラノース転移酵素群の機能解析

備瀬政晃¹, 田中大², 門岡千尋¹, 岡拓二¹ (¹崇城大院・工, ²東北医薬大・薬)

【目的】病原性糸状菌 *Aspergillus fumigatus* の細胞壁に含まれるガラクトマンナン(GM)は、細胞壁表層に局在していることから糸状菌の感染・毒性発現機構との関連が示唆されている。私たちの研究グループにおける先の研究により、推定ゴルジ体局在機能未知 II 型膜タンパク質遺伝子の中から、GM 中のガラクトフラン側鎖の初発酵素である α -マンノシド β -(1→6)-ガラクトフラノース (Gal_f) 転移酵素遺伝子を *Aspergillus nidulans* より同定し、MgfA と名付けた。*A. fumigatus* のゲノム上には 6 つの *mgfA* オルソログがあり、*AfmgfA* から *AfmgfF* と名付けた。本研究では、病原性糸状菌 *A. fumigatus* の Mgf ファミリータンパク質の機能解析を試みた。

【方法・結果】大腸菌発現系を用いて AfMgfA から AfMgfF の組換えタンパク質発現を試みた。得られた組換え酵素と受容基質として 4-メチルウンベリフェリル(4MU)- α -マンノース(Man)を用いた Gal_f 転移活性測定系に供した。その結果、MgfA, MgfB および MgfC の Gal_f 転移酵素活性を確認できた。特に、MgfA では強い Gal_f 転移活性を示した。そこで、MgfA 酵素反応産物を精製し、¹H-NMR およびメチル化分析を行った。MgfA 酵素反応産物の構造は、マンノース残基の 6 位にガラクトフラノース残基の 1 位が結合した構造であることが明らかになった。さらに、様々な受容基質を用いて MgfA の基質特異性を解析したところ、MgfA は、 α -Man に対する強い活性の他に β -Man および α -グルコースに対しても微弱ながら Gal_f 残基を転移する活性を有していることが明らかになった。

Enzymatic analysis of α -mannoside β -(1→6)-galactofuranosyltransferase from *Aspergillus fumigatus*.

Masaaki Bise¹, Yutaka Tanaka², Chihiro Kadooka¹, Takuji Oka¹

(¹Fac. Biotech. Life Sci., Sojo Univ., ²Dept. Pham., TMPU)

* P-7 (O-9)

Aspergillus nidulans 由来 CYP540A2 の新規電子伝達系の解明

鈴木康太, 門岡千尋, 梶尾俊介, 志水元享, 高谷直樹 (筑波大・生命環境・MiCS)

Cytochrome P450 (P450) は微生物から植物, 動物まで生物界に広く分布する一群のヘムタンパク質であり, 還元・一酸化炭素結合型が 450 nm 付近に吸収極大を示す。P450 はモノオキシゲナーゼとして機能するが, この反応には, P450 のヘムに配位した酸素分子を活性化するために還元酵素が P450 へ電子を伝達する必要である。Cytochrome *b₅* (cyt *b₅*) を介した P450 への電子伝達は, 一般的に NAD(P)H, cyt *b₅* 還元酵素 (*b₅r*), cyt *b₅* を経ることが知られている。我々は, *Aspergillus nidulans* のゲノム上に, cyt *b₅* と *b₅r* の融合タンパク質(*b₅/b₅r*) をコードする遺伝子を発見した。また, これは推定 P450 (CYP540A2) 遺伝子とゲノム上で隣接していた。本研究では, この *b₅/b₅r* が CYP540A2 の還元酵素として機能することを酵素学的に示した。

CYP540A2 と *b₅/b₅r* の組換えタンパク質を調製し, SDS-PAGE 上で単一になるまで精製した。これらはそれぞれ P450 と cyt *b₅* に典型的な可視吸収スペクトルを示した。これらを混合したものをゲルろ過カラムに供したところ, それぞれにはない新たなピークが検出されたことから, 両者が複合体を形成することが示された。CYP540A2 と *b₅/b₅r* の混合液に NADH と一酸化炭素を添加したところ, 446 nm に吸収極大が見られた。ヘム結合部位のアミノ酸変異を導入した *b₅/b₅r* を用いて同様の実験を行ったところ, 酸化型の P450 が観察された。以上の結果から, NADH から *b₅/b₅r* の cyt *b₅* ドメインのヘムを介して CYP540A2 に電子が伝達されることが明らかとなった。この一連の反応によって, 短鎖脂肪酸が水酸化されることも示された。本発見は, *b₅/b₅r* による P450 への電子伝達とそれに伴う水酸化反応の初めての例である。

Identification of the novel electron transfer system of *Aspergillus nidulans* CYP540A2

Kota Suzuki, Chihiro Kadooka, Shunsuke Masuo, Motoyuki Shimizu, Naoki Takaya

(Faculty of Life Env. Sci./ MiCS, Univ. Tsukuba)

* P-8

糸状菌 *Trichoderma asperellum* 由来糖質加水分解酵素および生産制御の研究

豊田俊介¹, 劉麗¹, 坂川絵里香¹, 中村華穂¹, 鈴木孝征^{1,3}, 金政真^{1,2}

(¹中部大院・応生, ²中部大・環生科, ³中部大・応生化)

バイオマスは地球上に最も多く存在する再生可能な資源であり, その利用過程で生じる二酸化炭素は植物に吸収されて炭素循環を形成することから, 持続可能社会の実現に向けた有力な解決策になると期待されている。食糧と競合しない木質バイオマスの利用のためには糖質加水分解酵素による分解(糖化)が必要である。愛知県の土壌から分離された糸状菌 *T. asperellum* IC-1 株は, セルラーゼおよびヘミセルラーゼの生産分泌能を有しているが詳細は不明である。そこで本研究では, 培養時の炭素源が本菌の糖質分解酵素の生産制御に与える影響を調べた。

本菌を各種炭素源で培養したところ, β -グルコシダーゼ, CM セルラーゼ, キシラナーゼ, キシロシダーゼ, β -マンノシダーゼ, キチナーゼの活性が検出された。稲わらおよび小麦フスマを炭素源として培養したところグルコシダーゼ, キシロシダーゼ, CM セルラーゼ, キチナーゼは *Trichoderma reesei* QM6A 株よりも高い活性が確認された。さらに, 12 種類の炭素源でそれぞれ培養して両菌のキチナーゼ活性を調べたところ, ローカストビーンガムと同程度であった他は全ての炭素源において *T. asperellum* が高い活性を示した。本酵素の生産はグルコースをはじめとする単糖によって阻害されないことも分かった。本菌から全 RNA を抽出し, セルラーゼ・ヘミセルラーゼ遺伝子の転写誘導に関する知見を得たことについても報告する。

Study on carbohydrate hydrolases from a filamentous fungus *Trichoderma asperellum* and their regulation

Ryosuke Toyoda¹, Li LIU¹, Erika Sakagawa¹, Kaho Nakamura¹, Takamasa Suzuki^{1,3}, Shin Kanamasa^{1,2}

(¹Grad. Sch. Biosci. Biotech., Chubu Univ., ²Dept. Envi. Biol., Chubu Univ., ³Dept. Biol. Chem. Chubu Univ.)

* P-9

芳香族主鎖型ポリマー加水分解酵素の探索と機能解析

西岡利隆, 榎尾俊介, 老沼研一, 高谷直樹 (筑波大・生命環境系/MiCS)

【背景・目的】微生物は様々な天然または人工の高分子ポリマーを分解できるが、ポリエチレンテレフタレート等の芳香族化合物を主鎖とするポリマーを分解する微生物や酵素はほとんど報告されていない。poly(4HCA-co-DHCA) (4CDP) は、クマル酸とカフェ酸を重合させた芳香族化合物を主鎖とする新規なポリエステルである。当研究室において 4CDP を分解する微生物や酵素が探索され、*Aspergillus niger* 由来ペクチナーゼ試薬 (Sigma 社) から 4CDP の分解活性を有するタンパク質が見出され、その遺伝子 (EHA22274) が同定された。本研究では、この 4CDP 分解機能の詳細を明らかにすることを目的とした。

【方法および結果】EHA22274 と同じファミリーに分類される大腸菌の Thioesterase/protease (TesA) のシグナルペプチドを EHA22274 の成熟型アミノ酸配列の N 末端側に融合させた遺伝子を大腸菌用の発現プラスミド pRSFDuet-1 に挿入した。得られた発現プラスミドを大腸菌 *Escherichia coli* BL21(DE3) に導入した結果、培養液画分の SDS-PAGE 上で目的タンパク質と思われるバンドが認められた。この培養液を 4CDP と反応させ、反応液を HPLC に供したが、4CDP の加水分解産物は検出されなかったことから、活性型の EHA22274 が生産されていないことが示された。大腸菌では EHA22274 の糖鎖修飾が適切に行われなかった可能性を考え、*Aspergillus oryzae* を用いて EHA22274 を発現させ、その培養上清中の 4CDP 分解活性を検証した。その結果、EHA22274 を発現させていない菌体においても 4CDP の分解産物が検出された。このことから、*A. oryzae* も 4CDP 分解活性を有していることが明らかになった。

Identification and analysis of aromatic polymer hydrolases

Toshitaka Nishioka, Shunsuke Masuo, Ken'ichi Oinuma, Naoki Takaya

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

* P-10

ヒラタケ *rho1b* の過剰発現は *ccl1* 破壊株で観察されたセルロース分解酵素遺伝子の転写活性化を引き起こす

奥田希実, 中沢威人, 堀井雅人, 呉紅麗, 河内護之, 坂本正弘, 本田与一 (京大院・農)

先行研究において、ブナ木粉培地 (小麦ふすま 1.3% w/w 含有) 上で培養したヒラタケのリグニン分解不全変異株において、推定上のセルロース分解酵素遺伝子 (CEGs) のうち 13 個の顕著な転写活性化が観察された。また、ChIP 解析の結果、ヒストン H3 の N 末端から 4 番目のリジン (H3K4) の N-ジメチル化が、この転写変動に関与することが示唆された (Wu *et al.*, 2021 Fungal Genet. Biol.)。本研究では、この因果関係を確かめることを目的とし、ヒラタケ 20b (*ku80* 破壊株) において、COMPASS 複合体の構成因子をコードすると推定される *ccl1* 遺伝子の破壊により、H3K4 メチル化レベルが低下した株を作出した。ブナ木粉培地上で培養 13 日および 20 日目の時点で、RNA-seq および qRT-PCR を行なった結果、*ccl1* 破壊株では、リグニン分解不全変異株で転写活性化していた 13 個中 5 個の CEGs の転写蓄積量の顕著な増加が観察された。さらに、シグナル伝達に関与する GTPase をコードすると推定される *rho1b* の転写蓄積量が、*ccl1* 破壊株とリグニン分解不全株で共通して増加していることを発見した。*rho1b* 過剰発現 (OE) 株を作出したところ、培養 20 日目で *ccl1* 破壊株において転写活性化した 5 個の CEGs のうち、調査した 4 個中 3 個の転写活性化が観察された。一方、*ccl1/rho1b* 二重破壊株ではこれらの転写活性化はみられなかった。これらの結果は、Rho1b が一部の CEGs の転写活性化に関与することを示唆する。さらに、Rho1b の下流で MAP キナーゼと推定される Mpk1b が機能することも、*ccl1/mpk1b* 二重破壊株および *rho1bOE/Δmpk1b* 株を用いた転写解析の結果から示唆された。

Overexpressing *P. ostreatus rho1b* results in upregulation of the cellulolytic enzyme genes observed in *ccl1* disruptants

Nozomi Okuda, Takehito Nakazawa, Masato Horii, Hongli Wu, Moriyuki Kawauchi, Masahiro Sakamoto, Yoichi Honda

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

* P-11

ヒラタケにおける *hap2* 遺伝子破壊が *mnp* および *vp* 遺伝子の転写に及ぼす影響の解析

香山溪太, 中沢威人, 河内護之, 坂本正弘, 本田与一 (京大院・農)

白色腐朽菌のリグニン分解酵素遺伝子のプロモーター領域には, CCAAT-box の存在がしばしば報告されているが, 転写における役割は調査されていない。そこで本研究では, ヒラタケでリグニン分解酵素遺伝子 (*mnp*, *vp*, *lac* の合計 19 個) の転写における CCAAT-box の役割を調査する目的で行った。CCAAT-box の機能を喪失させるために, ヒラタケ 20b 株 (*ku80* 破壊株) において, CCAAT 配列結合複合体の機能に必須だと推定される遺伝子 (*hap2*) を破壊した。*hap2* 破壊株と 20b 株の間で, 一般的な位置 (TATA-box 上流 100 bp 以内) に CCAAT-box が存在する *mnp*, *vp* 遺伝子 (9 個中 8 個) の転写蓄積量を比較するため, これらの株を寒天培地もしくはリグノセルロース成分を主とする培地 (合計 6 種類) 上で培養した後, 全 RNA を抽出し定量 RT-PCR を行った。結果, ブナ木粉, 稲わら, もしくは結晶性セルロース (Avicel) に小麦ふすま 1.3% (w/w) を添加したリグノセルロース成分の培地では, *hap2* 破壊株における多くの *mnp*, *vp* の転写蓄積量の低下がみられた。特に *vp2*, *mnp1*, *mnp5*, *mnp6* の転写蓄積量の顕著な低下は, 共通して観察された。ブナ木粉培地を Wise 法で脱リグニン処理したホロセルロースの培地では, ブナ木粉培地ほど顕著ではないが, 6 個の *mnp*, *vp* の転写蓄積量の低下がみられた。一方, YMG 寒天培地およびグルコースを炭素源とする最少寒天培地では, 20b 株と *hap2* 破壊株との間で *mnp*, *vp* の転写蓄積量の違いはほとんどみられなかった。一方で, CCAAT-box が存在しない *mnp4* に関しては, 今回調査した全ての培養条件で, 20b と *hap2* 破壊株の間で転写蓄積量に差がなかった。一般的な位置に CCAAT-box が存在しない全ての *lac* 遺伝子 (10 個) についても, RNA-seq 解析の結果から, ブナ木粉培地での転写蓄積量に変動はみられなかった。以上の結果より, ヒラタケの *mnp*, *vp* 上の CCAAT-box の多くは, リグノセルロース成分の培地上における転写活性化に重要であることが示唆される。

Effects of *Pleurotus ostreatus hap2* disruption on transcriptional expression patterns of *mnp* and *vp* genes

Keita kayama, Takehito Nakazawa, Moriyuki Kawauchi, Masahiro Sakamoto, Yoichi Honda

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

P-12

Aspergillus 属糸状菌の代謝耐性イソマルトースアナログによるアミラーゼ生産

沼本穂¹, 平井剛², 高橋俊二³, 加藤直樹¹ (1 摂南大・農, 2 九大院・薬, 3 理研・CSRS)

イソマルトース (IM) は, *Aspergillus* 属糸状菌においてアミラーゼ生産の誘導シグナルとして働く。しかしながら, その受容体を含め, アミラーゼ遺伝子の発現を経路特異的に誘導する転写活性化因子 AmyR までのシグナル伝達経路の詳細は不明なままである。代謝耐性を賦与した IM アナログは, 恒常的なアミラーゼ生産の誘導シグナルとして機能し, そのシグナル伝達経路を解明するケミカルプローブとなることが期待できる。IM のグリコシド結合の酸素原子を硫黄および炭素に置換した IM アナログ (*S*-IM, *CH*₂-IM) を合成し, 麹菌 *amyB* を導入した *Aspergillus nidulans* をレポーター系として, それらのアミラーゼ生産誘導能力を調べた。

その結果, *CH*₂-IM は, 添加後初期は IM の誘導と比べてアミラーゼ生産は劣るが, 添加 30 時間後には恒常的かつ IM よりも高いアミラーゼ生産を示した。一方, *S*-IM はアミラーゼ生産をほとんど誘導しなかった。また, 発現解析を行ったところ, *CH*₂-IM は AmyR 支配下の遺伝子群の発現を IM より遅れて誘導した。以上の結果から, 代謝耐性 IM アナログ *CH*₂-IM は生理的シグナルである IM より誘導開始が遅れるものの, 恒常的なアミラーゼ生産の誘導シグナルとして機能することが示唆された。

Amylase production by induction of non-digested isomaltose analogues in *Aspergillus* fungi.

