

The 21th Conference on

Fungal Genetics

and

Molecular Biology

第 21 回糸状菌分子生物学コンファレンス

2022 年 11 月 24 日 – 25 日

Zoom および SpatialChat 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
シンポジウム講演要旨	11
オンライン・セミナー要旨	21
口頭発表講演要旨	23
ポスター発表講演要旨	31
発表者索引	62
糸状菌分子生物学研究会会則	64
糸状菌分子生物学研究会運営委員名簿	65
糸状菌遺伝子研究会賛助会員	66

第 21 回糸状菌分子生物学コンファレンス

日時：2022年11月24日(木)-25日(金)

会場：Zoom および SpatialChat 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24日(木)

10:25-10:30	開会の辞	〈 Zoom 〉
10:30-12:06	口頭発表 (0-1~0-8)	〈 Zoom 〉
12:10-13:30	昼食	
13:30-15:30	ポスター発表 (奇数番号)	〈 SpatialChat 〉
15:30-15:40	休憩	
15:40-17:04	口頭発表 (0-9~0-15)	〈 Zoom 〉

11月25日(金)

10:00-12:00	ポスター発表 (偶数番号)	〈 SpatialChat 〉
12:00-13:30	昼食	
13:30-16:05	シンポジウム	〈 Zoom 〉
16:05-16:30	休憩	
16:30-17:30	オンライン・セミナー	〈 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	〈 SpatialChat 〉

発表演題および講演時間

11月25日(金) 13:30 - 16:05

シンポジウム

「二次代謝が紡ぐ微生物生理と生物間相互作用」

〔座長：櫻谷 英治(S-1,2), 高野 義孝(S-3), 木村 真(S-4,5)〕

13:30-13:35

はじめに

13:35-14:05

S-1 「真正担子菌の子実体発生と木材分解における代謝と生理」

中沢 威人(京都大学大学院農学研究科)

14:05-14:35

S-2 「糸状菌にも寄生する植物病原細菌」

甲斐 建次(大阪公立大学大学院農学研究科)

14:35-15:05

S-3 「植物二次代謝物を介した植物-糸状菌間の軍拡競争」

熊倉 直祐(理化学研究所)

15:05-15:35

S-4 「かび毒分解微生物によるコムギ赤かび病の発症抑制効果」

佐藤 育男(名古屋大学大学院 生命農学研究科)

15:35-16:05

S-5 「イネいもち病菌の二次代謝産物の生合成と生物間相互作用における役割」

本山 高幸(理化学研究所)

11月25日(金) 16:30 - 17:30

オンライン・セミナー

〔座長：後藤 正利〕

「かれこれ十数年、黒麹菌を勉強しています」

山田 修(酒類総合研究所)

口頭発表 (O-1~O-8) 11月24日(木) 10:30 - 12:06

[座長: 萩原 大祐 (O-1,2,3), 岩間 亮 (O-4,5,6), 酒井 香奈江(O-7,8)]

- 10:30 O-1 醤油麹菌 *Aspergillus sojae* における転写因子 AsFibC の固体培養特異的な酵素生産への影響
藤田翔貴¹, 片山琢也², 丸山潤一², 新谷尚弘¹, 五味勝也¹ (¹東北大院・農, ²東大院・農生科)
- 10:42 O-2 黒麹菌 Aox (Alternative oxidase) と発熱現象との関連性に関する研究
具志堅結香, 中村療, 渡嘉敷直杏, 外山博英, 水谷治 (琉球大・農)
- 10:54 O-3 麹菌におけるゲノム編集を利用した染色体大規模欠損の異種天然物生産に対する効果
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)
- 11:06 O-4 *Aspergillus oryzae* の気中菌糸の形成におけるリン脂質組成の重要性
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, ²東大・微生物連携機構)
- 11:18 O-5 黄麹菌生細胞におけるグルコアミラーゼ mRNA の時空間制御機構
守田湧貴, 竹川薫, 樋口裕次郎 (九大院・生資環)
- 11:30 O-6 Cellular dynamics and role of mitochondrial fission in heterokaryon incompatibility of *Aspergillus oryzae*
Yahong Zou¹, Chan Lu¹, Takuya Katayama^{1,2}, Ryota Saito³, Kazuhiro Iwashita³, Jun-ichi Maruyama^{1,2}
(¹Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, ²CRIIM, The Univ. of Tokyo, ³NRIB)
- 11:42 O-7 3種の地衣化担子菌類のゲノムが保有する CAZyme レパートリーの比較
升本宙¹, 吉橋佑馬², 出川洋介², 田中千尋¹ (¹京都大・地球環境学堂, ²筑波大・菅平)
- 11:54 O-8 白麹菌 *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii* における α -アミラーゼ AmyB の機能解析
井上太雅¹, 山口正晃¹, 門岡千尋², 奥津果優¹, 吉崎由美子¹, 高峯和則¹, 後藤正利³, 玉置尚徳¹, 二神泰基¹ (¹鹿児島大大学院・農林水産学研究科, ²崇城大・生物生命学部, ³佐賀大・農学部)

口頭発表 (O-9~O-15) 11月24日(木) 15:40 - 17:04

[座長: 田中 瑞己 (O-9,10), 辻 健也 (O-11,12), 玉野 孝一(O-13,14,15)]

- 15:40 O-9 ウシグソヒトヨタケの傘成熟に必要な暗期と CcChd1 タンパク質と減数分裂の関係性
阿部晴紀, 三村玲, 畑中こずえ, 村口元 (秋田県立大・生物資源)
- 15:52 O-10 麹菌 *Aspergillus oryzae* の細胞融合に関わる新規転写因子の探索
川崎淳平¹, 片山琢也^{1,2}, 丸山潤一^{1,2} (¹東大院・農生科・応生工, ²東大・微生物連携機構)
- 16:04 O-11 トウモロコシ黒穂病菌における tRNA 由来 RNA 断片の生成と分泌
芳本玲, 石田史子, 山口美幸, 田中茂幸 (摂南大・農)
- 16:16 O-12 植物病原性糸状菌 *Fusarium oxysporum* の侵襲性と病原性の関連
酒造ひなた¹, 井谷綾花¹, 山本里穂¹, 高谷直樹¹, 佐藤良勝², Antonio Di Pietro³, 竹下典男¹ (¹筑波大・MiCS, ²名古屋大・ITbM, ³コルドバ大学・遺伝学科)
- 16:28 O-13 アミノ酸生合成を介した *Aspergillus nidulans* の一酸化窒素ストレス耐性機構
天久まどか, 門岡千尋, 塚越まどか, 榊尾俊介, 高谷直樹 (筑波大・生命環境・MiCS)
- 16:40 O-14 白色腐朽担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* のリグニンフラグメント分解機構
加藤大志, 早坂実夏, 鈴木裕満, 加藤雅士, 志水元亨 (名城大院・農)
- 16:52 O-15 麹菌における核の増加と菌糸形態および酵素生産性の関連
一ノ瀬恵¹, 細田柊志¹, 井谷綾花¹, 高谷直樹¹, 織田健², 山下秀行³, 酒井香奈江⁴, 田中拓未⁴, 楠本憲一⁴, 竹下典男¹ (¹筑波大・MiCS, ²酒類研, ³樋口松之助商店, ⁴阪大院・工)

ポスター発表

11月24日(木) 13:30 – 15:30 (奇数番号)

ROOM1 : P-1・3・5・7 ROOM2 : P-9・11・13・15 ROOM3 : P-17・19・21・23

ROOM4 : P-25・27・29・31 ROOM5 : P-33・35・37・39 ROOM6 : P-41・43・45・47

ROOM7 : P-49・51・53・55 ROOM8 : P-57・59・61

11月25日(金) 10:00 – 12:00 (偶数番号)

ROOM9 : P-2・4・6・8 ROOM10 : P-10・12・14・16 ROOM11 : P-18・20・22・24

ROOM12 : P-26・28・30・32 ROOM13 : P-34・36・38・40 ROOM14 : P-42・44・46・48

ROOM15 : P-50・52・54 ROOM16 : P-56・58・60

(*は学生)

- * P-1 麹菌における核を丸ごと分解するヌクレオファジーの分子機構の解析
橋本真宇¹, 黄梅昌朗¹, 有岡学^{1,2} (¹東大院・農生科・応生工, ²東大・CRIIM)
- P-2 Differential response of soil-related components in two strains of *Aspergillus oryzae*
Liyun Liu, Takumi Tanaka, Kanae Sakai, Ken-Ichi Kusumoto (Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)
- * P-3 麹菌における RIDD 低減株造成を目指した IreA の機能解析
横山将己, 五味勝也, 新谷尚弘 (東北大院・農)
- * P-4 麹菌の液体培養における自己生育阻害物質の生産能と感受性に関する解析
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)
- P-5 醤油麹菌 *Aspergillus sojae* における転写因子 AsFibC の固体培養特異的な酵素生産への影響
藤田翔貴¹, 片山琢也², 丸山潤一², 新谷尚弘¹, 五味勝也¹ (¹東北大院・農, ²東大院・農生科)
- * P-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, 酒造ひなた, 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-7 麹菌ハイドロフォビン RoIA の自己組織化に静電的相互作用が与える影響の解析
高橋尚央¹, 寺内裕貴², 田中拓未³, 吉見啓⁴, 藪浩^{5,6}, 阿部敬悦¹ (¹東北大院・農, ²京都大院・学舎, ³大阪大院・工, ⁴京都大院・農, ⁵東北大・多元, ⁶東北大・AIMR)
- P-8 *Aspergillus section Nigri* のプロトプラスト形成に及ぼす mutanase の添加効果
渡嘉敷直杏¹, 草山泰和², 五味勝也¹ (¹東北大院・農, ²サービステックジャパン)
- * P-9 黒麹菌 Aox (Alternative oxidase) と発熱現象との関連性に関する研究
具志堅結香, 中村燎, 渡嘉敷直杏, 外山博英, 水谷治 (琉球大・農)
- * P-10 麹菌におけるゲノム編集を利用した染色体大規模欠損の異種天然物生産に対する効果
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-11 *Aspergillus oryzae* における Tet-on システムの最適化
大島侃¹, 峯岸悠也¹, 田中瑞己¹, 二神泰基², 山形洋平¹ (¹農工大・応用化, ²鹿児島大・農)

- * P-12 異種分泌タンパク質遺伝子導入による麹菌の生育ストレスの解析
開田有紗¹, 三澤恒汰², 五味勝也¹, 新谷尚弘¹ (¹東北大院・農, ²東北大・農)
- * P-13 黄麹菌 ΔAG-GAG 株におけるニゲラン高生産株の造成
阿部多恵¹, 與古田佳世¹, 阿部敬悦², 外山博英¹, 上地敬子¹, 水谷治¹ (¹琉球大院・農, ²東北大院・農)
- * P-14 鯉節カビ *Aspergillus chevalieri* における生活環に関わる遺伝子の解析
平松健太郎¹, 門岡千尋², 森一樹³, 田代康介³, 奥津果優¹, 吉崎由美子¹, 高峯和則¹, 玉置尚徳¹, 二神泰基¹ (¹鹿兒島大院・農林水産, ²崇城大・生物生命, ³九大院・農)
- * P-15 アカパンカビにおける *RAD7*, *RAD16* の機能解析
須澤文生香, 吉野航, 藤村真, 一石昭彦 (東洋大院・生命科)
- * P-16 黄麹菌 *Aspergillus oryzae* におけるエンドサイトーシス関連因子 AipA と新規相互作用タンパク質の解析
日浅怜子, 竹川 薫, 樋口裕次郎 (九大院・生資環)
- * P-17 白色腐朽菌ヒラタケにおける蛍光融合タンパク質を用いたタンパク質分泌経路の可視化
樽林一皓, 中沢威人, Shivani, 河内護之, 坂本正弘, 本田与一 (京大院・農)
- * P-18 ウシグソヒトヨタケの生長中栄養二核菌糸におけるセプチン関連タンパク質の動態
柿崎哲哉¹, 小峠優佳¹, 松渕美月¹, 菅生麻友¹, 本間ちはる¹, 附田浩基¹, 佐藤壮一¹, 塩谷達弘¹, 中村宏江¹, Amy Gladfelter², 竹下典男³, 村口元¹ (¹秋田県立大・生物資源, ²ノースカロライナ大, ³筑波大)
- * P-19 菌糸ネットワークは局所的な Ca²⁺シグナルの伝播により地方分権型のストレス応答を示す
井谷綾花¹, 梶尾俊介¹, 山本里穂¹, 芹澤知子¹, 深澤遊², 高谷直樹¹, 豊田正嗣³, 別役重之⁴, 竹下典男¹ (¹筑波大・MiCS, ²東北大院・農, ³埼玉大・理工, ⁴龍谷大・農)
- P-20 水平伝播頻度から *Aspergillus flavus* におけるマイコウイルスの宿主特異性を俯瞰する
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)
- * P-21 *Aspergillus oryzae* の気中菌糸の形成におけるリン脂質組成の重要性
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, ²東大・微生物連携機構)
- * P-22 黄麹菌生細胞におけるグルコアミラーゼ mRNA の時空間制御機構
守田湧貴, 竹川薫, 樋口裕次郎 (九大院・生資環)
- * P-23 糸状菌が放出する細胞外膜小胞に含まれる二次代謝産物の探索
三上力輝¹, 二宮章洋², 浦山俊一^{3,4}, 萩原大祐^{3,4} (¹筑波大院・生命地球環境, ²東大院・農, ³筑波大・生命環境系, ⁴筑波大・MiCS)
- * P-24 イネいもち病菌におけるクロラムフェニコールによる付着器形成阻害機構
粟根志織, 樋口絵莉香, 田代綾子, 野坂亮仁, 荒添貴之, 鎌倉高志 (東理大・理工)
- P-25 病原性糸状菌 *Aspergillus fumigatus* の臨床分離株の表現型と細胞壁成分の比較解析
宮澤拳¹, 梅山隆¹, 高塚翔吾¹, 村長保憲¹, 星野泰隆¹, 阿部雅広¹, 阿部敬悦, 宮崎義継¹
(¹感染研・真菌部, ²東北大院農・農化)

- P-26** 木材腐朽菌の菌糸体における週周電位振動の発見
深澤遊¹, 赤井大介², 武樋孝幸² (1東北大, 2長岡高専)
- P-27** 糸状菌 *Aspergillus nidulans* のライフサイクルにおけるリン脂質組成のダイナミックな変動
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-28** 分散型麹菌のオルガネラ観察とオミックス解析
鈴木智大¹, 小野大暉¹, 若井暁^{2,3}, 近藤昭彦², 荻野千秋¹ (1神戸大院・工, 2神戸大院・イノベ, 3海洋機構)
- * **P-29** Cellular dynamics and role of mitochondrial fission in heterokaryon incompatibility of *Aspergillus oryzae*
Yahong Zou¹, Chan Lu¹, Takuya Katayama^{1,2}, Ryota Saito³, Kazuhiro Iwashita³, Jun-ichi Maruyama^{1,2}
(1Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, 2CRIIM, The Univ. of Tokyo, 3NRIB)
- * **P-30** 麹菌 *Aspergillus oryzae* における推定新規ペキソファジー関連タンパク質の解析
西尾譲一郎, 武田陽一, 菊間隆志 (立命館大院・生物工)
- P-31** 担子孢子形成に必須な新奇分泌タンパク質の特性評価
吉田裕史, 坂本裕一 (岩手生工研)
- * **P-32** 糸状菌 *Aspergillus nidulans* のラムノガラクトuronan分解機構の解明
亀山綾音, 鈴木裕満, 志水元亨, 加藤雅士 (名城大院・農)
- P-33** 糸状菌に特徴的な α -(1→6)-マンノース転移酵素 AnpA は *Aspergillus fumigatus* における真菌型ガラクトマンナン¹の生合成に必須である
門岡千尋¹, 平大輔¹, 田中大², 宮澤拳³, 高塚翔吾³, 岡拓二¹ (1崇城大・生物, 2東北医薬大・薬, 3感染研)
- P-34** 黄麹菌 (*A. oryzae*) 及び黒麹菌 (*A. luchuensis*) の液胞ペプチダーゼ PepE は凝乳酵素である。
田久陽子¹, 浅村太郎¹, 岡本綾子¹, 前田浩¹, 竹内道夫¹, 楠本憲一², 片瀬徹³, 石田弘樹⁴, 田中瑞己¹, 山形洋平¹ (1農工大・応生, 2阪大・生物工, 3天野エンザイム, 4月桂冠)
- P-35** 麹菌酸性ホスファターゼの機能解析
酒井香奈江¹, 鈴木忠宏², 堀井悠一郎³, 和久豊⁴, 楠本憲一¹ (1阪大院・工, 2農研機構, 3新潟食品研, 4(株)ピオック)
- * **P-36** *Aspergillus nidulans* の NO 耐性に関わる P450 関連遺伝子の機能解析
小島才卓, 鈴木康太, 榊尾俊介, 志水元亨, 高谷直樹 (筑波大・生命環境/MiCS)
- P-37** 3種の地衣化担子菌類のゲノムが保有する CAZyme レパートリーの比較
升本宙¹, 吉橋佑馬², 出川洋介², 田中千尋¹ (1京都大・地球環境学, 2筑波大・菅平)
- * **P-38** 白麹菌 *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii* における α -アミラーゼ AmyB の機能解析
井上太雅¹, 山口正晃¹, 門岡千尋², 奥津果優¹, 吉崎由美子¹, 高峯和則¹, 後藤正利³, 玉置尚徳¹, 二神泰基¹ (1鹿児島大大学院・農林水産学, 2崇城大・生物生命学部, 3佐賀大・農学部)
- * **P-39** 植物バイオマスの分解における糸状菌間の相互作用解析
大西みはる¹, 岩波明季¹, 浦山俊一^{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)

- * P-40 ウシグソヒトヨタケの傘成熟に必要な暗期と CcChd1 タンパク質と減数分裂の関係性
阿部晴紀, 三村玲, 畑中こずえ, 村口元 (秋田県立大・生物資源)
- * P-41 *Aspergillus fumigatus* の大規模ゲノム解析による新規二次代謝遺伝子クラスターの探索
永山聖樹¹, 楠屋陽子¹, 高橋弘喜^{1,2,3} (1千葉大・真菌センター, 2千葉大・分子キラリティー
研究センター, 3千葉大・植物分子科学研究センター)
- * P-42 *Aspergillus nidulans* の分生子形成に関わる新規転写因子 SrdA の同定
小川真弘¹, 土屋慧², 岩間亮^{2,3}, 堀内裕之^{2,3} (1野田産研, 2東大院・農生科・応生工, 3東大・
微生物連携)
- * P-43 アカパンカビの F-box タンパク質 *exo-1/dgr-2* の欠損株と点変異(S11L)株の形質の比較
平井献士¹, 加藤志穂¹, 陳心怡¹, 福森文康², 一石昭彦¹, 藤村真¹ (1東洋大院・生命, 2東
洋大院・食環境)
- P-44 グルコースがウシグソヒトヨタケの子実体発生を抑制する機構の解析
坂本裕一¹, 佐藤志穂¹, 刑部敬史², 吉田裕史¹ (1岩手生工研, 2徳島大)
- * P-45 黄麹菌 PrtR の転写制御機構における局在解析
沼澤里佳¹, 田中優花子², 白石敦士², 西岡佐和子², 辻遼太郎², 田中瑞己^{1,2}, 山形洋平^{1,2}
(1農工大院・連農, 2農工大院・応生化)
- * P-46 麹菌 *Aspergillus oryzae* の細胞融合に関わる新規転写因子の探索
川崎淳平¹, 片山琢也^{1,2}, 丸山潤一^{1,2} (1東大院・農生科・応生工, 2東大・微生物連携機構)
- * P-47 アカパンカビ *upr-1* 遺伝子の転写制御因子の探索
木下颯也, 椎崎一宏, 藤村真, 一石昭彦 (東洋大・生命科)
- P-48 麹菌 *Aspergillus oryzae* 種内におけるハイドロフォピン RolA の変異は, RolA の自己組織化能の
種内多様性を示唆する
田中拓未¹, 阿部敬悦², 楠本憲一¹ (1大阪大院・工, 2東北大院・農)
- P-49 黄麹菌の胞子色素の成熟には2つのラッカーゼ遺伝子が主に関与している
玉野孝一^{1,2}, 高山晴香¹, 八十川さえ子¹, 佐野元昭³, Scott E. Baker⁴ (1産総研・生物プロセス
研究部門, 2産総研・CBBD-OIL, 3金沢工業大学, 4パシフィックノースウエスト国立研究所)
- * P-50 麹菌における核の増加と菌糸形態および酵素生産性の関連
一ノ瀬恵¹, 細田柊志¹, 井谷綾花¹, 高谷直樹¹, 織田健², 山下秀行³, 酒井香奈江⁴,
田中拓未⁴, 楠本憲一⁴, 竹下典男¹ (1筑波大・MiCS, 2酒類研, 3樋口松之助商店, 4阪大院・
工)
- * P-51 アミノ酸生合成を介した *Aspergillus nidulans* の一酸化窒素ストレス耐性機構
天久まどか, 門岡千尋, 塚越まどか, 梶尾俊介, 高谷直樹 (筑波大・生命環境・MiCS)
- * P-52 もみ殻培養で産生される糸状菌二次代謝化合物の生物間相互作用における役割
須藤快¹, 鎌倉高志², 浦山俊一^{3,4}, 萩原大祐^{3,4} (1筑波大院・生命地球科学, 2東理大・理工
学部応用生物科学科, 3筑波大・生命環境系, 4筑波大・MiCS)
- * P-53 白色腐朽担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* のリグニンフラグメント分解機構
加藤大志, 早坂実夏, 鈴木裕満, 加藤雅士, 志水元亨 (名城大院・農)

- * P-54 糸状菌由来新規エルゴステロールアミノ酸誘導体の生理機能解析
横川大祐¹, 立松俊祐¹, 佐賀裕亮¹, Frédéric Fischer², Hubert D. Becker², 久城哲夫¹ (1 明治大・院農・農芸化学, 2 ストラスブール大)
- * P-55 植物病原性糸状菌 *Fusarium oxysporum* の侵襲性と病原性の関連
酒造ひなた¹, 井谷綾花¹, 山本里穂¹, 高谷直樹¹, 佐藤良勝², Antonio Di Pietro³, 竹下典男¹
(1 筑波大・MiCS, 2 名古屋大・ITbM, 3 コルドバ大学・遺伝学科)
- P-56 トウモロコシ黒穂病菌における tRNA 由来 RNA 断片の生成と分泌
芳本玲, 石田史子, 山口美幸, 田中茂幸 (摂南大・農)
- * P-57 コムギ赤カビ病菌における新規ステロールアミノ酸誘導体の生理機能解析
金子雅弘¹, 横川大祐¹, 佐賀裕亮¹, Frédéric Fischer², Hubert D. Becker², 久城哲夫¹ (1 明治大・院農・農芸化学, 2 ストラスブール大)
- P-58 ウリ類炭疽病菌の細胞内ステロール輸送機構は膜湾曲と付着器侵入に必要である
小玉紗代¹, 梶河直起², 深田史美^{2,3}, 久保康之¹ (1 摂南大・農, 2 京府大院・生環, 3 岡山大・資源植物研)
- * P-59 平板培養時に高頻度で生じるイネいもち病菌の雌性稔性の喪失
喜多光徹¹, 内田百岳¹, 寺岡徹², 有江力², 荒添貴之¹, 鎌倉高志¹ (1 東理大・理工, 2 農工大・農)
- P-60 *Bipolaris maydis* の菌糸表面疎水性におけるハイドロフォビンの関与についての調査
辻健也¹, 佐波雅史¹, 寺内裕貴², 吉見啓¹, 田中千尋^{1,2}, 本田与一¹, 河内護之¹ (1 京大院・農, 2 京大院・学舎)
- * P-61 北海道のテンサイ褐斑病菌に感染する新規マイコウイルス探索および薬剤感受性への影響の調査
津金朋代¹, 栢森美幸², 福原敏行³, 森山裕充¹ (1 農工大・農, 2 北海道立総合研究機構)

Symposium

二次代謝が紡ぐ

微生物生理と生物間相互作用

真正担子菌の子実体発生と木材分解における代謝と生理

中沢 威人

(京都大学大学院農学研究科)

本コンファレンス参加者の皆様は“担子菌”(ここでは真正担子菌)と言われて何をイメージするでしょうか? 本発表では, おそらく大多数の方々がイメージするであろう“きのこ”の発生開始に加えて, 木材腐朽菌による木材分解について, 主に代謝と生理の観点から紹介する。

1. 木材腐朽菌の生理および代謝

地球上の有機性バイオマス資源として最も賦存量が多い草本系・木質系バイオマスは主に, 多糖(セルロースなど)と芳香族高分子リグニンが相互に結合および会合しあったりリグノセルロースから成る。複雑強固な構造であり, これらのバイオマスの有効利用を妨げとなっている。木材腐朽菌は, この強固なリグノセルロース中の成分を, 単独かつ常温常圧条件下で効率よく分解できる。従って, 森林生態系における分解者として物質循環に重要であると同時に, 環境負荷を伴わない形でリグノセルロース成分を分離し, 石油代替資源として利用する方法を我々に教えてくれる生物でもある。

主要な木材腐朽菌は全て担子菌に属しており, 木材の分解パターンによって白色腐朽菌と褐色腐朽菌に大別される。スペースの都合上, 詳しい内容は, 優れた日本語総説¹⁾を参照していただきたい。本発表では, 木材腐朽菌の生理と代謝物に関する研究に加えて, 自身の研究および最近の木材分解に関する分解酵素遺伝子群の発現調節に関する研究を紹介したうえで, 今後の展望を述べる。

2. 子実体(きのこ)発生における生理および代謝

担子菌による子実体形成は, 菌類における代表的な多細胞形態形成の例としてしばしば取り上げられる。また, 国内の一般的なスーパーや食卓に並ぶ全てのきのこは担子菌だと言っても過言ではなく, さらに国内のきのこ生産額は林業産出額全体の40~50%程度を占めており, 産業上重要である。これらの背景もあり, 子実体発生および形態形成に関する研究は, 国内外の多くの研究グループによって長年取り組まれてきた。本発表では, 発生開始に焦点を絞って紹介する。

担子菌の子実体発生は一般に, 遺伝的に異なる2種類の核が1つの菌糸細胞内に共存するダイカリオン(もしくはヘテロカリオン)を形成した後, 栄養, 青色光, 温度などの環境因子がトリガーとなって開始される²⁾。しかし, 子実体発生開始の条件は, 種によって多様である。本発表では, この子実体発生開始機構に関して, 生理と代謝の観点から自身の研究および最近の研究を紹介したうえで, 今後の展望を述べる。

引用文献

1: 吉田誠 (2018) 腐朽メカニズムの概要と研究の展望, 木材保存, 44:172-175.