Minori Numamoto¹, Go Hirai², Shunji Takahashi³, Naoki Kato¹

(¹Fac. of Agric., Setsunan Univ., ²Grad. School of Pharm. Sci., Kyushu Univ., ³RIKEN CSRS)

* P-13

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

沼澤里佳¹, 田中優花子², 西岡佐和子², 辻僚太郎², 山形洋平^{1,2} (¹農工大院・連合農学研究科, ²農工大院・応生化)

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* の有する転写因子 PrtR は他の *Aspergillus* 属で見出されている PrtT のオルソログであり, 広範な分泌型ペプチダーゼ遺伝子の転写を制御すると考えられている。本研究では作製した PrtR 欠損株を用い, 小麦ふすまを用いた固体培養における PrtR の制御下にある遺伝子の同定並びに制御機構の解明を目指した。

分泌型ペプチダーゼ遺伝子の転写解析の結果, アスパルティックエンドペプチダーゼ (APase) をコードする遺伝子では *pepO* が PrtR によって正に制御されることが示された。また, セリントイプカルボキシペプチターゼ (CPase) をコードする遺伝子である *ocpO*, トリペプチジルペプチダーゼをコードする遺伝子 *tpaA*, 固体培養時に高発現することが報告されているメタロエンドペプチターゼ, CPase をコードする遺伝子 *deuA*, *ocpA* も正に制御されることが示された。一方, 転写量の低いいくつかの APase と CPase, ジペプチジルペプチダーゼをコードする遺伝子 *dppB*, *dppE*, *dppF* 並びにトリペプチジルペプチダーゼをコードする遺伝子 *tpcC* は PrtR により負の制御を受けることが示された。

このように, 小麦ふすまを用いた固体培養においては, 転写量の高い主要なペプチターゼ遺伝子は PrtR により正に制御され, 転写量の低いエンドペプチダーゼやエキソペプチダーゼに分類されるジペプチジル・トリペプチジルペプチダーゼ遺伝子では負に制御されるものが見られた。

Study on transcription factor PrtR of *Aspergillus oryzae*

Rika Numazawa¹, Yukako Tanaka², Sawako Nishioka², Ryotaro Tsuji², Youhei Yamagata^{1,2}

(¹United Graduate School of Agricultural Science, Tokyo Univ. of Agriculture and Technology, ²Dept. of Applied Biological Science, Tokyo Univ. of Agriculture and Technology)

* P-14 (O-10)

Bipolaris maydis における転写因子 RPR1 の制御因子の探索

藤林悠希, 二神加奈恵, 竹山さわな, 辻健也, 陳帯娣, 吉見啓, 田中千尋 (京大院・農)

B. maydis のヘム生合成に関わる Hydroxymethylbilane Synthase 遺伝子の変異株 (*pol2*) は, 殺菌剤ポリオキシンに対する耐性化, ポリケチド化合物である Emodin や未同定赤色素蓄積など多相的な表現型を示す。我々はこの多相遺伝子に関わるさらなる因子として, *pol2* 株由来の突然変異株から Zn₂Cys₆ 型転写因子をコードする遺伝子 *RPR1* を見出した。*RPR1* の破壊により *pol2* 株の薬剤耐性ならびに菌叢の赤褐色呈色が失われること, *RPR1* の発現量は野生型株では極めて低いながら *pol2* 遺伝子存在下で高発現し, 色素合成に関わる *PKS21* や *PKS19* の発現を正に制御することから, 本転写因子がこれらの多相的な表現型を直接支配しているものと考えられる。しかし, *pol2* 突然変異がどのようにして *RPR1* の発現を制御するかは不明である。我々はさらなるスクリーニングから *RPR1* の C 末領域欠損突然変異が, *pol2* 非依存的にその発現が上昇し, ポリオキシン耐性化および菌叢の赤褐色化を引き起こすことを見つけた。一般に Zn₂Cys₆ 型転写因子ではホモ二量体の形成や他のタンパク質との相互作用によって下流の遺伝子発現を制御することから, *RPR1* の C 末端への制御因子の結合が *RPR1* の発現を制御しているのではないかと仮説を立て, 現在「*RPR1* 制御因子の探索」を試みている。相互作用する因子を探索するために, N 末端 FLAG 融合 *RPR1* を持つ株の作出を行った。FLAG 融合 *RPR1* の機能を確認するために, *pol2 alb3* 株から *RPR1* を破壊して白い菌叢になった *pol2 alb3 ΔRPR1* 株に対して N 末端 FLAG 融合 *RPR1* を導入し, 赤褐色に戻ることを確認した。同様に野生型株に対しても *RPR1* を破壊した後, N 末端 FLAG 融合 *RPR1* 導入株を作出した。現在, FLAG 抗体での *RPR1* 検出が可能か調査している。今後, 免疫沈降を行い, *RPR1* および相互作用因子の回収を試みる予定である。

Exploration of regulatory factors of a transcription factor RPR1 in *Bipolaris maydis*

Yuki Fujibayashi, Kanae Futagami, Sawana Takeyama, Kenya Tsuji, Daidi Chen, Akira Yoshimi, Chihiro Tanaka

(Grad. School of Agriculture, Kyoto Univ.)

* P-15

G protein-coupled receptors GprK and GprR regulate sclerotia formation through their GTPase-activating activity in *Aspergillus oryzae*

Dong Min Kim¹, Manabu Arioka^{1,2} (¹Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo, ²CRIIM, UTokyo)

G protein-coupled receptors (GPCRs) form the largest transmembrane receptor family in eukaryotes that sense and transduce extracellular signals into cells. In *Aspergillus* spp., about fifteen GPCR genes have been identified in each organism, which are classified into 9 classes based on their functions and similarity. Despite their possible important roles, their functional properties, such as ligands, G protein coupling modes, and signaling pathways, are not fully understood. Class VI GPCRs (GprK and GprR), found only in plants and fungi but not in animals, are characterized by the hybrid structure containing the regulator of G protein signaling (RGS) domain at the C-terminus of canonical seven transmembrane regions. Since RGS protein is known to function as GTPase-activating protein (GAP) for G α subunit and thus block GPCR signaling, how the activation and inactivation of class VI GPCRs are controlled is enigmatic. *Aspergillus oryzae* has three class VI GPCRs, AoGprK-1, AoGprK-2, and AoGprR. We generated single, double, and triple deletion strains, and examined the phenotype. Although no phenotypic alteration was observed in the single deletion strains, we found that the double and triple deletion strains produced much larger number of sclerotia compared to the control strain. When the complemented strains were examined, not only the full-length construct, but also the construct carrying only the RGS domain could reverse the phenotype. Conversely, the Δ RGS mutant possessing only the seven transmembrane regions failed to complement the phenotypic change. Furthermore, EN/AA mutation that inactivates the GAP activity of RGS domain in the full-length construct also caused the failure of phenotypic complementation. These results strongly suggest that class VI GPCRs play a role in controlling sclerotia formation through their GAP activity in the RGS domain. Transcriptional analysis of genes involved in sexual and asexual development in the deletion mutants is currently underway.

P-16 (O-12)

麹菌においてカーボンカタボライト抑制を制御する脱ユビキチン化酵素 CreB はユビキチンリガーゼアダプター CreD の転写誘導とタンパク質安定性を制御する

田中瑞己¹, 藤田翔貴², 河原崎泰昌³, 山形洋平¹, 新谷尚弘², 五味勝也² (¹東農工大院・農, ²東北大院・農, ³静岡県・食栄)

糸状菌におけるカーボンカタボライト抑制制御因子として、脱ユビキチン化酵素 CreB とユビキチンリガーゼアダプターとして働くアレクチン様タンパク質 CreD が同定されている。出芽酵母においては、アレクチン様タンパク質がユビキチン化され、脱ユビキチン化酵素がその安定化に関与することが報告されている。しかし、CreB はそれらの脱ユビキチン化酵素とは相同性が低く、その機能は不明である。本研究では、麹菌における CreD の発現量制御への CreB の関与について解析した。

炭素源が CreD の発現量に与える影響を調べた結果、野生株ではグルコース存在下で *creD* の転写産物量と翻訳産物量がそれぞれ増加した。一方、*creB* 破壊株においては、グルコース存在下における CreD タンパク質量が著しく減少し、*creD* の発現誘導も抑制された。このことから、CreB はグルコースによる *creD* の転写発現誘導の制御に関与していることが示唆された。また、CreD タンパク質の安定性を調べた結果、*creB* 破壊株ではグルコース添加後の CreD の安定性が著しく低下した。このことから、CreB はグルコース存在下における CreD タンパク質の安定化にも関与していることが示された。以上の結果から、CreB はグルコース存在下における CreD の発現量を転写レベルとタンパク質レベルで二重に制御していることが示唆された。

The deubiquitinating enzyme CreB regulates gene expression and protein stability of CreD in *Aspergillus oryzae*

Mizuki Tanaka¹, Shoki Fujita², Yasuaki Kawarasaki³, Yohei Yamagata¹, Takahiro Shintani², Katsuya Gomi²

(¹Tokyo Univ. of Agri. and Tech., ²Tohoku Univ., ³Univ. of Shizuoka)

* P-17 (O-11)

黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* とその近縁種におけるアミラーゼ生産制御機構の解析

森瀬太一¹, 橋本渉¹, 渡部昭¹, 水谷治², 山田修³, 新谷尚弘¹, 五味勝也¹ (¹東北大院・農, ²琉球大・農, ³酒総研)

産業上重要なアミラーゼの遺伝子発現制御機構に関する研究はこれまで主に黄麹菌 *Aspergillus oryzae* やモデルカビ *A. nidulans* で行われてきた。一方、未解明であった黒麹菌 *A. luchuensis* についても明らかになりつつある。黒麹菌と上記2種とではアミラーゼ遺伝子およびそれらの発現を制御する転写因子 AmyR の発現様式が異なる可能性を示唆する結果が得られている。また、*A. niger* は黒麹菌の近縁種でクエン酸やグルコアミラーゼなどの産業用酵素剤の生産に利用されている。そこで本研究では、上記の可能性の検証に加えて、*A. niger* についてアミラーゼ関連遺伝子の発現および AmyR の機能を調べることで、*Aspergillus* 属 *Nigri* 節におけるアミラーゼ遺伝子発現制御機構を比較することとした。

イソマルトースを含む培地で培養した黒麹菌および *A. niger* から抽出した全 RNA を qRT-PCR に用いることで、アミラーゼ関連遺伝子 (α -アミラーゼ *amyA*, *amyC*, α -グルコシダーゼ *agdA*, グルコアミラーゼ *glaA*, 耐酸性 α -アミラーゼ *asaA/aamA*, 転写因子 *amyR*) の発現を調べた。黒麹菌ではアミラーゼ遺伝子の発現誘導が遅く起こることが再確認された一方で、*A. niger* では黄麹菌と同様、誘導開始後早い段階で遺伝子発現が見られた。このことより、*A. niger* のアミラーゼ遺伝子発現様式は黒麹菌よりも黄麹菌に似ていることが考えられた。さらに興味深いことに、*amyA* は黄麹菌、黒麹菌および *A. niger* で同一のアミノ酸配列の α -アミラーゼをコードしているが、黄麹菌では誘導発現、黒麹菌では構成的発現、*A. niger* では非発現というように、種間で発現の様式が全く異なっていた。そこでこれらの発現の様式の違いを明らかにするため、AmyR の細胞内局在などの特性や *amyR* 自身の発現様式について解析を進めているところである。

Analysis of amylase production regulatory mechanisms in *Aspergillus luchuensis* and its related species

Taichi Morise¹, Wataru Hashimoto¹, Akira Watanabe¹, Osamu Mizutani², Osamu Yamada³, Takahiro Shintani¹, Katsuya Gomi¹

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

* P-18

Zn(II)₂Cys₆ transcription factors essential for sclerotia formation involve AmyR, a transcriptional activator of amyolytic genes, in *Aspergillus oryzae*

Xueyan Sun¹, Haruka Minagawa¹, Takuya Katayama^{1,2}, Hiroya Oka³, Masahiro Ogawa⁴, Takaaki Kojima³, Hideo Nakano³, Katsuhiko Kitamoto⁵, Jun-ichi Maruyama^{1,2} (¹Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, ²CRIIM, UTokyo, ³Grad. Sch. Bioagric. Sci. Nagoya Univ., ⁴Noda Inst. Sci. Res., ⁵Nihon Pharmaceutical Univ.)

Sclerotia are the asexual development structures with mycelial aggregation mass formed in a part of filamentous fungal species. They are also capable of acting as repositories for sexual reproduction, but the loss of or reduced ability of sclerotia formation is related to cryptic sexuality in the industrial filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. We previously found that two Zn(II)₂Cys₆ transcription factors TrsA and TrsB are essential for sclerotia formation in *A. oryzae*¹⁾. To investigate the TrsA/TrsB-mediated mechanisms in sclerotia formation, ChIP-seq analysis was performed. Out of the candidate genes, *amyR* for a transcriptional activator of amyolytic genes was further characterized, since *amyR* was upregulated in the deletions of *trsA* and *trsB*. Sclerotia were increased by the *amyR* deletion but not formed in the *amyR* overexpression, which indicated that AmyR negatively regulates sclerotia formation. ChIP-qPCR analysis demonstrated the enrichment of TrsB on the *amyR* promoter region. These results suggested that TrsB directly downregulates *amyR* to affect sclerotia formation. To examine an inverse physiological relationship between sclerotia formation and AmyR-dependent transcriptional activation, transcripts and enzyme activities for amylases are presently analyzed in the deletions of *trsA* and *trsB*.

1) Nakamura *et al.* (2015) 67th SBJ Annual Meeting, Abstract book p. 89.

* P-19

アカパンカビを用いた浸透圧シグナル攪乱剤及びステロール合成阻害剤に応答するルシフェラーゼアッセイの構築

加藤志穂, 平井献士, 一石昭彦, 藤村真 (東洋大院・生命科)

農業用殺菌剤の多くには耐性菌が出現しており, 新しい母核を持つ殺菌剤の開発が求められている。薬剤スクリーニングにルシフェラーゼレポーターアッセイが有効であることが知られている。我々は, アカパンカビを用いて作用機構の異なる阻害剤に応答するルシフェラーゼ株の作製を始めている。今回は, 最初の例として, OS-2 MAP キナーゼ活性化剤に応答する *ccg-1* (clock-controlled gene), エルゴステロール合成阻害剤に応答する *erg-3* (sterol C-14 reductase)及び *erg-8* (lanosterol 14 α -demethylase)遺伝子のルシフェラーゼアッセイ系について報告する。まず, 各遺伝子のプロモーター1.5 kb を PCR 増幅し, ルシフェラーゼ遺伝子と In-Fusion 法によって連結させた。なお, キメラ遺伝子は *his-3* 座にターゲットするプラスミドに連結した。キメラ遺伝子はエレクトロポレーション法を用いて *his-3* 株に形質転換した。形質転換体株はヘテロカリオンであったため, 野生株(#4200)と交雑することによりホモ化した。MAP キナーゼ活性化剤 fludioxonil は *Pccg-1-luc* 株の発光を誘導した。ERG-3 酵素を阻害する fenpropimorph と ERG-8 酵素を阻害する fluconazole は, それぞれ *Perg-3-luc* 株と *Perg-8-luc* 株の発光を誘導した。薬剤特異性を調べるために, 作用機構が異なる農業用殺菌剤(FRAC コード 1, 2, 3, 5, 6, 7, 9, 11, 12, 29, 39, M4, M5)のべ 20 種類の解析も行ったので, その結果についても報告する。本研究で得られた株は, 薬剤スクリーニングへの利用だけでなく, プロモーターのエLEMENT解析や転写因子による発現制御機構の解明にも有効であると考えている。

Construction of luciferase reporter assay system to detect osmotic stress signaling and sterol synthesis inhibition in *Neurospora crassa*

Shiho Kato, Kenshi Hirai, Akihiko Ichiishi, Makoto Fujimura

(Life science, Univ. of Toyo)

* P-20

Aspergillus nidulans の sirtuin 阻害剤の探索

久保友汰, 小田倉里佳, 榊尾俊介, 高谷直樹 (筑波大・生命環境)

Sirtuin は真核生物に広く保存されている, NAD⁺に依存的なヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) である。Sirtuin はクラスⅢの HDAC に分類され, 糸状菌 *Aspergillus nidulans* は 6 種の Sirtuin 様タンパク質 (SirA-SirE, HstA) を有する。これまでに, SirA, SirE が二次代謝, 胞子形成や自己溶菌に関わる遺伝子発現の制御に関わることや SirC, SirD が細胞周期や減数分裂に関わる遺伝子発現の制御に関わることを示された。当研究室では SirA の脱アセチル化反応の阻害物質として, 4-hydroxyphenylacetamide (4HPAA) が取得されているが, *A. nidulans* が有する他の Sirtuin の活性阻害物質は取得されていない。様々な Sirtuin を標的とした阻害剤が取得できれば, これらを用いることで, より広範な遺伝子の発現制御が可能となる。そこで本研究では研究室保有の真菌 200 種の培養抽出物から, SirC, SirD の阻害物質のスクリーニングを行なった。

大腸菌を用いて組換え SirC, SirD タンパク質を調製し, 蛍光プローブを用いた活性測定により, これらの脱アセチル化活性を確認した。蛍光強度を指標にして, 96 ウェルプレートを用いた SirC および SirD 阻害剤のスクリーニング系を構築した。真菌培養液 10 mL の酢酸エチル抽出画分を乾燥後, 1mL のジメチルスルホキシドに溶解したものをを用いてスクリーニングを行った。その結果, 溶媒のみを加えたコントロールと比較し, SirC および SirD の活性をそれぞれ 50 %以上阻害する抽出物が 30 種および 31 種得られた。そのうち 8 種は SirC, SirD の両方を 50 %以上阻害した。特に *Rhizoglyphus moryella* の抽出物は SirC, SirD 両方の活性を 99%以上阻害した。この抽出物はさらに 10 倍希釈しても 74%の活性阻害を示した。*R. moryella* が強い阻害効果を持つ物質を生産していると考えられた。

Screening for *Aspergillus nidulans* sirtuin Inhibitors

Yuta Kubo, Rika Odakura, Shunsuke Masuo, Naoki Takaya

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

* P-21

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

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

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

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

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

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

* P-22

糸状菌 *Aspergillus terreus* におけるイタコン酸生産制御機構についての研究

川尻康平¹, 浜田勇和¹, 柿崎徹也¹, 福井志帆¹, 金政真^{1,2} (¹中部大院・応生, ²中部大・環生科)

イタコン酸は不飽和基を有する二価の水溶性有機酸であり、合成樹脂や接着剤、インキ等の工業原料として幅広く利用されている。工業生産においては、生育速度の観点からもつばら *A. terreus* が使用されてきた。本菌のイタコン酸生産性向上を目的とした研究はこれまでに数多く行われてきたが、本菌におけるイタコン酸の生物学的な意義は未だに不明である。これまでに当研究グループでは、イタコン酸合成の鍵酵素であるシス・アコニット酸デカルボキシラーゼをコードする *cad1* 遺伝子を単離・同定し、解析してきた。本菌のイタコン酸生産性は、培養時の pH に大きく依存しており、pH4 よりも低い pH 条件で旺盛に生産することが知られているが、培養 pH がイタコン酸合成に関わる代謝酵素遺伝子の発現や転写因子の働きに与える影響の知見は少ない。本研究では、イタコン酸の生物学的意義の解明を目指し、培養 pH が遺伝子発現に与える影響を解析した。また、野生株とイタコン酸高生産性変異株 (TN-484 株) との遺伝子発現の比較も行った。

本菌を前培養し、グルコースを炭素源とした酸性条件 (pH2) と中性条件 (pH5~6.5) の合成培地に菌体を移して本培養した。一定時間培養後に菌体を回収し、RNA-seq により転写解析した。その結果、酸性条件では *cad1* 遺伝子の転写量は顕著に増加した。ゲノムの *cad1* 遺伝子の近隣にある遺伝子の転写量も上昇していた。さらに、野生株と TN-484 株の培養液に含まれるイタコン酸濃度と RNA-seq の結果を照らし合わせて比較したところ、TN-484 株の方がイタコン酸生産量のピークに達した後の減少が緩やかであり、*cad1* 遺伝子とその近隣の遺伝子の発現量も高い傾向が見られた。RNA-seq により転写量の変化が認められた遺伝子についての詳細な解析結果についても報告する。

Regulation of itaconic acid production in *Aspergillus terreus*

Kohei Kawajiri¹, Hayato Hamada¹, Tetsuya Kakizaki¹, Shiho Fukui¹, Shin Kanamasa^{1,2}

(¹Grad. Sch. Biotech. Chubu Univ., ²Dept. Envi. Biol., Chubu Univ.)

*P-23

アカパンカビのソルボース耐性 *col-26/amyR* 株のグルコース輸送体遺伝子発現とソルボース消費

平井献土, 加藤志穂, 一石昭彦, 藤村真 (東洋大院・生命科)

アカパンカビのグルコース抑制はグルコースセンサーSOR-4, ヘキソキナーゼHXK-2, 転写因子CRE-1及びCOL-26/AmyRによって構成されており, アミラーゼ・セルラーゼ等の発現が制御されている。我々は, これらの因子の中で *sor-4* 株と *col-26* 株のみがソルボース耐性を示すことを報告している。アミラーゼ等の発現はCRE-1が負に, COL-26が正にそれぞれ制御するとされているが, 両転写因子の関係は不明な点が多い。そこで, まず, 二重変異株 *col-26;cre-1* 株を作製した。*cre-1* 株はソルボース培地で野生株と同様にコロニー状の生育を示したが, 二重変異株は *col-26* 株と同様に菌糸状の生育を示した。遺伝子発現解析でも, *cre-1* 株はグルコース条件において, α -アミラーゼ遺伝子 *gh13-2* を高発現(野生株よりも30倍以上)していたが, 二重変異株は *col-26* 株と同様に低発現であった。コウジカビでは, ソルボース耐性にグルコース輸送体 *sorA* 遺伝子が関与することが報告されている。アカパンカビのオーソログ NCU04537 はCOL-26によって発現制御されていた。NCU04537株は *col-26* 株と *sor-4* 株ほど明瞭ではないものの, ソルボース培地で菌糸生育を示した。そこで, *col-26* 株と *sor-4* 株のグルコースとソルボースの培地中の濃度を経時的に測定した。その結果, 野生株では培養24時間で1%グルコースがほぼ消費されたが, *col-26* 株と *sor-4* 株では60%程度が残存しており, グルコース輸送体活性との相関が考えられた。一方, ソルボースの場合は, いずれの株でも90%程度が培地中に残存していた。これらの結果から, ソルボース耐性は, グルコース輸送体が関与するが, ソルボースをエネルギー源として利用する活性とは直接関係ないと考えられた。

Expression of glucose transporter genes and sorbose consumption in sorbose-resistance *col-26/amyR* mutant of *Neurospora crassa*.

Kenshi Hirai, Shiho Kato, Akihiko Ichiishi, Makoto Fujimura.

(Life science., Toyo Univ.)

P-24

麹菌接種チーズ熟成における酵素活性

鈴木聡¹, 大森英之¹, 林田空¹, 野村将¹, 小林美穂¹, 萩達朗¹, 成田卓美¹, 富田理¹, 山下秀行², 荒川洋輔³, 三浦孝之⁴, 佐藤薫⁴, 楠本憲一¹ (¹農研機構, ²樋口松之助商店, ³蔵王酪農センター, ⁴日獣生科大)

日本発の国産ナチュラルチーズを開発するため, 我々は麹菌に着目した。カマンベールチーズ, ブルーチーズ等のカビによる熟成チーズの製造では, チーズカードに接種された *Penicillium* 属菌の生産するリパーゼ及びプロテアーゼが製品チーズの風味に重要な役割を果たす。麹菌もまた, リパーゼ及びプロテアーゼを生産する能力がある。我々はチーズ熟成における麹菌の利用の可能性を検討するため, 1 cm角キューブチーズをモデルとして, ソフトタイプチーズ熟成工程におけるチーズカード中のリパーゼ及びプロテアーゼ活性を測定し麹菌株5株と市販 *Penicillium* 属菌(カマンベールチーズ熟成用菌株 *P. candidum* (Swing PCA 3)及びブルーチーズ熟成用菌株 *P. roqueforti* (Swing PR 4))との比較を行った。熟成温度は麹菌30°C, *Penicillium* 属菌25°Cで行った。カビ付け後3日間で供試した麹菌5菌株はキューブチーズのほぼ全面を覆ったので, この時点で一旦サンプリングを行った。また, カビ付け後5日間でキューブチーズのカードの軟化が観察されたため, 熟成を終了しサンプリングを行った。対照菌株の *Penicillium* 属菌のリパーゼ活性と比べると, 麹菌5菌株のうち3菌株は有意にリパーゼ活性が低く, 2菌株は *Penicillium* 属菌と同等の活性を示した。プロテアーゼ活性は, 麹菌1株で *Penicillium* 属菌と同等, 麹菌4株は有意にプロテアーゼ活性が高かった。

Lipase and protease activities in Koji cheeses

Satoshi Suzuki¹, Hideyuki Ohmori¹, Sora Hayashida¹, Masaru Nomura¹, Miho Kobayashi¹, Tatsuro Hagi¹, Takumi

Narita¹, Satoru Tomita¹, Hideyuki Yamashita², Yousuke Arakawa³, Takayuki Miura⁴, Kaoru Sato⁴, Ken-Ichi Kusumoto¹

(¹NARO, ²Higuchi Matsunosuke Shoten, ³Zao Dairy Center, ⁴NVLU)

* P-25 (O-2)

麹菌そのもの、および麹菌含有食品のプレバイオティクス効果について

野村亮¹, 都築翔¹, 児島孝明², 志水元亨¹, 加藤雅士¹ (¹名城大院・農, ²名大院・生命農学)

【緒言】麹菌は、清酒、醤油、味噌、甘酒、塩麹の製造など、我が国の発酵・醸造産業にとって不可欠の存在である。麹菌が生産する種々の酵素や代謝産物は、これらの発酵食品に味や香りを付与するだけでなく、それらの摂取を通じて我々ヒトに様々な健康効果をもたらすことが明らかになってきている。しかしながら、麹菌そのものの摂取が宿主にどのような影響を及ぼすのかは、ほとんど解明されていない。本研究では、麹菌そのもの、および麹菌を含有した食品の摂取が宿主の腸内環境に及ぼす影響について検討した。

【方法・結果】麹菌の摂取が腸内細菌叢にどのような影響を及ぼすかを明らかにするために、生きた麹菌の孢子および加熱滅菌した麹菌の孢子 5.0×10^4 個をそれぞれマウスに 14 日間毎日経口投与した。メタゲノム解析の結果、麹菌の生死に係らず、麹菌の孢子を摂取することで Firmicutes 門 (Erysipelotrichaceae 科) の細菌の割合が減少し、Actinobacteria 門 (Bifidobacterium 属) の細菌の割合が 2 倍増加した。これまでに、Erysipelotrichaceae 科細菌の増加が腸炎を引き起こし、Bifidobacterium 属細菌が生産する短鎖脂肪酸が大腸炎を緩和すると報告されている。そこで次に、麹菌の摂取が大腸炎を緩和するかを検討した。デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) を用いて人為的に大腸炎を誘発させたマウスに、生きた麹菌の孢子および加熱滅菌した麹菌の孢子 (5.0×10^4 個; 0.13 mg) を 19 日間毎日投与したところ、それらを投与しないマウス (コントロール) と比較して大腸炎による大腸の萎縮や組織の損傷が改善された。また、麹菌孢子から調製した細胞壁画分 (0.10 mg) を投与することでも同様に大腸炎が緩和された。さらに、麹菌を含有する食品 0.4% を含む餌を大腸炎マウスに摂取させたところ、同様に大腸炎が緩和された。以上の結果から、麹菌とその細胞壁画分、ならびに麹菌を含有した食品がプレバイオティクスとして利用できることが示された。

Prebiotic effect of *Aspergillus oryzae* and fermented foods containing *A. oryzae*

Ryo Nomura¹, Sho Tsuzuki¹, Takaaki Kojima², Motoyuki Shimizu¹, Masashi Kato¹

(¹ Grad. Sch. Agric., Meijo Univ., ² Grad. Sch. Bioagric., Sci., Nagoya Univ.)

* P-26

黒麹菌による 1-octen-3-ol 生産に対するリノール酸生合成遺伝子 *odeA* 破壊の影響

片岡涼輔¹, 坂口雅和², 渡邊泰祐^{1,2}, 山田修³, 荻原淳^{1,2} (¹日大院生資科・生資利用, ²日大生資科・生命化, ³酒総研)

【背景・目的】1-octen-3-ol は泡盛に含まれる代表的な香気物質の 1 つである。これまでの研究で、泡盛醸造に使用される黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* が製麹において 1-octen-3-ol を生産し¹⁾、製麹後の工程には本化合物の生成に直接関与する因子がないことを明らかにした²⁾。また、黒麹菌における 1-octen-3-ol の生合成には、脂肪酸オキシゲナーゼ *ppoC* が直接的に関与するという結果を得た^{1,2)}。PpoC はリノール酸を基質として 1-octen-3-ol 生合成に関与していると考えられるが、泡盛醸造の製麹において、黒麹菌の PpoC が原料米に含まれるリノール酸を利用しているのか、細胞内で生合成したリノール酸を利用しているのか、明らかではない。そこで本研究では、黒麹菌による 1-octen-3-ol 生産に対してリノール酸生合成遺伝子、オレイン酸デサチューラーゼをコードする *odeA* 破壊の影響について検討を行った。

【方法・結果】*A. luchuensis* のゲノムデータベース上において、*Aspergillus nidulans* の *odeA* と相同性が高い遺伝子を見出した。*odeA* 破壊株の取得は *A. luchuensis* $\Delta ligD$ 株を供試菌株としてアグロバクテリウム法を用いて実施した。得られた *odeA* 破壊株を用いて製麹を行い、麹に含まれる香気物質について GCMS 分析を行った。その結果、*odeA* 破壊株の麹に含まれる 1-octen-3-ol 量は、親株の半分以下であったことから、*odeA* が本化合物の生合成に関与していることが示された。現在、合成培地を用いて 1-octen-3-ol 生産性に対する脂肪酸添加の影響について評価しており、菌体外からの脂肪酸の取り込みについて検討を進めている。

1) Kataoka et al., *J Biosci Bioeng*, 129, 192-198 (2020). 2) Kataoka et al., *J Biosci Bioeng*, 130, 489-495 (2020).

Effect of linoleic acid biosynthesis gene *odeA* disruption on 1-octen-3-ol production in *Aspergillus luchuensis*

Ryosuke Kataoka¹, Masakazu Sakaguchi², Taisuke Watanabe^{1,2}, Osamu Yamada³, Jun Ogihara^{1,2}

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

* P-27

麹菌 *Aspergillus oryzae* 菌糸分散株の培養液混合特性とその酵素生産性への寄与

薄田隼弥¹, 武藤清明², 市川暉², 宮澤拳², 古明地敬介², 吉見啓^{3,4}, 加藤好一⁵, 阿部敬悦^{2,4} (1東北大・農, 2東北大院・農, 3京大院・農, 4東北大・未来研, 5佐竹化学・攪拌研)

糸状菌の液体培養では、菌糸形態で生育が進むと攪拌による混合状態が悪化することが知られる¹⁾。我々はこれ迄に、麹菌 *Aspergillus oryzae* の2種類の細胞壁多糖 α -1,3-グルカン (AG) とガラクトサミノガラクトン (GAG) の二重欠損 (AG Δ -GAG Δ) 株がフラスコでの組換え酵素生産に適していることを示してきた²⁾。ジャー型発酵槽においては、AG Δ -GAG Δ 株では培養48時間目以降の酵素生産量が野生株の2倍近くに達し³⁾、AG Δ -GAG Δ 株は培養液の粘度が低下したことが明らかになった³⁾。更に、槽内での培養液の流動性について Computational Fluid Dynamics シミュレーションを実施した結果、AG Δ -GAG Δ 株は野生株に比べて培養液の流動性が高いことが示唆された⁴⁾。そこで、本研究ではジャー型発酵槽における AG Δ -GAG Δ 株の培養性状が酵素生産量の増加をもたらす要因を解明することを目的とし、培養中のグルコース消費量、排出ガス中の O₂ および CO₂ 濃度変化を分析した。その結果、AG Δ -GAG Δ 株は培養36時間目までのグルコース消費量が野生株より約2倍大きく、排出 CO₂ 濃度が30時間目から48時間目まで野生株よりも断続的に高かった。AG Δ -GAG Δ 株では培養液粘度の低下により攪拌性が向上した結果、解糖系-TCA サイクルによる糖代謝量が増加し、酵素生産量の向上に寄与したと考えられる。

1) Cairns et al. *Biotechnol. Biofuels* (2019) 12:77; 2) Miyazawa et al. *Front. Microbiol.* (2019) 10:2090; 3) 古明地ら, 日本生物工学会大会, p. 146 (2018);

4) 市川ら, 日本生物工学会大会, p. 129 (2019)

Relationship between the mixing properties and the productivity of the hyphal dispersed *Aspergillus oryzae* mutant in batch culture

Shunya Susukida¹, Kiyooki Muto², Hikaru Ichikawa², Ken Miyazawa², Keisuke Komeiji², Akira Yoshimi^{3,4}, Yoshikazu Kato⁵, Keietsu Abe^{2,4}

(¹Dept. Agric., Tohoku Univ., ²Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., ³Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., ⁴NICHe, Tohoku Univ., ⁵Satake Ltd.)

* P-28

Improvement of Monacolin K Hyperproducing Mutant Strains in *Monascus purpureus* through Synchrotron Light Irradiation and Comparative Genome Analysis

Sittichoke Ketkaeo^{1,2}, Yukio Nagano^{1,3}, Shuichiro Baba^{1,2}, Kei Kimura^{1,2}, Taiki Futagami^{1,4}, Werasit Sanpamongkolchai⁵, Genta Kobayashi^{1,2}, Masatoshi Goto^{1,2}

(¹United Grad. Sch. Agri. Sci., Kagoshima Univ., ²Fac. Agri., Saga Univ., ³Anal. Res. Cen. Exp. Sci., Saga Univ., ⁴Fac. Agri., Kagoshima Univ., ⁵Dept. Biotechnol., Kasetsart Univ.)

Monascus purpureus have been used worldwide in food consumption as well as medical therapeutic treatment in *koji* terms. The most beneficial substance derived by *M. purpureus* was monacolin K (MK), an agent for competitively inhibit cholesterol synthesis as one of secondary metabolites. An alternative mutation tool, synchrotron light irradiation was applied with the expectation to improve the MK hyper-producing strain of *M. purpureus* KUPM5. After screening approximately 900 colonies, three mutant strains were selected by plate bioassays. Mutant strains SC01 and SC03 after cultivated in *koji* produced more than 1.5-folds higher while strain SC02 produced three folds higher and also retained the metabolites capabilities in pigment production, mycelial contents and amylolytic enzyme activity when compared to the parental strain KUPM5. The result of genome comparative analysis for wt and three mutant strains showed the synchrotron light induced mutations within genes including 5'-UTR, CDS with introns, and 3'-UTR approximately by 90% of the total genes. The frequencies of transversion and transition substitutions occupied by 92.38% and 7.62%, respectively. The localization of MK gene cluster was also observed which scattered in different scaffolds. This study established that synchrotron light was particularly powerful for strain improvement of the filamentous fungus *M. purpureus* and offered understanding of the determinants of mutation in the fungus caused by synchrotron light.

* P-29(O-1)

ゲノム編集技術を利用した大規模欠損による麹菌に特徴的な染色体領域の機能解析

知見悠太¹, 山口勝司², 齋藤直也¹, 片山琢也^{1,3}, 重信秀治², 丸山潤一^{1,3} (¹東大院・農生科・応生工,
²基生研, ³東大・CRIIM)

麹菌 *Aspergillus oryzae* は日本の醸造微生物であり、高い酵素活性を示すなどの特性を有し、日本酒・醤油・味噌などの用途に応じて多様な実用株が存在する。近年、次世代シーケンサーを利用して多数の *A. oryzae* 実用株のゲノム配列が報告されてきているなか、染色体レベルの大規模な領域の違いについて十分な比較はなされていない。本研究では、*A. oryzae* の株ごとのゲノム情報比較から特徴的な染色体領域を探索、ゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 システムを利用して大規模欠損による機能解析を行った。

ロングリードシーケンスにより得られた *A. oryzae* 株の染色体構造を比較した結果、株間で異なる染色体に位置する約 120 kb の領域を見いだした。また、これと相同性を示す染色体領域について、*A. oryzae* および醤油麹菌 *Aspergillus sojae* の多くの株が有するのに対し、それぞれの祖先とされる *Aspergillus flavus* および *Aspergillus parasiticus* の株の大部分には存在しないことがわかった。以上の結果から、見いだした特徴的な染色体領域が日本の醸造微生物としての特性に関係する可能性が考えられた。そこで、特徴的な染色体領域の機能を調べるため大規模欠損を行った。染色体構造レベルの改変にはゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 システムを用いることで、長さが 100 kb を超える領域の大規模欠損に成功した。現在、取得した大規模欠損株において酵素生産能などの醸造特性に関する影響を解析している。

Functional analysis of a chromosomal region mainly found in *Aspergillus oryzae* strains by genome editing

Yuta Chiken¹, Katsushi Yamaguchi², Naoya Saito¹, Takuya Katayama^{1,3}, Shuji Shigenobu², Jun-ichi Maruyama^{1,3}

(¹Dept of Biotechnol, The University of Tokyo, ²NIBB, ³CRIIM, UTokyo)

* P-30

麹菌由来界面活性タンパク質 Hydrophobin RolA の自己組織化メカニズム解析

井田大輝¹, 齋藤有美¹, 寺内裕貴², 吉見啓³, 田中拓未⁴, 石崎裕也⁵, 三ツ石方也⁵, 藪浩^{6,7}, 阿部敬悦¹

(¹東北大院・農, ²京大院・地球環境学堂, ³京大院・農, ⁴農研機構・農環研, ⁵東北大院・工, ⁶東北大・WPI-AIMR, ⁷東北大・多元研)

麹菌 *Aspergillus oryzae* が産生する Hydrophobin RolA は界面に集合して両親媒性単分子膜を形成後、rodlet と呼ばれるアミロイド β 様の棒状構造へと自己組織化する⁽¹⁾。本研究では、RolA の rodlet 構造への自己組織化メカニズムの解明、ならびに自己組織化と RolA の界面科学的性質との関係を明らかにすることを目指した。まず、精製 RolA を用いて水面上単分子膜 (Langmuir 膜) を作製し、原子間力顕微鏡でその表面構造を観察した。その結果、RolA WT は密集した rodlet 構造を形成した一方で、RolA 二重変異体 L137S/L142S では rodlet 形成能が失われていた。さらに、単変異体 L137S, L142S を用いた解析結果から、L137 と L142 の両残基が RolA の自己組織化に協奏的に寄与すること、ならびに両 Leu 残基を介した RolA 分子間の疎水性相互作用が rodlet 形成の重要な駆動力であることが示唆された。次に、Pendant Drop 法による RolA の表面張力測定を行った。その結果、RolA は単分子膜から rodlet 膜への自己組織化を引き起こすことで、表面張力を単分子膜状態よりも大きく低下させることが示唆された。(1) Y. Terauchi *et al.*, *Biosci., Biotechnol., Biochem.* (2020)

Analysis of the self-assembly mechanism of the fungal hydrophobin RolA.