DOI: <https://doi.org/10.5990/jwpa.44.172>

2: 坂本裕一(2018) Fungal Biol. Rev. 32:236-248.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2018.02.003>

Physiology and metabolism underlying wood degradation and fruiting initiation in *Agaricomcetes*

Takehito Nakazawa

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

ご略歴

- 2006年3月 東京工業大学生命理工学部生命科学科 卒業
- 2008年3月 東京工業大学大学院生命理工学研究科 修士課程修了
- 2009年3月 東京工業大学大学院生命理工学研究科 博士課程修了 博士（理学）
- 2008年4月 日本学術振興会特別研究員（DC1）東京工業大学
- 2009年4月 日本学術振興会特別研究員（PD）岡山大学
- 2011年4月 静岡県立大学大学院薬学研究科 特任助教
- 2012年4月 静岡県立大学大学院薬学研究科 客員共同研究員（発酵研若手助成）
- 2013年7月 京都大学大学院農学研究科 助教

糸状菌にも寄生する植物病原細菌

甲斐 建次

(大阪公立大学大学院農学研究科生命機能化学専攻)

青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* は、ナス科を中心とした 250 種以上の植物に感染し、青枯病を引き起こす植物病原性のグラム陰性細菌である。本細菌の「植物病原菌」としての特性は多くの部分が解明され、私はそのメカニズム解明にクオラムセンシング (QS) を中心として取り組んできた。最近、糸状菌との相互作用研究の過程で、青枯病菌が真菌に厚膜胞子を誘導し、その器官を通じて糸状菌に寄生する現象が発見された。大学教員になった頃から、細菌-糸状菌間の相互作用研究も細々と進めてきた。運命を感じて、この現象解明を精力的に進めている。気が付けば、強い競合相手がゴロゴロいる状況になってしまっていて、いくつかの点で海外勢に先を越されている。しかし、ようやく研究を論文として仕上げるだけになってきたので、講演では未発表内容を中心に紹介させて頂きたい。

青枯病菌が糸状菌に内部寄生するには、厚膜胞子の誘導が必須となる。有名な Keller らによってその原因遺伝子が特定され、青枯病菌が作るリポペプチドが鍵分子であることが報告された。実は私も、その遺伝子には注目していたので、その論文を見たときの衝撃は今も忘れない。(一応、天然物化学者なので) 化学では負けられないと、実験スピードをトップギアに入れてその分子の解明を何とか世界初で達成した。1 ヶ月後に、同じ分子がドイツチームから報告されて冷や汗をかいた。Ralstonin と名付けたその分子は、低濃度から *Fusarium oxysporum* などにおいて厚膜胞子を誘導した。さらに、誘導された胞子内に青枯病菌が寄生されるのが観察された。蛍光顕微鏡で、それを始めて観察したときの感動は言葉にならなかった。

青枯病菌も他の細菌と同様、菌密度依存の遺伝子発現機構である QS を持っている。しかし、*Ralstonia* 属独自のシステムになっている。この QS 機構が、糸状菌内への寄生に必須であることを見出した。異種微生物間での相互作用に、QS が関与することが知られているケースは少なく、糸状菌内への寄生では初めての例である。青枯病菌の *F. oxysporum* へのアクセスから、その厚膜胞子誘導、胞子内への寄生までの分かっていたメカニズムを全て紹介する。また、ralstonin 生合成遺伝子の分子進化に関する研究からも、青枯病菌にとっての真菌寄生の重要性を議論するつもりである。青枯病菌が持つ、植物と糸状菌の両方を宿主とする寄生細菌としての能力の高さを上手くお伝えしたい。

A phytopathogenic bacterium that also parasitize fungi

Kenji Kai

(Osaka Metropolitan Univ.)

ご略歴

- 2002 年 3 月 大阪府立大学農学部応用生物化学科卒業
- 2007 年 5 月 京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻博士課程修了
- 2007 年 6 月 生物系特定産業技術研究支援センター博士研究員 (静岡大学)
- 2008 年 1 月 大阪府立大学大学院生命環境科学研究科応用生命科学専攻 助教

2015年4月 大阪府立大学大学院生命環境科学研究科応用生命科学専攻 講師
2019年4月 大阪府立大学大学院生命環境科学研究科応用生命科学専攻 准教授
2022年4月 大阪公立大学農学研究科生命機能化学専攻 准教授

植物二次代謝物を介した植物-糸状菌間の軍拡競争

熊倉 直祐

(理化学研究所環境資源科学研究センター)

植物は糸状菌に対する防御機構の一つとして、しばしば抗菌活性をもつ二次代謝産物を生合成する。糸状菌の中には、植物の二次代謝物の抗菌性を乗り越える例が一部知られているものの、分子メカニズムが明らかになった例はわずかである。アグライア属植物由来の二次代謝物 rocaglate は真核生物の翻訳開始因子の一つである eIF4A を標的として翻訳を抑制する (1, 2, 3)。rocaglate は抗真菌活性を持ちアグライア属植物の真菌への抵抗性に寄与すると考えられる。本研究では rocaglate による抗真菌活性を回避することでアグライア属植物に寄生する真菌を見いだした。系統樹解析によりアグライア属植物に寄生する真菌が *Ophiocordyceps* 属菌であることが明らかになった。de novo トランスクリプトーム解析により、アグライア寄生菌は翻訳開始因子 eIF4A の rocaglate 結合部位にアミノ酸置換を受け耐性を獲得していることが明らかになった。さらにウリ類炭疽病菌を利用したリボソームプロファイリングにより rocaglate による翻訳阻害作用がアグライア寄生菌に見られる変異により減弱することを網羅的に明らかにした。またアグライア寄生菌と同様の変異を持つウリ類炭疽病菌の遺伝子組換え体は rocaglate 存在下でのキュウリへの感染において野生型より高い病原性を示した。以上の結果は真菌における宿主植物由来の抗菌性二次代謝物に対するユニークな適応メカニズムを示す。

引用文献

- 1: Engelmeier *et al.* *J Agric Food Chem* 48:1400–1404 (2000)
- 2: Iwasaki *et al.* *Nature* 2016 534:558-561 (2016)
- 3: Chen *et al.* *Cell Chem Biol* 28:475-486.e.8 (2021)

Plant-fungus arms race mediated by plant secondary metabolites

Naoyoshi Kumakura

(CSRS, RIKEN)

ご略歴

- 2008年 東京大学教養学部生命・認知科学科 卒業
- 2010年 東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻修士課程 修了
- 2014年 東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻博士（学術）課程 修了
- 2014年 理研環境資源科学研究センター 特別研究員
- 2017年 理研環境資源科学研究センター 基礎科学特別研究員
- 2020年 理研環境資源科学研究センター 研究員（現在まで）
- 2021年 フランス国立農業食料環境研究所（INRAE）訪問研究員

かび毒分解微生物によるコムギ赤かび病の発症抑制効果

佐藤 育男

(名古屋大学大学院生命農学研究科)

赤かび病菌 *Fusarium graminearum* 種複合体は、穀類の最重要病害の一つである「赤かび病」を引き起こす(図1)。発症した穂では穀粒の肥大化・穂枯れが生じるとともに、穀粒にかび毒が蓄積する。この発症は世界中で報告され、その経済的被害は例えばアメリカ合衆国ではかび毒を含めた赤かび病による経済的損失は1990年代の10年間で30億も及んだ(1)。

赤かび菌が産生するかび毒のうち、最も高頻度に出され、汚染が問題となっているのはデオキシニバレノール(DON, 図1)である。DONは真核生物リボソームの60Sサブユニットに結合し、タンパク質の生合成を阻害する。人畜が比較的高濃度のDONを摂取すると、嘔吐や下痢といった急性毒性症状が表れる。低濃度であっても、長期にわたるDONの摂取は成長抑制や免疫機能の低下といった慢性毒性症状を引き起こすことから、各国で基準値が設けられ、日本では2002年に厚生労働省によりコムギのDON暫定基準値(1.1 ppm)が設定された。基準値を超えた場合は出荷停止となる。

DONはまた、植物に対しても毒性を示し、コムギ赤かび病菌では病原性因子として宿主の防御応答系を抑制し、感染拡大を助長する(2)。したがって、赤かび病菌が感染したコムギ上のDONを低減できれば、「かび毒の蓄積」だけでなく「赤かび病の発症」も抑制できる可能性がある。

コムギでの赤かび病菌の感染とDONの蓄積は収穫の2~3週間前までは化学農薬の使用による抑制が可能である。しかしながら、それ以降の化学農薬の使用できない時期にも赤かび病菌の感染とDONの蓄積が進行することが近年明らかとなってきた。また、DONは熱・化学安定性が高く、たとえば100°Cでも分解しないため、ひとたび穀粒に蓄積すると調理や加工工程での除去は困難となる。そのため農業生産現場でDONを直接分解する技術の開発が望まれており、物理的、化学的および生物的分解法の研究開発が進められている。中でも、DON分解微生物(本講演ではDONを部分的に代謝する微生物も含む)を用いたDON分解法は、穀物の栄養成分への影響や環境負荷が少ないこと、およびDON代謝酵素の基質特異性によりDONの選択的分解が可能と考えられることから有望視されている(3)。

私たちの研究グループでは、コムギの穂、葉、栽培土壌、湖水等を分離源とし、DONを炭素源とする液体培地を用いてDON分解微生物の集積培養を行い、これまでに土壌、コムギ、湖水試料等から計19株の好気性DON分解細菌を分離している(4,5)。これらの分離株を用いて、赤かび病の発症抑制効果および抑制候補株の選抜を試みた。

コムギ小穂を用いた発症抑制試験は多くの時間と労力が掛かることから、発芽コムギを用いた簡便な試験法を用いて、発症抑制候補株の一次スクリーニングを行った(6)。すな



コムギやオオムギなどの穂に「赤かび病」を引く阻害やする。本は大きい。かび病ドルに

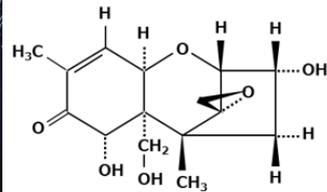


図1. コムギ赤かび病(左)とデオキシニバレノール(DON, 右)

度に検

出され汚染が問題となっているのはデオキシニバレノール(DON, 図1)である。DONは真核生物リボソームの60Sサブユニットに結合し、タンパク質の生合成を阻害する。人畜が比較的高濃度のDONを摂取すると、嘔吐や下痢といった急性毒性症状が表れる。低濃度であっても、長期にわたるDONの摂取は成長抑制や免疫機能の低下といった慢性毒性症状を引き起こすことから、各国で基準値が設けられ、日本では2002年に厚生労働省によりコムギのDON暫定基準値(1.1 ppm)が設定された。基準値を超えた場合は出荷停止となる。

DONはまた、植物に対しても毒性を示し、コムギ赤かび病菌では病原性因子として宿主の防御応答系を抑制し、感染拡大を助長する(2)。したがって、赤かび病菌が感染したコムギ上のDONを低減できれば、「かび毒の蓄積」だけでなく「赤かび病の発症」も抑制できる可能性がある。

コムギでの赤かび病菌の感染とDONの蓄積は収穫の2~3週間前までは化学農薬の使用による抑制が可能である。しかしながら、それ以降の化学農薬の使用できない時期にも赤かび病菌の感染とDONの蓄積が進行することが近年明らかとなってきた。また、DONは熱・化学安定性が高く、たとえば100°Cでも分解しないため、ひとたび穀粒に蓄積すると調理や加工工程での除去は困難となる。そのため農業生産現場でDONを直接分解する技術の開発が望まれており、物理的、化学的および生物的分解法の研究開発が進められている。中でも、DON分解微生物(本講演ではDONを部分的に代謝する微生物も含む)を用いたDON分解法は、穀物の栄養成分への影響や環境負荷が少ないこと、およびDON代謝酵素の基質特異性によりDONの選択的分解が可能と考えられることから有望視されている(3)。

私たちの研究グループでは、コムギの穂、葉、栽培土壌、湖水等を分離源とし、DONを炭素源とする液体培地を用いてDON分解微生物の集積培養を行い、これまでに土壌、コムギ、湖水試料等から計19株の好気性DON分解細菌を分離している(4,5)。これらの分離株を用いて、赤かび病の発症抑制効果および抑制候補株の選抜を試みた。

コムギ小穂を用いた発症抑制試験は多くの時間と労力が掛かることから、発芽コムギを用いた簡便な試験法を用いて、発症抑制候補株の一次スクリーニングを行った(6)。すな

わち、シャーレに敷いたろ紙上で表面殺菌したコムギ種子（品種：農林 61 号）を発芽させ DON 分解細菌を接種した後に、赤かび病菌胞子を接種した。その後、伸長した葉の長さ と発病度（葉の長さに対する菌糸の進展の割合）を調査したところ、3 株の細菌株接種区 で発病抑制効果が観察され、葉での DON の蓄積量も低下した。これらの細菌株は、コム ギ小穂を用いた試験でも、赤かび病発症抑制効果を示した。

分解菌接種によるコムギ上の DON 低減が赤かび病発症抑制に及ぼす影響を明らかにす るために、UV 照射法によって発症抑制効果を示した *Nocardioides* sp. SS3 株の DON 代謝低 下変異株を作出した。変異株は品種 USU-Apogee では発症抑制能が著しく低下する一方、 農林 61 号では野生株と同等の発症抑制効果を示した。この結果は、品種間で DON 低減が 発症抑制効果に寄与する程度が異なること、DON 分解以外の発症抑制機構も存在するこ と、を示している。

引用文献

- 1: Windels. *Phytopathol.* 90: 17-21 (2000)
- 2: Jansen et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102: 16892-16897 (2005)
- 3: Awad et al. *Food Addit Contam Part A* 27: 510-520 (2010)
- 4: Sato et al. *FEMS Microbiol. Lett.* 327: 110-117 (2012)
- 5: Ito et al. *Appl. Environ. Microbiol.* 79: 1619-1628 (2013)
- 6: Morimura et al. *Toxins* 12: 399 (2020)

Biocontrol effect of mycotoxin-degrading bacteria on wheat *Fusarium* head blight

Ikuo Sato

(Grad. Sch. of Bioagr. Sci., Univ. of Nagoya)

ご略歴

- 2003 年 3 月 千葉大学園芸学部 卒業
- 2005 年 3 月 千葉大学大学院自然科学研究科 修士課程修了
- 2005 年 4 月～2006 年 2 月 日東製粉株式会社
- 2006 年 5 月～2007 年 3 月（独）農業環境技術研究所（研究助手）
- 2010 年 3 月 筑波大学大学院生命環境科学研究科 博士課程修了
- 2010 年 4 月 （独）農業環境技術研究所（契約研究員，特別研究員）
- 2014 年 4 月 名古屋大学生命農学研究科 助教 現在に至る

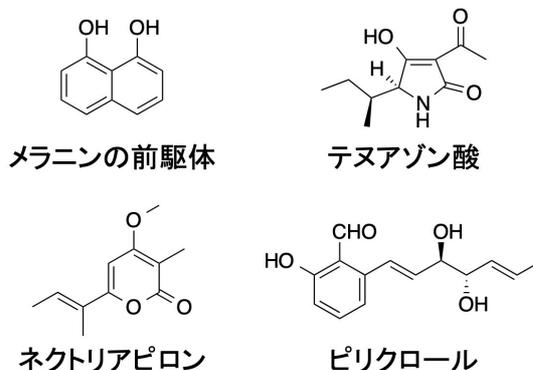
イネいもち病菌の二次代謝産物の生合成と

生物間相互作用における役割

本山 高幸
(理化学研究所)

はじめに

糸状菌は二次代謝産物の宝庫で、ペニシリン等の有用化合物や、アフラトキシン等の有害化合物をつくる。糸状菌ゲノムには膨大な数の二次代謝遺伝子が存在するが、大部分は「休眠遺伝子」であり利用できない。また、二次代謝産物は生物間相互作用に重要と考えられるが、大部分の役割は不明である。特に、植物病原菌の場合は宿主植物への感染への関与が期待されている。では、実際はどうだろうか？発表者は、イネいもち病菌 *Pyricularia oryzae* (*Magnaporthe oryzae*) のような植物病原糸状菌を用いれば、生物間相互作用における二次代謝産物の役割の解析ができる研究を始めた。最近、コムギいもち病界的なパンデミックを引き起こしてきいもち病菌の防除は益々重要なテーマてきた。本発表では、イネいもち病菌する二次代謝産物 (図 1, メラニンについて解析した結果について主に紹介し



と考え、菌が世でおり、となつが生産外) につ

イネいもち病菌の二次代謝産物

メラニンは PKS で生合成され、病原須である。メラニン生合成は優れた創であり、多くの農薬が開発されてきた。

PKS-NRPS 融合酵素 ACE1 は、生合成する化合物は不明であるが、特定のイネといもち病菌の間の相互作用に関与しており注目されてきた。イネいもち病菌のゲノム中には 55 個の生合成遺伝子クラスターの存在が予測されるが、主要な二次代謝産物として知られていたのは、メラニン、テヌアゾン酸、ピリクロール類のみであり、生合成遺伝子はメラニンのもののみが知られていた。このような状況から、イネいもち病菌の二次代謝産物の生合成と役割を明らかにすることが求められていた。

そこで発表者は、二次代謝を活性化して、活性化条件で発現誘導される遺伝子の中から生合成遺伝子を同定し、生合成遺伝子の遺伝子破壊などにより二次代謝産物の機能を明らかにするという戦略で研究を行ってきた。

性に必薬標的また、

図1 イネいもち病菌が生産する二次代謝産物

二次代謝の活性化と生合成遺伝子の同定

テヌアゾン酸はかび毒の一種で、1957年に最初に報告された。我々は、二種類のテヌアゾン酸の生産誘導条件を見出し、生合成遺伝子 *TAS1* を発見した¹⁾。テヌアゾン酸は二成分情報伝達系の MAP キナーゼ *OSM1* の遺伝子破壊と、DMSO 処理で生産誘導された。生合成酵素 *TAS1* は構造から予想される一般的な PKS-NRPS ではなく NRPS-PKS のユニークなドメイン構造のものであった。*TAS1* は糸状菌で初めて報告された NRPS-PKS 融合酵素で

ある。テヌアゾン酸はマイコウイルス感染でも生産誘導されることが報告されている。テヌアゾン酸の生産誘導化合物を化合物ライブラリーから探索し、NPD938 を取得した²⁾。NPD938 は興味深いことにメラニン生合成を抑制した。テヌアゾン酸の生産誘導には経路特異的転写因子 TAS2 やグローバルレギュレーターLAE1 が関与する³⁾。

ネクトリアピロンは二成分情報伝達系の HPT と MAP キナーゼ OSM1 の二重遺伝子破壊で生産誘導された⁴⁾。発現誘導される遺伝子の中から生合成遺伝子を同定した。ネクトリアピロンは PKS (NEC1) により基本骨格がつけられる。類似の生合成遺伝子クラスターは、近縁の炭疽病菌を含む多くの植物病原菌やエンドファイトで見出され、共通の生理作用があることが示唆された。

ピリクロールは植物に対する毒性を示す化合物であることが知られていた。タンパク質合成阻害剤ハイグロマイシン B により生産誘導されることを見出し、発現誘導される遺伝子群の中から生合成遺伝子クラスターを見出した⁵⁾。ピリクロールも PKS が基本骨格をつくるが、還元型の PKS で芳香族化合物を作るというユニークな特徴を持つ。また、類似の遺伝子クラスターが見出されており、アカパンカビの類似クラスターは類縁化合物をつくることが明らかになっている。

生物間相互作用における役割

テヌアゾン酸の生合成遺伝子 *TASI* の大量発現株で病原性が低下した。感染後期に発現誘導されることや、大量発現株でイネに特徴的な反応を誘導すること等から、感染への関与が示唆された⁶⁾。*TASI* と同様の感染特異的発現パターンを示す二次代謝遺伝子群があることから、機能の重複があることが示唆される。

ネクトリアピロンは放線菌に対する生育阻害効果が認められ、微生物間相互作用への関与が示唆された。*Fusarium* は類似の化合物ジベピロンを生産するが、やはりバクテリアに対する生育阻害作用が示されている。また、両方の化合物とも水酸化等により活性が低下する。解毒反応の存在が示唆される。

ピリクロールの生合成遺伝子 *PYCI* (PKS をコード) の破壊株のイネへの感染能は予想に反して変化しなかった。ハイグロマイシン B が放線菌が生産する二次代謝産物であることから、放線菌に対する作用を解析したところ、生育阻害活性を示すことが明らかになり、微生物間相互作用への関与が示唆された⁷⁾。

おわりに

今回紹介したデータを含めて、イネいもち病菌の二次代謝産物の生合成と役割について、最近、総説にまとめた⁸⁾。テヌアゾン酸とネクトリアピロンとピリクロールは異なる条件で生産誘導される。テヌアゾン酸は感染への関与が、ネクトリアピロンとピリクロールは微生物間相互作用への関与が示唆される。植物病原菌の二次代謝産物であっても感染に関与するとは限らない。研究の難しさとしては、生合成遺伝子の単純な遺伝子破壊では役割を明らかに出来ないというものがある。イネいもち病菌が潜在的に生産可能な二次代謝産物の大部分はまだ同定出来ていない。これらはどのような機能を持っているのだろうか？

引用文献

1: *Nat Commun*, 6, 8758, 2015

2: *Biosci Biotechnol Biochem*, 85, 2200-2208, 2021

3: *ACS Chem Biol*, 12, 2270-2274, 2017

- 4: *Chembiochem*, 20, 693-700, 2019
5: *Biosci Biotechnol Biochem*, 85, 126-133, 2021
6: *Biosci Biotechnol Biochem*, 86, 135-139, 2022
7: *Biosci Biotechnol Biochem*, 85, 1290-1293, 2021
8: *J Indust Microbiol Biotechnol*, 48, kuab058, 2021

Secondary metabolites of rice blast fungus: Biosynthesis and roles in biological interactions

Takayuki Motoyama

(RIKEN CSRS)

ご略歴

- 1990年 東京大学 農学部 農芸化学科 卒業
1995年 東京大学大学院 農学系研究科 博士課程 修了, 博士 (農学)
1995年 理化学研究所 基礎科学特別研究員
1997年 理化学研究所 研究員
2007年 理化学研究所 専任研究員

かれこれ十数年、黒麴菌を勉強しています

山田 修
(酒類総合研究所)

黒麴菌とは泡盛や焼酎の製造に利用されている有用糸状菌であり、「国菌」の一つともされています。しかし20年ほど前、福岡国税局鑑定官室に勤務していた頃は、黄麴菌に比べて研究者も論文もはるかに少ないという状況でした。これは何とはなしに清酒に比べて焼酎が格下に見られていたのが遠因だったのかもしれませんが。とはいえ既に当時でも酒税額では焼酎は清酒に匹敵しており、だれか研究してくれないかなと思っていたところ、独立行政法人化のドサクサに紛れて酒類総合研究所への勤務を命じられたことから、黒麴菌の勉強を始めることとしました。

当時、欧米では黒麴菌と *A. niger* とは同じ生物種と見なされていましたが、日本国内では疑問の声が多くありました。そこで、醸造現場由来の株などを広く集め、ヒストン H3 など複数の遺伝子の部分配列により系統樹を作製させてみたところ、醸造現場由来の株のほとんどは1つのグループにまとまるとともに *A. niger* とは別の種であることを示唆する結果を得ることができました。残念ながら黒麴菌の学名としてそれまで使われていた *Aspergillus awamori* と呼ばれていた株は、黒麴菌及び *A. niger* の両グループに混在していたため、乾博士が初めて黒麴菌として命名した *Aspergillus luchuensis* を醸造現場由来の株を含む菌株の学名としてはと提案したところ、幸いにも国際的に認知して頂くことができました (1, 2)。

次いで、黒麴菌のゲノムを黄麴菌にならってコンソーシアムとして解析することとなり参加させてもらえることになりました。その結果、ゲノムレベルでの相同性が89%と算出され、あらためて黒麴菌と *A. niger* とは別の生物種であることが確認されました。また、一部の *A. niger* が生産することが報告されている2つのカビ毒、オクラトキシンAとフモニシンについても黒麴菌は生合成遺伝子を持たず非生産性であることが証明されました。さらに、塚原らによるNGSを用いた最新の解析によると黒麴菌はA(アワモリ)グループ及びSK(サイトイ・カワチ)グループの2つ大別されることが明らかとなっています。なお、黒麴菌についてもアグロバクテリウムやプロトプラスPEG法による形質転換系や *ligD* 破壊株による遺伝子破壊系などが確立されています (3, 4, 5)。

現在取り組んでいるのは、黒麴菌の有性生殖についてです。*Aspergillus* 属糸状菌の多くは有性生活環を持たない不完全菌と考えられてきましたが、ゲノム解析の進展に伴い有性生殖に関する遺伝子を保持し、条件によっては有性生活環を回すことができることが報告されています。黒麴菌もゲノム配列からはヘテロタリックな有性生活環を有することが示唆されましたが、前述の系統解析に用いた菌株は全て MAT1-2 株ばかりで、相手となる MAT1-1 株は見当たりませんでした。ところが最近、八丈島や青ヶ島から単離した黒麴菌の中に MAT1-1 株が存在していることが確認されたことから、現在、黒麴菌の有性生活環が回らないか検討を行っているところです(残念ながら全くうまくいっていないのですが・・・)。

このように、まだまだ勉強の足りない黒麴菌ですが、少しでも多くの方に興味を持って

いただけると幸いです。

引用文献

- 1: Yamada O. et al., *J. Biosci. Bioeng.*, **112**, 233-237 (2011)
- 2: Hong S. B. et al., *PLOS ONE*, **8**, e63769 (2013)
- 3: Yamada O. et al., *DNA Res.*, **23**, 507–515 (2016)
- 4: 塚原ら, *醸協*, **117**, 413-421 (2022)
- 5: Takahashi T. et al., *J. Biosci. Bioeng.*, **112**, 529-534 (2011)

Studies about Black Koji mold *Aspergillus luchuensis* for over ten years

Osamu Yamada

(Natl. Res. Inst. Brew.)

ご略歴

- 1985年3月 東京農工大学農学部農芸化学科 卒業
1986年4月 国税庁入庁
1987年1月 仙台国税局鑑定官室技官
その後転々
1997年7月 福岡国税局鑑定官室鑑定官
2001年4月 独立行政法人酒類総合研究所
2019年7月 品質・評価研究部門 部門長

2009年3月 博士（農学）

Oral Session

O-1 (P-5)

醤油麹菌 *Aspergillus sojae* における転写因子 AsFlbC の固体培養特異的な酵素生産への影響

藤田翔貴¹, 片山琢也², 丸山潤一², 新谷尚弘¹, 五味勝也¹ (¹東北大院・農, ²東大院・農生科)

醤油麹菌 *Aspergillus sojae* は、醤油醸造時に大豆を基質とした固体培養条件で利用される。当研究グループでは、黄麹菌 *Aspergillus oryzae* において、固体培養特異的に発現するグルコアミラーゼ遺伝子 *glaB* を制御する転写因子として FlbC を見出している。また、FlbC は小麦麩を基質とした固体培養条件で、*glaB* のみならず、プロテアーゼやセルラーゼ等の遺伝子発現の制御にも関与していることを報告している。*A. sojae* は、*A. oryzae* の FlbC と相同性が極めて高い配列を保持している。そこで、本研究では *A. sojae* の FlbC オルソログ AsFlbC の固体培養における酵素生産への関与を解析することを目的とし、AsflbC の遺伝子破壊株の作製を試みた。遺伝子破壊株の作製は、*A. oryzae* や *A. sojae* において確立されているゲノム編集技術 CRISPR/Cpf1 システムを用いて実施した。得られた AsflbC 破壊株では、固体培養時のグルコアミラーゼ生産が抑制されていることが明らかになった。現在、AsflbC 破壊株を用いて各種プロテアーゼ活性や遺伝子の発現量の解析を進めており、その成果を本研究会で発表したい。

1) Katayama and Maruyama. (2022) *J Biosci Bioeng*.

Effect of transcription factor AsflbC deletion for enzyme production in solid state cultivation in *Aspergillus sojae*.

Shoki Fujita¹, Takuya Katayama², Junichi Maruyama², Takahiro Shintani¹, Katsuya Gomi¹

(¹Grad. Sch. Argric. Sci., Tohoku Univ., ²Dept. of Biotechnol, Univ. of Tokyo)

O-2 (P-9)

黒麹菌 Aox (Alternative oxidase) と発熱現象との関連性に関する研究

具志堅結香, 中村燎, 渡嘉敷直杏, 外山博英, 水谷治 (琉球大・農)

清酒醸造において米に麹菌を生育させ、麹を作る工程を製麹といい、麹菌は米のデンプンを糖化(資化)しながら生育する。黒麹菌 (*Aspergillus luchuensis*) は製麹が進むとその品温は麹菌の生育を妨げる温度まで上昇する。温度が高まる原因の半分は麹菌の呼吸によるものとされているが、詳細なメカニズムは分かっていない。本研究では植物において知られている発熱因子、代替酸化酵素 Aox が、黒麹菌においても品温上昇に関与していると仮定し、黒麹菌 *aoxA* 遺伝子の破壊株 ($\Delta aoxA$) と過剰発現株 (OE $aoxA$) を作成し、麹の品温に影響を与えるか検討した。黒麹菌 $\Delta ligD$ 株を親株に、 $\Delta aoxA$ 株および OE $aoxA$ 株をそれぞれプロトプラスト-PEG 法にて作成した。呼吸鎖複合体 IV の阻害剤であるアジ化ナトリウムを添加した培地で親株、 $\Delta aoxA$ 株、OE $aoxA$ 株の生育を観察した結果、 $\Delta aoxA$ が生育阻害されたことから、*aoxA* は代替酸化酵素をコードしていると示唆された。また、*aoxA* 遺伝子が麹の品温に影響を及ぼすかを調べるために、これらの菌株を用いて製麹を行った。製麹は手入れを必要としない無通風箱培養法にて行い、詳細な品温測定を行った。更に、*aoxA* 遺伝子が製麹に与える影響を調べるため、麹の酵素力価、クエン酸量、菌体量測定を行った。

製麹時における親株、 $\Delta aoxA$ 株、OE $aoxA$ 株の品温は、 $\Delta aoxA$ 株が親株よりわずかに高く、OE $aoxA$ 株が親株より低い値となった。品温測定の結果から、AoxA が発熱現象の直接的な要因となっていないことが示唆された。菌体量測定の結果より、親株よりも OE $aoxA$ 株が多く生育していることが分かった。以上から、OE $aoxA$ 株では過剰な AoxA の存在が呼吸によるエネルギー生産量を下げ、その結果、品温低下と菌体量の増加を引き起こしているのではないかと予想された。

Effect of alternative oxidase on heat generation in koji making of *Aspergillus luchuensis*

Yuika Gushiken, Ryo Nakamura, Jikian Tokashiki, Hirohide Toyama, Osamu Mizutani

(Agric., Univ. Ryukyus)

O-3 (P-10)

麹菌におけるゲノム編集を利用した染色体大規模欠損の異種天然物生産に対する効果

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* を利用した異種天然物生産において、目的産物の生産に特化した形質を実現するための手法として、異種生産に不必要な染色体領域の削除によるゲノム構造レベルでの最適化が考えられる。しかしながら、1つ1つ遺伝子破壊を繰り返して効果を調べるという従来の方法では多くの時間と労力を必要とし、*A. oryzae* の染色体のどの領域が異種天然物生産に関連するかを明らかにすることは困難である。本研究では、異種天然物生産に関連する *A. oryzae* ゲノム領域の解明を目的として、ゲノム編集¹⁾を利用した染色体大規模欠損を行い、それにより引き起こされる異種天然物生産量への影響を調べた。

A. oryzae のゲノム・トランスクリプトーム情報に基づいて、中央代謝経路遺伝子を含まず二次代謝産物合成遺伝子クラスターを含み、かつ転写産物量の少ない領域を大規模欠損の標的とした。CRISPR/Cas9 システムによる形質転換を行なった結果、これまでに 0.72 Mb (227 遺伝子), 0.70 Mb (209 遺伝子), 0.51 Mb (168 遺伝子) の計 3 カ所の染色体領域について、それぞれ複数の大規模欠損株の取得に成功した。取得した株について異種生産のモデルとしてジテルペン pleuromutilin の生産量を調べた結果、それぞれの株で生産量の増加または減少が見られた。現在、欠損領域に含まれる遺伝子と生産量の変化の関連を調べている。

1) Katayama *et al.* (2019) *Appl. Environ. Microbiol.* 85(3):e01896-18.

Effects of large-scale chromosomal deletion by genome editing on heterologous production of natural products in *Aspergillus oryzae*

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

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

O-4 (P-21)

Aspergillus oryzae の気中菌糸の形成におけるリン脂質組成の重要性

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, ²東大・微生物連携機構)

糸状菌は無性胞子である分生子から発芽し、菌糸はその先端を伸長させながら生長する。菌糸はまず基底菌糸として生長し、その後気中菌糸が形成され、分生子形成器官を分化させる。しかし、どのようにして基底菌糸から気中菌糸が形成されるのかについては、ほとんど明らかにされていない。

我々は、生体膜の主要構成成分であるリン脂質の糸状菌における役割を解析しており、特に、*Aspergillus oryzae* における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) に着目してきた。これらリン脂質の合成経路はモデル生物で明らかにされており、PE から PC への変換経路がある他に、エタノールアミン (Etn) から PE, コリン (Cho) から PC が合成される経路が存在している。今回、我々は PE から PC の変換に関わる遺伝子 *pemA*, *pemB* (1) に着目し、それらの破壊株を詳細に解析した。*DpemA* 株, *DpemB* 株は、最少培地である Czapek-Dox (CD) 培地ではほとんど生育せず、糸状菌の生育において PC の重要性が示された。しかしながら、Etn を添加した CD 培地では基底菌糸のみを伸長させることが分かった。一方で、この条件においては、いずれの破壊株も気中菌糸をほとんど形成しなかった。また、各遺伝子の発現抑制株を Etn 添加 CD 培地から Cho 添加 CD 培地にシフトしたところ、基底菌糸のみが伸長していた部分についても気中菌糸および分生子が形成されようになり、PC が十分量あれば気中菌糸が形成されることが示された。以上のことから、*A. oryzae* においては、気中菌糸形成には一定量以上の PC が必要であることが示唆された。

1) 須澤ら, 第 20 回糸状菌分子生物学コンファレンス

Importance of phospholipid composition in aerial-hyphae formation of *Aspergillus oryzae*

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

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

O-5 (P-22)

黄麹菌生細胞におけるグルコアミラーゼ mRNA の時空間制御機構

守田湧貴, 竹川薫, 樋口裕次郎 (九大院・生資環)

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* は、グルコアミラーゼなどの有用な酵素を安全かつ多量に分泌する。そのため、タンパク質分泌機構に関する理解を深め、産業的な利用価値を高めるための研究が数多く取り組まれてきた。遺伝子発現は、細胞内のタンパク質量を決定し、分泌生産量を左右し得る重要なプロセスである。その中で、黄麹菌細胞において「分泌酵素 mRNA がいつどこで翻訳されているのか」という時空間的な情報については、ほとんど明らかにされていない。本研究では、黄麹菌生細胞でグルコアミラーゼ(*glaA*) mRNA を可視化する手法を確立し、分泌酵素 mRNA に関する細胞内局在とその局在化メカニズムの解明を試みた。

MS2 system は、生体内の mRNA を一分子レベルで可視化する手法である。今回、MS2 system を黄麹菌に新たに適用し、*glaA* mRNA の細胞内局在について解析を行った。その結果、菌糸先端領域($\leq 50 \mu\text{m}$)に最も多く局在することを確認した。さらに、隔壁や分岐部位付近に *glaA* mRNA が局在することも確認した。これらの結果を踏まえ、*glaA* mRNA の転写箇所および動態に関するさらなる解析を行った。その結果、*glaA* mRNA が分泌部位である菌糸先端や隔壁に近い核で活発に転写され、細胞質でブラウン運動または分子モーター様の指向性運動を示すことを確認した。そこで、微小管重合を阻害した結果、*glaA* mRNA の分散が著しく低下した。以上の結果より、黄麹菌において分泌酵素が高分泌する際、その転写が分泌部位近傍の核で選択的に活性化し、その領域に分泌酵素 mRNA が多く局在することを明らかにした。また、局在化メカニズムの一端として、分泌酵素 mRNA が微小管分子モーター依存的に分泌部位近傍で分散されることが示唆された。

Spatiotemporal regulation of glucoamylase mRNA localization in living cells of *Aspergillus oryzae*

Yuki Morita, Kaoru Takegawa, Yujiro Higuchi

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

O-6 (P-29)

Cellular dynamics and role of mitochondrial fission in heterokaryon incompatibility of *Aspergillus oryzae*

Yahong Zou¹, Chan Lu¹, Takuya Katayama^{1,2}, Ryota Saito³, Kazuhiro Iwashita³, Jun-ichi Maruyama^{1,2}

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

In filamentous fungi, vegetative cells can fuse to form heterokaryons, and cell fusion between genetically incompatible strains causes growth inhibition or cell death, which is termed heterokaryon incompatibility. In *Aspergillus oryzae*, the filamentous fungus used in Japanese food fermentation, numerous diverse strains are used selectively for different purposes (e.g. sake, soy sauce and *miso*). Previously, we found that strains from distinct phylogenetic clades are mostly incompatible but that the same phylogenetic strains are compatible¹. However, it remains elusive on the physiological interaction and molecular mechanism of heterokaryon incompatibility in *A. oryzae*. In this study, we aim to directly provide cell-level evidence for physiological responses upon incompatible cell fusion in *A. oryzae*.

First, we established a time-course fluorescence observation of cell fusion in *A. oryzae*, and demonstrated that cell death occurred in the incompatible strain pair. Through the visualization of organelles with fluorescence proteins to characterize the subcellular dynamics, mitochondria fragmentation was observed immediately after the incompatible cell fusion. The mitochondrial fission-related genes *Aofis1* and *Aodnm1* were deleted in the *A. oryzae* strains, and then the viable heterokaryotic hyphae were found in the gene deletions of the incompatible strain pair by microscopy. After long-term culture, the incompatible heterokaryon of the gene deletions continued the growth and displayed obvious colony morphology. These results revealed that the incompatibility-triggered cell death was alleviated by deletions of the mitochondrial fission-related genes in *A. oryzae*.

1) Lu *et al.* (2021) Annual meeting of JSBBA, 4C03-04.

O-7 (P-37)

3種の地衣化担子菌類のゲノムが保有する CAZyme レパートリーの比較

升本宙¹, 吉橋佑馬², 出川洋介², 田中千尋¹ (¹京都大・地球環境学堂, ²筑波大・菅平)

藻類と地衣共生する菌類は子囊菌門と担子菌門の様々な系統に散在しており、「地衣化菌類」と称されている。地衣共生の起源は複数存在するとされているが、その共生機構の共通性については未だ明らかでない。一部の地衣化菌類のゲノム情報は近年ようやく蓄積され始めたが、多くの地衣化系統のゲノムは依然として解読されていない。そこで演者らは、地衣共生という形質を考察する試みの一つとして、ゲノムが未解読であった担子菌門の地衣化菌類（地衣化担子菌類）に注目し、*Multiclavula mucida*（アンズタケ目；緑藻と地衣化）、及び *Cyphellostereum ushimanum* と *Dictyonema moorei*（ともにハラタケ目；ともにシアノバクテリアと地衣化）の3種を対象に、各々のドラフトゲノムを構築した。そして、糖質関連酵素（CAZyme）のレパートリーを子囊菌門の地衣化菌類と比較することで、地衣化系統間での共通点や相違点について調査した。

単相化した各ゲノムのアセンブリサイズは *C. ushimanum* が 36.7 Mb, *D. moorei* が 33.3 Mb, *M. mucida* が 24.1 Mb で、それぞれ 213 個, 274 個, 269 個の CAZyme の存在が予測された。スクロース分解に関与する GH32 を保有する点やペクチン分解に関与する GH28 を欠く点は、地衣化系統間で共通した特徴である可能性が示唆された。一方で、結晶性セルロース分解に関与する CAZyme については、*D. moorei* は GH6, *M. mucida* は GH6 と GH7 を保有しており、一般にこれらを欠いている地衣化菌類の多くのゲノムと相違した。また、*C. ushimanum* と *D. moorei* はともにペプチドグリカン分解に関与する GH25 を複数個保有しており、シアノバクテリアとの地衣化における関連が示唆された。*M. mucida* はセルロースと結合する CBM1 を多数（13 個）有し、キシラン分解に関与する GH10 も複数個保有する点で、発生基質（腐朽材）との関連が示唆された。

Comparison of CAZyme repertoires in the genomes of three lichenized basidiomycetes

Hiroshi Masumoto¹, Yuma Yoshihashi², Yousuke Degawa², Chihiro Tanaka¹

(¹GSGES, Kyoto Univ., ²SRS, MSC, Univ. of Tsukuba)

O-8 (P-38)

白麹菌 *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii* における α -アミラーゼ AmyB の機能解析

井上太雅¹, 山口正晃¹, 門岡千尋², 奥津果優¹, 吉崎由美子¹, 高峯和則¹, 後藤正利³, 玉置尚徳¹, 二神泰基¹ (¹鹿児島大大学院・農林水産学研究科, ²崇城大・生物生命学部, ³佐賀大・農学部)

白麹菌 *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii* は分泌型の α -アミラーゼとして、非耐酸性 α -アミラーゼ (AmyA) と耐酸性 α -アミラーゼ (AsaA) を生産する。加えて、白麹菌のゲノムにはもう1つ分泌型の α -アミラーゼをコードすると推定される *amyB* 遺伝子が存在する。本研究では、白麹菌の AmyB の機能を明らかにすることを目的とした。まず、白麹菌の $\Delta amyB$ 株に顕著な α -アミラーゼ活性の低下は見られなかった。しかし、 $\Delta amyA \Delta asaA \Delta amyB$ 株の培養上清における α -アミラーゼ活性は、 $\Delta amyA \Delta asaA$ 株の α -アミラーゼ活性よりも低下した。この結果から、AmyB は白麹菌が分泌生産する α -アミラーゼの総活性にわずかに寄与していることが示唆された。次に、*amyB* の coding sequence を RNA-seq のマッピングデータで確認したところ、イントロン予測に誤りがあり、AmyB の C 末端側に GPI アンカーが付加すると予測されるアミノ酸配列の存在が明らかになった。また、イントロンのプライミングを RT-PCR 産物のシーケンス解析によって確認した。さらに、 $\Delta amyA \Delta asaA$ *P amyA-amyB* 株の菌体から細胞膜画分を調製して α -アミラーゼ活性を測定したところ、 $\Delta amyA \Delta asaA$ 株と比べ 26 倍以上の高い活性を示した。以上の結果より、AmyB が GPI アンカーにより細胞膜に局在している可能性が示唆された。

Functional analysis of α -amylase AmyB in *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii*

Taiga Inoue¹, Masaaki Yamaguchi¹, Chihiro Kadooka², Kayu Okutsu¹, Yumiko Yoshizaki¹, Kazunori Takamine¹, Masatoshi Goto³, Hisanori Tamaki¹, Taiki Futagami¹

(¹Fac. Agric., Kagoshima Univ.; ²Fac. Bio. Life Sci., Sojo Univ.; ³Fac. Agric., Saga Univ.)

O-9 (P-40)

ウシグソヒトヨタケの傘成熟に必要な暗期と CcChd1 タンパク質と減数分裂の関係性

阿部晴紀, 三村玲, 畑中こずえ, 村口元 (秋田県立大・生物資源)

ウシグソヒトヨタケ子実体の傘が成熟するためには暗期が必須である。暗期を経ない (LL) 条件下の野生型子実体は傘成熟が途中で止まり, 減数分裂が第一減数分裂前期で停止することが報告されていた。しかし, この暗期中の反応と減数分裂進行の関係性の分子機構については未知のままであった。当研究室では, 暗期を与えた条件でも LL 条件下の野生型と似た外見となる突然変異体を見出した。この突然変異体の原因遺伝子は出芽酵母で見出されていた CHD1 (Chromodomain Helicase DNA-Binding Protein 1) タンパク質のホモログ (CcChd1) をコードしていた。Ccchd1 欠損株における減数分裂進行を Giemsa 染色で観察したところ, LL 条件下の野生型と同様に, 減数分裂は第一減数分裂前期で停止していた。RNA-seq データより Ccchd1 遺伝子の発現状況を見てみると, 遺伝子中央領域に転写量の低い領域 (Low transcribed region: LTcR) が存在し, 成熟した傘組織では全長の Ccchd1 が転写されるのに対し, 栄養菌糸から成熟前傘組織では Ccchd1 遺伝子から短いサイズの mRNA が転写されているだろうことが示唆された。そこで, CcChd1 の C 末端側及び N 末端側を認識するそれぞれの抗体を使用したウェスタン解析により, CcChd1 タンパク質のサイズを調べると共に, 明暗条件でタンパク質発現量が変わるかを調べた。その結果, 栄養菌糸では約 100 kDa の, そして傘組織からは全長 164 kDa の CcChd1 が検出され, LL 条件下の野生型栄養菌糸および傘組織では CcChd1 の発現量が低下していた。これらの結果は, Ccchd1 遺伝子は栄養菌糸と傘組織間ではサイズの異なるタンパク質を発現しており, 暗期を経ることで発現が促され, 傘組織では暗期を経て発現が促された全長の CcChd1 タンパク質が第一減数分裂前期から中期への移行に関与していることを示唆している。

The relationship between darkness essential for basidiocarp maturation, CcChd1 and meiosis in

Coprinopsis cinerea

Haruki Abe, Satoshi Mimura, Kozue Hatanaka, Hajime Muraguchi

(Dept. Biotech., Akita Pref. Univ.)

O-10 (P-46)

麹菌 *Aspergillus oryzae* の細胞融合に関わる新規転写因子の探索

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

麹菌 *Aspergillus oryzae* では有性世代が発見されておらず, 交配育種は困難である。有性生殖を誘導するためにはこれに深く関わる細胞融合の制御機構の理解が重要だと考えられる。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* では転写因子 Ste12 が接合に関連する遺伝子の発現を直接誘導する。一方, 糸状菌の細胞融合の制御機構は異なり, 例えば糸状菌 *Neurospora crassa* の Ste12 オルソログは別の転写因子遺伝子 *adv-1* の発現を, ADV-1 は細胞融合に関与する遺伝子の発現を誘導している。しかし我々は, *A. oryzae* の Ste12 オルソログ AoSte12 が細胞融合に必須ではなく, *adv-1* オルソログ *AonosA* の誘導への寄与が小さいことを示した。そのため AoSte12 以外の *AonosA* を制御する転写因子の存在が示唆され, *A. oryzae* に *N. crassa* とは異なる未知の細胞融合制御機構が存在すると予想された。そこで本研究では, *A. oryzae* の細胞融合に関わる転写因子を探索した。

AonosA のオルソログが酵母には存在しないため, *AonosA* を制御する転写因子が糸状菌に特異的に存在すると予想した。そこで, Blastp 解析により *A. oryzae* の全タンパク質のなかから 8 種の糸状菌において高い相同性を示し, 4 種の酵母において相同性が低いタンパク質を選択した。さらに, タンパク質のドメイン解析によって転写因子と推定される 101 個のタンパク質を選抜し, そのうち 95 個のタンパク質をコードする遺伝子の破壊株を取得した。これら推定転写因子遺伝子の破壊株について野生型株をテスターとし細胞融合効率を測定した結果, 5 株の破壊株の細胞融合効率が野生型株どうしと比較して 20%未満にまで低下していた。さらに, そのうち 2 株の破壊株では *AonosA* の転写産物量が減少し, *AonosA* の発現制御への関与が示唆された。今後, 残りの 3 つの推定転写因子についても *AonosA* の発現誘導への関与について検討する予定である。

Screening of novel transcription factors for cell fusion in *Aspergillus oryzae*

Jumpei Kawasaki¹, Takuya Katayama^{1,2}, Jun-ichi Maruyama^{1,2}

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

O-11 (P-56)

トウモロコシ黒穂病菌における tRNA 由来 RNA 断片の生成と分泌

芳本玲, 石田史子, 山口美幸, 田中茂幸 (撰南大・農)

トウモロコシ黒穂病菌は、トウモロコシに活物寄生する担子菌である。本菌は、他生物においてよく保存されている低分子 RNA の生成に関与する Dicer および Argonaute タンパク質を含む RNAi 機構を持たない。しかし、本菌が実際に低分子 RNA を生成するかどうかは不明であった。我々は、トウモロコシ黒穂病菌は、増殖中に約 20~30 塩基の低分子 RNA を生成することを明らかにした。RNA-seq 解析により、これら低分子 RNA は、tRNA と 5.8S リボソーム RNA に由来することがわかった。興味深いことに、低分子 RNA の大部分は、アスパラギン、グルタミン、グリシンをコードする tRNA から生成されていた。また、tRNA の切断は、主にアンチコドンステムループに近い位置で起きていた。tRNA を切断する候補酵素として RNase T2 に着目し、これをコードする 2 つの遺伝子 *nuc1* および *nuc2* の二重破壊株を作出した。この破壊株では、tRNA 由来の低分子 RNA 蓄積が顕著に低下していた。分泌タンパク質である Nuc1 と tRNA の細胞内局在を観察したところ、両者とも出芽細胞の先端に共局在し、tRNA 断片が細胞外に分泌される可能性が示唆された。そこで、培養上清から RNA を回収し、ノーザンブロットを行ったところ、完全長 tRNA は検出されなかったが、tRNA 由来低分子 RNA は検出された。以上より、トウモロコシ黒穂病菌は増殖中に特定の tRNA を分泌経路の過程で切断し細胞外に分泌することが示された。このことは、tRNA 由来低分子 RNA が細胞外機能を持っている可能性があることを示唆している。

The production and secretion of tRNA-derived RNA fragments in the corn smut fungus *Ustilago maydis*.

Rei Yoshimoto, Fumiko Ishida, Miyuki Yamaguchi, Shigeyuki Tanaka

(Faculty of Agriculture, Setsunan Univ.)