Daiki Ida¹, Yumi Saito¹, Yuki Terauchi², Akira Yoshimi³, Takumi Tanaka⁴, Yuya Ishizaki⁵, Masaya Mitsuishi⁵, Hiroshi Yabu^{6,7}, Keietsu Abe¹

(¹Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., ²Grad. Sch. Glob. Env. Stud., Kyoto Univ., ³Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., ⁴NARO・NIAES, ⁵Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ., ⁶WPI-AIMR, Tohoku Univ., ⁷IMRAM, Tohoku Univ.)

* P-31

麹菌におけるゲノム編集を利用した多重代謝遺伝子改変による異種天然物高生産系の構築

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

麹菌 *Aspergillus oryzae* における異種天然物の生産性向上のためには、異種経路へつながる代謝を増強させる多重の遺伝子改変が不可欠である。加えて、構築した高生産系が他の天然物生産に容易に利用できることが求められる。我々は *A. oryzae* におけるゲノム編集を利用した高効率の多重遺伝子改変技術を確立したことで¹⁾、大規模な代謝改変を試みるのが可能になった。異種天然物のモデルとして担子菌由来のジテルペン pleuromutilin について、4 重代謝改変により 4.8 倍の生産量増加に成功した²⁾。本研究では、より大規模な代謝経路の増強による *A. oryzae* における異種天然物の生産性向上と、他の天然物高生産への適用を目的とした。

複数遺伝子の過剰発現による代謝増強を行うために開発した過剰発現カセットを連続的に導入する手法を用いて、4 重代謝改変株の *wA* 遺伝子座に 8 個のメバロン酸経路遺伝子の過剰発現カセットを導入した 12 重代謝改変株を取得した。取得した株の生産量は代謝改変を行っていない株と比較して約 7 倍に増加した。さらに、多重代謝改変株から pleuromutilin 生合成遺伝子を脱落させたのち、DNA 合成阻害活性をもつジテルペン aphidicolin の生合成遺伝子を導入した。現在、aphidicolin の生産量を調べることにより、取得した多重代謝改変株の汎用的な高生産宿主としての利用が可能であるか検討している。

1) Katayama *et al.* (2019) *Appl. Environ. Microbiol.* 2) 齋藤ら, 第 19 回糸状菌分子生物学コンファレンス

Construction of high-level production system of heterologous natural products in *Aspergillus oryzae* by metabolic engineering based on multigene targeted-genome editing

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

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

* P-32

糸状菌 *Trichoderma reesei* における CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集

大武侑平¹, 志田洋介¹, 織田健², 岩下和裕², 小笠原渉¹ (¹長岡技科大・生物, ²酒類総研)

Trichoderma reesei はセルラーゼ高生産菌であり植物バイオマスの利用のために重要な糸状菌である。本菌の分子生物学的な解析には、相同組換えによる形質転換によって対象となる遺伝子機能の解析をすることが主流であったが、相同組換え効率の低さが研究のボトルネックであった。そこで、本研究では *T. reesei* における CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集の実験系を構築し、目的遺伝子の機能欠損株や改変株を簡便に取得することを目的とした。

菌体外タンパク質の中で最大量を示すセロビオヒドロラーゼ (CBHI) を標的として、その遺伝子 *cbh1* の両端にアニーリングするガイド RNA (gRNA) を設計した。また、*cbh1* の上流および下流領域の 50 bp を付加したプライマーを用いてハイグロマイシン耐性遺伝子 *hph* を PCR で増幅しドナー DNA (dDNA) を取得した。Cas9 タンパク質と gRNA を *in vitro* で結合させた後、プロトプラスト-PEG 法により dDNA と同時に細胞へ導入した。得られた候補株をセルラーゼ誘導培地で培養し上清サンプルの SDS-PAGE を行った結果、解析した全ての株で CBHI 生産能の消失が確認された。また、PCR で *cbh1* 遺伝子座への dDNA 挿入が確認された 8 株を対象にサザンブロット解析を行ったところ、6 株で dDNA が 1 コピーで挿入されていた。以上の結果から、*T. reesei* において *in vitro* CRISPR/Cas9 による標的遺伝子の破壊が有効であることが示された。あわせて、切り出された *cbh1* が再びゲノムに組み込まれるという現象も観察された。現在は確立された方法を用いた複数遺伝子同時破壊の実験系を構築中である。

CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing in filamentous fungus *Trichoderma reesei*

Yuhei Otake¹, Yosuke Shida¹, Ken Oda², Kazuhiro Iwashita², Wataru Ogasawara¹

(¹Nagaoka Univ. of Technology, ²NRIB)

* P-33

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* のエンドサイトーシス関連因子 AipA と AoAbp1 がエンドサイトーシスに及ぼす影響の解析

日浅怜子, 竹川薫, 樋口裕次郎 (九大院・生資環)

エンドサイトーシスは、細胞膜タンパク質や細胞外の物質を細胞内に取り込む機構であり、栄養源の獲得やシグナル伝達などの生理機構に重要である。黄麹菌 *Aspergillus oryzae* は、安全で有用な真核微生物であり、有用酵素を菌体外に大量分泌できるものの、細胞内輸送経路については未だ明らかになっていない点も多い。我々は、黄麹菌のエンドサイトーシスに関わる因子 AoAbp1 と相互作用する AAA ATPase である AipA を見出し、AipA はエンドサイトーシスを負に制御することが示唆されたが、未だ詳細な機能は明らかになっていない。本研究では、AipA と AoAbp1 のエンドサイトーシスにおける分子機構の一層の解明を目的とした。

選択的にエンドサイトーシスを誘導できるマーカーとして、アルギニントランスポーター AoCan1 に緑色蛍光タンパク質 EGFP を融合した AoCan1-EGFP 発現株を作製し、経時的解析を行った。その結果、*aipA* 過剰発現株では WT と比べて、エンドサイトーシスが遅延したことから、AipA はエンドサイトーシスを負に制御することが強く示唆された。また、AipA の AAA ATPase 活性部位に変異を導入した *aipA*^{K542A} 過剰発現株において、変異のない *aipA* 過剰発現株でみられたエンドサイトーシスの遅延が見られなくなった。一方、*aipA*^{E596Q} 過剰発現株においては、WT よりもエンドサイトーシスが亢進していた。これらの結果より、AipA の機能には、AAA ATPase 活性が重要であるとともに、変異 K542A と変異 E596Q がエンドサイトーシスに異なる影響を与えることが示唆された。さらに、 Δ *aoabp1* 株および Δ *aipA* Δ *aoabp1* 株では、ともにエンドサイトーシスが遅延したことから、AipA は AoAbp1 の下流で機能することが示唆された。

Analysis of the effect of endocytosis-related factors AipA and AoAbp1 in endocytosis in *Aspergillus oryzae*

Reiko Hiasa, Kaoru Takegawa, Yujiro Higuchi

(Bioresource and Bioenvironmental Dept., Kyushu Univ.)

P-34

Aspergillus nidulans におけるキチン合成酵素 ChsB の菌糸先端局在への AP-2 複合体の寄与

金京運¹, 岩間亮^{1,2}, 堀内裕之^{1,2} (1 東大院・農生科・応生工, 2 東大・微生物連携)

糸状菌は適切な菌糸生長のために、細胞壁合成に関わる膜タンパク質を細胞膜から回収し、菌糸先端へと輸送している。エンドサイトーシスがこれら膜タンパク質の回収に関与し、AP-2 複合体が特定の基質の認識に関わると考えられている。*Candida albicans* では AP-2 複合体がクラス IV キチン合成酵素である Chs3 を菌糸内へと取り込むことが示され、*Fusarium graminearum* では AP-2 複合体の欠失により生育の遅延及び病原性の低下が見られている。*Aspergillus nidulans* においても、AP-2 複合体の欠損が異常な菌糸形態や異常なキチン分布に繋がることが示されていたが、その原因は明らかになっていなかった (1)。

今回我々は、以前作製した AP-2 複合体を構成する 4 つのサブユニット (α , β 2, μ 2, σ 2) をそれぞれ欠失した AP-2 複合体欠損株を用い検討を行った。各欠損株では、キチンの細胞表層における異常な分布が見られ、キチン含量が上昇しており、細胞壁完全性の維持に関わる cell wall integrity pathway の活性化も見られた。次に、*A. nidulans* の菌糸先端生長において非常に重要な役割を持つクラス III キチン合成酵素 ChsB の局在への AP-2 複合体の欠損の影響を解析した。ChsB は、野生型株では菌糸先端部に主に局在するが、AP-2 複合体欠損株では菌糸先端における存在量が低下し、菌糸後方の表層部分まで局在することが示された。一方、糸状菌のエンドサイトーシスに必須の因子をコードする *wspA* (2) の発現を抑制した条件では、菌糸先端における ChsB の存在量が AP-2 複合体欠損株よりも低下し、AP-2 複合体欠損株より更に菌糸後方表層部分にまで局在が示された (3)。これらの解析から、AP-2 複合体は細胞表層の ChsB を効率良く菌糸内へと取り込み、菌糸先端へリサイクルすることにより、正常な細胞壁の維持に関与することが示唆された。

1. Martzoukou *et al.* (2017). *Elife*. **6**, 1–26; 2. Hoshi *et al.* (2016). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **80**, 1802–1812

3. Jin *et al.* (2021). *Fungal Biol.* doi:10.1016/j.funbio.2021.05.009.

AP-2 complex contributes to the hyphal tip localization of a chitin synthase ChsB in *Aspergillus nidulans*

Jingyun Jin¹, Ryo Iwama^{1,2}, Hiroyuki Horiuchi^{1,2}

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

* P-35

糸状菌・細菌の相互作用における pH の影響と生態系における役割

頼永萌々佳, 工藤凱門, Gayan Abeysinghe, 高谷直樹, 竹下典男 (筑波大・MiCS)

糸状菌と細菌は土壌中のバイオマスの大部分を占める主要な微生物であり、両者が相互作用を通じて特徴的な機能を発揮することが明らかになってきた。糸状菌 *Aspergillus nidulans* と枯草菌 *Bacillus subtilis* をプレート上で共培養することで、*B. subtilis* が菌糸上を移動し、菌糸生長を利用し拡散・増殖することが示された (Life Sci Alliance 2020)。そこでは *B. subtilis* が分泌するビタミン B1 (チアミン) が菌糸生長を促進することも示されている。様々な糸状菌と細菌の多様な組み合わせの共培養を用いた解析から、相互作用の選択性・特異性が示されている。特に *Aspergillus* 属の複数の糸状菌と *B. subtilis* との相互作用を解析したところ、*B. subtilis* が *Aspergillus niger* の菌糸上は移動しないことが判明した。クエン酸生産に利用される *A. niger* の菌糸上を *B. subtilis* が移動しない原因として菌糸周辺の pH が考えられたため、異なる pH 環境あるいはクエン酸分泌に関わるトランスポーター欠損株における *B. subtilis* の挙動を解析した。さらに、土壌中あるいは植物根から共存する糸状菌と細菌を単離し、共培養における相互作用を解析した。土壌中における菌糸生長と細菌の移動を再構築系で検証した。さらに植物根に内生する糸状菌と菌糸に乗って移動する細菌を用いて、植物根に集合する細菌における糸状菌の菌糸生長の役割を解析した。これらの解析を通じて、生態系における糸状菌と細菌の相互作用の役割を明らかにするとともに、相互作用の選択性・特異性に関わる分子機構を明らかにすることを目指す。

Effect of pH on filamentous fungus-bacteria interactions and its role in ecosystems

Momoka Yorinaga, Gamon Kudo, Gayan Abeysinghe, Naoki Takaya, Norio Takeshita

(MiCS, Univ. of Tsukuba)

* P-36

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

小川翠, 溝上哲哉, 鈴木遥香, 佐々木信光, 山形洋平 (農工大院・応生化)

Insulysin は真核生物で広く見られる metalloendopeptidase の 1 つであり、黄麹菌 *Aspergillus oryzae* には 3 つの insulysin 遺伝子が存在する (以下 *insA*, *insB*, *insC*)。酵母 *Saccharomyces cerevisiae* においては、2 つの遺伝子しか存在しないことから、*A. oryzae* の insulysin が特異的な機能を有する可能性が考えられた。また、*S. cerevisiae* の insulysin ホモログはミトコンドリアで機能することが明らかとなっており、*A. oryzae* においてもミトコンドリアに局在する可能性が考えられた。

本研究では InsA, InsB, InsC の機能を解析するにあたり、InsA, InsB, InsC と HA tag, DsRed の融合タンパク質発現株を作製し、蛍光観察や細胞分画とウエスタンブロット解析を用いた生化学的解析による局在解析を行った。その結果、InsA が酵母 insulysin である Cym1p と同様に、ミトコンドリアに局在する可能性が示唆された。一方、InsB, InsC に関しては、ミトコンドリア以外のオルガネラに局在する可能性が示唆された。InsB, InsC のより詳細な局在決定のために、細胞分画条件の検討を行い、ミトコンドリア、リソソーム、ペルオキシソームの分離を可能とした。ショ糖密度勾配を用いた細胞分画とマーカー酵素の活性測定による各 insulysin ホモログの局在解析について報告する。

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

Midori Ogawa, Tetsuya Mizokami, Haruka Suzuki, Nobumitsu Sasaki, Youhei Yamagata

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

* P-37

糸状菌 *Aspergillus nidulans* における Sec14 ファミリータンパク質の生理機能の解析

楊淳兒¹, 須澤徹生¹, 岩間亮^{1,2}, 福田良一^{1,2}, 堀内裕之^{1,2} (¹東大院・農生科・応生工, ²東大・微生物連携機構)

リン脂質は生体膜の主要構成成分であり、特にその頭部の構造により、ホスファチジン酸 (PA), ホスファチジルセリン (PS), ホスファチジルエタノールアミン (PE), ホスファチジルコリン (PC), ホスファチジルイノシトール (PI)などに分類される。これらリン脂質の合成酵素はそれぞれ特異的なオルガネラに局在しており、各々の生体膜間でリン脂質が輸送されることが重要である。生体膜間リン脂質輸送において、小胞輸送に依存しないリン脂質輸送が知られており、それに関わるタンパク質は脂質輸送タンパク質(LTP)と呼ばれる。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* や哺乳細胞について、LTP の生理的意義が精力的に解析されているが、糸状菌では LTP の役割がほとんど解析されていない。今回、我々は LTP の一種である Sec14 とそのホモログである Sfh (Sec-fourteen homolog)タンパク質群に着目した。*S. cerevisiae* において、Sec14 は生育に必須であり、PI や PC を輸送するタンパク質として知られているが、Sfh タンパク質の欠損は *S. cerevisiae* の生育に通常の培養条件では影響を与えないことが知られていた。一方で、二形性かつ *n*-アルカン資化性酵母 *Yarrowia lipolytica* では、Sfh2 オルソログが *n*-アルカン資化に必要なことが示されるなど、*S. cerevisiae* 以外の生物種において、Sfh タンパク質群の機能の重要性が示唆されている。そこで糸状菌 *Aspergillus nidulans* において、Sfh タンパク質をコードする遺伝子 9 種についてそれぞれの単独欠失株を作製し解析を行った。*SEC14/SFHI* と類似性の高い *sfhA* 単独欠失株では顕著な生育の悪化が観察され、菌糸や分生子形成器官に著しい形態異常が認められた。その他の *sfh* 遺伝子の単独欠失株では野生型株と比較して顕著な生育の差は見られなかったが、菌糸形態に異常が認められるものが存在した。本発表では、これらの解析を含めた *A. nidulans* における Sec14 ファミリータンパク質の機能について報告する。

Analysis of the physiological functions of Sec14-family proteins in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*

Chuner Yang¹, Tetsuki Suzawa¹, Ryo Iwama^{1,2}, Ryouichi Fukuda^{1,2}, Hiroyuki Horiuchi^{1,2}

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

* P-38

Aspergillus oryzae のホスファチジルコリン合成関連遺伝子の機能解析

須澤徹生¹, 岩間亮^{1,2}, 福田良一^{1,2}, 堀内裕之^{1,2} (¹東大院・農生科・応生工, ²東大・微生物連携機構)

リン脂質はオルガネラ等を構成する生体膜の主要構成成分であり、多様な種類が存在する。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を筆頭としたモデル生物において、リン脂質合成経路に関する研究が精力的に行われ、それぞれのリン脂質が特有のオルガネラ膜上で合成されることが知られている。我々の研究室では、糸状菌 *Aspergillus nidulans* におけるリン脂質合成に関する研究を行ってきており、*S. cerevisiae* と *A. nidulans* ではリン脂質合成制御が一部異なること、*A. nidulans* の菌糸生長においてリン脂質組成の維持が重要であることが示唆されている(1)。今回、顕著なタンパク質分泌能などを有し産業上有用な糸状菌である *Aspergillus oryzae* に着目し、リン脂質生合成遺伝子の発現を制御できる株を構築することにより、形態形成への影響とタンパク質分泌能へのリン脂質の影響を解析した。ホスファチジルエタノールアミン (PE)からホスファチジルコリン (PC)への変換の最初のステップに関わる *S. cerevisiae* の遺伝子 *CHO2/PEM1* の *A. oryzae* のオルソログを *pemA* と命名し、その発現を抑制したところ、*A. oryzae* においても野生型株に比べ PE 量が増加していることが示された。この発現抑制条件下では、顕著な生育阻害も見られた。また、*pemA* を高発現させたところ、分生子形成器官の形態が異常になった。さらに、PE から PC への変換の次のステップに関わる遺伝子である *S. cerevisiae* *OPI3/PEM2* のオルソログを *pemB* と命名し解析した結果、*pemB* についても *pemA* の発現を変化させた場合と同様の表現型となることが示された。本発表では、タンパク質分泌能への影響も含めて、リン脂質生合成遺伝子を発現制御することで変化する *A. oryzae* の特性について報告する。

1) Takagi, K., et al., *J. Biosci. Bioeng.*, **131**(2), 139-146 (2021).