O-12 (P-55)

植物病原性糸状菌 *Fusarium oxysporum* の侵襲性と病原性の関連

酒造ひなた¹, 井谷綾花¹, 山本里穂¹, 高谷直樹¹, 佐藤良勝², Antonio Di Pietro³, 竹下典男¹ (筑波大・MiCS, ²名古屋大・ITbM, ³コルドバ大学・遺伝学科)

糸状菌は菌糸と呼ばれる管状の細胞からなり、無機有機物基質や動植物の宿主に吸着し菌糸を侵入させて生長する。土壌を通じて植物根に感染(共生)する病原性(内生)糸状菌 *Fusarium oxysporum* は、根表面から菌糸を侵入させ、植物細胞間を伸長する。菌糸が維管束組織に到達すると、植物の細胞死や通水障害を誘導し病原性を示す。植物病原性糸状菌が病原性を示すには、ほとんど隙間のない植物細胞間隙を通り宿主体内を侵襲する必要があるため、侵襲性と病原性の関連が予想される。菌糸が自身よりも狭い空間に入るには、菌糸の形態を変化させる必要がある。これまでに、菌糸直径より細い 1 μm の流路を持つマイクロ流体デバイスに 7 種の糸状菌を培養し、菌糸が細い流路を通過できるか(侵襲性)をライブイメージングで解析した。伸長の遅い菌糸は流路を通過できるのに対して伸長の早い菌糸は流路を通過できず、伸長速度と侵襲性のトレードオフが示されている。本研究では、菌糸の侵襲性と病原性の関連を解明するため、*F. oxysporum* の病原性が低下する遺伝子欠損株 18 株(3 つの MAPK, 浸透圧センサー, 細胞壁関連酵素, カゼインキナーゼなど)をそれぞれ同様のデバイス内で生育させ、細い流路を通過する菌糸の様子から侵襲性を評価した。いくつかの破壊株で流路の通過率が低下し、菌糸の侵襲性に関わる機構が示唆された。今後、根への侵襲や病原性との相関を解析する。本研究は、植物細胞間の伸長に関わる物理的な機構の解明と、類似した感染機構を持つ菌の病原性の理解や防除への貢献が期待される。

Correlation between invasiveness and pathogenicity of plant pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*

Hinata Miki¹, Ayaka Itani¹, Riho Yamamoto¹, Naoki Takaya¹, Sato Yoshikatsu², Antonio Di Pietro³, Norio Takeshita¹

(¹Univ. of Tsukuba, MiCS, ²Univ. of Nagoya, ITbM, ³Univ. of Córdoba)

O-13 (P-51)

アミノ酸生合成を介した *Aspergillus nidulans* の一酸化窒素ストレス耐性機構

天久まどか, 門岡千尋, 塚越まどか, 榎尾俊介, 高谷直樹 (筑波大・生命環境・MiCS)

一酸化窒素(NO)は様々な細胞成分と反応し、強い細胞毒性を示す。微生物、特に真菌はNOに対する耐性機構を発達させてきたが、その詳細は明らかにされていない。我々はこれまでに、*Aspergillus nidulans* のPro生合成系の遺伝子と予想される *proC* が本菌のNO耐性に関与することを見出した。Pro及びArg要求性を示す *proA5*, *argB2* 変異株は野生株と比べて生育のNO耐性が低下し、生育のために要求するProとArgの量が増加した。細胞内の遊離アミノ酸量はNO暴露時で顕著に減少したことから、NOが*A. nidulans*の細胞内アミノ酸の飢餓を引き起こすことが示された。そこで、アミノ酸飢餓応答を担うCross Pathway Control (CPC)系に着目した。CPC系の転写制御因子であるCpcAの遺伝子の遺伝子破壊株は、野生株と比べて生育のNO耐性が低下した。また、野生株で見られたNO暴露時のProやArgを含むアミノ酸生合成遺伝子の転写活性化が見られなくなったことから、CpcAがNO暴露時にアミノ酸生合成遺伝子の転写を活性化することが示された。NOを暴露した $\Delta cpcA$ 株では、野生株よりも13種の細胞内アミノ酸量が減少したことから、CpcAはNO暴露時の細胞内アミノ酸量を維持することが示された。この時、アミノ酸の前駆体となる複数の有機酸の細胞内レベルも低下したことから、NOはこれらの前駆体の生合成を阻害することによってアミノ酸レベルを制御すると考えられた。以上より、CpcAがNOによるアミノ酸の飢餓に応答し、アミノ酸の生合成を転写レベルで亢進することによって、細胞内のアミノ酸の恒常性を維持するという新規なNO耐性機構が示された。

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

Madoka Amahisa, Chihiro Kadooka, Madoka Tsukagoshi, Shunsuke Masuo, Naoki Takaya

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

O-14 (P-53)

白色腐朽担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* のリグニンフラグメント分解機構

加藤大志, 早坂実夏, 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完全に分解ができる。リグニンは、白色腐朽菌の菌体外酵素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。リグニンフラグメントは菌体内で水酸化や脱メチル化、脱炭酸反応後、最終的に芳香環の開裂が引き起こされる。しかしながら、これらの反応に関与する白色腐朽菌の酵素については十分には解明されていない。本研究では、白色腐朽菌 *P. chrysosporium* によるリグニンフラグメント分解機構の解明を目指す。

【方法・結果】芳香族化合物の水酸化や脱炭酸反応に関与する酵素として flavoprotein monooxygenase (FPMO) が知られており、*P. chrysosporium* のゲノムには59のFPMO遺伝子がコードされている。59の中から複数のリコンビナントタンパク質 (PcFPMO3~8) を調製し、リグニンフラグメントと反応させた。その結果、PcFPMO8は4-ヒドロキシ安息香酸 (4-HBA), バニリン酸 (VA), シリンガ酸 (SA) をそれぞれヒドロキノン (HQ), メトキシヒドロキノン (MHQ), ジメトキシヒドロキノン (DMHQ) に変換した。これまでに4-HBA, VA, SA全てを脱炭酸できるFPMOは報告されておらず、PcFPMO8が初めての報告例となる。

当研究室では既に、MHQがPcFPMO2によってメトキシトリヒドロキシベンゼン (MTHB) に変換されることを明らかにしている (1)。そこで、MTHBの環開裂を触媒する酵素に着目した。芳香環開裂を触媒する酵素として intradiol dioxygenase (IDD) の報告例はあるが、白色腐朽菌では不明であった。*P. chrysosporium* ゲノムにコードされている5種のIDDを解析した結果、PcIDD1, 2がMTHBの芳香環を開裂することを明らかにした。従来白色腐朽菌では、MTHBはトリヒドロキシベンゼン (THB) を経由して環開裂されると考えられてきたが、MTHBを直接環開裂する新たなリグニンフラグメント代謝経路の存在を提唱する (2)。

(1) Suzuki H, et al. (2022) JBB, in press (2) Kato H, et al. (2022) AMB 106, 4499

Lignin fragment degradation by white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*

Hiroyuki Kato¹, Mika Hayasaka¹, Hiromitsu Suzuki¹, Masashi Kato¹, Motoyuki Shimizu¹

(¹Fac of Agric, Univ. of Meijo)

O-15 (P-50)

麹菌における核の増加と菌糸形態および酵素生産性の関連

一ノ瀬恵¹, 細田柁志¹, 井谷綾花¹, 高谷直樹¹, 織田健², 山下秀行³, 酒井香奈江⁴, 田中拓未⁴, 楠本憲一⁴, 竹下典男¹ (¹筑波大・MiCS, ²酒類研, ³樋口松之助商店, ⁴阪大院・工)

麹菌は糖質・タンパク質などの分解酵素の分泌能が高いため、古くから発酵醸造に利用されている。これまでに関連する酵素の高生産のため、遺伝子発現・翻訳制御機構が研究されている。私たちは培養時間の経過に伴って *Aspergillus oryzae* (RIB40) の核の数が増加する現象を発見した (1本の菌糸あたり 20 から 200 以上の核に増加)。核数の増加により転写・翻訳量が増加し、酵素生産性が向上することが予想され、実際に酵素活性との相関が見られた。この表現型は、*Aspergillus nidulans* や近縁種である *Aspergillus flavus* では見られない。醤油の醸造に利用される *Aspergillus sojae* で核の増加が見られ、焼酎の醸造に利用される *Aspergillus luchuensis* では見られない。*A. oryzae* でも清酒用の RIB128 株では核の増加が見られ、醤油用の RIB915 株では見られない。これらの結果は、核の増加が育種の中で選抜された獲得形質であること、異なる種でも育種の選抜の過程で収斂進化が起きること、同じ種でも異なる目的での育種と選抜により異なる進化が起きることを示唆する。核増加に関わる分子機構を解明するため、ゲノム比較により育種進化と表現型の関連を解析する。また、核増加を誘導する条件を見出し、遺伝子発現変化を解析する。転写因子破壊株ライブラリーを用いた核形質のスクリーニングにより、窒素源応答が関与することが示唆された。ライブイメージングにより核の増加した菌糸が分岐により出現し、それらの伸長速度が速いため、コロニーの周辺で優占することが示された。今後、菌糸形態を定量的に評価することで、酵素生産性と菌糸形態の関連を解析する。

Correlation between nuclear increase, enzyme production and morphogenesis in *Aspergillus oryzae*

Aya Ichinose¹, Syuuji Hosoda¹, Ayaka Itani¹, Naoki Takaya¹, Ken Oda², Hideyuki Yamashita³, Sakai Kanae⁴, Tanaka takumi⁴, Kenichi Kusumoto⁴, Norio Takeshita¹

(¹ Univ. of Tsukuba, MiCS, ²NRIB, ³Higuchi Moyashi, ⁴Univ. of Osaka)

Poster Session

(*は学生)

* P-1

麹菌における核を丸ごと分解するヌクレオファジーの分子機構の解析

橋本真宇¹, 黄梅昌朗¹, 有岡学^{1,2} (¹東大院・農生科・応生工, ²東大・CRIIM)

オートファジーは真核生物に広く保存された細胞内分解プロセスであり, このうち核を特異的に分解するものをヌクレオファジーと呼ぶ。麹菌 *Aspergillus oryzae* において, 核全体がオートファゴソームによって丸ごと取り囲まれ分解されるヌクレオファジーの存在が当研究室で明らかとなった。この現象はオートファジー研究のモデル微生物である出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* では確認されていない。本研究では, 麹菌のヌクレオファジーの分子機構の解明を最終的な目標とし, 今回はその観察系の構築と, 飢餓条件ごとのヌクレオファジー活性の定量評価やオートファゴソームの観察結果をまとめ考察する。

オートファゴソームの観察を効率的に行うためには, それが形成された後であり, かつその分解が阻害されるような株が必要である。そこで, 出芽酵母においてオートファゴソームと液胞の融合に必須な麹菌オルソログを *Aoypt7* と名付け, その破壊株の取得を行った。*Aoypt7* 破壊株では分生子形成能の喪失と液胞の高度な断片化が認められた。次に, EGFP を融合した *AoAtg8* (EGFP-*AoAtg8*) または *Aspergillus nidulans* 由来のヒストン H2B (AnH2B-EGFP) を発現する野生株と *Aoypt7* 破壊株を作製し, それぞれオートファゴソームマーカーと核マーカーとして利用した。オートファジーおよびヌクレオファジー活性を EGFP-*AoAtg8* と AnH2B-EGFP の分解により定量評価した結果, 野生株では窒素源および炭素源飢餓条件で活性の有意な上昇が認められたが, *Aoypt7* 破壊株では大きく抑制された。さらに, EGFP-*AoAtg8* 発現株の核を DAPI により染色し蛍光顕微鏡を用いて観察を行った結果, 核全体を取り囲んだオートファゴソームが細胞質に蓄積する様子が認められた。また, その蓄積頻度は野生株よりも *Aoypt7* 破壊株で, また非飢餓条件よりも飢餓条件で有意に高かった。現在, 透過型電子顕微鏡を用いてより詳細なオートファゴソーム構造の観察を試みている。

Analysis of molecular mechanism of nucleophagy in *Aspergillus oryzae*

Mau Hashimoto¹, Masaaki Kobai¹, Manabu Arioka^{1,2}

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

P-2

Differential response of soil-related components in two strains of *Aspergillus oryzae*

Liyun Liu, Takumi Tanaka, Kanae Sakai, Ken-Ichi Kusumoto

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

Humic acid (HA) is one of the most abundant and chemically active fractions of component in terrestrial soil (de Melo et al. 2016). In our previous study, we have found that HA stimulated the giant colony diameter of RIB40 strain and inhibited the giant colony diameter of RIB143 strain at the optimum concentration on Czapek Dox Agar medium. To investigate the opposite effect of soil components on the growth of RIB40 and RIB143, we observed the growth of two stains with several soil-related components at day 4 and day 7. Optimum concentration of gallic acid (a phenolic compound containing trihydroxy benzoic acid and carboxylic acid) stimulated the growth of RIB40 but unaffected the growth of RIB143, respectively. Next, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) inhibited the growth of RIB40, however, addition of HA alleviated the inhibition, suggesting the existence of metal components in HA. The following experiment demonstrated that $MnSO_4$ (0.001% w/v) and $FeSO_4$ (0.002% w/v) stimulated the growth of RIB40 but unaffected to that of RIB143; $ZnSO_4$ (0.002% w/v) stimulated the growth of RIB40 only at day 4, but inhibited that of both strains at day 7; $CaCl_2$ (0.01% w/v) more stimulated the growth of RIB40 than the growth of RIB143. Therefore, we concluded that soil-related components differently effect the growth of RIB40 and RIB143. We plan to identify the genes related to the response of these soil-related components.

* P-3

麹菌における RIDD 低減株造成を目指した IreA の機能解析

横山将己, 五味勝也, 新谷尚弘 (東北大院・農)

麹菌はタンパク質分泌能が高く組換えタンパク質生産の有望な宿主であるが、異種タンパク質の生産性が著しく低下することが課題となっている。異種遺伝子が発現してタンパク質として分泌されるまでの過程で、その mRNA やタンパク質が宿主の品質管理機構によって異物として排除されることが原因と考えられる。そこで、小胞体の mRNA 分解機構である Regulated IRE1-dependent decay (RIDD) に着目した。小胞体ストレス下では小胞体膜貫通型のセンサータンパク質 IreA がオリゴマー化とリン酸化を介して活性化し、小胞体膜にターゲティングされた分泌タンパク質 mRNA をその RNase 活性によって特異的に分解する。一方、IreA は Unfolded protein response (UPR) における *hacA* mRNA のスプライシングにも関わっており、その遺伝子破壊は致死である。本研究では、RIDD 低減回避株の造成を目指して、IreA の機能解析を行なった。出芽酵母における先行研究で、Ire1 (麹菌 IreA のオルソログ) の RNase ドメインに点変異を導入すると、Ire1 のオリゴマー形成を阻害することなく RNase 活性を喪失することが示された。さらに、*in vitro* 再構成系では野生型と変異型 Ire1 の混合比を調節することで、RIDD が特異的に抑制されることが報告された。そこで、麹菌 IreA の RNase ドメインに変異を導入し、自身のプロモーターで発現させた。チアミン添加で宿主由来の *ireA* 発現を抑制できる株を宿主として用い、機能相補性を調査した。野生型 IreA は *ireA* 抑制株の生育不全を相補できたが、変異型 IreA はできなかった。興味深いことに、変異型発現株ではチアミン存在下で宿主株よりもさらに生育が低下し、ドミナントネガティブ効果を示すことが明らかにされた。今後は、野生株で変異型 IreA を発現させ、生育、UPR、RIDD への影響を解析したい。

Functional analysis of IreA for RIDD reduction in *Aspergillus oryzae*

Masaki Yokoyama, Katsuya Gomi, Takahiro Shintani

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

* P-4

麹菌の液体培養における自己生育阻害物質の生産能と感受性に関する解析

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)

我々は、麹菌 *Aspergillus oryzae* の同じ株どうしを寒天培地上で対峙培養した際に 2 つのコロニー間で生育が阻害されることを見だし、この現象に何らかの生育阻害物質が介することを示唆した¹⁾。本研究では、液体培養においても同様に自己生育阻害物質が産生されるかに着目し、麹菌の液体培養における生育阻害物質の生産能とそれに対する自己感受性、さらにこの現象が *A. oryzae* の様々な株で共通して見られる性質であるかについて解析することにした。

A. oryzae の野生株 RIB40 を液体培地で培養した上清を凍結乾燥で濃縮し、水で溶かしたものを同じ株のコロニーに隣接する部位に滴下したところ、滴下した部位でコロニーの生育が阻害された。麹菌は醸造等の用途に応じて多様な株が存在するが、RIB40 株で見られた自己生育阻害の現象が他の株でも同様に生じるかを、種麹として使用されている *A. oryzae* 株で検討した。その結果、自身の培養上清を濃縮した溶液を滴下しても自己生育阻害が見られない株も存在する一方、顕著な生育阻害活性を有する株も存在した。また、自己生育阻害活性を示す培養上清の濃縮溶液を他の株のコロニーに対して滴下したところ、すべての株で生育阻害が生じた。以上の結果から、麹菌の液体培養における生育阻害物質の産生能は株によって異なるが、阻害物質に対しては様々な株が共通して感受性を示すことを明らかにした。

1) 浜中ら 日本農芸化学会 2022 年度大会要旨集 4A06-09 (2022)

Studies on productivity and sensitivity of self-growth inhibitor of the strains 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-5 (O-1)

醤油麹菌 *Aspergillus sojae* における転写因子 AsFlbC の固体培養特異的な酵素生産への影響

藤田翔貴¹, 片山琢也², 丸山潤一², 新谷尚弘¹, 五味勝也¹ (¹東北大院・農, ²東大院・農生科)

醤油麹菌 *Aspergillus sojae* は、醤油醸造時に大豆を基質とした固体培養条件で利用される。当研究グループでは、黄麹菌 *Aspergillus oryzae* において、固体培養特異的に発現するグルコアミラーゼ遺伝子 *glaB* を制御する転写因子として FlbC を見出している。また、FlbC は小麦麩を基質とした固体培養条件で、*glaB* のみならず、プロテアーゼやセルラーゼ等の遺伝子発現の制御にも関与していることを報告している。*A. sojae* は、*A. oryzae* の FlbC と相同性が極めて高い配列を保持している。そこで、本研究では *A. sojae* の FlbC オルソログ AsFlbC の固体培養における酵素生産への関与を解析することを目的とし、AsflbC の遺伝子破壊株の作製を試みた。遺伝子破壊株の作製は、*A. oryzae* や *A. sojae* において確立されているゲノム編集技術 CRISPR/Cpf1 システムを用いて実施した。得られた AsflbC 破壊株では、固体培養時のグルコアミラーゼ生産が抑制されていることが明らかになった。現在、AsflbC 破壊株を用いて各種プロテアーゼ活性や遺伝子の発現量の解析を進めており、その成果を本研究会で発表したい。

1) Katayama and Maruyama. (2022) *J Biosci Bioeng.*

Effect of transcription factor AsflbC deletion for enzyme production in solid state cultivation in *Aspergillus sojae*.

Shoki Fujita¹, Takuya Katayama², Junichi Maruyama², Takahiro Shintani¹, Katsuya Gomi¹

(¹Grad. Sch. Argric. Sci., Tohoku Univ., ²Dept. of Biotechnol, Univ. of Tokyo)

* P-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, 酒造ひなた, 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))

生物が外部からの刺激に対して生長方向を制御する性質のことを屈性という。糸状菌の菌糸は栄養源のある方向へ屈性を示す可能性があるが、その機構はほとんど明らかになっていない。本研究ではマイクロ流体デバイスを用いたライブイメージングにより、菌糸の栄養源に対する屈性を細胞レベルで解析した。デバイス内で異なる2つの培養液を合流させ、隣り合って流れる層流を形成する。このうち一方は炭素源、窒素源などを含み、他方は含まないように設定した。層流に菌糸を生育させ、二層での菌糸先端の割合、方向変化、分岐を測定した。その結果、*Aspergillus nidulans* の菌糸はグルコースやリン酸、ミネラルに対して屈性を示し、一方で硝酸やアンモニウムに対しては、それを避けるように生長する負の屈性を示した。N源への負の屈性は、濃度依存的であった。硝酸またはリン酸トランスポーター欠損株では、野生株に比べ硝酸またはリン酸に対する屈性応答が弱まった。さらに菌糸は pH にも屈性を示し、pH3-8 の範囲では特に pH4 に対して顕著な屈性を示した。形質膜に局在す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応答が弱まった。栄養源への屈性と pH への屈性の関連を明らかにするため、酸性アミノ酸 (グルタミン酸) または有機酸 (クエン酸) への屈性を pH 調整の有無で比較した。その結果、それぞれへの屈性に pH の低下が重要であることが示された。菌糸は栄養源および pH に屈性を示したことから、両者の組み合わせでより良い環境を探し、生長していると考えられる。中でも pH が菌糸の屈性に重要である可能性が示された。

Analysis of hyphal chemotropism using microfluidic devices

Riho Yamamoto, Hinata Miki, Sayumi Fukuda, Naoki Takaya, Norio Takeshita

(Tsukuba univ. MiCS)

* P-7

麴菌ハイドロフォビン RolA の自己組織化に静電的相互作用が与える影響の解析

高橋尚央¹, 寺内裕貴², 田中拓未³, 吉見啓⁴, 藪浩^{5,6}, 阿部敬悦¹ (¹東北大院・農, ²京都大院・学堂, ³大阪大院・工, ⁴京都大院・農, ⁵東北大・多元, ⁶東北大・AIMR)

麴菌由来ハイドロフォビン RolA は低分子量の両親媒性タンパク質である。RolA はポリエステラーゼ CutL1 と相互作用して、CutL1 による基質分解を促進する。RolA と CutL1 の相互作用には、RolA の N 末端領域内正電荷残基と CutL1 分子表面の負電荷残基との間の静電的相互作用が重要である。RolA は界面上で、まず単分子膜を形成して、その後自己組織化して rodlet を形成することが明らかになっているが、どの状態の RolA が CutL1 と相互作用するかは不明である。そのため RolA の自己組織化機構の詳細な解析が必要である。これまでの研究では、疎水性相互作用が RolA の自己組織化に重要であることが示唆されている。

本研究では、未だ不明である静電的相互作用の自己組織化への影響について解析を行った。まず、RolA が形成する rodlet が伸長していく様子を原子間力顕微鏡で観察し、異なる pH 条件での rodlet 伸長の様子を経時的に解析した。結果、rodlet 伸長の様子は pH 条件によって異なっており、自己組織化に静電的相互作用が関与することが示唆された。次に、荷電性アミノ酸残基が集中している N 末端領域に着目し、N 末端領域内正電荷残基を中性のセリンに置換した変異体を用いた解析を行った。結果、N 末端領域内正電荷残基は rodlet 伸長に関与することが明らかになり、“CutL1 との相互作用”と“自己組織化”の両方に関わる 2 機能性の領域であることが初めて示唆された。

Effect of ionic interactions on self-assembly of hydrophobin RolA

Nao Takahashi¹, Yuki Terauchi², Takumi Tanaka³, Akira Yoshimi⁴, Hiroshi Yabu^{5,6}, Keietsu Abe¹

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

P-8

Aspergillus section Nigri のプロトプラスト形成に及ぼす mutanase の添加効果

渡嘉敷直杏¹, 草山泰和², 五味勝也¹ (¹東北大院・農, ²サービステックジャパン)

糸状菌の形質転換法であるプロトプラスト-PEG 法では Yatalase を用いてプロトプラスト調製されることが国内では多い。この Yatalase によるプロトプラスト化は通常、黄麴菌などでは容易に、黒麴菌ではプロトプラスト化がほとんど進行しないことが分かっている。一方、黒麴菌のプロトプラスト形成難化の原因の一つに α -1,3-glucan の関与が分かっており、 α -1,3-glucanase を添加した試薬 (Yatalase Plus) を用いてプロトプラスト調製に用いることが一般化しつつある。本研究では様々な *Nigri* 節に属する *Aspergillus* 属糸状菌を対象として、*Trichoderma* 属糸状菌由来の α -1,3-glucanase 標品である mutanase (STzyme006) と Yatalase を用いてプロトプラスト形成を試み、プロトプラスト化のされやすさを比較した。

はじめに Yatalase で溶解しない供試菌として *A. fijiensis* を Yatalase および Yatalase Plus を用いてプロトプラスト調製を行った結果、この菌株では Yatalase Plus の量に応じてプロトプラスト化されることが分かった。次に Yatalase と共に STzyme006 を添加し、*A. fijiensis* のプロトプラスト調製を行ったところ、STzyme006 の添加量に応じてプロトプラスト化が促進され、STzyme006 が Yatalase Plus と同様に有用であることが確認された。つぎに、*A. fijiensis* 以外の *Nigri* 節糸状菌でも同様にプロトプラスト化を試みたところ、Yatalase 単独ではプロトプラスト調製が困難な菌株でもプロトプラスト化が促進された。STzyme006 は Yatalase などの細胞壁溶解酵素と併用して利用することができ、添加量を調節できることから、これまで α -1,3-glucanase をプロトプラスト調製剤として必要としていた菌株における有用な酵素剤と考えられた。

Effect of mutanase on protoplast formation in *Aspergillus section Nigri*

Jikian Tokashiki¹, Yasukazu Kusayama², Katsuya Gomi¹

(¹Grad. Sci. Agric. Sci., Univ. Tohoku, ²Servicetec Japan)

* P-9 (O-2)

黒麹菌 *Aox* (Alternative oxidase) と発熱現象との関連性に関する研究

具志堅結香, 中村燎, 渡嘉敷直杏, 外山博英, 水谷治 (琉球大・農)

清酒醸造において米に麹菌を生育させ、麴を作る工程を製麴といい、麹菌は米のデンプンを糖化(資化)しながら生育する。黒麹菌 (*Aspergillus luchuensis*) は製麴が進むとその品温は麹菌の生育を妨げる温度まで上昇する。温度が高まる原因の半分は麹菌の呼吸によるものとされているが、詳細なメカニズムは分かっていない。本研究では植物において知られている発熱因子、代替酸化酵素 *Aox* が、黒麹菌においても品温上昇に関与していると仮定し、黒麹菌 *aoxA* 遺伝子の破壊株 (ΔaoxA) と過剰発現株 (OE*aoxA*) を造成し、麴の品温に影響を与えるか検討した。黒麹菌 ΔligD 株を親株に、 ΔaoxA 株および OE*aoxA* 株をそれぞれプロトプラスト-PEG 法にて造成した。呼吸鎖複合体 IV の阻害剤であるアジ化ナトリウムを添加した培地で親株、 ΔaoxA 株、OE*aoxA* 株の生育を観察した結果、 ΔaoxA が生育阻害されたことから、*aoxA* は代替酸化酵素をコードしていると示唆された。また、*aoxA* 遺伝子が麴の品温に影響を及ぼすかを調べるために、これらの菌株を用いて製麴を行った。製麴は手入を必要としない無通風箱培養法にて行い、詳細な品温測定を行った。更に、*aoxA* 遺伝子が製麴に与える影響を調べるため、麴の酵素力価、クエン酸量、菌体量測定を行った。

製麴時における親株、 ΔaoxA 株、OE*aoxA* 株の品温は、 ΔaoxA 株が親株よりわずかに高く、OE*aoxA* 株が親株より低い値となった。品温測定の結果から、*AoxA* が発熱現象の直接的な要因となっていないことが示唆された。菌体量測定の結果より、親株よりも OE*aoxA* 株が多く生育していることが分かった。以上から、OE*aoxA* 株では過剰な *AoxA* の存在が呼吸によるエネルギー生産量を下げ、その結果、品温低下と菌体量の増加を引き起こしているのではないかと予想された。

Effect of alternative oxidase on heat generation in koji making of *Aspergillus luchuensis*

Yuika Gushiken, Ryo Nakamura, Jikian Tokashiki, Hirohide Toyama, Osamu Mizutani

(Agric., Univ. Ryukyus)

* P-10 (O-3)

麹菌におけるゲノム編集を利用した染色体大規模欠損の異種天然物生産に対する効果

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* を利用した異種天然物生産において、目的産物の生産に特化した形質を実現するための手法として、異種生産に不必要な染色体領域の削除によるゲノム構造レベルでの最適化が考えられる。しかしながら、1 つ 1 つ遺伝子破壊を繰り返して効果を調べるという従来の方法では多くの時間と労力を必要とし、*A. oryzae* の染色体のどの領域が異種天然物生産に関連するかを明らかにすることは困難である。本研究では、異種天然物生産に関連する *A. oryzae* ゲノム領域の解明を目的として、ゲノム編集¹⁾を利用した染色体大規模欠損を行い、それにより引き起こされる異種天然物生産量への影響を調べた。

A. oryzae のゲノム・トランスクリプトーム情報に基づいて、中央代謝経路遺伝子を含まず二次代謝産物合成遺伝子クラスターを含み、かつ転写産物量の少ない領域を大規模欠損の標的とした。CRISPR/Cas9 システムによる形質転換を行なった結果、これまでに 0.72 Mb (227 遺伝子), 0.70 Mb (209 遺伝子), 0.51 Mb (168 遺伝子) の計 3 カ所の染色体領域について、それぞれ複数の大規模欠損株の取得に成功した。取得した株について異種生産のモデルとしてジテルペン *pleuromutilin* の生産量を調べた結果、それぞれの株で生産量の増加または減少が見られた。現在、欠損領域に含まれる遺伝子と生産量の変化の関連を調べている。

1) Katayama *et al.* (2019) *Appl. Environ. Microbiol.* 85(3):e01896-18.

Effects of large-scale chromosomal deletion by genome editing on heterologous production of natural products in *Aspergillus oryzae*

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-11

Aspergillus oryzae における Tet-on システムの最適化

大島侃¹, 峯岸悠也¹, 田中瑞己¹, 二神泰基², 山形洋平¹ (¹農工大・応用化, ²鹿児島大・農)

Tet-on システムは、トランス不活性化因子であるテトラサイクリン結合転写調節タンパク質を恒常的に発現させる領域と、不活性化因子が結合するオペレーター、並びにプロモーター配列、目的遺伝子からなる目的タンパク質発現領域とで形成されている。*Aspergillus* 属においては、1つのカセットにすべての制御システムが含まれた Tet-on システムが開発された。

しかしこの Tet-on システムには、不活性化因子を発現させる *gpdA* プロモーターと目的遺伝子が発現させる最小 *gpdA* プロモーターに 176 bp の相同配列が存在している。*A. oryzae* ではこの相同配列上での組換えにより *gpdA* プロモーターの下流に存在する DNA 配列の欠失が生じ、*gpdA* プロモーターによる目的遺伝子の転写が行われることがある。その結果、このような組換え体はシステム導入株における遺伝子解析に支障をきたす可能性がある。

本研究では、*Aspergillus fumigatus* の例にならって¹⁾ 黄麹菌 *Aspergillus oryzae* における Tet-on システム内の組み換えによる機能の喪失を防止するため、*gpdA* プロモーターを *Aspergillus nidulans tpiA* プロモーターに置換した株を作製し、Tet-on システム制御下にある遺伝子の転写解析をおこなった。その結果、プロモーターの置換により Tet-on システム内の組換えを回避し、テトラサイクリン誘導体であるドキシサイクリンの有無による転写制御の安定性向上が示唆された。

¹⁾ Helmschrott *et al.*, *Appl Environ Microbiol.* **79**: 1751-1754. (2013)

Optimization of the Tet-on system in *Aspergillus oryzae*

Tsuyoshi Oshima¹, Yuya Minegishi¹, Mizuki Tanaka¹, Taiki Hutagami², Youhei Yamagata¹

(¹Dept. of Applied Biological Science, Tokyo Univ. of Agriculture and technology, ²Fac. Agric., Kagoshima univ.)

* P-12

異種分泌タンパク質遺伝子導入による麹菌の生育ストレスの解析

開田有紗¹, 三澤恒汰², 五味勝也¹, 新谷尚弘¹ (¹東北大院・農, ²東北大・農)

糸状菌はタンパク質分泌能が高いことから、異種タンパク質の分泌生産宿主として有望である。しかしながら、近縁種のタンパク質の生産量に比べて高等生物由来のそれが著しく低いことが課題である。何らかの品質管理機構によって異種タンパク質が異物として認識・除去されていると考えられる。そこで、本研究では麹菌における分泌ストレスを解析することを目的とした。

まず、コドン改変したオボアルブミン (OVA) およびヒトリゾチーム (HLY) 遺伝子をキャリアタンパク質 (グルコアミラーゼ) 遺伝子に融合し、宿主株の *niaD300* 部位に一重交叉で導入することを試みた。興味深いことに、コドン改変型 OVA の形質転換時の選択培地上での生育は、ネイティブ OVA のそれと比べて著しく遅延していた。コドン改変型 OVA の形質転換体を選択培地で植え継ぐと、正常な生育を示す株に加え、生育が遅くコロニー形態の異常が見られる株が得られた。次に、これらの株をサザンブロット解析に供したところ、生育が良好な株では *niaD300* アレルが野生型の *niaD* アレルに置き換わっていることが明らかとなった。植え継ぎ操作によって目的タンパク質配列がグループアウトによって脱落している可能性が高いと考えられた。HLY 導入時も同様なことが起こった。即ち、形質転換体を植え継ぐ前後でサザンブロット解析におけるバンドパターンが変わっており、目的タンパク質遺伝子の脱落が生じていることが明らかとなった。これらの結果から、異種分泌タンパク質の発現が麹菌にとってストレスとなることが示唆された。遺伝子脱落を回避するために、二重交叉による遺伝子導入を行い、生育の観察を行ったので、その結果も報告する。

Analysis of growth stress by introduction of heterologous protein genes in *Aspergillus oryzae*

Arisa Kaita¹, Kota Misawa², Katsuya Gomi¹, Takahiro Shintani¹

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

* P-13

黄麹菌 Δ AG-GAG 株におけるニゲラン高生産株の造成

阿部多恵¹, 與古田佳世¹, 阿部敬悦², 外山博英¹, 上地敬子¹, 水谷治¹ (¹琉球大院・農, ²東北大院・農)

ニゲランとは, *Aspergillus* 属や *Penicillium* 属の一部の糸状菌が窒素飢餓時に生産する細胞壁多糖である。我々は, 黒麹菌由来のニゲラン合成酵素遺伝子 (*nisA*) や合成に関与する遺伝子 (*agtC*, *gnsA*) を同定, 報告しており, ニゲランのエステル誘導体化合物はバイオマスプラスチックの作成が可能であることも報告している。本研究では, ニゲランの高生産を目指して, 黒麹菌及び黄麹菌を宿主としたニゲラン高生産株の造成を試みた。黄麹菌の高発現用プロモーター *PenoA142* に *nisA* 遺伝子を連結した発現カセットを黒麹菌野生株に導入したところ, 親株 (50 mg/g dry cell) の約 2 倍量のニゲランを生産した。黄麹菌においては, α -1,3-グルカン合成酵素遺伝子群を破壊した Δ AG 株を宿主に *nisA* 過剰発現株を造成したところ, 黒麹菌過剰発現株の約 1.5 倍のニゲランを生産した。さらなる高生産を目指し, 液体培養で完全に菌糸が分散する黄麹菌 Δ AG-GAG 株を宿主としたニゲラン高生産株, 1 株を造成し Δ AG 株以上の生産に成功した。現在, 同宿主における *nisA* 遺伝子マルチコピー株の取得を目指して, 複数の形質転換体から, ニゲラン高生産株のスクリーニングを行っている。

Construction of high-producing strains of nigeran in *Aspergillus oryzae* Δ AG-GAG strain

Tae Abe¹, Kayo Yokoda¹, Keietsu Abe², Hirohide Toyama¹, Keiko Uechi¹, Osamu Mizutani¹

(¹Grad. Agric., Univ. Ryukyus, ²Grad. Agric., Univ. Tohoku)

* P-14

鯉節カビ *Aspergillus chevalieri* における生活環に関わる遺伝子の解析

平松健太郎¹, 門岡千尋², 森一樹³, 田代康介³, 奥津果優¹, 吉崎由美子¹, 高峯和則¹, 玉置尚徳¹, 二神泰基¹ (¹鹿児島大院・農林水産, ²崇城大・生物生命, ³九大院・農)

鯉節はカビ付け工程の有無により, 枯節と荒節に分類される。枯節製造におけるカビ付けの方法は, 優良カビを噴霧する方法とカビ付け室で自然に生育するカビを用いる方法がある。先行研究において, 後者の方法でカビ付けを行った枯節表面の菌叢解析が行われ, *Aspergillus chevalieri* の有性世代の菌株が優勢であることに加えて, 無性世代の菌株も存在していることが分かった。一般的に鯉節の製造に用いられるカビは有性世代であることが知られており, 無性世代の菌株はカビ付け室という鯉節カビにとって生育しやすい環境で有性生殖の能力を失ったために出現したのではないかと考えた。そこで本研究では, *A. chevalieri* の生活環に関わる遺伝子の同定を目的とした。

まず, *A. chevalieri* の有性世代と無性世代の菌株のゲノムを比較したところ, 無性世代の菌株には 4 つの遺伝子 (*ACHE_40145A*, *ACHE_40420A*, *ACHE_50514S*, *ACHE_70660A*) にフレームシフトやストップコードの挿入などによる, 機能が失われるような破壊的変異が入っていることが示唆された。次に, *A. chevalieri* の有性世代の菌株において, これらの遺伝子を破壊すると無性世代に移行するかどうかを調べるために, *A. chevalieri* における遺伝子組換え実験系の構築に取り組んだ。CRISPR-Cas9 を用いたゲノム編集により, ATP sulfurylase をコードする *sC* と非同末端結合修復に関わる *ligD* のノックアウト株を構築した。今後は構築した株における相同組換え効率を評価し, 生活環に関わる遺伝子の解析に用いる予定である。

Analysis of the genes involved in life cycle of *Aspergillus chevalieri*

Kentaro Hiramatsu¹, Chihiro Kadooka², Kazuki Mori³, Kosuke Tashiro³, Kayu Okutsu¹, Yumiko Yoshizaki¹, Kazunori Takamine¹, Hisanori Tamaki¹, Taiki Futagami¹

(¹Fac. Agric., Kagoshima Univ.; ²Fac. Bio. Life Sci., Sojo Univ.; ³Grad. Sch. Agric., Kyushu Univ.)

*P-15

アカパンカビにおける *RAD7*, *RAD16* の機能解析

須澤文生香, 吉野航, 藤村真, 一石昭彦 (東洋大院・生命科)

アカパンカビがもっているDNA修復機構のうち,紫外線に関わる機構としてNERとUVERが挙げられる。出芽酵母のRad7p-Rad16pは,NERにおける損傷認識の初期段階に関与することが知られている。またRad7p-Rad16pはElc1p-Cul3pと相互作用し,E3ユビキチンリガーゼとして機能することが報告されており,主要な損傷認識因子であるRad4pをユビキチン化することで効率的に損傷を認識することが明らかになっている。しかし,アカパンカビのRad7p, Rad16p, Elc1p, Cul3pのホモログであるncRAD7p, ncRAD16p, ELC1p, CUL3pのNERへの関与や機能は未だ明らかになっていない。本研究では,ncRAD7p, ncRAD16p, ELC1p, CUL3pがNERに関与するかを調査した。

UVER因子の欠損株である $\Delta mus-18$ 株と $\Delta ncRAD7$ 株, $\Delta ncRAD16$ 株, $\Delta elc-1$ 株, $\Delta cul-3$ 株を交配することで二重欠損株,三重欠損株を作製した。野生株および各欠損株における紫外線感受性を調べたところ,Rad7p, Rad16p, ELC1p, CUL3pはUVERとは別の経路で機能することが明らかになった。また,4NQOに対する感受性を調べたところ,NERに関与している可能性が示唆された。 $\Delta ncRAD7$ 株, $\Delta ncRAD16$ 株, $\Delta elc-1$ 株は同じようなUV生存曲線と4NQO感受性を示していたことから複合体を形成していることが考えられた。現在,分裂酵母において紫外線や薬剤による*RAD7*, *RAD16*遺伝子の発現誘導が報告されていることから,野生株における*ncRAD7*, *ncRAD16*, *elc-1*, *cul-3*遺伝子および各欠損株における*RAD4*遺伝子の発現誘導についてRT-PCRを用いた解析を進めている。

Analysis of the function of *Neurospora ncRAD7* and *ncRAD16* genes

Fuka Suzawa, Wataru Yoshino, Makoto Fujimura, Akihiko Ichiishi

(Life science, Univ. of Toyo)

*P-16

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* におけるエンドサイトーシス関連因子 AipA と新規相互作用タンパク質の解析

日浅怜子, 竹川薫, 樋口裕次郎 (九大院・生資環)

【目的】黄麹菌は有用酵素の分泌生産能に優れた真核微生物である。より生産効率の高い菌株を育種するためにも細胞内の物質輸送機構の理解が必要であるが,未解明な点が多く存在している。その中でも,栄養源の獲得やシグナル伝達などの生命機能に重要なエンドサイトーシスについては,詳細な分子メカニズムが未だ明らかでない。これまでに,黄麹菌のAAAATPaseであるAipAは,アクチン結合タンパク質AoAbp1と相互作用し,エンドサイトーシスを負に制御することを明らかにした¹⁾。本研究ではAipAに関する分子機構の理解をさらに深めるために,新規のAipA相互作用タンパク質の探索を目的とした。

【方法・結果】EGFP-AipA発現株を用いて,GFP-Trapを用いた免疫沈降法により,黄麹菌細胞内におけるAipAの相互作用タンパク質の網羅的な探索を試みた。これにより見出したタンパク質候補をLC-MS/MS解析およびデータベース解析により同定した結果,AipB(ミオシン),AoSec13(COPII因子),AoCof1(コフィリン)の三つの相互作用タンパク質を抽出することに成功した。現在,蛍光顕微鏡観察と共免疫沈降によってAipAと候補タンパク質間の相互作用についてin vivoでの解析を行なっている。

1) Hiasa R et al. 2022 *Fungal Biol.* 126, 149-161

Analysis of newly found proteins that interact with the endocytosis-related factor AipA in *Aspergillus oryzae*

Reiko Hiasa, Kaoru Takegawa, Yujiro Higuchi

(Dept. of Bioresource and Bioenvironment Sciences, Kyushu Univ.)

*P-17

白色腐朽菌ヒラタケにおける蛍光融合タンパク質を用いたタンパク質分泌経路の可視化

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

白色腐朽菌は担子菌類に属し, 様々な酵素を分泌することでリグノセルロースを分解できる。しかし, これらの酵素群の分泌機構については, 従来研究が進んでいない。そこで本研究では白色腐朽菌ヒラタケにおけるタンパク質分泌系路について明らかにする目的で, 蛍光タンパク質を用いた分泌経路の可視化を試みた。まず子囊菌 *Aspergillus nidulans* など小胞体, ゴルジ体 (Early/Late Golgi), 分泌小胞それぞれへの局在が報告されているタンパク質をコードする遺伝子についてヒラタケゲノム配列上で相同性検索を行った。続いて, それらのタンパク質のN末端もしくはC末端に蛍光タンパク質を融合させた組換えタンパク質の発現カセットを, ヒラタケ PC9 株に導入した。小胞体への局在が推測される Sec13-EGFP を発現させた株について, 小胞体を赤色蛍光で標識する ER-Tracker で処理したところ, これら2色の蛍光の大部分が重複していた。Early Golgi への局在が推測される mCherry-Rer1, Late Golgi への局在が推測される EGFP-PH を個別に発現させた株では, どちらの場合も, 粒状の蛍光像が菌糸の先端付近に観察された。分泌小胞への局在が推測される EGFP-Rab5 および mCherry-Rab4 を同時に発現させた株では, 2色の蛍光が菌糸先端部に強く集積して重複していた。以上の結果は, 白色腐朽菌における小胞体, ゴルジ体, 分泌小胞までの一連のタンパク質分泌経路の可視化に初めて成功したことを示唆する。現在は, mCherry-Rer1 および EGFP-PH のゴルジ体への局在を明確にするため, ゴルジ体への小胞輸送阻害剤を添加した際の両組換えタンパク質の局在への影響を調査しているほか, これらのタンパク質を共発現し Early Golgi と Late Golgi を区別して可視化できるか調査中である。

Visualizing secretory pathway in the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* using fluorescent fusion proteins

Kazuhiro Kurebayashi, Takehito Nakazawa, Shivani, Moriyuki Kawauchi, Masahiro Sakamoto, Yoichi Honda

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

*P-18

ウシグソヒトヨタケの生長中栄養二核菌糸におけるセプチン関連タンパク質の動態

柿崎哲哉¹, 小峠優佳¹, 松渕美月¹, 菅生麻友¹, 本間ちはる¹, 附田浩基¹, 佐藤壮一¹, 塩谷達弘¹, 中村宏江¹, Amy Gladfelter², 竹下典男³, 村口元¹ (¹秋田県立大・生物資源, ²ノースカロライナ大, ³筑波大)

ウシグソヒトヨタケの柄伸長欠損突然変異体の原因遺伝子が出芽酵母 Cdc3 セプチンの相同タンパク質 (CcCdc3) をコードしていた。出芽酵母ではセプチンが細胞質分裂タンパク質の動員, 形態形成チェックポイント, 膜の曲率感知等に関与していると言われている。本菌には少なくとも5種類のセプチン (CcCdc3, CcCdc10, CcCdc11a, CcCdc11b, CcCdc12) が含まれているが, その役割には不明点が多い。そこで栄養菌糸生長時のセプチンの役割を解明するために, EGFP や mCherry, PA-GFP という蛍光タンパク質を各種セプチンや関連タンパク質に融合し, その動態を観察した。

セプチンは生長中の菌糸先端に集合しているものの, 最先端には局在せず, 先端中央に穴の空いたドームとして観察された。CcCdc3, CcCdc10, CcCdc11a, CcCdc12 はこの先端穴開きセプチンドームから細胞膜上を次端細胞側へと広がっていた。CcCdc14 は菌糸先端では動的なドームとして観察され, その後部は先端穴開きセプチンドームと重なっていた。ポラリソーム成分の CcSpa2 は生長中菌糸先端に球体として観察された。アクチンは菌糸先端に観察されると共に, 先端後方領域では細胞膜上の EGFP-CcCdc10 の内側に観察され, セプチンのエンドサイトーシス性リングとの共役が示唆された。セプチンは生長中菌糸の最先端に局在しないことから, ポラリソームと Spitzenkörper の周辺で主に機能すると推察される。現在 PA-GFP 融合セプチンの動態の観察及び解析も行っているところである。

Dynamics of septin related proteins in the growing dikaryotic vegetative hypha of *Coprinopsis cinerea*

Tetsuya Kakizaki¹, Yuuka Kotouge¹, Mitsuki Masubuchi¹, Mayu Sugou¹, Chiharu Honma¹, Kouki Tsukuta¹, Souichi

Satoh¹, Tatsuhiro Shioya¹, Hiroe Nakamura¹, Amy Gladfelter², Norio Takeshita³, Hajime Muraguchi¹

(¹Dept. Biotech., Akita Pref. Univ., ²North Carolina Univ., ³Tsukuba Univ.)

* P-19

菌糸ネットワークは局所的な Ca^{2+} シグナルの伝播により地方分権型のストレス応答を示す

井谷綾花¹, 榎尾俊介¹, 山本里穂¹, 芹澤知子¹, 深澤遊², 高谷直樹¹, 豊田正嗣³, 別役重之⁴, 竹下典男¹

(¹筑波大・MiCS, ²東北大院・農, ³埼玉大・理工, ⁴龍谷大・農)

多くの糸状菌は菌糸体として存在する。菌糸ネットワークは広域の栄養と水分の分配に適しており、時に数メートル以上に生存域を拡大する。その物流機能は、生態系における物質循環、菌根共生、病原性などに必須である。一方、菌糸ネットワークにおけるシグナル伝達についてはほとんど知られていない。本研究では、モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* の蛍光 Ca^{2+} バイオセンサーを用いて、切断、エタノール、塩ストレス、点レーザーなどの局所刺激に応答して、菌糸ネットワークおよび各菌糸内の Ca^{2+} シグナルの伝播を可視化し解析した。菌糸内部での Ca^{2+} シグナルの波状伝播は、ストレス種やその近接度合いによって変化する。しかし、 Ca^{2+} シグナルは 1000 μm 付近までしか伸びず、菌糸が局所的に応答することが示唆された。また、細胞内の主要な Ca^{2+} 受容体であるカルモジュリン (CaM) と Ca^{2+} /CaM 依存性プロテインキナーゼ (CaMK) を GFP トラップし、質量分析により Ca^{2+} シグナルの下流標的を同定した。局所的に活性化された CaM と CaMKs は、シグナル伝達経路、膜輸送、細胞壁合成、糖・アミノ酸代謝などの異なる標的の機能を制御し、菌糸体における地方分権型のストレス応答をもたらす。このことは集中神経系を持たない菌糸ネットワークの生存戦略、つまり物流・生長・分化の分権型選択から記憶・知能らしきものにも関わる可能性がある。

Local calcium signal transmission in mycelial network exhibits decentralized stress responses

Ayaka Itani¹, Shunsuke Masuo¹, Riho Yamamoto¹, Tomoko Serizawa¹, Yu Fukasawa², Naoki Takaya¹, Masatsugu Toyota³, Shigeyuki Betsuyaku⁴, Norio Takeshita¹

(¹ MiCS, Univ. of Tsukuba, ² Tohoku Univ., ³ Saitama Univ., ⁴ Ryukoku Univ.)