Functional analysis of phosphatidylcholine synthesis-related genes of *Aspergillus oryzae*

Tetsuki Suzawa¹, Ryo Iwama^{1,2}, Ryouichi Fukuda^{1,2}, Hiroyuki Horiuchi^{1,2}

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

* P-39

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* の菌体外ペプチダーゼ PepO 及び OcpO 欠損が酸性ペプチダーゼ生産に与える影響

佐藤光希子, 内平瑛子, 上野綾子, 田中瑞己, 山形洋平 (農工大院・応生化)

ゲノム解析の結果, 黄麹菌 *A. oryzae* には酸性ペプチダーゼの遺伝子の割合が多いことが明らかになっている。本研究では *A. oryzae* の主要な菌体外分泌型酸性ペプチダーゼのうちアスパルティックエンドペプチダーゼ (APase) に分類される PepO およびセリントイプカルボキシペプチダーゼ (CPase) に分類される OcpO の2つの酵素に着目し, *A. oryzae* RIB40 においてこれらの単欠損株および両欠損株を作製した。これら大豆たんぱく質を窒素源とした液体培地で 36 時間培養し, 培養上清中のペプチダーゼ活性, および酸性ペプチダーゼ遺伝子の転写解析を行った結果を報告する。pH 3.0 においてカゼインを基質としたペプチダーゼ活性は, PepO の欠損で約 2 割に低下した。この PepO 欠損時に残存する活性は, pepstatin, EDTA, PMSF, antipain のいずれにも阻害されなかった。pH 3.5 における Z-Glu-Tyr に対する CPase 活性は, コントロール株に比べ $\Delta ocpO$ 株で約 5 割, $\Delta pepO \Delta ocpO$ 株で約 6 割に低下した。pH 4.0 における Z-Arg-Arg-MCA 分解活性は, PepO の欠損で約 6 割に低下した。この活性は EDTA で約 1 割, antipain でほぼ完全に阻害された。pH 5.0 におけるトリペプチジルペプチダーゼ活性は, PepO の欠損で上昇する傾向が見られた。酸性ペプチダーゼ遺伝子の転写解析の結果, $\Delta pepO \Delta ocpO$ 株ではコントロール株に比べ APase に分類される AO090013000667 および glutamic endopeptidase に分類される *pipA* の転写量が約 2 倍に上昇した。

Effect of deficiency of extracellular peptidases PepO and OcpO on acidic peptidase production in *Aspergillus oryzae*

Mikiko Sato, Eiko Uchihira, Ayako Ueno, Mizuki Tanaka, Youhei Yamagata

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

* P-40

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* における *egfp* プローブを用いた smFISH による mRNA 局在解析

守田湧貴, 竹川薫, 樋口裕次郎 (九大院・生資環・生命機能)

mRNA の細胞内局在化機構は, タンパク質の翻訳・成熟・局在を制御する上で重要である。黄麹菌 *Aspergillus oryzae* は, 有用酵素の分泌高生産性を有するため, タンパク質分泌メカニズムの解明に向けて, 細胞内輸送に関する細胞生物学的研究が行われてきた。しかし, これまでの研究では主にタンパク質レベルでの解析にとどまり, タンパク質が翻訳前にどのような制御を受けているのか十分に明らかにされていない。そこで本研究では, 黄麹菌においてこれまでに解析のなされてきた細胞内構造やオルガネラに関連したタンパク質に対して, それらの mRNA 局在を解析し, タンパク質局在との関連性を明らかにすることを目的とした。

改変型緑色蛍光タンパク質(EGFP)を目的タンパク質と融合発現する株において, *egfp* に特異的な塩基配列で構成され赤色蛍光標識したプローブを用いた single-molecule fluorescence in situ hybridization (smFISH)法により, mRNA を可視化した。対照には, EGFP を発現しない野生株である RIB40 および細胞質に EGFP を発現する株を用いた。また, EGFP および EGFP 融合タンパク質はすべて *amyB* プロモーター下で発現させることにより, 同様の発現条件下での局在解析を行った。smFISH 操作の前後でタンパク質の局在に大きな変化が無いことを確認し, Lifeact (アクチン細胞骨格), AoSec22 (小胞体), AoSnc1 (分泌小胞), AoUapC (細胞膜), AoVam3 (液胞膜)のそれぞれと EGFP を融合したタンパク質とそれらに対応する mRNA の局在解析を行った。その結果, タンパク質と mRNA の局在が異なる場合があり, それらを制御する分子機構の存在が示唆された。

mRNA localization analysis by smFISH using an *egfp* probe in *Aspergillus oryzae*

Yuki Morita, Kaoru Takegawa, Yujiro Higuchi

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

P-41 (O-5)

マイコウイルスが *Aspergillus flavus* の表現型に与える影響の普遍性を解明する

黒木美沙¹, 浦山俊一^{1,2}, 矢口貴志³, 萩原大祐^{1,2} (¹筑波大・生命環境, ²筑波大・MiCS, ³千葉大真菌)

環境中から単離された糸状菌には一定の割合でマイコウイルスが感染している。そのほとんどは不顕性だと考えられてきたが、近年、マイコウイルスの感染により宿主の培養性状や遺伝子発現が変化するという報告が増えている。これらの報告は、特定の宿主-ウイルスの間で観察されたもので、宿主に対するウイルスの普遍的な影響であるか判別できない。ウイルスの宿主への影響の理解が深まれば、ウイルスにより糸状菌のもつ特性を人為的に増幅・抑制することが可能となり、糸状菌の活用範囲は今以上に広がると考えられる。そこで本研究では、*Aspergillus flavus* を研究対象とし、多様なウイルス種の探索と、それらの宿主に対する影響を網羅的に解析し並列に評価することで、ウイルス機能の体系的な理解を目指す。

アスペルギルス症患者や土壌などから単離された 72 株の *A. flavus* 野生株のうち 7 株でマイコウイルスの感染を確認した。検出されたウイルス種は 6 種で、7 株の *A. flavus* のうち 3 株には共通のウイルス種が感染していた。ウイルス保持株からウイルスを除去したウイルスフリー株をそれぞれ作出し、生育速度、菌糸形態、形成胞子数、胞子形態、共培養での抗菌活性、代謝化合物などの表現型を観察した。一部の株では、ウイルス感染により生育速度や形成胞子数が変化することがわかった。また、ほとんどの株で代謝化合物の変化が見られ、特にアフラトキシンやシクロピアゾン酸などの重要なカビ毒の生産量に大きな変化が見られる株もあった。複数の *A. flavus* 菌株-ウイルス種セットで比較すると、変化のあった化合物種は株により異なっており、その株やウイルス種により表現型への影響が大きく異なることがわかった。今後は、表現型に変化の見られた条件で RNA-seq を行い、ウイルス感染株と非感染株での比較を行うとともに、自然宿主ではない菌株へのウイルスの導入を検討していく予定である。

Exploring mycovirus's general effect on phenotype of *Aspergillus flavus*.

Misa Kuroki¹, Shun-ichi Urayama^{1,2}, Takashi Yaguchi³, Daisuke Hagiwara^{1,2}

(¹Fac. of Life and Env. Sci., Univ. of Tsukuba, ²MiCS, Univ. of Tsukuba, ³MMRC, Chiba Univ.)

* P-42

アスパラガス疫病菌に感染する *Phytophthora endornavirus* の完全長 cDNA クローン構築

作田康平¹, 内田景子², 福原敏行¹, 植松清次², 森山裕充¹ (¹農工大院・農, ²農工大・細胞分子)

アスパラガス疫病菌 *Phytophthora* sp. CH98ASP059 株に共感染する 2 種のエンドルナウイルス *Phytophthora endornavirus2* (PEV2) と *Phytophthora endornavirus3* (PEV3) は、生育抑制や薬剤感受性変化等を宿主にもたらす (Uchida, K., et al., 2021)。そこで、PEV2 と PEV3 が宿主に与える影響や機能に関する解析を深化させることを目的とし、これらエンドルナウイルスの完全長 cDNA クローンの構築を試みた。長鎖の RNA ゲノムのクローニング手法としては、酵母細胞の DNA 相同組み換え技術を利用することより、PEV2 (14.3kb) と PEV3 (13.8kb) の完全長 cDNA クローンの構築に成功した。PEV2 と PEV3 の各全長 cDNA 導入酵母は、コントロール株に比べて生育速度が遅かった。生菌細胞数の比較では、PEV2 導入酵母は 16 時間後に有意な減少がみられた。長鎖 RNA ゲノムを有するエンドルナウイルスの全長 cDNA クローン構築の報告は初であり、今後、酵母異種発現系を利用し、本ウイルスが疫病菌や農作物などの宿主細胞に付与する潜在的な機構について解析を進めていきたい。

Construction of full-length cDNA clones of *Phytophthora endornaviruses* infecting a *Phytophthora* pathogen of *Asparagus officinalis*.

Kohei Sakuta¹, Keiko Uchida², Toshiyuki Fukuhara¹, Seiji Uematsu², Hiromitsu Moriyama¹

(¹TUAT, ²TUAT bcell)

P-43

子嚢殻形成における Kex2 切断反復タンパク質の役割

梅村舞子¹, 栗岩薫¹, 萩原大祐², 豊留孝仁³, 榊尾俊介², 高谷直樹², 矢口貴志⁴, 渡辺哲⁴, 亀井克彦⁴

(¹産総研・生物プロセス, ²筑波大・生命環境, ³帯広畜産大・獣医, ⁴千葉大・真菌センター)

Kex2-processed repeat protein (KEP) は Kex2 ペプチダーゼが切断する反復タンパク質であり、ほぼすべての糸状菌に一株平均 5 個保存されている普遍的な因子だが (Marquer et al., *BMC Genomics*, 20:64, 2019), その生物学的機能はほとんど明らかになっていない。これまでの Fungi 界 1461 株のドライ解析により、本因子群は種特異的に高い多様性を示し、糸状菌の種/属レベルでの自己認識や有性生殖に関与する可能性が示唆された (Umemura, *Fungal Biol. Biotechnol.*, 7:11, 2020)。そこで本研究では、ホモタリックな種である *Aspergillus nidulans* 及び *Neosartorya fischeri* のうち子嚢殻形成度の異なる各 2 株を選択し、ゲノム解析と全遺伝子発現解析によって KEP 因子の子嚢殻形成への関与を調べた。まず *A. nidulans* のうち、子嚢殻形成度の高い A4 株に対し形成度の低い IFM 65258 株を選択し、A4 株に対するマッピングアセンブリを行った。すると IFM 65258 株は A4 株の 99.7% と高いゲノム相同性を示したにもかかわらず、A4 株の持つ 3 つの KEP 因子遺伝子のうち 1 つを欠損していた。またこの KEP 因子遺伝子は A4 株において液体培養下では発現せず、子嚢殻を形成する固体培養下で高発現していた。そこで A4 株を起源とする親株で本因子を欠損させたところ、子嚢殻形成能の消失を確認した。ただし親株の子嚢殻形成度も著しく低下していたため、同 KEP 因子の子嚢殻形成への関与は不確定である。他の有性生殖関連因子の挙動も含め、*N. fischeri* でも同様の解析を行った結果を報告する。

Role of Kex2-processed repeat proteins in perithecium formation

Maiko Umemura¹, Kaoru Kuriwa¹, Daisuke Hagiwara², Takahito Toyotome³, Shunsuke Masuo², Naoki Takaya²

Takashi Yaguchi⁴, Akira Watanabe⁴, Katsuhiko Kamei⁴

(¹Bioprod., AIST, ²Fac. Life Environ., Univ. of Tsukuba, ³Dept. Vet. Med., Univ. Agric. Vet. Med., ⁴MMRC, Chiba Univ.)

* P-44

白色腐朽菌ヒラタケにおけるオートファジー機能欠損 *atg9* 破壊株の解析

樽林一皓, 中沢威人, 山本太一, 河内護之, 坂本正弘, 本田与一 (京大院・農)

オートファジーは、多くの菌類で窒素源飢餓等に応答した細胞内成分のリサイクルに関わるが、白色腐朽菌ではこれまでにほとんど研究されていない。そこで本研究ではヒラタケを用い、窒素源に乏しい木材上での生長ならびにリグニン分解におけるオートファジーの重要性を調査する目的で行った。ヒラタケ 20b (*ku80* 破壊株) において、*Magnaporthe oryzae* などオートファゴソーム形成に必須な *atg9* に相当する遺伝子を相同組換えで破壊した。ヒラタケ *atg9* 破壊株では、菌糸生長の遅延 (YMG 寒天培地よりも最少培地で顕著) および気中菌糸の減少がみられた。これらの表現型は、担子菌を含む多くの糸状菌のオートファジー機能欠損株でもみられるため、Atg9 はヒラタケでもオートファジー機能に重要であることが示唆された。*atg9* 破壊株をブナ木粉培地 I (小麦ふすま 1.3%w/w 含有) 上で静置培養したところ、ほとんど生長せず、親株と比較した場合、最少培地よりもさらに顕著な生長の遅延が観察された。一方、小麦ふすま添加の多いブナ木粉培地 II (8.3%w/w) では、*atg9* 破壊株の生長がみられ、親株との差は YMG 寒天培地の場合と同程度だった (菌糸生長速度が親株の約 3/4 倍)。次に、ブナ木粉培地 II で *atg9* 破壊株を 30 日間培養した場合のリグニン減少量は、親株の約 1/3 倍だった。そこで、*atg9* 破壊株におけるリグニン分解酵素遺伝子の転写蓄積量を調査したところ、全 9 個の *mnp*, *vp* のうち 5 遺伝子の転写蓄積量が親株に比べて顕著に増加していた。一方で、*atg9* 破壊株の菌体外 MnP 活性は親株の 1/10 倍程度だった。以上の結果から、ヒラタケのオートファジー機能は、木材上での菌糸生長ならびにリグニン分解系の転写以降の制御に重要だと考えられた。

Analysis of autophagic deficient *atg9* disruptants in the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*

Kazuhiro Kurebayashi, Takehito Nakazawa, Taichi Yamamoto, Moriyuki Kawauchi, Masahiro Sakamoto, Yoichi Honda

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

P-45 (O-7)

生体膜不飽和度が *Aspergillus nidulans* の生育に及ぼす影響

岩間亮^{1,2}, 堀内裕之^{1,2} (¹東大院・農生科・応生工, ²東大・微生物連携)

生体膜は細胞を外界と区画化する主要な構成要素の一つであり, その大部分はリン脂質二重層が占めている。リン脂質の構造は極性頭部と疎水性尾部に大きく分けられるが, 尾部は多様な脂肪酸から構成されている。これら脂肪酸鎖の不飽和度は, 生体膜の重要な物性の一つである膜流動性に関わるなど, 厳密に制御される必要がある。モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* のゲノムには, Δ^9 デサチュラーゼをコードする *sdeA* (AN6731), *sdeB* (AN4135), Δ^{12} デサチュラーゼをコードする *odeA* (AN1037), *odeB* (AN7204) が存在し, *sdeA* 破壊株や *odeA* 破壊株は生育が遅延し, 分生子形成数が低下することが知られている (1, 2)。しかしながら, これらの表現型がどのようにして生じるのかについては解明されていない。

糸状菌の分生子発芽や生育への生体膜不飽和度の寄与を理解するため, 我々はこれら不飽和化酵素遺伝子の破壊株を様々な温度で培養し, その表現型を詳細に解析した。これまでの報告と異なり, *sdeA* 破壊株は高温 (37°C, 42°C) での分生子発芽率と生育が著しく低下する一方で, 低温 (20°C) では高温ほどの顕著な表現型が見られないことが示された。また我々は, *sdeA* 破壊株を親株として高温で生育がある程度回復した変異株を取得した。本発表では, *sdeA*, *sdeB*, *odeA*, *odeB* の各破壊株に加え, 取得した変異株に関して, 細胞形態の解析, リン脂質の網羅的解析, 各不飽和化酵素遺伝子の転写解析から得られた結果を基に, 糸状菌生体膜における脂肪酸不飽和度変化の意義について議論する。

1) Wilson, R.A., et al. (2004). *Fungal Genet. Biol.* **41**, 501; 2) Calvo, A.M., et al. (2001). *J. Biol. Chem.* **276**, 25766.

Effects of biomembrane unsaturation on the growth of *Aspergillus nidulans*

Ryo Iwama^{1,2}, Hiroyuki Horiuchi^{1,2}

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

* P-46 (O-6)

マイクロ流体デバイスで示す外部環境に応じた糸状菌の伸長方向制御

山本里穂, 福田紗弓, 高谷直樹, 竹下典男 (筑波大学 微生物サステイナビリティ研究センター (MiCS))

糸状菌は菌糸と呼ばれる管状の細胞の先端を伸ばして生長し, 先端生長と分岐によりネットワーク状の菌糸体を形成します。生長の際, 多くの酵素を細胞外に分泌して有機物を分解し, 栄養を吸収します。糸状菌はより良い環境を探すため, 外部シグナルを感知して菌糸の生長速度や方向, 分岐を制御する「屈性」を示すと考えられていますが, その機構はほとんど明らかになっていません。

本研究では菌糸の栄養源に対する屈性を細胞レベルで調べるために目的に合わせたマイクロ流体デバイスを構築し, 液体培地を流した流路内で糸状菌を培養しながら, 顕微鏡で菌糸生長の観察を行いました。デバイスの2つの入り口から出口に向かって異なる溶液を適当な速さで流すと, 溶液が合流した流路では2つの溶液が混ざることなく, 2層に分かれます。このうち, 一方の培養液は炭素源, 窒素源などを含み, 他方は含まないように設定して菌糸を生育させ, その伸長速度, 方向変化, 分岐を測定しました。

ライブイメージングの結果, *Aspergillus nidulans* の菌糸が培地中に含まれる栄養源や特定の pH に対してその方向に向かう屈性を示すことを初めて明らかにしました。菌糸はグルコースやリン酸, ミネラルに対して正の屈性を示し, 一方で硝酸イオンやアンモニウムイオンに対しては, それを避けるように生長する負の屈性を示しました。さらに低 pH に対して顕著な屈性を示すことが明らかとなり, 形質膜上にあるプロトンポンプをコードする *pmaA* のノックダウン株ではその屈性が見られなくなりました。植物病原糸状菌である *Fusarium oxysporum* でも同様に解析を行ったところ, 屈性が見られるものの, *A. nidulans* と異なる応答を示しました。糸状菌の屈性の理解と制御は, 菌糸状の生長様式と密接に関連するバイオ産業や医学, 農業分野への貢献が期待されます。

Analysis of hyphal chemotropism using microfluidic devices

Riho Yamamoto, Sayumi Fukuda, Naoki Takaya, Norio Takeshita

(Tsukuba Univ. MiCS)

* P-47

麹菌における核増加の分子機構

細田柗志¹, 安井瑞稀¹, 門岡千尋¹, 高谷直樹¹, 織田健², 竹下典男¹ (¹筑波大・生命環境系, ²酒総研)