P-20

水平伝播頻度から *Aspergillus flavus* におけるマイコウイルスの宿主特異性を俯瞰する

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)

マイコウイルスは糸状菌に感染するウイルスだが、一般的なウイルスのような宿主細胞破壊的な感染拡大を起こさず、宿主の細胞分裂に伴い次世代に伝播する。自然単離菌株では宿主菌同士の遺伝的距離とウイルス配列同士の遺伝的距離が類似することが多いため、自然環境中では主に垂直伝播により増殖し共進化してきたと考えられる。一方でホストジャンプが起こったような形跡も見られ、水平伝播による宿主特異性の拡大が示唆されている。ウイルスの水平伝播の起こりやすさは宿主の菌糸融合頻度に依存すると予想できるが、同種の菌株間でも伝播しないウイルスが多数あり、菌糸融合頻度だけでは説明がつかない。本研究では、マイコウイルスの宿主特異性を規定する要素を明らかにすることを目的に、ウイルスの水平伝播を観測した。

Aspergillus flavus の複数の野生株からマイコウイルスが検出されている。菌株同士を共培養したのちウイルス感染の有無を判定することで、菌株間でのウイルスの伝播頻度を算出した。自然宿主菌株から作出したウイルスフリー株に対して再びウイルスを伝播させた場合、高いウイルス伝播頻度を示した。異なる株由来のウイルスの場合でも、近縁ウイルスであれば伝播頻度は高い傾向にあり、ウイルス種と宿主糸状菌株の間には選択性があることがわかった。一方で、宿主の遺伝的距離に関わらず複数の菌株に伝播しやすいウイルス種も存在した。また、一度伝播したウイルスが宿主菌株に適合できず培養の過程で脱離していく例もあり、宿主菌株によるウイルスの排除機構がはたらくことが示唆されている。つまり、マイコウイルスの宿主特異性は宿主の菌糸融合頻度のみで定義されるものではなく、菌糸融合による伝播ののちにも、宿主内に維持されるか排除されるかというウイルスと宿主菌株の攻防があることが推測できた。

Investigating a key element determining host range of mycovirus in *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-21 (O-4)

Aspergillus oryzae の気中菌糸の形成におけるリン脂質組成の重要性

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, 2 東大・微生物連携機構)

糸状菌は無性胞子である分生子から発芽し、菌糸はその先端を伸長させながら生長する。菌糸はまず基底菌糸として生長し、その後気中菌糸が形成され、分生子形成器官を分化させる。しかし、どのようにして基底菌糸から気中菌糸が形成されるのかについては、ほとんど明らかにされていない。

我々は、生体膜の主要構成成分であるリン脂質の糸状菌における役割を解析しており、特に、*Aspergillus oryzae* における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) に着目してきた。これらリン脂質の合成経路はモデル生物で明らかにされており、PE から PC への変換経路がある他に、エタノールアミン (Etn) から PE、コリン (Cho) から PC が合成される経路が存在している。今回、我々は PE から PC の変換に関わる遺伝子 *pemA*, *pemB* (1) に着目し、それらの破壊株を詳細に解析した。D*pemA* 株、D*pemB* 株は、最少培地である Czapek-Dox (CD) 培地ではほとんど生育せず、糸状菌の生育において PC の重要性が示された。しかしながら、Etn を添加した CD 培地では基底菌糸のみを伸長させることが分かった。一方で、この条件においては、いずれの破壊株も気中菌糸をほとんど形成しなかった。また、各遺伝子の発現抑制株を Etn 添加 CD 培地から Cho 添加 CD 培地にシフトしたところ、基底菌糸のみが伸長していた部分についても気中菌糸および分生子が形成されようになり、PC が十分量あれば気中菌糸が形成されることが示された。以上のことから、*A. oryzae* においては、気中菌糸形成には一定量以上の PC が必要であることが示唆された。

1) 須澤ら、第 20 回糸状菌分子生物学コンファレンス

Importance of phospholipid composition in aerial-hyphae formation of *Aspergillus oryzae*

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

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

* P-22 (O-5)

黄麹菌生細胞におけるグルコアミラーゼ mRNA の時空間制御機構

守田湧貴, 竹川薫, 樋口裕次郎 (九大院・生資環)

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* は、グルコアミラーゼなどの有用な酵素を安全かつ多量に分泌する。そのため、タンパク質分泌機構に関する理解を深め、産業的な利用価値を高めるための研究が数多く取り組まれてきた。遺伝子発現は、細胞内のタンパク質量を決定し、分泌生産量を左右し得る重要なプロセスである。その中で、黄麹菌細胞において「分泌酵素 mRNA がいつどこで翻訳されているのか」という時空間的な情報については、ほとんど明らかにされていない。本研究では、黄麹菌生細胞でグルコアミラーゼ (*glaA*) mRNA を可視化する手法を確立し、分泌酵素 mRNA に関する細胞内局在とその局在化メカニズムの解明を試みた。

MS2 system は、生体内の mRNA を一分子レベルで可視化する手法である。今回、MS2 system を黄麹菌に新たに適用し、*glaA* mRNA の細胞内局在について解析を行った。その結果、菌糸先端領域 ($\leq 50 \mu\text{m}$) に最も多く局在することを確認した。さらに、隔壁や分岐部位付近に *glaA* mRNA が局在することも確認した。これらの結果を踏まえ、*glaA* mRNA の転写箇所および動態に関するさらなる解析を行った。その結果、*glaA* mRNA が分泌部位である菌糸先端や隔壁に近い核で活発に転写され、細胞質でブラウン運動または分子モーター様の指向性運動を示すことを確認した。そこで、微小管重合を阻害した結果、*glaA* mRNA の分散が著しく低下した。以上の結果より、黄麹菌において分泌酵素が高分泌する際、その転写が分泌部位近傍の核で選択的に活性化し、その領域に分泌酵素 mRNA が多く局在することを明らかにした。また、局在化メカニズムの一端として、分泌酵素 mRNA が微小管分子モーター依存的に分泌部位近傍で分散されることが示唆された。

Spatiotemporal regulation of glucoamylase mRNA localization in living cells of *Aspergillus oryzae*

Yuki Morita, Kaoru Takegawa, Yujiro Higuchi

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

* P-23

糸状菌が放出する細胞外膜小胞に含まれる二次代謝産物の探索

三上力輝¹, 二宮章洋², 浦山俊一^{3,4}, 萩原大祐^{3,4} (¹筑波大院・生命地球環境, ²東大院・農, ³筑波大・生命環境系, ⁴筑波大・MiCS)

糸状菌は抗生物質やマイコトキシンをはじめとした二次代謝産物の産生能が非常に高い微生物である。二次代謝産物の生産は、環境中における糸状菌の生存戦略の一つと考えられているが、その分泌様式については未解明の点が多い。我々は、複数の糸状菌が細胞外膜小胞 (eMV : extracellular Membrane Vesicle) を産生することを見出しており、本研究ではこの eMV が二次代謝産物の輸送に寄与している可能性について検討する。eMV を介した二次代謝産物の輸送が発見されれば、糸状菌 eMV を新たな生物制御の標的とする応用利用にも繋がることを期待される。

初めに、環境中からよく分離される 6 種の糸状菌を用い、eMV が多量に産生される条件を検討した。その結果、ほとんどの菌株は栄養豊富な YPD 培地で活発に eMV を産生し、培養前期よりも後期に eMV の産生量が増加していた。続いて、Iodixanol を用いた密度勾配遠心分離法により eMV を精製し、その画分に含まれる化合物を LC-MS/MS で検出し、GNPS Network で解析した。その結果、*Aspergillus clavatus* や *Penicillium expansum* が産生する eMV には、リン脂質の構成成分や脂質メディエーターに加え、抗菌活性が報告されている Kotanin や Roquefortine C をはじめとした複数の真菌代謝物が含まれていることが明らかとなった。以上の結果から、eMV が糸状菌の物質輸送様式の一つとして機能している可能性が示唆された。今後は、eMV 画分や菌体、培養液に含まれる化合物プロファイルの定性・定量的比較を行い、eMV に二次代謝産物を積み込む機構が存在するのか検証していく。

Exploration of extracellular Membrane Vesicles containing secondary metabolites in filamentous fungi

Riki Mikami¹, Akihiro Ninomiya², Shunichi Urayama^{3,4}, Daisuke Hagiwara^{3,4}

(¹Fac.of Life&Earth Sci. Univ. of Tsukuba, ²Fac.of Agri. Univ. of Tokyo, ³Fac.of Life&Env., ⁴MiCS, Univ. of Tsukuba)

* P-24

イネいもち病菌におけるクロラムフェニコールによる付着器形成阻害機構

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

イネいもち病菌 (*Pyricularia oryzae*) はイネに感染する植物病原糸状菌であり、感染の際に葉面上で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。付着器形成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および細胞の形態形成に至る一連の反応が 1 細胞内で起こる細胞分化系である。先行研究において付着器形成を阻害する既存薬剤のスクリーニングが行われ、原核細胞に作用するクロラムフェニコール (Cm) が付着器形成を特異的に阻害することが示された。これまで、Ser/Thr protein phosphatase である Dullard および細胞周期制御因子である CDC25 が Cm の新規標的因子であることを見出した (第 16 回, 第 19 回本コンファレンス)。本研究では T7 フェージディスプレイ法により抽出された他の 17 の Cm 標的候補因子について過剰発現株ならびに遺伝子破壊株を作製し、Cm による付着形成阻害との関連性を評価した。その結果、MFS hexose transporter と推測される MGG_07157, Trichothecene 3-O-Acetyltransferase と類似性を示す MGG_10757, 小胞体でのミスフォールディングタンパク質のコピキチン化への関与が推測される MGG_13508 が新たな Cm 標的因子であることが示唆された。以上の結果ならびにこれまでの知見を踏まえ、Cm による付着形成阻害メカニズムについて考察した。

Inhibition mechanisms of infection-specific cell differentiation by chloramphenicol in the rice blast fungus *Pyricularia oryzae*

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

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

P-25

病原性糸状菌 *Aspergillus fumigatus* の臨床分離株の表現型と細胞壁成分の比較解析

宮澤拳¹, 梅山隆¹, 高塚翔吾¹, 村長保憲¹, 星野泰隆¹, 阿部雅広¹, 阿部敬悦², 宮崎義継¹ (¹ 感染研・真菌部, ² 東北大院農・農化)

当施設では、難治症例や診断困難例を対象に真菌の同定等に関する検査を実施しており、多数の臨床分離株が収集されている。こうした臨床分離株は、種々の形質を獲得・欠失させて宿主体内の環境に馴化していると考えられる。アスペルギルス症の主な原因菌種として *Aspergillus fumigatus* が知られている。本研究では、*A. fumigatus* の臨床分離株に着目し、その形質や細胞壁成分を解析し、実験室株との比較解析を通して新規の病原因子やアスペルギルス症の感染メカニズムを見出そうと考えた。まず、当施設で保有する *A. fumigatus* 臨床分離株のうち 44 株 (喀痰由来 25 株, 脳膿瘍由来 6 株, 肺生検由来 5 株, その他 8 株) について表現型を観察した。その結果、実験室株 (AfS35) に比べて著しく菌糸伸長速度が遅い株が 4 株、無機窒素資化性が低下・欠失した株が 5 株、バイオフィーム形成能が低い株が 1 株見出された。分生子形成能の低下やメラニン産生の異常、色素産生をする菌株も存在した。このことから、宿主体内において治療に抵抗性を示す形質の獲得や不要な代謝経路の脱落が示唆された。また、44 株のうち 18 株について栄養菌糸の細胞壁成分を解析し、18 株の平均を算出したところ、 β -1,3-グルカンとキチンは菌体重量当たりそれぞれ $8.5 \pm 0.6\%$ および $2.9 \pm 0.6\%$ で比較的一定に保たれていた一方、 α -1,3-グルカン ($4.5 \pm 1.2\%$) やガラクトマンナン ($1.7 \pm 0.6\%$) については株間でその量に多様性が認められた。現在、特異な表現型や細胞壁成分に変化が認められた株について、その代謝経路や免疫細胞応答、マウスモデルにおける病原性の解析を進めている。

Comparative analyses of phenotypes and cell wall components in the clinical isolates of *Aspergillus fumigatus*

Ken Miyazawa¹, Takashi Umeyama¹, Shogo Takatsuka¹, Yasunori Muraosa¹, Yasutaka Hoshino¹, Masahiro Abe¹, Keietsu Abe², Yoshitsugu Miyazaki¹

(¹Dep. Fungal Infect., Nat. Inst. Infect. Dis., ²Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ.)

P-26

木材腐朽菌の菌糸体における週周電位振動の発見

深澤遊¹, 赤井大介², 武樋孝幸² (¹ 東北大, ² 長岡高専)

菌類の菌糸体には、動物の神経細胞で見られる自発的電位振動に類似した電位の振動があることが知られており、0.1 秒から 23 分まで様々な周期の電位振動が測定されている。この電位振動は、外部刺激に対する菌糸体の知覚や応答に関係すると考えられており、その実態を理解することは菌類の認知能力を理解する上で重要である。しかし、さらに長期的な電位振動については調べられていない。菌類にも概日リズムをはじめとした数十時間単位の生理的振動が知られており、電位についても、より長期的な振動の存在が予想される。本研究では、電極を設置した直径 9cm のシャーレ内の素寒天培地で木材腐朽菌 *Pholiota brunnescens* の菌糸体を培養し、223 日間の長期に渡り電位をモニタリングした。資源として滅菌したアカマツの角材 (1cm³) を添加したシャーレでは、角材に設置した電極において 6~8 日周期の明瞭な電位振動が見られた。この振動は、角材を設置しなかったシャーレでは見られなかったことから、資源への応答に関係したものであることが示唆された。今後は、この長周期の電位振動と菌糸体の生理活性との関係を明らかにしていきたい。

Discovery of the weekly electrical oscillation in wood decomposer fungal mycelia

Yu Fukasawa¹, Daisuke Akai², Takayuki Takechi²

(¹Tohoku Univ., ²Nat. Ins. Tec. Nagaoka Col.)

P-27

糸状菌 *Aspergillus nidulans* のライフサイクルにおけるリン脂質組成のダイナミックな変動

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)

生体膜は細胞と外界, あるいは細胞質と細胞内小器官を区画化する主要な構成要素の 1 つであり, その大部分はリン脂質二重層が占めている。リン脂質は極性頭部と疎水性尾部に大きく分けられ, 頭部の違いにより, ホスファチジン酸 (phosphatidic acid, PA), ホスファチジルセリン (phosphatidylserine, PS), ホスファチジルエタノールアミン (phosphatidylethanolamine, PE), ホスファチジルコリン (phosphatidylcholine, PC), ホスファチジリンイノシトール (phosphatidylinositol, PI) などに分類される。これまでに我々は, 出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* などモデル生物で明らかにされてきたリン脂質合成の制御機構が少なくとも一部は糸状菌に適用できないこと, 特に, リン脂質の一種である PE の合成制御が糸状菌で重要な可能性を示してきた (1)。

今回, 我々はモデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* の分生子から菌糸体形成に至るまでの液体培養において, 主要リン脂質を網羅的に解析した。分生子では PC が 6 割ほど, PE が 2 割ほどのリン脂質組成となっていたが, 菌糸体を形成する頃には PC は 2~3 割, PE は 5~6 割ほどになるなど組成が逆転していた。また, リン脂質の脂肪酸鎖に着目したところ, 分生子の発芽前後に一過的に 3 つの不飽和結合を持つ脂肪酸が顕著に増加していた。本発表では, 糸状菌のライフサイクルにおけるこれらダイナミックなリン脂質組成変化とその要因・生理的意義について議論する。

1) Takagi, et al. (2021). *J. Biosci. Bioeng.* **131**, 139.

Dynamic changes in phospholipid composition during the life cycle of the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*.

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

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

* P-28

分散型麹菌のオルガネラ観察とオミックス解析

鈴木智大¹, 小野大暉¹, 若井暁^{2,3}, 近藤昭彦², 荻野千秋¹ (¹神戸大院・工, ²神戸大院・イノベ, ³海洋機構)

麹菌は液体培養において菌糸が絡まることで菌糸塊を形成するため, 培養時の形態制御が難しく物質生産能の低下が懸念されている。先行研究において, 菌糸塊形成に関わる菌糸接着因子を破壊した分散型麹菌が構築され, 酵素生産性の向上が認められている。加えて, 分散型麹菌では, 従来型麹菌より菌体増殖量が多いことや糖代謝フラックスがスムーズになっていること, 菌体重量当たりの酸素消費量が大きくなっている実験結果を得ている。本研究では, さらに細胞内の機能に関わるオルガネラの観察とトランスクリプトーム解析の結果を加えることで, 多角的に分散型麹菌の物質生産性向上について検討を行った。従来型株と分散型株を 3 %GPY 培地で 24 時間培養し, 培養中の菌糸を採取した後, 生細胞用蛍光プローブ(Mito-Tracker および ER-Tracker) を用いて染色し, 蛍光顕微鏡を用いて菌糸先端の細胞を観察した。小胞体の染色像では, 両方の株で菌糸全体に強い蛍光シグナルが観察された。小胞体の発達は, 麹菌の特徴である高いタンパク質生産能と一致する。一方, ミトコンドリアの染色像では, 分散型株において菌糸先端に強い蛍光シグナルが観察され, 従来型株では全体的に弱い蛍光シグナルが見られた。したがって, 分散型株の菌糸先端においてミトコンドリアが発達していることを示しており, 分散型麹菌が従来型より高い呼吸活性を持つ特徴と一致する。これらの結果から, 分散型麹菌の高い物質生産能は, 発達したミトコンドリアが高い物質生産に必要な活発なエネルギー代謝に貢献していることが示される。現在, 代謝解析とトランスクリプトーム解析の結果を加えて, これらの代謝を支える分子生物学的な機構の解明を進めている。

Organelle observation and omics analysis in hyphae-dispersed type of *Aspergillus oryzae*

Tomohiro Suzuki¹, Taiki Ono¹, Satoshi Wakai^{2,3}, Akihiko Kondo², Chiaki Ogino¹

(¹Grad Sch Eng, Kobe Univ., ²Grad Sch Sci Technol Innov, Kobe Univ., ³JAMSTEC)

* P-29 (O-6)

Cellular dynamics and role of mitochondrial fission in heterokaryon incompatibility of *Aspergillus oryzae*

Yahong Zou¹, Chan Lu¹, Takuya Katayama^{1,2}, Ryota Saito³, Kazuhiro Iwashita³, Jun-ichi Maruyama^{1,2}

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

In filamentous fungi, vegetative cells can fuse to form heterokaryons, and cell fusion between genetically incompatible strains causes growth inhibition or cell death, which is termed heterokaryon incompatibility. In *Aspergillus oryzae*, the filamentous fungus used in Japanese food fermentation, numerous diverse strains are used selectively for different purposes (e.g. sake, soy sauce and *miso*). Previously, we found that strains from distinct phylogenetic clades are mostly incompatible but that the same phylogenetic strains are compatible¹⁾. However, it remains elusive on the physiological interaction and molecular mechanism of heterokaryon incompatibility in *A. oryzae*. In this study, we aim to directly provide cell-level evidence for physiological responses upon incompatible cell fusion in *A. oryzae*.

First, we established a time-course fluorescence observation of cell fusion in *A. oryzae*, and demonstrated that cell death occurred in the incompatible strain pair. Through the visualization of organelles with fluorescence proteins to characterize the subcellular dynamics, mitochondria fragmentation was observed immediately after the incompatible cell fusion. The mitochondrial fission-related genes *Aofis1* and *Aodnm1* were deleted in the *A. oryzae* strains, and then the viable heterokaryotic hyphae were found in the gene deletions of the incompatible strain pair by microscopy. After long-term culture, the incompatible heterokaryon of the gene deletions continued the growth and displayed obvious colony morphology. These results revealed that the incompatibility-triggered cell death was alleviated by deletions of the mitochondrial fission-related genes in *A. oryzae*.

1) Lu *et al.* (2021) Annual meeting of JSBBA, 4C03-04.

* P-30

麹菌 *Aspergillus oryzae* における推定新規ペキシファジー関連タンパク質の解析

西尾譲一郎, 武田陽一, 菊間隆志 (立命館大院・生物工)

【目的】選択的オートファジーの一種であるペキシファジーは、ペルオキシソームを選択的に液胞/リソソームへ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オートファゴソーム上に存在する Atg8 が結合することにより生じると考えられている。しかし糸状菌では、レセプタータンパク質を含む選択的オートファジー関連タンパク質はほとんど同定されていないため、ペキシファジーをはじめとする選択的オートファジーの分子機構はほぼ未解明である。そこで本研究は、麹菌における AoAtg8 結合タンパク質から、新規選択的オートファジー関連タンパク質を探索し、その機能を明らかにすることを目的としている。

【方法・結果】TAP 法により精製された AoAtg8 結合タンパク質の中から、炭素源枯渇条件下で精製され、機能未知である AO090011000108 (AO108) を選別した¹⁾。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ペルオキシソームおよび pre-autophagosomal structure (PAS) に局在し、炭素源枯渇条件下では大きなカップ状構造へも局在することが観察された。また、Yeast two-hybrid 解析により、AO108 が AoAtg8 と相互作用することが示された。さらに AO108 が保有する 3 つの Atg8-family-interacting motif (AIM) のうち、最も C 末側の AIM の変異体では AoAtg8 との結合能を失うことがわかった。AO108 をコードする遺伝子の破壊株におけるペルオキシソームの分解レベルを検討したところ、野生株と比べて有意に低下した。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シファジーに関連する新規タンパク質である可能性が示唆された。

(1) 高橋ら, 第 19 回糸状菌分子生物学コンファレンス (2019)

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

Joichiro Nishio, Yoichi Takeda, Takashi Kikuma

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

P-31

担子孢子形成に必須な新奇分泌タンパク質の特性評価

吉田裕史, 坂本裕一 (岩手生工研)

ウシグソヒトヨタケ *Coprinopsis cinerea* の CC2G_001138 遺伝子は、担子孢子形成間近の子実体傘組織において転写量が急激に増大する。同遺伝子のノックアウト株においては子実体の柄や傘は正常に形成されるが、担子孢子が全く形成されない。その際、担子器での減数分裂は正常に完了し、担子孢子支持構造（ステリグマ）の形成も正常に見られるが、その後の前孢子体形成に至る前に発生が停止する。一方、同遺伝子のホモログは担子菌類以外では全く見つからず、予測されたアミノ酸配列からも既知ドメインが検出されないため、その遺伝子産物の分子機能は全く未知である。そこで、同遺伝子産物の分子機能および担子孢子形成に寄与する分子機序を解明すべく、その特性評価に取り組んだ。

CC2G_001138 は発現配列タグの情報から 253 aa のアミノ酸配列をコードすると予測され、SignalP-6.0 を用いた解析から N 末端にシグナルペプチドを有する分泌タンパク質であることが示唆された。同遺伝子ノックアウト株に野生型遺伝子を再導入したところ担子孢子形成能は回復し、赤色蛍光タンパク質 mCherry を C 末端に結合した融合タンパク質遺伝子を導入した場合にも同様に担子孢子形成能が回復した。後者導入株を用いて担子孢子形成前後における mCherry 融合タンパク質の局在性を解析したところ、ステリグマ形成時期においてステリグマ先端部で特異的に検出され、先端部表層を覆うようなキャップ状分布を示すことが見出された。また、前孢子体形成時期になるとステリグマ先端・前孢子体基部のくびれ部分表層にリング状ないし筒状の分布を示し、やがて前孢子体が発達して担子孢子として成熟する頃になると徐々に消失することが見出された。これらの結果から、同遺伝子産物はステリグマ先端において分泌されて細胞表層に吸着し、前孢子体形成を誘導または支持する役割を果たすと考えられる。

Characterization of a novel secreted protein essential for basidiospore formation

Hiroshi Yoshida, Yuichi Sakamoto

(Iwate Biotech. Res. Ctr.)

* P-32

糸状菌 *Aspergillus nidulans* のラムノガラクトツロナン分解機構の解明

亀山綾音, 鈴木裕満, 志水元亨, 加藤雅士 (名城大院・農)

【緒言】*Aspergillus nidulans* などの糸状菌は細胞外に様々な多糖分解酵素を分泌することが知られている。ペクチンのみを炭素源にして *A. nidulans* を培養後、セクレトーム解析したところ、機能既知のタンパク質とアミノ酸配列レベルで全く相同性がない機能未知タンパク質 (HP) が多数同定された。その中の一つが新規ラムノガラクトツロナンリアーゼ (AnRGL) であった。さらに、GH105 に分類される Unsaturated rhamnogalacturonyl hydrolase (AnURH) も同定された。本研究では、*A. nidulans* によるラムノガラクトツロナン (RG) の分解機構について解析した。

【方法・結果】AnRGL を 6 種のペクチンの構成多糖と反応させたところ、RG のみに作用した。RG の反応産物を MALDI-TOF-MS にて解析したところ、不飽和結合を含む RG オリゴ糖が検出されたことから、AnRGL は現存するいずれの Polysaccharide Lyase (PL) ファミリーに属さない新規のラムノガラクトツロナンリアーゼであることが判明した。また、X 線結晶構造解析から AnRGL は β -helix 型の構造を有することが示された。さらに、野生株および AnRGL の遺伝子破壊株 (Δ AnRGL 株) を RGI のみを炭素源にして 3 日間培養後、得られた細胞外面分と RG を反応させた。その結果、 Δ AnRGL 株では RG オリゴ糖が検出されなかったことから、AnRGL は、主要なエンド型のラムノガラクトツロナン分解酵素であることが明らかになった。さらに、GH105 に分類される AnURH は AnRGL の分解産物である不飽和 RG オリゴ糖を加水分解した。以上の結果から、*A. nidulans* による RG 分解において、AnRGL および AnURH が中心的な役割を果たしていることが明らかになった。

Rhamnogalacturonan degradation mechanism of *Aspergillus nidulans*

Ayane Kameyama, Hiromitsu Suzuki, Motoyuki Shimizu, Masashi Kato

(Fac of Agric, Univ. of Meijo)

P-33

糸状菌に特徴的な α -(1→6)-マンノース転移酵素 AnpA は *Aspergillus fumigatus* における真菌型ガラクトマンナンの生合成に必須である

門岡千尋¹, 平大輔¹, 田中大², 宮澤拳³, 高塚翔吾³, 岡拓二¹ (¹崇城大・生物, ²東北医薬大・薬, ³感染研)

病原性糸状菌 *Aspergillus fumigatus* の細胞表面には真菌型ガラクトマンナン (FTGM) が存在しており、本菌の正常な菌糸伸長に重要である。FTGM のマンナン主鎖は 9~10 個の α -(1→2)-テトラマンノシドユニットが α -(1→6)-結合した構造をとるが、マンナン主鎖生合成に関与する α -(1→6)-マンノース転移酵素 (ManT) は同定されていない。本研究では FTGM 生合成に関与する α -(1→6)-ManT の同定を目的とした。

まず、*A. fumigatus* のゲノム上に存在する 9 種の推定 α -(1→6)-ManT 遺伝子の単独破壊株を構築し、その表現型を観察した結果、出芽酵母 *ANP1* のホモログである *anpA* 遺伝子破壊株のみが野生株と比較して顕著に生育が遅延した。そこで、*anpA* 破壊株の FTGM 構造を ¹H-NMR により解析した結果、マンナン主鎖固有のケミカルシフトが消失していることが明らかになった。また、組換え AnpA の受容基質に対する基質特異性の解析および AlphaFold2 による立体構造予測モデルを用いた分子動力学シミュレーションにより、AnpA は FTGM のマンナン主鎖生合成に適した性質をもつ α -(1→6)-ManT であることが示唆された。さらに、AnpA を含む子囊菌門の GT62 family に属する糖転移酵素のアミノ酸配列に基づく系統解析を行った結果、糸状菌の AnpA は出芽酵母や分裂酵母の Anp1 とは独立したクレードに分類された。以上の結果より、AnpA は FTGM のマンナン主鎖生合成のために、糸状菌において独自に進化した α -(1→6)-ManT であることが示唆された。

Identification of α -(1→6)-mannosyltransferase responsible for biosynthesis of fungal-type galactomannan in *Aspergillus fumigatus*.

Chihiro Kadooka¹, Daisuke Hira¹, Yutaka Tanaka², Ken Miyazawa³, Shogo Takatsuka³, Takuji Oka¹

(¹Fac. Biotech. Life Sci., Sojo Univ., ²Div. Pham., Tmpu, ³Dept. Fungal infection., NIID)

P-34

黄麹菌 (*A. oryzae*) 及び黒麹菌 (*A. luchuensis*) の液胞ペプチダーゼ PepE は凝乳酵素である。

田久陽子¹, 浅村太郎¹, 岡本綾子¹, 前田浩¹, 竹内道夫¹, 楠本憲一², 片瀬徹³, 石田弘樹⁴, 田中瑞己¹, 山形洋平¹ (¹農工大・応生化, ²阪大・生物工, ³天野エンザイム, ⁴月桂冠)

A. oryzae は、11 種のアスパラギン酸エンドペプチダーゼ遺伝子を有している。凝乳酵素である牛キモシンのアミノ酸配列との相同性からチーズ製造に必要な凝乳活性を持つ酵素の探索を行った。その結果、強い凝乳活性を持つ酵素が一つ見いだされた。他の *Aspergillus* でも同様の活性を持つ酵素が存在するであると推測し、*A. luchuensis* でも探索を行ったところ、同様に凝乳活性を持つ酵素が存在した。興味深いことに、これらの 2 つの酵素は、そのアミノ酸配列から、いずれも液胞に存在するとされている PepE のオルソログであると推定された。2 つの凝乳活性を持つ酵素は、 κ -カゼインの ¹⁰⁵Phe-¹⁰⁶Met 間のペプチド結合を選択的に加水分解していた。さらに両酵素は、カゼインを基質とした際に、タンパク質分解活性を示したが、凝乳活性とタンパク質分解の至適 pH は異なっていた。これまでに報告されている微生物レンネットより、凝乳活性/タンパク質分解の比が高いことも明らかとなった。また、*A. oryzae* の PepE の基質特性は非常に高く、ペプチドに対する限定的な分解を示した。酵母では、PepE の細胞外への分泌が知られており、麹菌でも PepE の細胞外への分泌が推定されている。これらのことから、日本の伝統的な醗酵に用いられる麹や麹菌がチーズ製造のための酵素源として利用できることが期待された。

A novel milk-clotting enzyme from *Aspergillus oryzae* and *A. luchuensis* is an aspartic endopeptidase PepE presumed to be a vacuolar enzyme. Yoko Takyu¹, Taro Asamura¹, Ayako Okamoto¹, Hiroshi Maeda¹, Michio Takeuchi¹, Ken-Ich Kusumoto², Toru Katase³, Hiroki Ishida⁴, Mizuki Tanaka¹, Youhei Yamagata¹. (¹Dept Appl Biol Chem, Tokyo Univ Agric & Tech, ²Dept Biotech, Osaka Univ, ³Amano Enzyme Inc, ⁴Gekkeikan Sake Co., Ltd)

P-35

麹菌酸性ホスファターゼの機能解析

酒井香奈江¹, 鈴木忠宏², 堀井悠一郎³, 和久豊⁴, 楠本憲一¹ (¹阪大院・工, ²農研機構, ³新潟食品研, ⁴(株) ビオック)

だし入り味噌の製造時, だし成分を分解する酸性ホスファターゼ失活させるための加熱処理が必要となる。しかし, 熱処理を行うことで, 味噌の風味や色調変化といった品質低下が免れない上に粘性のある味噌を加熱する特殊な装置が必要という問題がある。そこで, 酸性ホスファターゼ活性を低下させることができれば, 熱処理の工程が不要だし入り味噌の生産につながると考えられる。

これまでの研究で, *Aspergillus oryzae* には 13 種類の酸性ホスファターゼ遺伝子(*aphA-M*)が存在し, リン酸濃度依存的な発現制御を受けていることが分かった[1]。中でも, *Aph* 遺伝子破壊株の酵素活性測定により *AphC* が主にだし成分であるイノシン酸などの脱リン酸化に関与していることが示唆されている[2]。Bio'c が保有する *A. oryzae* 503 株のスクリーニングにより, プロテアーゼやアミラーゼ活性は味噌作りに十分な活性を保ちつつ, 酸性ホスファターゼ活性が大きく低下した株を見出している。ゲノム解析からこの株は市販味噌用株と比較して *aphC* 遺伝子や他のいくつかの *aph* 遺伝子に変異が入っていることが確認された。

現在, 変異の入った *AphC* を中心にその活性や安定性についての解析を進めており, 酸性ホスファターゼ活性が低下した原因を探っているところである。

1: Marui et al., 2013, Int J Food Microbiol., 166:238-243

2: Yasuda et al., 2014, Food Sci. Technol. Res., 20:367-374

Functional analysis of acid phosphatase of *Aspergillus oryzae*

Kanae Sakai¹, Tadahiro Suzuki², Yuichiro Horii³, Yutaka Wagu⁴, Ken-Ichi Kusumoto¹

(¹ Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., ²NARO, ³Niigata Food Res. Center, ⁴Bio'c)

* P-36

Aspergillus nidulans の NO 耐性に関わる P450 関連遺伝子の機能解析

小島才卓, 鈴木康太, 梶尾俊介, 志水元亨, 高谷直樹 (筑波大・生命環境/ MiCS)

糸状菌は一酸化窒素 (NO) に応答して遺伝子発現と代謝を制御して NO の毒性を回避するが, そのメカニズムの多くは不明である。我々は, NO によって誘導される *A. nidulans* の遺伝子のうち, cytochrome P450 (P450) を含む共通した 4 つの遺伝子からなる遺伝子クラスターを 2 つ発見した。当該クラスター内の AN8919 (推定 P450 : CYP540A2) 遺伝子の遺伝子破壊株の生育が NO 感受性を示したことから, 少なくとも AN8919 は *A. nidulans* の NO 耐性に関与することが既に示されている。本研究では, 当該クラスターに含まれる推定転写因子と P450 への電子伝達タンパク質の機能を解析した。

クラスター内の推定転写因子 AN8918 の遺伝子破壊株を作製した。これを NO に 3 時間曝露した際の 2 つのクラスター内の遺伝子の発現量を定量 PCR を用いて定量したところ, 約 0.17~3.8 倍増加した。これに対して野生株では NO の曝露により約 8.6~320 倍の転写量を示した。これらの結果より, AN8918 は NO 存在下における P450 遺伝子クラスターの発現量を制御していることが示された。

AN8920 はシトクロム *b₅* とシトクロム *b₅* 還元酵素が融合したユニークなタンパク質 (*b₅/b₅R*) であり, P450 の活性に必要な電子を伝達する機能を持つことを示してきた。組換え *b₅/b₅R* を用いて可視吸収スペクトル解析を行った。*b₅/b₅R* は NADH と NADPH によって還元され, NAD(P)H-DCIP 還元酵素活性を指標とした K_m はそれぞれ 9.6 μM , 390 μM であり, k_{cat} はそれぞれ 23 s^{-1} , 18 s^{-1} であった。この結果から *b₅/b₅R* は電子供与体として NADH を好むことが明らかとなった。また, *b₅/b₅R* の cytochrome *c* との反応における K_m は 1.1 μM , k_{cat} は 34 s^{-1} であることから, cytochrome *c* は電子受容体として利用可能であることが示された。

Cytochrome P450 gene clusters involved in nitric oxide tolerance in *Aspergillus nidulans*.

Saito Kojima, Kota Suzuki, Shunsuke Masuo, Motoyuki Shimizu, Naoki Takaya

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

P-37 (O-7)

3種の地衣化担子菌類のゲノムが保有する CAZyme レパートリーの比較

升本宙¹, 吉橋佑馬², 出川洋介², 田中千尋¹ (¹京都大・地球環境学堂, ²筑波大・菅平)

藻類と地衣共生する菌類は子囊菌門と担子菌門の様々な系統に散在しており、「地衣化菌類」と称されている。地衣共生の起源は複数存在するとされているが、その共生機構の共通性については未だ明らかでない。一部の地衣化菌類のゲノム情報は近年ようやく蓄積され始めたが、多くの地衣化系統のゲノムは依然として解読されていない。そこで演者らは、地衣共生という形質を考察する試みの一つとして、ゲノムが未解読であった担子菌門の地衣化菌類（地衣化担子菌類）に注目し、*Multiclavula mucida*（アンズタケ目；緑藻と地衣化）、及び *Cyphellostereum ushimanum* と *Dictyonema moorei*（ともにハラタケ目；ともにシアノバクテリアと地衣化）の3種を対象に、各々のドラフトゲノムを構築した。そして、糖質関連酵素（CAZyme）のレパートリーを子囊菌門の地衣化菌類と比較することで、地衣化系統間での共通点や相違点について調査した。

単相化した各ゲノムのアセンブリサイズは *C. ushimanum* が 36.7 Mb, *D. moorei* が 33.3 Mb, *M. mucida* が 24.1 Mb で、それぞれ 213 個, 274 個, 269 個の CAZyme の存在が予測された。スクロース分解に関与する GH32 を保有する点やペクチン分解に関与する GH28 を欠く点は、地衣化系統間で共通した特徴である可能性が示唆された。一方で、結晶性セルロース分解に関与する CAZyme については、*D. moorei* は GH6, *M. mucida* は GH6 と GH7 を保有しており、一般にこれらを欠いている地衣化菌類の多くのゲノムと相違した。また、*C. ushimanum* と *D. moorei* はともにペプチドグリカン分解に関与する GH25 を複数個保有しており、シアノバクテリアとの地衣化における関連が示唆された。*M. mucida* はセルロースと結合する CBM1 を多数（13 個）有し、キシラン分解に関与する GH10 も複数個保有する点で、発生基質（腐朽材）との関連が示唆された。

Comparison of CAZyme repertoires in the genomes of three lichenized basidiomycetes

Hiroshi Masumoto¹, Yuma Yoshihashi², Yousuke Degawa², Chihiro Tanaka¹

(¹GSGES, Kyoto Univ., ²SRS, MSC, Univ. of Tsukuba)

* P-38 (O-8)

白麹菌 *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii* における α -アミラーゼ AmyB の機能解析

井上太雅¹, 山口正晃¹, 門岡千尋², 奥津果優¹, 吉崎由美子¹, 高峯和則¹, 後藤正利³, 玉置尚徳¹, 二神泰基¹ (¹鹿児島大大学院・農林水産学研究科, ²崇城大・生物生命学部, ³佐賀大・農学部)

白麹菌 *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii* は分泌型の α -アミラーゼとして、非耐酸性 α -アミラーゼ (AmyA) と耐酸性 α -アミラーゼ (AsaA) を生産する。加えて、白麹菌のゲノムにはもう1つ分泌型の α -アミラーゼをコードすると推定される *amyB* 遺伝子が存在する。本研究では、白麹菌の AmyB の機能を明らかにすることを目的とした。まず、白麹菌の $\Delta amyB$ 株に顕著な α -アミラーゼ活性の低下は見られなかった。しかし、 $\Delta amyA\Delta asaA\Delta amyB$ 株の培養上清における α -アミラーゼ活性は、 $\Delta amyA\Delta asaA$ 株の α -アミラーゼ活性よりも低下した。この結果から、AmyB は白麹菌が分泌生産する α -アミラーゼの総活性にわずかに寄与していることが示唆された。次に、*amyB* の coding sequence を RNA-seq のマッピングデータで確認したところ、イントロン予測に誤りがあり、AmyB の C 末端側に GPI アンカーが付加すると予測されるアミノ酸配列の存在が明らかになった。また、イントロンのプライミングを RT-PCR 産物のシーケンス解析によって確認した。さらに、 $\Delta amyA\Delta asaA$ *PamyA-amyB* 株の菌体から細胞膜画分を調製して α -アミラーゼ活性を測定したところ、 $\Delta amyA\Delta asaA$ 株と比べ 26 倍以上の高い活性を示した。以上の結果より、AmyB が GPI アンカーにより細胞膜に局在している可能性が示唆された。

Functional analysis of α -amylase AmyB in *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii*

Taiga Inoue¹, Masaaki Yamaguchi¹, Chihiro Kadooka², Kayu Okutsu¹, Yumiko Yoshizaki¹, Kazunori Takamine¹, Masatoshi Goto³, Hisanori Tamaki¹, Taiki Futagami¹

(¹Fac. Agric., Kagoshima Univ., ²Fac. Bio. Life Sci., Sojo Univ., ³Fac. Agric., Saga Univ.)

* P-39

植物バイオマスの分解における糸状菌間の相互作用解析

大西みはる¹, 岩波明季¹, 浦山俊一^{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)

糸状菌は植物バイオマスの主要な分解者であり、自然環境中では複数の菌種が群集を形成し互いに影響を与えながら分解が進展するとされている。しかし、バイオマス分解における種間相互作用の詳細な分子メカニズムについては理解が進んでいない。そこで本研究では、もみ殻培地を用いて、植物バイオマス分解時の菌種間の生育競合や機能の協働に関して、分子メカニズムの解明を目指す。先行研究において、もみ殻で占有していることが明らかになった *Chaetomium globosum*, 相互作用による増加が見られた *Curvularia micropus* を使用もみ殻から分離し、セルラーゼ産生モデル菌である *Trichoderma reesei* ともみ殻培地上で共培養し、分解と相互作用に関する解析を行なった。まず乾燥重量ベースでもみ殻分解量を比較したところ、全ての組み合わせの共培養において、単独培養時に比べてもみ殻分解量が増加した。続いて、菌の生体量を qRT-PCR で定量し比較すると、*T. reesei* は単独培養時と比べて共培養した際に生体量が大きく低下することが明らかになった。3種の菌の競争関係は、*C. globosum*>*C. micropus*>*T. reesei* であることが示唆された。もみ殻培養時の RNA-sequencing 解析を実施すると、*T. reesei* は単独培養時に多くのセルラーゼ関連遺伝子を発現していたが、*C. globosum* や *C. micropus* との共培養ではその発現が大きく抑制されていた。一方で、ヒートショックプロテインやキチナーゼ、グルカン分解酵素などの遺伝子発現が共培養により促進されることが明らかになった。以上の結果から、もみ殻を分解して生育する過程で糸状菌間の相互作用が生じ、バイオマス分解機能の発揮に関しても競争関係が築かれていることが示唆された。

Analysis of filamentous fungi interaction in plant biomass

Miharu Ohnishi¹, Aki Iwanami¹, Shun-ichi Urayama^{2,3}, Daisuke Hagiwara^{2,3}

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

* P-40 (O-9)

ウシグソヒトヨタケの傘成熟に必要な暗期と CcChd1 タンパク質と減数分裂の関係性

阿部晴紀, 三村玲, 畑中こずえ, 村口元 (秋田県立大・生物資源)

ウシグソヒトヨタケ子実体の傘が成熟するためには暗期が必須である。暗期を経ない (LL) 条件下の野生型子実体は傘成熟が途中で止まり、減数分裂が第一減数分裂前期で停止することが報告されていた。しかし、この暗期中の反応と減数分裂進行の関係性の分子機構については未知のままであった。当研究室では、暗期を与えた条件でも LL 条件下の野生型と似た外見となる突然変異体を見出した。この突然変異体の原因遺伝子は出芽酵母で見出されていた CHD1 (Chromodomain Helicase DNA-Binding Protein 1) タンパク質のホモログ (CcChd1) をコードしていた。Ccchd1 欠損株における減数分裂進行を Giemsa 染色で観察したところ、LL 条件下の野生型と同様に、減数分裂は第一減数分裂前期で停止していた。RNA-seq データより Ccchd1 遺伝子の発現状況を見てみると、遺伝子中央領域に転写量の低い領域 (Low transcribed region: LTcR) が存在し、成熟した傘組織では全長の Ccchd1 が転写されるのに対し、栄養菌糸から成熟前傘組織では Ccchd1 遺伝子から短いサイズの mRNA が転写されているだろうことが示唆された。そこで、CcChd1 の C 末端側及び N 末端側を認識するそれぞれの抗体を使用したウェスタン解析により、CcChd1 タンパク質のサイズを調べると共に、明暗条件でタンパク質発現量が変わるかを調べた。その結果、栄養菌糸では約 100 kDa の、そして傘組織からは全長 164 kDa の CcChd1 が検出され、LL 条件下の野生型栄養菌糸および傘組織では CcChd1 の発現量が低下していた。これらの結果は、Ccchd1 遺伝子は栄養菌糸と傘組織間ではサイズの異なるタンパク質を発現しており、暗期を経ることで発現が促され、傘組織では暗期を経て発現が促された全長の CcChd1 タンパク質が第一減数分裂前期から中期への移行に関与していることを示唆している。

The relationship between darkness essential for basidiocarp maturation, CcChd1 and meiosis in

Coprinopsis cinerea

Haruki Abe, Satoshi Mimura, Kozue Hatanaka, Hajime Muraguchi

(Dept. Biotech., Akita Pref. Univ.)

* P-41

Aspergillus fumigatus の大規模ゲノム解析による新規二次代謝遺伝子クラスターの探索

永山聖樹¹, 楠屋陽子¹, 高橋弘喜^{1,2,3} (1千葉大・真菌センター, 2千葉大・分子キラリティー研究センター, 3千葉大・植物分子科学研究センター)

糸状菌 *Aspergillus fumigatus* は、肺アスペルギルス症の原因菌である。一方で、糸状菌からは、ペニシリンに代表される抗生物質や抗がん剤、殺虫剤など、二次代謝産物と呼ばれる多くの有用な天然物が単離され、様々な分野で利用されていることから、*A. fumigatus* には微生物資源としての側面もある。二次代謝産物は、ゲノム上に近接して配置された二次代謝遺伝子クラスター (BGC) によって生合成されるが、微生物ゲノム解析の進展によって、考えられていたよりも多くの BGC がゲノム上に存在することが明らかとなった。

そこで我々は、天然物探索の配列情報基盤を構築するために、千葉大学真菌医学研究センターに保存されている *A. fumigatus* 173 株の BGC の多様性と保存性について調べた。ドラフトゲノム配列を構築し、BGC を予測したところ、計 6075 個の BGC を検出した。それらの比較・分類を行い、既知 BGC を含む、49 種類の BGC を同定した。現在、新規 BGC の確からしさについて手がかりを得るため、BGC 内に存在する Af293 と相同な遺伝子群に対して公共データベースを用いた遺伝子共発現解析を行っており、その結果についても報告する予定である。

Search for novel secondary metabolic gene clusters by large-scale genome analysis of *Aspergillus fumigatus*

Masaki Nagayama¹, Yoko Kusuya¹, Hiroki Takahashi^{1,2,3}

(¹MMRC, Chiba Univ., ²MCRC, Chiba Univ., ³PMSC, Chiba Univ.)

* P-42

Aspergillus nidulans の分生子形成に関わる新規転写因子 SrdA の同定

小川真弘¹, 土屋慧², 岩間亮^{2,3}, 堀内裕之^{2,3} (1野田産研, 2東大院・農生科・応生工, 3東大・微生物連携)

糸状菌の産業利用上の重要な特徴として、各種分解酵素の細胞外分泌能の高さが挙げられ、これら各種分解酵素の細胞外分泌能を強化するための様々な研究が行われている。これまでに我々は麹菌類においてタンパク質分泌を増強させることが知られていた変異遺伝子の *Aspergillus nidulans* におけるオルソログである *rseA* 破壊株のタンパク質分泌量が増加することを示した (1)。しかしながら、*rseA* 破壊株は細胞壁に異常があることや、分生子形成効率が著しく低下していることなど、培養上のデメリットが存在していた。

今回、我々は *rseA* 破壊株を親株として分生子形成効率を回復させる変異株を取得し、原因遺伝子として Zn₂Cys₆ 型転写因子をコードすると推定される AN5849 を同定し、この遺伝子を *srdA* (suppressor for reduced conidiation phenotype of *rseA* deletion mutant) と命名した。分生子形成を制御する遺伝子転写ネットワークにおける *srdA* の機能を理解するため、既知の分生子形成に関わる遺伝子群との二重欠損株の表現型を解析するとともに、トランスクリプトーム解析により SrdA が制御している遺伝子を網羅的に捉えることを試みた。本発表では、得られた結果をもとに、SrdA がどのように分生子形成に関与するのかを議論する。

1) Ogawa, M., et al. (2021). *J. Biosci. Bioeng.*, **131**, 589

Identification of SrdA, a novel transcription factor involved in the conidiation of *Aspergillus nidulans*.

Masahiro Ogawa¹, Kei Tsuchiya², Ryo Iwama^{2,3}, Hiroyuki Horiuchi^{2,3}

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

*P-43

アカパンカビの F-box タンパク質 *exo-1/dgr-2* の欠損株と点変異(S11L)株の形質の比較

平井獻士¹, 加藤志穂¹, 陳心怡¹, 福森文康², 一石昭彦¹, 藤村真¹ (¹東洋大院・生命, ²東洋大院・食環境)

アカパンカビはスクロースやグルコースを糖源とする培地では放射状に生育するが、ソルボースを含む培地では菌糸の異常分岐が起こり、コロニー状の生育をする。我々は、Carbon catabolite repression (CCR)因子のうち、*Asor-4* (グルコースセンサー)株と *Δcol-26/amyR* (転写因子)株がソルボース培地上で放射状に生育するソルボース耐性を示すが、主要転写因子 CRE-1 を含む他の因子は、ソルボース耐性に関与しないことを報告している。このことから、SOR-4 と COL-26 を繋ぐ中間因子の存在が考えられた。そこで、我々は、2-deoxyglucose (2-DG)耐性 *dgr-2* 株がソルボース耐性を示すことから、変異遺伝子の同定を試みた。しかし、Gabriel らによってアミラーゼの高生産 *exo-1* 株の原因遺伝子が F-box タンパク質であり、それが *dgr-2* 遺伝子と同一であることが報告された。なお、*dgr-2* 株は EXO-1 に S11L 点変異をもっていた。また、*dgr-2* 株(*exo-1*^{S11L}株)はソルボース耐性を示したが、欠損株は示さなかった。そこで、両株の形質をさらに比較した。まず、2-DG 耐性を検証したところ、*exo-1*^{S11L}株は耐性を示したが、*Δexo-1*株は感受性を示した。次に、分泌タンパク質量を比較したところ、*Δexo-1*株が大量に分泌していた一方で、*exo-1*^{S11L}株は野生株および *Δcol-26*株と同程度であった。さらに、COL-26 が発現制御する *gla-1* (glucoamylase), *inv* (invertase), *glt-1* (glucose transporter)および *hgt-1* (glucose transporter)の発現解析を行ったところ、*exo-1*^{S11L}株の発現パターンは *Δcol-26*株とよく似ていた。以上から、*exo-1*^{S11L}株の形質は *Δcol-26*株と酷似していることが明らかになった。F-box タンパク質は、標的タンパク質を認識してユビキチン分解をすることが知られている。これらの結果から、EXO-1 は SOR-4 と COL-26 を結ぶ因子であり、EXO-1 の標的は COL-26 である可能性が示唆された。

Phenotypic differences between deletion and a point mutation (S11L) of F-box protein *exo-1* in *N. crassa*.

Kenshi Hirai¹, Shiho Kato¹, Chen Xinyi¹, Fumiyasu Fukumori², Akihiko Ichiishi¹, Makoto Fujimura¹

(¹Life Sciences, Toyo Univ., ²Food and Nutritional Sciences, Toyo Univ.)

P-44

グルコースがウシグソヒトヨタケの子実体発生を抑制する機構の解析

坂本裕一¹, 佐藤志穂¹, 刑部敬史², 吉田裕史¹ (¹岩手生工研, ²徳島大)

ウシグソヒトヨタケにおいては、培地中のグルコース濃度が 0.2%の際には青色光照射により同調的かつ同心円上に子実体原基 (knot) を発生させる。一方培地中のグルコース濃度が 1%の際には青色光照射による子実体発生誘導が完全に抑制される。高濃度グルコース条件下では多くのきのこ種において子実体発生が阻害されることから、その原因解明に取り組んでいる。

はじめに、0.2%グルコース条件下と 1%グルコース条件下において青色光照射後に発現する遺伝子の比較を行った。0.2%グルコース条件下では、青色光照射 1 時間後には子実体発生に必須な遺伝子である *cfs1* や *btb1* をはじめとする遺伝子が発現する。*cfs1* 遺伝子は脂質の修飾に関わる遺伝子、*btb1* はタンパク質相互作用に関わる遺伝子であり、両者をゲノム編集で破壊すると子実体発生が抑制される。1%グルコース条件下では knot 形成が完全に抑制されるにもかかわらず、*cfs1* をはじめとする青色光照射後発現する遺伝子の多くが発現する。一方、*btb1* に関しては 1%グルコース条件下では青色光照射しても発現しないことが明らかになった。青色光照射後 6,12,18 時間後の遺伝子発現を比較したところ、ハイドロホビン *hyd1* をはじめとする 12 時間以降に発現する遺伝子の多くは、1%グルコース条件下では青色光照射をしても発現が上昇しないことが明らかになった。特に F-box ドメインを持ち、青色光照射 6 時間後から発現が上昇する *kif1* が 1%グルコース条件下で発現しなかった。*kif1* をゲノム編集で破壊したところ、knot 形成が抑制されたことから、*btb1* や *kif1* の転写制御が 1%グルコース条件下での子実体発生抑制の鍵となることが予想される。さらに、1%グルコース条件下で knot 形成する変異株を取得してその原因遺伝子の解析を行っており、合わせて報告する。

Mechanism of suppression of fruiting body initiation by glucose in *Coprinopsis cinerea*.

Yuichi Sakamoto¹, Shiho Sato¹, Keishi Osakabe², Hiroshi Yoshida¹

(¹IBRC, ²Tokushima Univ.)