麹菌は有用酵素の高い生産能を持つことから、醸造や酵素生産などに利用されてきた。そして、これまで生産性の向上を目的とする育種がなされてきた。私たちはこれまでに *Aspergillus oryzae* の破精込み（米の内部への菌糸の侵入）を蛍光イメージングによって、定量的な解析を行なった。その研究過程で、培養時間の経過に伴って *A. oryzae* の核が異常に増える現象を発見した。核の増加により酵素生産能が向上していると予想される。核増加の機構を解明することは、これまででない酵素生産能の制御に繋がる。核の異常な増加は、近縁種の *Aspergillus flavus* では見られなかった。また、醤油の製造に用いられる *Aspergillus sojae*, 焼酎の製造に用いられる *Aspergillus luchuensis* と *Aspergillus kawachii* を同様に観察した。*A. luchuensis* と *A. kawachii* では核の増加は見られなかったが、*A. sojae* は *A. oryzae* と同様に核が増加したことから、異なる種でも育種選抜の過程で同様の進化をする可能性が示された。さらに、*A. oryzae* の清酒用または醤油用の株で、核増加における表現型が異なっており、異なる目的での育種選抜により、核増加に関する異なる進化が起きたことを示唆している。今後、他の *Aspergillus* 属の種とのゲノム比較を行い、核増加と遺伝子変異の相関を調べる。また、*A. oryzae* の調節因子破壊株コレクションを用いて、核増加における表現型のスクリーニングにより、原因遺伝子の探索を行う。

Molecular mechanism of nuclear increase in *Aspergillus oryzae*

Shuji Hosoda¹, Mizuki Yasui¹, Chihiro Kadooka¹, Naoki Takaya¹, Ken Oda², Norio Takeshita¹

(¹Univ. of Tsukuba, ²National Research Institute of Brewing)

* P-48

麹菌の同株どうしの対峙培養時における増殖抑制応答の解析

浜中祐弥¹, 齋藤直也¹, 片山琢也^{1,2}, 黒田裕樹³, 丸山潤一^{1,2} (¹東大院・農生科・応生工, ²東大・微生物連携機構, ³慶應大・環境情報)

糸状菌では異種の株どうしを対峙培養した際に 2 つのコロニー間で増殖が抑制される現象が数多く報告されており、このような相互作用は拮抗作用(antagonistic effect)として知られている。一方、麹菌 *Aspergillus oryzae* RIB40 株どうしを寒天培地上で対峙培養すると 2 つのコロニー間に間隙が観察されるが¹⁾、糸状菌において同じ株どうしで生じるこのような増殖抑制の報告はない。本研究では、*A. oryzae* でこの現象が生じるメカニズムを解明するため、対峙培養における増殖抑制時の遺伝子発現応答を解析し、コロニー間で産生される物質が増殖抑制を起こす可能性を検討した。

RIB40 株どうしの対峙培養および単独コロニーのそれぞれの生育条件で、RNA-seq 解析を行って比較した。その結果、対峙培養で約 1,000 遺伝子の転写産物量が有意に増減しており、コロニー間の増殖抑制により生理的な変化が起こることが明らかになった。また、コロニー間で産生される物質が増殖抑制に関与している可能性を考え、RIB40 株を培養した寒天培地から抽出物を得て、同じ株を培養したコロニーの外側に滴下した。その結果、抽出物の周囲にコロニーの増殖抑制が観察され、なんらかの物質が増殖抑制を引き起こすことが示唆された。一方で、*A. oryzae* において対峙培養で増殖抑制を生じない株の存在も見いだしたことから、RIB40 株との比較によって増殖抑制に関与する物質の作用について調べる予定である。

1) 浜中ら 第 19 回糸状菌分子生物学コンファレンス要旨集 P-18 (2019)

Studies on growth inhibition effects upon the interaction between colonies of the same strain in *Aspergillus oryzae*

Yuya Hamanaka¹, Naoya Saito¹, Takuya Katayama^{1,2}, Hiroki Kuroda³, Jun-ichi Maruyama^{1,2}

(¹Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo, ²CRIIM, Univ. of Tokyo, ³Fac. of Environ. and Information Stds., Keio Univ.)

* P-49 (O-4)

糸状菌 *Trichoderma reesei* の形態形成とセルラーゼ生産性の相関解析にむけた菌糸伸長制御マイクロ流体システムの開発

井谷綾花¹, 北原雪菜¹, 志田洋介¹, 大倉玲子², 若本祐一², 小笠原渉¹ (¹長岡技科大・生物, ²東大・総合)

糸状菌 *Trichoderma reesei* は微生物で最大の酵素分泌量を誇る微生物として古くから研究されている。長年、酵素生産と形態に何らかの関連があることが示唆されていたが、広範にわたる分岐など糸状菌特有の形態により、相関関係を調査することは困難であった。本研究では、*T. reesei* の菌糸形態と酵素生産との相関性を明らかにするため、観察流路入り口に設置した狭窄構造に胞子をトラップすることにより、流路へ伸びる単一の菌糸の伸長観察を可能とする PDMS マイクロ流体デバイスを作製した。これにより異なる培養基質での菌糸伸長の挙動の違いや、培養基質切り替え時の菌糸動体などを定量的に表すことが可能となった。さらに、マイクロ流体デバイス内での酵素生産を検出するため、4-MUC (4-Methylumbelliferyl-beta-D-cellobioside) を用いたセルラーゼ検出方法を考案した。これらを組み合わせることで、菌糸伸長と酵素生産の挙動を同時に観察することが可能となった。今後は、開発したマイクロ流体デバイスおよび4-MUC を用いたセルラーゼ検出系を用いて酵素生産性に関連する菌糸形態の更なる調査を行う。

この成果は、国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) の助成事業 (JPNP19001) の結果得られたものです。

Development of a microfluidic system to control mycelial elongation for the correlation between morphogenesis and cellulase productivity in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*

Ayaka Itani¹, Yukina Kitahara¹, Yosuke Shida¹, Reiko Okura², Yuichi Wakamoto², Wataru Ogasawara¹

(¹Nagaoka Univ. of Technology, ²The Univ. of Tokyo, Art and Science)

* P-50

糸状菌における細胞外膜小胞産生能の普遍性

岩橋由佳¹, 浦山俊一^{2,3}, 榎尾俊介^{2,3}, 高谷直樹^{2,3}, 野村暢彦^{2,3}, 竹下典男^{2,3}, 豊福雅典^{2,3}, 萩原大祐^{2,3}

(¹筑波大院・生命地球科学, ²筑波大・生命環境系, ³筑波大・MiCS)

細胞外膜小胞 (extracellular Membrane Vesicle, 以下 eMV) は細胞外に放出された膜小胞の総称であり、物質輸送を担う新たな機構として注目されている。糸状菌の eMV については、ここ数年でいくつかの糸状菌でその内包物や機能等が報告されており、eMV の存在は重要視され始めている。これまでに我々は複数種の糸状菌を同一条件下で培養し、細胞外への脂質や eMV の放出を確認したことで、糸状菌の eMV 産生能の普遍性を提唱してきた。本研究では、さらに菌種を増やし合計 10 種の糸状菌を用いてより詳細な検討を行った。その結果、菌体が増殖する対数増殖期には一部の糸状菌が eMV を産生し、溶菌を伴う定常期にはほぼすべての糸状菌が eMV を産生することが明らかとなった。また、*Aspergillus oryzae* は菌体対数増殖期に脂質の放出が認められたにもかかわらず小胞構造をとる eMV は産生していないことが明らかとなった。そこで、細胞壁や浸透圧に着目して eMV 産生を検討した。具体的には、細胞壁に関する変異株や細胞壁分解酵素を用いた場合、また、培地の浸透圧を変化させた場合に、小胞構造をとる eMV が産生されるようになった。さらに、菌体対数増殖期に eMV を産生しないいくつかの糸状菌においても、同様の処理により eMV 産生が誘導された。以上より、細胞壁が eMV 産生に深く関与していることが示唆された。

Universality of extracellular membrane vesicles producing ability in filamentous fungi

Yuka Iwahashi¹, Syunichi Urayama^{2,3}, Shunsuke Masuo^{2,3}, Naoki Takaya^{2,3}, Nobuhiko Nomura^{2,3}, Norio Takeshita^{2,3},

Masanori Toyofuku^{2,3}, Daisuke Hagiwara^{2,3}

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

P-51

Aspergillus fumigatus の N-グリカンに存在する糖鎖構造の生理的役割の解析

門岡千尋¹, 田中大², 岡拓二¹ (¹崇城大・生物生命, ²東北医薬大・薬)

ヒト病原性糸状菌 *Aspergillus fumigatus* の細胞壁糖鎖にはマンナンが多く含まれており, それらの合成酵素は新たな抗真菌薬の標的として期待されている。出芽酵母の N-グリカンには糖鎖鎖と呼ばれる約 50 個のマンノース (Man) 残基からなる α -(1 \rightarrow 6)-Man 主鎖に複数の α -(1 \rightarrow 2)-Man 側鎖が結合した巨大なマンナン構造が存在しており, Cell wall integrity において重要であることが明らかになっている。出芽酵母の Mnn2 と Mnn5 は糖鎖鎖の Man 側鎖の合成を担う α -(1 \rightarrow 2)-Man 転移酵素である。*A. fumigatus* のゲノム上にはこれらのホモログとして *Afmnn2* と *Afmnn5* が存在しているが, *A. fumigatus* において糖鎖鎖構造の存在は報告されていない。本研究では, *A. fumigatus* の糖鎖鎖構造を発見し, その生理的役割を明らかにすることを目的とした。

まず, *A. fumigatus* の AfMnn2 と AfMnn5 の組換え酵素を用いた活性測定および, 各種マンノシダーゼ処理により, いずれも α -(1 \rightarrow 2)-Man 転移酵素であることが示された。次に, *A. fumigatus* において *Afmnn2* と *Afmnn5* の単独および二重破壊株を構築した。その結果, 各単独破壊株は野生株と比較して表現型に違いは見られなかった。一方, *Afmnn2/Afmnn5* 二重破壊株は野生株と比較して菌糸伸長が遅延し, 分生子形成能が低下した。また, *Afmnn2/Afmnn5* 二重破壊株の細胞壁画分の ¹H-NMR 解析により, 糖鎖鎖の α -(1 \rightarrow 6)-Man 主鎖由来のケミカルシフトが検出された。この α -(1 \rightarrow 6)-Man 主鎖由来のケミカルシフトは, 出芽酵母において糖鎖鎖 α -(1 \rightarrow 6)-Man 主鎖の初期伸長に関与する Mnn9 および Van1 のホモログ遺伝子である *Afmnn9* または *Afan1* との三重破壊により消失した。以上の結果より, *A. fumigatus* においても糖鎖鎖構造が存在しており, 菌糸伸長と分生子形成において重要な役割をもつことが示唆された。

Identification of outer chain structures of N-glycans in *Aspergillus fumigatus* and analysis of its physiological roles.

Chihiro Kadooka¹, Yutaka Tanaka², Takuji Oka¹

(¹Fac. Biotech. Life Sci., Sojo Univ., ²Dept. Pham., TMPU)

* P-52

MSUD 抑制株を用いた子嚢内における CDC10 の局在解析

辻健也, 北出雄生, 吉見啓, 田中千尋 (京大院農)

Bipolaris maydis における Core septin 遺伝子の一つ *Cdc10* の破壊株は糸状の子嚢胞子ではなく, 紡錘形の子嚢胞子を形成する。演者らは以前, この子嚢胞子の形態異常に減数分裂時 RNA サイレンシングである MSUD (meiotic silencing by unpaired DNA) が関与していることを見出した。しかし, CDC10 が子嚢胞子形成にどのように関与するのか詳しいことはわかっていない。そこで, 子嚢胞子形成における CDC10 の挙動を調査するために, *Cdc10-eGFP* 融合遺伝子発現株 (蛍光株) を作出し, 局在解析を行った。まず, 無性生殖での CDC10 の挙動を確認するために, 菌糸および分生子での観察を行った。菌糸および分生子では, 他菌での報告と同様, 棒状構造や点状構造が観察された。次に, 蛍光株を MSUD 抑制株と交配し, 得られた子嚢を観察した。その結果, 子嚢発生初期から子嚢胞子発生までの間, 子嚢全体が蛍光を示し, 無性生殖で見られた棒状構造などは観察されなかった。子嚢胞子形成時では, 発生途中の子嚢胞子膜近傍に局在を示した。また, 興味深いことに片親のみが蛍光株にも拘らず, 子嚢内のすべての発生途中の子嚢胞子が蛍光を示した。この結果は, 一つの子嚢内において CDC10 を共有して利用していることを示唆している。子嚢胞子完成後は, 胞子内で菌糸の場合と同様の構造を形成していた。これらの結果から, 有性生殖時において, CDC10 は無性生殖時とは異なった挙動を示すことが明らかとなった。また, この局在解析および破壊株における子嚢胞子形態異常から, CDC10 は子嚢胞子の伸長に関与していると考えられる。

Characterization of CDC10 behavior in ascus of MSUD suppressed strain

Kenya Tsujii, Yuki Kitade, Akira Yoshimi, Chihiro Tanaka

(Grad. School of Agriculture, Kyoto Univ.)

* P-53 (O-3)

ゲノム比較解析を用いた *Bipolaris maydis* 表面疎水性変異株の原因遺伝子の同定

佐波雅史, 吉田裕史, 吉見啓, 田中千尋 (京大院・農)

多くの糸状菌で菌糸の表面疎水性に関与する物質として hydrophobin が知られており, 気中菌糸の形成や菌糸と疎水面との接着を媒介する役割を担うと考えられている。しかし, トウモロコシごま葉枯病菌 *Bipolaris maydis* においては, hydrophobin の欠失が表面疎水性に影響する事例は見出されておらず, 本菌が疎水性を帯びるメカニズムは不明な点が多い。これまでに当研究室では, 表面疎水性を欠いた (wetttable 型) 変異体である DO2N20-86 株 (以下, 86 株) および R2-4-8a-wet 株 (以下, R2 株) が得られている。本研究ではこれらの株の疎水性要因を遺伝学的に解析することを目的とした。まず, 野生株との交配試験を行い子孫の分離比を調べたところ, 両株とも wetttable 型と野生型で 1 対 1 に分離したことから, どちらの株も 1 遺伝子が変異したことで表面疎水性が失われたことが示唆された。続いて, 両株子孫の wetttable 型株 2 株, 野生型株 1 株をシーケンスし得られた配列とリファレンスゲノムとの比較を行い, それぞれの株に見出された特異的な多型の中から ORF 上の多型を抽出した。さらに, 86 株と野生株の交配による子孫株を用いて, 抽出した多型と wetttable 型の間での連鎖解析を行った。その結果, NRPS4 (nonribosomal peptide synthetase 4) 上の多型が wetttable 型と連鎖していることが判明した。NRPS4 を欠失した株は表面疎水性を失うことが本菌を含む数種の菌で報告されている。一方, R2 株については NRPS4 上に多型が見出されなかったため, 86 株とは異なる未知因子が原因で疎水性が失われたと考えられる。現在, R2 株と野生株の交配による子孫株を用いて連鎖解析を行うことで, 表面疎水性変異の原因遺伝子の同定を進めている。

Identification of causal genes which are involved in hydrophobicity in *Bipolaris maydis* by whole genome comparison

Masafumi Saba, Hiroshi Yoshida, Akira Yoshimi, Chihiro Tanaka

(Grad. School of Agriculture, Kyoto Univ.)

* P-54

麹菌 *Aspergillus oryzae* における推定新規選択的オートファジー関連タンパク質の解析

西尾譲一郎, 高橋慶晃, 武田陽一, 菊間隆志 (立命館大・生物工)

【目的】選択的オートファジーは真核細胞内において特定のタンパク質やオルガネラを液胞/リソソームに輸送し分解する機構である。一般的に選択的オートファジーの選択性は分解基質がもつ特異的なレセプタータンパク質と隔離膜上に存在する Atg8 が結合することにより生じると考えられているが, 麹菌をはじめとする糸状菌においてこれらのレセプタータンパク質を含む選択的オートファジーに関連するタンパク質は殆ど同定されていない。そこで本研究は, AoAtg8 結合タンパク質の抽出を行い, 新規選択的オートファジー関連タンパク質の機能解析を目的とした。

【方法・結果】AoAtg8 に TAP タグを付加した AoAtg8-TAP 発現株をオートファジー誘導条件下の炭素源または窒素源枯渇条件下で培養した。その後, TAP 法により AoAtg8 結合タンパク質の精製を行い, 得られたタンパク質を LC-MS/MS および MASCOT 検索により同定した。その中から, 炭素源枯渇条件下で精製され, 機能未知である AO090011000108 を推定新規選択的オートファジー関連候補タンパク質 (AO108) として抽出した。AO108 は Microbodies C-terminal targeting signal を保有していた。AO108 に緑色蛍光タンパク質 EGFP を融合し局在解析を行ったところ, 通常の生育条件下ではドット状構造に局在し, 炭素源枯渇条件下ではドット状構造に加えて, 大きなカップ状構造へ局在することが観察された。これらの構造は AoAtg8 と共局在していたことから PAS および隔離膜であることが示唆された。また一部はペルオキシソームにも局在した。AO108 をコードする遺伝子の破壊株を作製し, 表現型の解析を行ったところ野生型と大きな違いはなく分子形成にもほとんど差異はなかった。これらのことから, AO108 はペルオキシソームを選択的に分解するペキソファジーをはじめとする選択的オートファジーに関与する可能性が示唆された。

Analysis of a putative selective autophagy-related protein in *Aspergillus oryzae*.

Joichiro Nishio, Yoshiaki Takahashi, Yoichi Takeda, Takashi Kikuma

(Dept. of Life science, Univ. of Ritsumeikan)

P-55

Aspergillus fumigatus と *Aspergillus nidulans* の共培養による抗菌性ジフェニルエーテルの産生誘導

二宮章洋^{1,2}, 浦山俊一^{1,3}, 萩原大祐^{1,3} (¹筑波大・生命環境, ²東大院・農, ³筑波大・MiCS)

糸状菌のゲノム上には多数の二次代謝産物の生合成遺伝子クラスターが存在するが、その大半は通常の培養条件下では休眠状態にある。休眠遺伝子を活性化してその産物を得る手法としてしばしば、糸状菌と他の微生物を共に培養する「共培養法」が用いられる。このような共培養系において、共培養が糸状菌の物質産生を促進する分子機構が明らかになれば、効率的に物質産生能を刺激する基盤技術の開発に繋がると期待される。しかしながら、そのような分子機構は、放線菌と糸状菌の共培養については詳しく解析が進められているが、糸状菌同士の共培養については理解が進んでいない。そこで本研究では、モデル糸状菌同士の共培養系「モデル共培養系」を確立し、共培養が物質産生を刺激する分子機構を明らかにすることを目的とした。

Aspergillus fumigatus (*Af*) と *Aspergillus nidulans* (*An*) との共培養が抗菌性ジフェニルエーテル (DPEs) の産生を誘導することが明らかになった。この DPEs 産生誘導には、*An* のオルセリン酸 (OA) 生合成遺伝子クラスター (*ors* クラスター) の活性化が必要であることを遺伝子破壊によって示した。興味深いことに、*ors* クラスターは放線菌との共培養によっても活性化すると報告があるが、当該共培養の主産物は OA とレカノール酸 (LA) であり、*Af-An* 共培養の主産物である DPEs とは異なる。そこで、麹菌異種発現系を用いて、ポリケチド合成酵素によって OA と LA が生合成されるが、DPEs の産生にはこれに加えて最大 3 種の修飾酵素が必要であることを示した。それぞれの共培養に特異的な酵素活性の制御機構の存在が示唆された。

Antibacterial Diphenyl Ether Production Induced by Co-culture of *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus fumigatus*

Akihiro Ninomiya^{1,2}, Syun-ichi Urayama^{1,3}, Daisuke Hagiwara^{1,3}

(¹Fac. Life & Env., Univ. of Tsukuba, ²Grad. Sch. Agric. & Life Sci., The Univ. of Tokyo, ³MiCS, Univ. of Tsukuba)

P-56 (O-14)

立体選択的[4+2]環化付加反応を触媒するデカリン合成酵素の阻害剤同定

加藤直樹^{1,2}, 藤山敬介³, 永野真吾³, 高橋俊二² (¹摂南大・農, ²理研・CSRS, ³鳥取大院工)

糸状菌の生産する抗ウイルス物質エキセチンとその鏡像異性類縁体フォマセチンの生合成経路において、デカリン合成酵素 Fsa2 および Phm7 は立体選択的[4+2]環化付加反応(ディールスアルダー反応)を触媒する。その機能と構造の相関を明らかにすることは、反応メカニズムの理解とそれに基づく酵素の機能改変に不可欠である。本酵素ファミリーは、既知のディールスアルダー反応を触媒する酵素とは同源性を示さず、その機能に補因子を必要としない。酵素の活性中心の特定が困難であることが予想されたため、酵素の結晶構造解析と並行してリガンドの探索を行った。本発表では、リガンド探索と取得した阻害剤を用いた解析結果について報告する。

Phm7 の基質および産物と類似した部分構造を有する市販の小分子化合物を対象に、thermofluor アッセイならびに microscale thermophoresis アッセイによる Phm7 リガンドのスクリーニングを行った。その結果、*p*-menthane 誘導体の 1 つが親和性は低いものの Phm7 および Fsa2 に結合することを見出した。フォマセチン生産菌 *Pyrenochaetopsis* sp. RK10-F058 株に由来する *phm7* 欠失株の菌糸から細胞抽出液を用いた *in vitro* 酵素アッセイ系を用いることで、この化合物が濃度依存的に酵素活性を阻害すること、培養液に添加することでフォマセチン、エキセチンの生産を阻害することを確認した。次いで、本化合物と Phm7 との共結晶構造解析を行った。酵素を構成する 2 つのβ-ドメイン間のポケットに化合物が結合しており、そのポケットが活性中心であることが示唆された。

Identification of an inhibitor of decalin synthases that catalyze stereospecific [4+2] cycloaddition

Naoki Kato^{1,2}, Keisuke Fujiyama³, Shingo Nagano³, Shunji Takahashi²

(¹Fac. of Agric., Setsunan Univ., ²RIKEN CSRS, ³Tottori Univ.)

* P-57

麹菌における分化制御因子の改変による異種天然物生産の向上

原中実穂¹, 齋藤直也¹, 片山琢也^{1,2}, 南篤志³, 及川英秋³, 丸山潤一^{1,2} (¹東大院・農生科・応生工, ²東大・微生物連携機構, ³北大院・理)

麹菌 *Aspergillus oryzae* は近年異種天然物生産の宿主として用いられており, その生産性向上は産業利用において重要である。異種天然物の生産量増加のアプローチの一つとして, 単一の制御因子の改変による代謝フラックスの改良が報告されている。また, 糸状菌は分化によって多様な形態をとるが, 分化は二次代謝と関連することが知られている。そこで本研究では, *A. oryzae* の有する分化形態のうち菌核形成に着目し, 分化制御因子の改変による異種天然物の高生産を目的とした。

異種天然物生産のモデルとして, 担子菌由来の抗菌活性をもつジテルペン pleuromutilin を利用した。これまでに我々は, *A. oryzae* において菌核形成能に影響を及ぼす転写因子を数多く同定している¹⁾。そのなかから菌核数が大幅に増加または減少した転写因子の遺伝子破壊株において, pleuromutilin 生産量の変化を調べた。その結果, 遺伝子破壊により菌核形成が増加する株において pleuromutilin 生産量が増加する傾向が見られ, 最大で 2.6 倍に増加した株の取得に成功した。現在, pleuromutilin 生産量が増加した遺伝子破壊株を用いて, 他のテルペンの異種生産や宿主代謝のフラックスの変化について解析している。

1) 中村ら, 第 67 回日本生物工学会大会要旨集 p.89 (2015)

Improved heterologous production of natural product by modification of development in *Aspergillus oryzae*

Miho Haranaka¹, Naoya Saito¹, Takuya Katayama^{1,2}, Atsushi Minami³, Hideaki Oikawa³, Jun-ichi Maruyama^{1,2}

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

* P-58

糸状菌 *Aspergillus terreus* におけるエルゴチオネイン生合成に関する研究

林大三¹, 浜田勇和¹, 村田紋奈¹, 柿崎徹也¹, 鈴木孝征^{1,3}, 金政真^{1,2} (¹中部大院・応生, ²中部大・環生科, ³中部大・応生化)

エルゴチオネイン(ERG)はライ麦角菌から単離された含硫アミノ酸の一種であり強い抗酸化活性を有する。ヒドロキシラジカルの捕捉作用による活性酸素種の除去やエラストーゼ活性阻害・チロシナーゼ活性阻害によるシミ・シワの抑制など様々な生理活性があり, 機能性生体物質として注目されている。真菌や細菌において ERG の生産が報告されているが, 多様性に富む真菌のうち一部でしか発見されておらず, 生合成制御に関する研究は進んでいない。これまでに我々は, イタコン酸やロバスタチンの生産菌として知られる糸状菌 *Aspergillus terreus* の CE-MS による網羅的代謝解析により本菌が ERG を合成していると考えられる結果を得た。そこで本研究では糸状菌の ERG 生合成制御の解明を目的に, 本菌の細胞に含まれる ERG を HPLC で高精度に分析し, 本菌の ERG 生合成における pH や環境ストレスが与える影響を調べた。

本菌を pH6.0 にて 2 日間前培養して菌体を増やした後, 環境ストレスを与えた培地で 3 日間本培養した。菌体を回収し, 乳鉢で破碎し, Bligh-Dyer 法にて精製して調製した試料を HPLC-UV にて分析した。その結果, 麹菌での報告よりも高濃度の ERG を検出することができた。また, 培養条件によって本菌の細胞内 ERG 含有量に違いが見られた。各種条件における ERG 生合成遺伝子の転写量の違いについても報告する。

Study on biosynthesis of ergothioneine in *Aspergillus terreus*

Daizo Hayashi¹, Hayato Hamada¹, Ayana Murata¹, Tetsuya Kakizaki¹, Takamasa Suzuki^{1,3}, Shin Kanamasa^{1,2}

(¹Grad. Sch. Biosci. Biotech., Chubu Univ., ²Dept. Envi. Biol., Chubu Univ., ³Dept. Biol. Chem. Chubu Univ.)

* P-59

糸状菌 *Aspergillus nidulans* のアミノ酸代謝を介した一酸化窒素ストレス応答

天久まどか¹, 鈴木康太¹, 塚越まどか¹, 門岡千尋², 榎尾俊介¹, 高谷直樹¹ (¹筑波大・生命環境, ²崇城大・生物生命)

一酸化窒素(NO)は、反応性の高い活性ラジカルであり、DNA やタンパク質を損傷することから強い細胞毒性を示す。自然免疫系において、マクロファージは NO を産出し、体内に侵入した病原菌を攻撃することや、NO が抗菌活性を持つことは良く知られている。糸状菌は、このような宿主の免疫系や、自身の硝酸代謝により生成する NO に対して強い耐性を示すが、その NO ストレス応答のメカニズムはほとんど明らかにされていない。本研究では、モデル真菌である *Aspergillus nidulans* の多コピー型遺伝子ライブラリーを本菌に導入することで、真菌の生育の NO 耐性に関わる遺伝子を探索した。

遺伝子の探索によりプロリン生合成系の *proC*, *A.nidulans* の Cross Pathway Control (CPC) 系の制御因子である *rbgB* の二つが本菌の生育の NO 耐性に関与することが見出された。また、培地にアミノ酸をそれぞれ添加することにより *A. nidulans* 野生株の生育の NO 耐性が強まり、NO に曝された菌体において複数のアミノ酸の細胞内存在量が減少した。さらに、培地へのプロリンの添加によってプロリン生合成能欠損株 (*proA*-) の NO 感受性が回復した。一方、CPC 系の転写因子である *cpcA* の欠損は NO 感受性を引き起こした。また、アミノ酸生合成関連遺伝子 *argB*, *prnB*, *lysA* の転写は NO により活性化されており、これは *cpcA* が関与していることが示された。以上の結果から、NO が引き起こすアミノ酸の飢餓への応答・適応というアミノ酸代謝系の新たな役割が明らかとなった。

Nitric oxide stress reply through the amino acid metabolism of *Aspergillus nidulans*.

Madoka Amahisa¹, Kouta Suzuki¹, Madoka Tsukagoshi¹, Chihiro Kadooka², Shunsuke Masuo¹, Naoki Takaya¹

(¹ Fac. Life & Env. Sci., Univ. of Tsukuba, ² Biotech. Life Sci., Sojo Univ.)

P-60

進化型 *FgTri1* 遺伝子を導入した *Fusarium graminearum* の生産するトリコテセン類の解析

前田一行^{1,2}, 中嶋佑一³, 小泉慶明⁴, 安藤直子⁴, 木村真³, 大里修一¹ (¹明治大・農, ²明治大・研究知財, ³名大院・生命農, ⁴東洋大院・理工)

近年、トリコテセン生産能が変化した *Fusarium graminearum* の分離株が報告された。本菌の生産する新規トリコテセン (NX 型トリコテセン) 類は、構造骨格中の C-8 位に従来型のケト基を持たず、C-7 位にのみ水酸基を保持しており、その原因として進化型の *FgTri1* 遺伝子 (*FgTri1_{NX chemotype}*) が同定された。交配により、同遺伝子が種内で水平伝播した場合、NX 型トリコテセン類の類縁体を生産する *F. graminearum* の出現につながる危険性が指摘されている。そこで本研究では、従来型の 3 種の毒素生産型 (ケモタイプ) の *F. graminearum* について、それぞれ *FgTri1* 遺伝子を破壊後、*FgTri1_{NX chemotype}* を *ectopic* に導入・過剰発現させた組換え体を作成して液体培養し、その代謝物を TLC と LC-MS/MS により解析した。解析の結果、全ての *FgTri1_{NX chemotype}* 発現株から NX 型トリコテセン類とその中間体が検出され、その比率はケモタイプ間で異なっていた。また、ニバレノール生産型の *FgTri1_{NX chemotype}* 発現株では、C-4 水酸化酵素 *FgTri13p* が機能しているにもかかわらず、NX 型トリコテセン類の C-4 水酸化体はほとんど検出されなかった。このことから、現状では NX 型トリコテセンの類縁体を生産する *F. graminearum* は出現しえないと考えられた。

Analysis of trichothecene metabolites produced by evolved *FgTri1* expressing strains of *Fusarium graminearum*.

Kazuyuki Maeda^{1,2}, Yuichi Nakajima³, Yoshiaki Koizumi⁴, Naoko Takahashi-Ando⁴, Makoto Kimura³, Shuichi Ohsato¹

(¹Sch. Agric., Meiji Univ., ²Org. Strategic Res. Intellect. Prop., Meiji Univ., ³Grad. Sch. Bioagric. Sci., Nagoya Univ.,

⁴Grad. Sch. Sci. Eng., Toyo Univ.)

* P-61

ナシ黒斑病菌に混合感染する二種のマイコウイルスの性状解析

丸山洋平¹, 千葉悠斗², 浦山俊一², 萩原大祐², 福原敏行¹, 森山裕充¹ (¹農工大・農, ²筑波大・生命環境)

Alternaria alternata chrysovirus 1 (AaCV1) は、ナシ黒斑病菌 (*Alternaria alternata* Japanese pear pathotype): N18 株から発見されたマイコウイルスである。AaCV1 は *Betachrysoviridae* に属し、5 分節の dsRNA ゲノムを有する (Okada *et al.*, 2018)。N18 株からは AaCV1 由来の dsRNA 分節ゲノムの他に、1.0 - 2.4 kbp に亘る複数成分の dsRNA が検出されてきた。これらの dsRNA は、Fragmented and primer ligated dsRNA sequencing (Urayama, *et al.*, 2018) 解析により、7 分節ゲノムの polymycovirus であることが判明し、既報の *Alternaria alternata* polymycovirus 1 と近縁であったので、このウイルスを *Alternaria alternata* polymycovirus 2 (AaPmV2) と命名した。AaCV1 と AaPmV2 が高含量で混合感染する N18 株から粒子精製を試みた結果、AaCV1 の粒子と推定される 35 - 40 nm の球状粒子が確認され、更に、幅 20 nm、長さ 50 - 300 nm の棒状の構造体が観察された。この棒状の構造体は抗血清を用いた生化学的解析により、AaPmV2 dsRNA5 から翻訳される約 30 kDa の蛋白質であることが示され、polymycovirus としては初めて棒状粒子構造が確認された。微生物培養装置を用いて 3 日間以上の長期間培養した菌体からは、AaCV1 の外皮蛋白質がプロセッシングされた状態で精製され、推定サイズよりも低分子量の蛋白質として検出された。一方、短期間 (2 日間) 培養菌体からは、インタクトな全長外皮蛋白質が精製された。この結果は広く菌類に分布する *Betachrysoviridae* に共通して生じるウイルス外皮蛋白質のプロセッシングが、AaCV1 においても保存されることを示し、各宿主菌に共通したプロテアーゼの関与が示唆された。

Characterization of two mycoviruses co-infecting in *Alternaria alternata* Japanese pear pathotype.

Yohei Maruyama¹, Yuto Chiba², Syun-ichi Urayama², Daisuke Hagiwara², Toshiyuki Fukuhara¹, Hiromitsu Moriyama¹

(¹Fac. Agric., Tokyo Univ. of Agric. and Technol., ²Fac. Life Environ. Sci., Univ. of Tsukuba.)

P-62

不適応型炭疽病菌のシロイヌナズナに対する非親和性の差異に着目した重層的植物免疫の解析

入枝泰樹¹, 高野義孝² (¹信大・学術院農, ²京大・院農)

シロイヌナズナを非宿主とする不適応型炭疽病菌は、シロイヌナズナ上で付着器を形成しても表皮侵入を阻止される。我々は、複数の不適応型菌 (コスモス菌, リンゴ菌, ウリ類菌) の付着器を介した侵入に対して、免疫因子 GSH1, EDS5, CAS が局在する表皮葉緑体が表層へ移動し (表皮葉緑体応答), 侵入阻止型の非宿主抵抗性に関与することを報告している。本応答は PEN2 免疫経路が崩壊した状況でより活性化され、*pen2* バックグラウンドで免疫への寄与が顕在化した。同様に、上記の不適応型菌に対する EDR1 免疫経路も *pen2* バックグラウンドにおいて効果を示した。しかし、PEN2 免疫経路の優位性が示唆される一方で、自然条件 (野生型) のシロイヌナズナが表皮葉緑体応答、さらには GSH1, EDS5, CAS, EDR1 それぞれの免疫経路を活用して炭疽病菌の付着器を介した侵入を阻止しているかは不明であった。今回、上記の不適応型菌と比べて非宿主シロイヌナズナに対する非親和性がより低く、野生型植物にも低頻度で侵入できる新たな不適応型菌としてサクラ炭疽病菌を同定した。本菌を用いた解析の結果、野生型のシロイヌナズナが本菌に対して表皮葉緑体応答や EDR1 等の免疫経路を機能させ、侵入阻止型の非宿主抵抗性を高めていることを見出した。以上より、炭疽病菌の非親和性の差異を利用することで、シロイヌナズナの非宿主抵抗性に寄与する免疫応答 (因子) の重層的効果を解析することが可能であることを明らかにした。

Analysis of multilayered plant immune system using different incompatibilities of nonadapted *Colletotrichum* strains with *Arabidopsis thaliana*

Hiroki Irieda¹, Yoshitaka Takano²

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

P-63

植物非病原性 *Penicillium* 属菌を対象とした Fludioxonil および Iprodione 耐性株の探索

老木紗予子¹, 矢口貴志², 浦山俊一^{1,3}, 萩原大祐^{1,3} (1筑波大・生命環境系, 2千葉大・MMRC, 3筑波大・MiCS)

【背景と目的】農薬として広く用いられている fludioxonil と iprodione に対して, 植物病原性糸状菌の耐性株の出現が複数報告されている。これらの耐性の原因として, 共通の作用機序である浸透圧応答性シグナル伝達経路のヒスチジキナーゼへのアミノ酸変異が示されている。一方で, 農薬に暴露する機会を持たないと考えられる植物非病原性糸状菌においては, 薬剤耐性に関する包括的な研究はなされていない。本研究では, 多様な環境から分離した *Penicillium* 属菌を対象として, 自然環境における農薬耐性株を探索し, 潜在的な耐性株出現リスクについて理解を深めることを目的とした。

【結果と考察】圃場以外の食品, 死体, 臨床サンプルなどから分離した 12 種 101 株の *Penicillium* 属を fludioxonil または iprodione 含有 PDA 培地で培養し, コロニー生育により感受性を評価した。101 株のうち, 14 株は fludioxonil に, 20 株は iprodione に対する耐性を示し, このうち 6 株は両剤に交差耐性を示した。そこで, 交差耐性を示す株を含む菌種 (*Penicillium chrysogenum* 18 株と *Penicillium oxalicum* 15 株) を対象に, 浸透圧応答性シグナル伝達経路のヒスチジキナーゼ NikA のシーケンス解析を行った。その結果, fludioxonil または iprodione に耐性を示した株に特異的な変異として, *P. chrysogenum* IFM 57243 株において G693D と T1318P, *P. oxalicum* IFM 54751 株において T960S のアミノ酸変異が NikA に認められた。このうち G693D は, 糸状菌 NikA に特有の構造である HAMP ドメインに含まれており, 当該変異が耐性に関与する可能性が考えられる。また, これらの耐性株は, fludioxonil のリード化合物であり *Pseudomonas* 属細菌によって産生される pyrrolnitrin に対しても耐性を示した。以上のことから, 農薬の直接暴露以外にも, 自然環境中において天然の抗菌物質に曝されることが, 作用機序を共有する農薬への耐性出現のリスクになると考えられる。

Wide distribution of resistance to the fungicides fludioxonil and iprodione in *Penicillium* species

Sayoko Oiki¹, Takashi Yaguchi², Syun-ichi Urayama^{1,3}, Daisuke Hagiwara^{1,3}

(¹Fac. of Life and Env. Sci., Univ. of Tsukuba, ²MMRC, Chiba Univ., ³MiCS, Univ. of Tsukuba)

* P-64 (O-13)

Aspergillus fumigatus と感染ウイルスの dual-genomics による進化的な関係性の解析

千葉悠斗¹, 高橋弘喜², 楠屋陽子², 渡辺哲², 浦山俊一^{1,3}, 萩原大祐^{1,2,3} (1筑波大・生命環境系, 2千葉大・真菌セ, 3筑波大・MiCS)

菌類には多種多様なウイルス (菌類ウイルス) が比較的高い割合で感染しており, その多くは細胞外伝播経路を持たず細胞の分裂や融合によって伝播するプラスミド様の伝播形式を有している。このようなウイルスの機能に関して近年少しずつ理解が進みつつあるが, 宿主集団中でどのように維持され, 進化してきたのかほとんど理解されていない。そこで本研究では, 単一の糸状菌種を対象として感染ウイルスと宿主の両者のゲノム情報を体系的に収集し, その比較から, ウイルスと宿主の間にある進化的な関係性を明らかにすることを目指した。

166 株の病原真菌 *Aspergillus fumigatus* を対象にウイルス探索を行い, 14 菌株から 8 種 19 株のウイルス配列を検出した。これら全てのウイルスゲノムに加え, ウイルス保有宿主 14 菌株及び非保有株のうち 104 菌株のゲノムを決定した。ゲノム情報をもとに宿主の系統解析を行うと, ウイルス保有株は系統樹上でランダムに位置し, 宿主の進化系統によらずウイルス感染が起こっていることが示唆された。また, 同種のウイルスが複数菌株で検出されたセットを対象に, ウイルスと宿主のゲノム系統樹を比較すると, 両者の系統的な位置関係が一致しなかったため, ウイルスと宿主株が非平行的に進化したことが示唆された。このことは, 進化の過程で異なる宿主菌株間で水平伝播のようなウイルス移動イベントが発生した可能性が考えられる。本研究の結果から, *A. fumigatus* 集団内のウイルスの感染動態が明らかとなった。今後はウイルスゲノムの多様性を詳細に解析することで, 菌類ウイルス-宿主間の感染維持機構の謎に迫りたい。

Dual-genomics unveiling host-mycovirus relationship in *Aspergillus fumigatus*.

Yuto Chiba¹, Hiroki Takahashi², Yoko Kusuya², Akira Watanabe², Syun-ichi Urayama^{1,3}, Daisuke Hagiwara^{1,2,3}

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

* P-65

菌類ウイルスが宿主糸状菌に与える影響の解析

池田彩乃¹, 千葉悠斗¹, 浦山俊一^{2,4}, 萩原大祐^{2,3,4} (¹筑波大院・生命地球科学, ²筑波大・生命環境系, ³千葉大・MMRC, ⁴筑波大・MiCS)

糸状菌にはウイルス（以下、菌類ウイルス）が広く潜伏しており、その多くは宿主に対して表現型の変化を与えないと考えられている。しかし、この一般則は限られた培養条件下での（形態などの）簡易な表現型観察に基づいて得られたものである。そこで、本研究では複数のウイルスと宿主のセットを用いた体系的な表現型解析を行い、菌類ウイルスが宿主に与える影響の実態や、宿主菌の生態において果たす役割を明らかにすることを旨とする。先行研究で取得された、ウイルスを保持する5株の *Aspergillus fumigatus* を対象に、ウイルス除去株を作成し、様々な培養条件下で表現型を比較した。本菌の生育至適条件である、37°C、PDAプレートで培養したところ、ウイルス保持株と非保持株間で形態や生育速度に違いは見られなかった。一方、最小培地で培養した場合、ウイルス保持株において生育促進を示す株が見出された。続いて、各種抗真菌薬に対する感受性を比較したところ、アンフォテリシンBに対してウイルス感染により耐性を示す株が見出された。また、宿主菌が産生する二次代謝産物のプロファイルが、ウイルスの感染有無で変化する株も見出された。これらの結果から、従来ほとんどの菌類ウイルスは宿主菌の表現型に影響を与えないとされてきたが、実際には特定の条件下でその機能を顕すことが明らかになった。ウイルスは宿主菌の表現型に多様性を与える因子とも捉えることが可能であり、そこにはまだ知られざる機能や役割があると考えられる。

Analysis of the effects of fungal viruses on host filamentous fungi

Ayano Ikeda¹, Yuto Chiba², Syun-ichi Urayama^{2,4}, Daisuke Hagiwara^{2,3,4}

(¹Dept. of Life & Earth Sci., Univ. of Tsukuba, ²Fac. of Life & Env., Univ. of Tsukuba, ³MMRC., Univ. of Chiba,

⁴MiCS., Univ. of Tsukuba.)

* P-66

イネいもち病菌における超低濃度酢酸による代謝スイッチングと感染特異的細胞分化機構

佐藤大元¹, 黒木美沙², 荒添貴之¹, 鎌倉高志¹ (¹東理大院・理工, ²筑波大・生命環境)

イネいもち病菌は付着器と呼ばれる感染特異的な器官を形成して植物体内に侵入する。付着器は外部環境因子の認識から細胞内シグナル伝達、関連遺伝子群の発現、細胞の形態形成が同調的に起こる細胞分化を経て形成される。キチン脱アセチル化酵素である Cbp1 は付着器形成初期に特異的に発現し、その酵素活性により細胞壁であるキチンをキトサンへと変換する。我々はこの細胞壁の変換時に放出される酢酸に着目し、1 fM という極めて低濃度の酢酸が貧栄養下で働くグリオキシル酸経路の活性化を介して付着器形成を誘導することを見出した (Kuroki et al., 2020)。本研究では酢酸の認識から代謝のスイッチングまでの一連の細胞応答機構に関与することが推測される細胞膜タンパク質、シグナル伝達経路および代謝関連遺伝子について単独破壊株ならびに *CBP1* との二重破壊株を作成し、付着器形成と酢酸応答への関与について網羅的に解析した。その結果、外部刺激や環境認識に関わる細胞膜タンパク質 Sho1、付着器形成の主要 MAPK である Pmk1、代謝関連遺伝子の制御に関わる転写因子 Far2、Pyruvate-Acetaldehyde-Acetate (PAA) 経路の主要酵素である Pdc1、ペルオキシソーム形成に関わる Pex6 の関与を見出した。また RNA-seq 解析により、 $\Delta cbp1$ 株において付着器形成時に生じる解糖系遺伝子の発現抑制がみられず、酢酸の添加によってその抑制が回復することを明らかにした。以上の結果より、細胞壁から放出された酢酸は Sho1 によって認識され、付着器形成に関わるシグナルの伝達・変換を経て β 酸化や PAA 経路の活性化が生じること、これにより細胞内での酢酸を含む脂肪酸合成が開始し、グリオキシル酸回路で利用されるアセチル-CoA の供給源となることで TCA 回路からグリオキシル酸回路へのスイッチングが生じることが推察された。

Ultra-trace amount of acetic acid stimulates metabolic switching-mediated infection specific cell differentiation in the rice blast fungus

Taigen Sato¹, Misa Kuroki², Takayuki Arazoe¹, Takashi Kamakura¹

(¹Grad. Sch. Sci. Tech., Tokyo Univ. of Sci.; ²Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

発表者索引

- A*
- Antonio Di Pietro.... 13
- C*
- Chuner Yang.....48
- D*
- Daidi Chen27, 36
- Dong Min Kim.....37
- G*
- Gayan Abeysinghe ..47
- Genta Kobayashi.....43
- H*
- Haruka Minagawa...38
- Hideo Nakano38
- Hiroya Oka.....38
- Hongli Wu34
- J*
- Jingyun Jin46
- Jun-ichi Maruyama .38
- K*
- Katsuhiko Kitamoto 38
- Kei Kimura43
- L*
- Li LIU33
- M*
- Manabu Arioka37
- Masahiro Ogawa.....38
- Masatoshi Goto43
- S*
- Shuichiro Baba.....43
- Sittichoke Ketkaco..43
- T*
- Taiki Futagami43
- Takaaki Kojima.....38
- Takuya Katayama... 38
- W*
- Werasit
- Sanpamongkolchai
- 43
- X*
- Xueyan Sun..... 38
- Y*
- Yukio Nagano..... 43
- あ*
- 浅井禎吾..... 14
- 阿部敬悦... 26, 30, 32,
- 43, 44
- 天久まどか..... 59
- 荒川洋輔..... 41
- 荒添貴之..... 40, 62
- 有江力..... 40
- 安藤直子..... 59
- い*
- 池田彩乃..... 62
- 石崎裕也... 26, 30, 32,
- 44
- 井田大輝..... 44
- 井谷綾花..... 24, 54
- 一石昭彦..... 39, 41
- 市川暉..... 43
- 入枝泰樹..... 60
- 岩下和裕..... 45
- 岩橋由佳..... 54
- 岩間亮.. 26, 46, 48, 52
- う*
- 上野綾子..... 49
- 植松清次..... 50
- 内田景子..... 50
- 内田百岳..... 40
- 内平瑛子..... 49
- 梅村舞子..... 51
- 浦山俊一... 25, 29, 50,
- 54, 57, 60, 61, 62
- お*
- 及川英秋..... 45, 58
- 老木紗予子..... 61
- 老沼研一..... 34
- 大倉玲子..... 24, 54
- 大里修一..... 59
- 大武侑平..... 45
- 大森英之..... 41
- 小笠原涉... 24, 45, 54
- 岡拓二..... 32, 55
- 小川翠..... 47
- 荻野千秋..... 31
- 荻原淳..... 42
- 奥田希実..... 34
- 小田倉里佳..... 39
- 織田健..... 45, 53
- 小野太暉..... 31
- か*
- 柿崎徹也..... 40, 58
- 片岡涼輔..... 42
- 片山琢也... 23, 44, 45,
- 53, 58
- 加藤志穂..... 39, 41
- 加藤直樹... 29, 35, 57
- 加藤大志..... 30
- 加藤雅士... 23, 30, 31,
- 42
- 加藤好一..... 43
- 門岡千尋... 27, 32, 33,
- 53, 55, 59
- 加戸悠..... 31
- 金政真..... 33, 40, 58
- 鎌倉高志..... 40, 62
- 亀井克彦..... 51
- 香山溪太..... 35
- 河内護之... 34, 35, 51
- 川尻康平..... 40
- 河原崎泰昌..... 28, 37
- き*
- 菊間隆志..... 56
- 喜多光徹..... 40
- 北出雄生..... 55
- 北原雪菜..... 24, 54
- 木村真..... 59
- 金京運..... 46
- く*
- 楠本憲一..... 41
- 楠屋陽子..... 29, 61
- 工藤凱門..... 47
- 久保友汰..... 39
- 栗岩薫..... 51
- 樽林一皓..... 51
- 黒木美沙... 25, 50, 62
- 黒田裕樹..... 53
- こ*
- 呉紅麗..... 34
- 小泉慶明..... 59
- 幸田明生..... 31
- 兒島孝明..... 23, 42
- 小西高裕..... 40
- 小林美穂..... 41
- 五味勝也... 28, 37, 38
- 古明地敬介..... 43
- 近藤昭彦..... 31
- さ*
- 齋藤直也... 23, 44, 45,
- 53, 58
- 齋藤有美... 26, 30, 44
- 坂川絵里香..... 33
- 坂口雅和..... 42
- 坂本正弘... 34, 35, 51
- 作田康平..... 50
- 佐々木信光..... 47
- 佐藤薫..... 41
- 佐藤大元..... 62
- 佐藤光希子..... 49

- 佐波雅史24, 56
- し
- 重信秀治23, 44
- 志田洋介 ...24, 45, 54
- 志水元亨 ...23, 27, 30, 31, 33, 42
- 新谷尚弘 ...28, 37, 38
- す
- 須澤徹生48
- 鈴木康太27, 33, 59
- 鈴木聡41
- 鈴木孝征33, 58
- 薄田隼弥43
- 鈴木智大31
- 鈴木遥香47
- 鈴木裕満30, 31
- た
- 高野義孝60
- 高橋俊二 ...29, 35, 57
- 高橋尚央32
- 高橋弘喜29, 61
- 高橋泰志30
- 高橋慶晃56
- 高谷直樹 ...25, 27, 33, 34, 39, 47, 51, 52, 53, 54, 59
- 竹川薫46, 49
- 竹下典男 ...25, 47, 52, 53, 54
- 武田陽一56
- 竹山さわな27, 36
- 田中拓未 ...26, 30, 32, 44
- 田中千尋 ...24, 27, 36, 55, 56
- 田中瑞己 ...28, 37, 49
- 田中優花子36
- 田中大32, 55
- ち
- 知見悠太23, 44
- 千葉悠斗... 29, 60, 61, 62
- 陳帶娣..... 27, 36
- つ
- 塚越まどか..... 59
- 辻健也..... 27, 36, 55
- 辻野義雄..... 31
- 辻僚太郎..... 36
- 都築翔..... 23, 42
- 坪井宏和..... 31
- て
- 寺内裕貴... 26, 30, 32, 44
- 寺岡徹..... 40
- と
- 富田理..... 41
- 豊田稔介..... 33
- 豊留孝仁..... 51
- 豊福雅典..... 54
- な
- 中沢威人... 34, 35, 51
- 中嶋佑一..... 59
- 永野真吾..... 29, 57
- 中村華穂..... 33
- 成田卓美..... 41
- に
- 西岡佐和子..... 36
- 西岡利隆..... 34
- 西尾讓一郎..... 56
- 二宮章洋..... 57
- ぬ
- 沼澤里佳..... 36
- 沼本穂..... 35
- の
- 野村暢彦..... 54
- 野村将..... 41
- 野村亮..... 23, 42
- は
- 萩達朗..... 41
- 萩原大祐... 18, 25, 29, 50, 51, 54, 57, 60, 61, 62
- 橋本渉..... 28, 38
- 浜田勇和..... 40, 58
- 浜中祐弥..... 53
- 林大三..... 58
- 林田空..... 41
- 原中実穂..... 58
- ひ
- 日浅怜子..... 46
- 樋口裕次郎..... 46, 49
- 備瀬政晃..... 32
- 平井献士..... 39, 41
- 平井剛..... 35
- 晝間敬..... 15
- ふ
- 福井志帆..... 40
- 福田紗弓..... 25, 52
- 福田良一..... 48
- 福原敏行..... 50, 60
- 藤ヶ崎礼夏..... 40
- 藤田翔貴..... 28, 37
- 藤林悠希..... 27, 36
- 藤村真..... 39, 41
- 藤山敬介..... 29, 57
- 二神加奈恵..... 27, 36
- ほ
- 坊垣隆之..... 31
- 細田柊志..... 53
- 堀井雅人..... 34
- 堀内裕之... 26, 46, 48, 52
- 本田与一 ... 34, 35, 51
- ま
- 前田一行..... 59
- 榊尾俊介... 27, 33, 34, 39, 51, 54, 59
- 丸山潤一 ...21, 23, 44, 45, 53, 58
- 丸山洋平 60
- み
- 三浦孝之 41
- 水谷治 28, 38
- 溝上哲哉 47
- 三ツ石方也26, 30, 32, 44
- 南篤志45, 58
- 宮澤拳 43
- む
- 武藤清明 43
- 村田紋奈 58
- も
- 森瀬太一 28, 38
- 守田湧貴 49
- 森山裕充 50, 60
- 森玲香 31
- や
- 矢口貴志 ...25, 50, 51, 61
- 安井瑞稀 53
- 藪浩 26, 30, 32, 44
- 山形洋平 ...28, 36, 37, 47, 49
- 山口勝司 23, 44
- 山下秀行 41
- 山田修 28, 38, 42
- 山本太一 51
- 山本里穂 25, 52
- よ
- 楊淳児 48
- 吉田裕史 24, 56
- 吉見啓 . 16, 24, 26, 27, 30, 32, 36, 43, 44, 55, 56
- 頼永萌々佳 47

り
劉麗33

わ
若井暁..... 31

若本祐一..... 24, 54
渡部昭..... 28, 38

渡辺哲29, 51, 61
渡邊泰祐42

糸状菌分子生物学研究会 会則

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

以上

補則

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

附則

本会則は, 平成 28 年 11 月 18 日から発効する。

糸状菌分子生物学研究会運営委員会名簿

会 長

堀内 裕之 東京大学大学院 農学生命科学研究科

運営委員

五十嵐 圭日子 東京大学大学院 農学生命科学研究科
石田 博樹 月桂冠株式会社
伊藤 考太郎 キッコーマン株式会社
小笠原 渉 (編集担当) 長岡技術科学大学大学院 生物機能工学専攻
織田 健 酒類総合研究所
木村 真 名古屋大学生命農学研究科
後藤 正利 佐賀大学 農学部
櫻谷 英治 徳島大学 生物資源産業学部
佐野 元昭 金沢工業大学 ゲノム生物工学研究所
新谷 尚弘 (庶務担当) 東北大学大学院 農学研究院
曾根 輝雄 北海道大学大学院 農学研究院
高野 義孝 京都大学大学院 農学研究科
高谷 直樹 筑波大学大学院 生命環境科学研究科
谷 修治 (広報担当) 大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科
丸山 潤一 東京大学大学院 農学生命科学研究科
山形 洋平 (会計担当) 東京農工大学大学院 農学研究院

会計監査

加藤 雅士 名城大学 農学部

糸状菌遺伝子研究会賛助会員（50音順）

株式会社秋田今野商店
アサヒビール株式会社
天野エンザイム株式会社
イチビキ株式会社
大関株式会社
菊正宗酒造株式会社
キッコーマン株式会社
月桂冠株式会社
合同酒精株式会社
三和酒類株式会社
新日本化学工業株式会社
寶酒造株式会社
公益財団法人日本醸造協会
公益財団法人野田産業科学研究所
ノボザイムズ・ジャパン株式会社
白鶴酒造株式会社
八海醸造株式会社
株式会社ビオック
ヒガシマル醤油株式会社
株式会社樋口松之助商店
ヒゲタ醤油株式会社
株式会社フジワラテクノアート
マルコメ株式会社
Meiji Seika ファルマ株式会社
名糖産業株式会社
盛田株式会社
ヤマサ醤油株式会社
株式会社雪国まいたけ