* P-45

黄麹菌 PrtR の転写制御機構における局在解析

沼澤里佳¹, 田中優花子², 白石敦士², 西岡佐和子², 辻遼太郎², 田中瑞己^{1,2}, 山形洋平^{1,2} (¹農工大院・連農, ²農工大院・応生化)

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* の有する転写因子 PrtR は広範な分泌型ペプチダーゼ遺伝子の転写を制御する転写因子であり, 我々は PepO や OcpO, OcpA など主要な酸性ペプチダーゼを正に制御することを報告している¹。今回は, PrtR によるペプチダーゼ遺伝子の転写制御機構を明らかにするため, PrtR の局在を検討した。GFP-PrtR 融合タンパク質を発現する *A. oryzae* を硝酸ナトリウムを単一窒素源とする CD-NO₃ 液体培地で 36 時間培養し, 窒素源の異なる CD 培地に切り替え, 蛍光顕微鏡による観察を行った。

CD-NO₃ に切り替えて 2 時間培養した場合には, PrtR は主に核に存在していることが明らかとなった。prtR の転写を誘導するアミノ酸であるグルタミンを単一窒素源とする CD-Gln 液体培地に切り替えた場合には, PrtR が核に局在している菌糸の割合は低く, 主に細胞質に存在していることが示唆された。一方で, prtR の転写を誘導しないアミノ酸であるトレオニンで単一窒素源とする CD-Thr 液体培地に切り替えた場合には, 主に核に存在していることが示唆された。これらの結果から, PrtR の局在が窒素源に対応していると考えられた。PrtR の窒素源に対する反応時間や核移行/核外搬出について, またその局在とペプチダーゼ遺伝子の転写が連携しているのかについて報告する。

1) 沼澤里佳 他, 糸状菌分子生物学コンファレンス, 第 20 回年次大会要旨集, P.36 (2021)

Localization analysis of PrtR on the transcriptional regulatory mechanism of *Aspergillus oryzae*

Rika Numazawa¹, Yukako Tanaka², Atsushi Shiraishi², Sawako Nishioka², Ryotaro Tsuji², Mizuki Tanaka^{1,2}, 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-46 (O-10)

麹菌 *Aspergillus oryzae* の細胞融合に関わる新規転写因子の探索

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

麹菌 *Aspergillus oryzae* では有性世代が発見されておらず, 交配育種は困難である。有性生殖を誘導するためにはこれに深く関わる細胞融合の制御機構の理解が重要だと考えられる。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* では転写因子 Ste12 が接合に関連する遺伝子の発現を直接誘導する。一方, 糸状菌の細胞融合の制御機構は異なり, 例えば糸状菌 *Neurospora crassa* の Ste12 オルソログは別の転写因子遺伝子 *adv-1* の発現を, ADV-1 は細胞融合に関与する遺伝子の発現を誘導している。しかし我々は, *A. oryzae* の Ste12 オルソログ AoSte12 が細胞融合に必須ではなく, *adv-1* オルソログ *AonosA* の誘導への寄与が小さいことを示した。そのため AoSte12 以外の *AonosA* を制御する転写因子の存在が示唆され, *A. oryzae* に *N. crassa* とは異なる未知の細胞融合制御機構が存在すると予想された。そこで本研究では, *A. oryzae* の細胞融合に関わる転写因子を探索した。

AonosA のオルソログが酵母には存在しないため, *AonosA* を制御する転写因子が糸状菌に特異的に存在すると予想した。そこで, Blastp 解析により *A. oryzae* の全タンパク質のなかから 8 種の糸状菌において高い相同性を示し, 4 種の酵母において相同性が低いタンパク質を選択した。さらに, タンパク質のドメイン解析によって転写因子と推定される 101 個のタンパク質を選抜し, そのうち 95 個のタンパク質をコードする遺伝子の破壊株を取得した。これら推定転写因子遺伝子の破壊株について野生型株をテスターとし細胞融合効率を測定した結果, 5 株の破壊株の細胞融合効率が野生型株どうしと比較して 20%未満にまで低下していた。さらに, そのうち 2 株の破壊株では *AonosA* の転写産物量が減少し, *AonosA* の発現制御への関与が示唆された。今後, 残りの 3 つの推定転写因子についても *AonosA* の発現誘導への関与について検討する予定である。

Screening of novel transcription factors for cell fusion in *Aspergillus oryzae*

Jumpei Kawasaki¹, Takuya Katayama^{1,2}, Jun-ichi Maruyama^{1,2}

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

*P-47

アカパンカビ *upr-1* 遺伝子の転写制御因子の探索

木下颯也, 椎崎一宏, 藤村真, 一石昭彦 (東洋大・生命科)

アカパンカビにおいて, 損傷乗り越え DNA 合成 (TLS) の中心因子である UPR-1 タンパク質は TLS ポリメラーゼの触媒サブユニットとして機能することが知られている。TLS とは損傷を受けた DNA 鎖を鋳型に DNA 合成を行う際, 損傷部位における DNA 合成の停止を回避する仕組みの一つである。TLS は真核生物において広く保存されており, カビだけでなく高等な生物であるマウスやヒトでも *upr-1* のホモログ遺伝子が確認されている。アカパンカビにおいて, *upr-1* 遺伝子は紫外線照射により発現が誘導されることが分かっており, *upr-1* 欠損株は紫外線に対し高度感受性を示す。また, ヒトの *upr-1* ホモログ遺伝子の発現は, 細胞周期による制御を受けていることが知られており, 特に S 期の DNA 合成の際にポリメラーゼと共役して働く因子 PCNA が関与していることが考えられている。しかし, 転写制御因子や詳細な発現機構には不明な点が多い。そのため, 本研究では, *upr-1* の転写制御因子および発現機構を解明することを試みている。

転写因子欠損株ライブラリーより, *upr-1* の発現量が低下している株を探索した。まず, ライブラリーの株について紫外線に対する感受性を指標にスクリーニングを行い, 紫外線感受性を示す 4 株を単離した。この 4 株における *upr-1* 遺伝子の発現量を調べたところ, 3 株 (FGSC #11344, #11444, #11098) において, *upr-1* 遺伝子の誘導時の発現量が, 野生株に比べ 1/5 程度に低下していることが明らかになった。*upr-1* 遺伝子の発現制御には, DNA 合成時にポリメラーゼの足場となる PCNA の分子構造の変化が関係することが報告されている。現在は, 細胞周期を揃えた株に対し *upr-1* 遺伝子及び, PCNA 遺伝子の発現状況の検証を行っている。

Search for transcription factors of *upr-1* gene in *Neurospora crassa*

Souya Kinohsita, Kazuhiro Shiizaki, Makoto Fuzimura, Akihiko Ichiishi

(Fac. of Life Science, Toyo Univ.)

P-48

麹菌 *Aspergillus oryzae* 種内におけるハイドロフォビン RolA の変異は, RolA の自己組織化能の種内多様性を示唆する

田中拓未¹, 阿部敬悦², 楠本憲一¹ (¹大阪大院・工, ²東北大院・農)

麹菌 *Aspergillus oryzae* は, 低分子量分泌型両親媒性タンパク質であるハイドロフォビン RolA を生産する。ハイドロフォビンは細胞壁表面に局在して自己組織化し, 糸状菌の形態形成に関与する。また, RolA は固体高分子に吸着後ポリエステラーゼ (クチナーゼ) CutL1 と相互作用し, CutL1 による固体高分子分解を促進する。この分子間相互作用を利用した固体高分子分解機構は糸状菌に普遍的に存在すると考えられる。*A. oryzae* は我が国の発酵食品に幅広く利用されており, 多種多様な表現型を示す株が用途に応じて使い分けられている。近年のゲノムワイド解析にて, *A. oryzae* は多数の系統に分類され染色体構造も多様であることが見出された。染色体構造と同様に RolA にも種内変異の存在が予想されるが, 変異の位置や数, および種内変異が RolA の物理化学的性質や生物学的機能に影響する可能性については, これまでに研究されてこなかった。

本研究では, NCBI にて公開されている *A. oryzae* 菌株 99 株の全ゲノム配列から, *rolA* 遺伝子及び RolA タンパク質の配列を比較した。塩基配列には 557 bp 中に 22 箇所の SNP が, アミノ酸配列には 151aa 中に 11 箇所の, 比較的多数の置換が見出された。アミノ酸置換は Cys4-Cys5 間及び Cys7-Cys8 間の領域に多く, これらの領域は *Aspergillus fumigatus* の持つ RolA オルソログ AfRodA において自己組織化に重要と考えられている。一方で, RolA が CutL1 と相互作用する際に重要である N 末端側領域の正電荷残基には, 全く置換が見られなかった。以上から, RolA の生物学的機能において, CutL1 との相互作用機構は *A. oryzae* 株間でよく保存されている一方, RolA の自己組織化能には多様性が生じている可能性が示唆された。

The possibility of intra-species diversity of self-assemble ability of hydrophobin RolA.

Takumi Tanaka¹, Keietsu Abe², Ken-ichi Kusumoto¹

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

P-49

黄麹菌の孢子色素の成熟には2つのラッカーゼ遺伝子が主に関与している

玉野孝一^{1,2}, 高山晴香¹, 八十川さえ子¹, 佐野元昭³, Scott E. Baker⁴ (1産総研・生物プロセス研究部門, 2産総研・CBBBD-OIL, 3金沢工業大学, 4パシフィックノースウエスト国立研究所)

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* は、その名称の”黄”とは異なり、菌株毎に「黄色、緑褐色、緑色、褐色」といった各色の孢子を形成する。この形成は、最初に AO090102000545 (*wA*) にコードされたポリケチド合成酵素が働いて YWA1 という黄色色素が作られ、その後 AO090011000755 (*yA*) にコードされたラッカーゼによりそれが別色素に変換されて成熟するという先行研究の内容で、これまで理解されてきた。但し、麹菌ゲノムには *yA* 以外にも、YWA1 に作用する可能性のある別のラッカーゼ遺伝子 AO090102000546 や加水分解酵素遺伝子 AO090005000332 が存在している。それらも孢子色素の成熟に関与しているか否かが不明であった。

そこで本研究では、これらのラッカーゼまたは加水分解酵素の二種類の遺伝子について、*yA* も含めた形で単独・二重・三重の欠失株を構築し、それぞれの孢子の色の観察から、孢子色素成熟への関与を調査した。結果として、AO090011000755 (*yA*) の欠失株は褐色、AO090102000546 の欠失株は緑色、AO090005000332 の欠失株は野生株と同じ緑褐色の孢子を、それぞれ形成した。AO090011000755 と AO090102000546 の二重欠失株、およびそれに AO090005000332 の欠失も加わった三重欠失株は、黄色の孢子を形成した。以上より、黄麹菌の孢子色素の成熟には、AO090011000755 (*yA*) だけでなく AO090102000546 のラッカーゼ遺伝子も、主に関与していることが明らかとなった。一方、AO090005000332 の加水分解酵素は、孢子色素の成熟に関与していないことが示唆された。

Major involvement of two laccase genes in conidial pigment biosynthesis in *Aspergillus oryzae*

Koichi Tamano^{1,2}, Haruka Takayama¹, Saeko Yasokawa¹, Motoaki Sano³, Scott E. Baker⁴

(¹BPRI, AIST, ²CBBBD-OIL, AIST, ³KIT, ⁴PNNL)

* P-50 (O-15)

麹菌における核の増加と菌糸形態および酵素生産性の関連

一ノ瀬恵¹, 細田柊志¹, 井谷綾花¹, 高谷直樹¹, 織田健², 山下秀行³, 酒井香奈江⁴, 田中拓未⁴, 楠本憲一⁴, 竹下典男¹ (1筑波大・MiCS, 2酒類研, 3樋口松之助商店, 4阪大院・工)

麹菌は糖質・タンパク質などの分解酵素の分泌能が高いため、古くから発酵醸造に利用されている。これまでに関連する酵素の高生産のため、遺伝子発現・翻訳制御機構が研究されている。私たちは培養時間の経過に伴って *Aspergillus oryzae* (RIB40) の核の数が増加する現象を発見した (1本の菌糸あたり 20 から 200 以上の核に増加)。核数の増加により転写・翻訳量が増加し、酵素生産性が向上することが予想され、実際に酵素活性との相関が見られた。この表現型は、*Aspergillus nidulans* や近縁種である *Aspergillus flavus* では見られない。醤油の醸造に利用される *Aspergillus sojae* で核の増加が見られ、焼酎の醸造に利用される *Aspergillus luchuensis* では見られない。*A. oryzae* でも清酒用の RIB128 株では核の増加が見られ、醤油用の RIB915 株では見られない。これらの結果は、核の増加が育種の中で選抜された獲得形質であること、異なる種でも育種の選抜の過程で収斂進化が起きること、同じ種でも異なる目的での育種と選抜により異なる進化が起きることを示唆する。核増加に関わる分子機構を解明するため、ゲノム比較により育種進化と表現型の関連を解析する。また、核増加を誘導する条件を見出し、遺伝子発現変化を解析する。転写因子破壊株ライブラリーを用いた核形質のスクリーニングにより、窒素源応答が関与することが示唆された。ライブイメージングにより核の増加した菌糸が分岐により出現し、それらの伸長速度が速いため、コロニーの周辺で優占することが示された。今後、菌糸形態を定量的に評価することで、酵素生産性と菌糸形態の関連を解析する。

Correlation between nuclear increase, enzyme production and morphogenesis in *Aspergillus oryzae*

Aya Ichinose¹, Syuuji Hosoda¹, Ayaka Itani¹, Naoki Takaya¹, Ken Oda², Hideyuki Yamashita³, Kanae Sakai⁴, Takumi Tanaka⁴, Kenichi Kusumoto⁴, Norio Takeshita¹

(¹Univ. of Tsukuba, MiCS, ²NRIB, ³Higuchi Moyashi, ⁴Univ. of Osaka)

*P-51 (O-13)

アミノ酸生合成を介した *Aspergillus nidulans* の一酸化窒素ストレス耐性機構

天久まどか, 門岡千尋, 塚越まどか, 榎尾俊介, 高谷直樹 (筑波大・生命環境・MiCS)

一酸化窒素(NO)は様々な細胞成分と反応し、強い細胞毒性を示す。微生物、特に真菌はNOに対する耐性機構を発達させてきたが、その詳細は明らかにされていない。我々はこれまでに、*Aspergillus nidulans* のPro生合成系の遺伝子と予想される *proC* が本菌のNO耐性に関与することを見出した。Pro及びArg要求性を示す *proA5*, *argB2* 変異株は野生株と比べて生育のNO耐性が低下し、生育のために要求するProとArgの量が増加した。細胞内の遊離アミノ酸量はNO暴露時で顕著に減少したことから、NOが*A. nidulans*の細胞内アミノ酸の飢餓を引き起こすことが示された。そこで、アミノ酸飢餓応答を担うCross Pathway Control (CPC)系に着目した。CPC系の転写制御因子であるCpcAの遺伝子の遺伝子破壊株は、野生株と比べて生育のNO耐性が低下した。また、野生株で見られたNO暴露時のProやArgを含むアミノ酸生合成遺伝子の転写活性化が見られなくなったことから、CpcAがNO暴露時にアミノ酸生合成遺伝子の転写を活性化することが示された。NOを暴露した $\Delta cpcA$ 株では、野生株よりも13種の細胞内アミノ酸量が減少したことから、CpcAはNO暴露時の細胞内アミノ酸量を維持することが示された。この時、アミノ酸の前駆体となる複数の有機酸の細胞内レベルも低下したことから、NOはこれらの前駆体の生合成を阻害することによってアミノ酸レベルを制御すると考えられた。以上より、CpcAがNOによるアミノ酸の飢餓に応答し、アミノ酸の生合成を転写レベルで亢進することによって、細胞内のアミノ酸の恒常性を維持するという新規なNO耐性機構が示された。

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

Madoka Amahisa, Chihiro Kadooka, Madoka Tsukagoshi, Shunsuke Masuo, Naoki Takaya

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

*P-52

もみ殻培養で産生される糸状菌二次代謝化合物の生物間相互作用における役割

須藤快¹, 鎌倉高志², 浦山俊一^{3,4}, 萩原大祐^{3,4} (1筑波大院・生命地球科学, 2東理大・理工学部応用生物科学科, 3筑波大・生命環境系, 4筑波大・MiCS)

糸状菌からはペニシリンやスタチンなど、多くの有用な化合物がみつかり、それらは創薬資源として重要である。しかし、なぜ糸状菌がこの様に多様な生物活性を持つ化合物を産生するのか、詳細には理解されていない。例として、環境中で糸状菌が抗生物質を生産する場合、その抗生物質の果たす役割を土着の微生物との相互作用の視点に立って解析した例は皆無である。そこで本研究では、糸状菌が産生する二次代謝化合物の自然環境における機能を評価するために、イネもみ殻を用いたマイクロコズム培養を行う。この培養法では、もみ殻由来の微生物叢と解析対象となる菌との間で起こる相互作用を、より自然環境に近い条件で化学的、生物学的な視点から解析が可能になる。初めに、モデル糸状菌である *Aspergillus fumigatus* 及び *Aspergillus nidulans* を非滅菌で非加工のもみ殻に植菌し2週間培養した。16Sアンプリコンシーケンス解析によりもみ殻中の細菌叢を比較すると、上記の糸状菌の培養が *Bacillus* 属菌をはじめとする多くの土着菌の生育に影響を与えることが分かった。もみ殻培地中には、植菌した糸状菌由来と考えられる二次代謝化合物がHPLCにより多数検出された。標準品との比較から、そのうちの 하나가 *A. fumigatus* の生産する gliotoxin であると明らかになった。Gliotoxinは *Bacillus* 属に対して in vitro で抗菌活性を示したことから、もみ殻培地の微生物コミュニティの構成に影響を及ぼす可能性が示唆された。Gliotoxinの関与をより詳細に解析することにより、二次代謝化合物の生物間相互作用における役割について、理解を深めることが可能になる。

Role of Filamentous Fungus Secondary Metabolic Compounds Produced in Rice Husk Culture in Interactions between Organisms

Kai Sudo¹, Takashi Kamakura², Shunichi Urayama^{3,4}, Daisuke Hagiwara^{3,4}

(¹Life Env. Sci, Univ. of Tsukuba, ²Dept. Biol. Sci. Technol., Tokyo Univ. Sci., ³Fac. of Life & Env., Univ. of Tsukuba, ⁴MiCS, Univ. of Tsukuba)

* P-53 (O-14)

白色腐朽担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* のリグニンフラグメント分解機構

加藤大志, 早坂実夏, 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完全に分解ができる。リグニンは、白色腐朽菌の菌体外酵素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。リグニンフラグメントは菌体内で水酸化や脱メチル化、脱炭酸反応後、最終的に芳香環の開裂が引き起こされる。しかしながら、これらの反応に関与する白色腐朽菌の酵素については十分には解明されていない。本研究では、白色腐朽菌 *P. chrysosporium* によるリグニンフラグメント分解機構の解明を目指す。

【方法・結果】芳香族化合物の水酸化や脱炭酸反応に関与する酵素として flavoprotein monooxygenase (FPMO) が知られており、*P. chrysosporium* のゲノムには 59 の FPMO 遺伝子がコードされている。59 の中から複数のリコンビナントタンパク質 (PcFPMO3~8) を調製し、リグニンフラグメントと反応させた。その結果、PcFPMO8 は 4-ヒドロキシ安息香酸 (4-HBA), バニリン酸 (VA), シリンガ酸 (SA) をそれぞれ ヒドロキノン (HQ), メトキシヒドロキノン (MHQ), ジメトキシヒドロキノン (DMHQ) に変換した。これまでに 4-HBA, VA, SA 全てを脱炭酸できる FPMO は報告されておらず、PcFPMO8 が初めての報告例となる。

当研究室では既に、MHQ が PcFPMO2 によってメトキシトリヒドロキシベンゼン (MTHB) に変換されることを明らかにしている (1)。そこで、MTHB の環開裂を触媒する酵素に着目した。芳香環開裂を触媒する酵素として intradiol dioxygenase (IDD) の報告例はあるが、白色腐朽菌では不明であった。*P. chrysosporium* ゲノムにコードされている 5 種の IDD を解析した結果、PcIDD1, 2 が MTHB の芳香環を開裂することを明らかにした。従来白色腐朽菌では、MTHB はトリヒドロキシベンゼン (THB) を経由して環開裂されると考えられてきたが、MTHB を直接環開裂する新たなリグニンフラグメント代謝経路の存在を提唱する (2)。

(1) Suzuki H, et al. (2022) JBB, in press (2) Kato H, et al. (2022) AMB 106, 4499

Lignin fragment degradation by white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*

Hiroyuki Kato, Mika Hayasaka, Hiromitsu Suzuki, Masashi Kato, Motoyuki Shimizu

(¹Fac of Agric, Univ. of Meiji)

* P-54

糸状菌由来新規エルゴステロールアミノ酸誘導体の生理機能解析

横川大祐¹, 立松俊祐¹, 佐賀裕亮¹, Frédéric Fischer², Hubert D. Becker², 久城哲夫¹ (¹明治大・院農・農芸化学, ²ストラスブール大)

アミノアシル tRNA 合成酵素 (aaRS) は、アミノ酸を対応する tRNA に結合させるアミノアシル化反応を触媒するタンパク質合成に必須の酵素である。近年、哺乳類を中心にタンパク質合成とは関係のない二次機能の存在が明らかとなってきた。そこで我々は、aaRS の二次機能の報告がほとんどない糸状菌を対象に、糸状菌特異的なドメインを有する aaRS 遺伝子の探索を行ったところ、*Aspergillus* 属糸状菌のアスパルチル tRNA 合成酵素の C 末端側に機能未知のドメイン (DUF2156) の付随した遺伝子 *erdS* を発見した。本酵素 (ErdS) は、エルゴステロールにアスパラギン酸を転移させ 1-ergosteryl-L-aspartate (Erg-Asp) を生成することを明らかにした (Yakovov, et al., PNAS, 2020)。さらに、Erg-Asp の特異的な加水分解酵素 ErdH も発見した。また、DUF2156 ドメインのみで構成される遺伝子 *ergS* も見出し、ErgS はエルゴステロールにグリシンを転移させ 1-ergosteryl-glycine (Erg-Gly) を生成することを明らかにした (Yakovov, et al., J. Biol. Chem., 2022)。これらの酵素は *Aspergillus* 属糸状菌だけでなく、真菌に幅広く保存されていた。このようなステロールのアミノ酸誘導体は全生物を通して初めての発見である。その生理機能を探るべく、麹菌 *A. oryzae* を用いて *erdS* 破壊株および *ergS* 破壊株を作製し、表現型観察を行った。その結果、*erdS* 破壊株および *ergS* 破壊株では野生株と比較して分生子の形成量がそれぞれ 20%, 50%まで減少し、糸状菌の防御組織である菌核の形成が促進された。また、メラニンと思われる色素の培地への蓄積も見られた。現在、これら遺伝子の過剰発現株の表現型観察を行うとともに、分生子および菌核形成に関連する遺伝子の発現量解析を行っている。

Physiological analysis of novel aminoacylated sterols in filamentous fungi

Daisuke Yokokawa¹, Shunsuke Tatematsu¹, Yusuke Saga¹, Frédéric Fischer², Hubert D. Becker², Tetsuo Kushiro¹

(¹Dept. of Agri. Chem., Sch. of Agri. Univ. of Meiji, ²Univ. of Strasbourg)

* P-55 (O-12)

植物病原性糸状菌 *Fusarium oxysporum* の侵襲性と病原性の関連

酒造ひなた¹, 井谷綾花¹, 山本里穂¹, 高谷直樹¹, 佐藤良勝², Antonio Di Pietro³, 竹下典男¹ (筑波大・MiCS, ²名古屋大・ITbM, ³コルドバ大学・遺伝学科)

糸状菌は菌糸と呼ばれる管状の細胞からなり、無機有機物基質や動植物の宿主に吸着し菌糸を侵入させて生長する。土壌を通じて植物根に感染(共生)する病原性(内生)糸状菌 *Fusarium oxysporum* は、根表面から菌糸を侵入させ、植物細胞間を伸長する。菌糸が維管束組織に到達すると、植物の細胞死や通水障害を誘導し病原性を示す。植物病原性糸状菌が病原性を示すには、ほとんど隙間のない植物細胞間隙を通り宿主体内を侵襲するため、侵襲性と病原性の関連が予想される。菌糸が自身よりも狭い空間に入るには、菌糸の形態を変化させる必要がある。これまでに、菌糸直径より細い $1\mu\text{m}$ の流路を持つマイクロ流体デバイスに7種の糸状菌を培養し、菌糸が細い流路を通過できるか(侵襲性)をライブイメージングで解析した。伸長の遅い菌糸は流路を通過できるのに対して伸長の早い菌糸は流路を通過できず、伸長速度と侵襲性のトレードオフが示されている。本研究では、菌糸の侵襲性と病原性の関連を解明するため、*F. oxysporum* の病原性が低下する遺伝子欠損株18株(3つのMAPK, 浸透圧センサー, 細胞壁関連酵素, カゼインキナーゼなど)をそれぞれ同様のデバイス内で生育させ、細い流路を通過する菌糸の様子から侵襲性を評価した。いくつかの破壊株で流路の通過率が低下し、菌糸の侵襲性に関わる機構が示唆された。今後、根への侵襲や病原性との相関を解析する。本研究は、植物細胞間の伸長に関わる物理的な機構の解明と、類似した感染機構を持つ菌の病原性の理解や防除への貢献が期待される。

Correlation between invasiveness and pathogenicity of plant pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*

Hinata Miki¹, Ayaka Itani¹, Riho Yamamoto¹, Naoki Takaya¹, Sato Yoshikatsu², Antonio Di Pietro³, Norio Takeshita¹

(¹Univ. of Tsukuba, MiCS, ²Univ. of Nagoya, ITbM, ³Univ. of Córdoba)

P-56 (O-11)

トウモロコシ黒穂病菌における tRNA 由来 RNA 断片の生成と分泌

芳本玲, 石田史子, 山口美幸, 田中茂幸 (摂南大・農)

トウモロコシ黒穂病菌は、トウモロコシに活物寄生する担子菌である。本菌は、他生物においてよく保存されている低分子 RNA の生成に関与する Dicer および Argonaute タンパク質を含む RNAi 機構を持たない。しかし、本菌が実際に低分子 RNA を生成するかどうかは不明であった。我々は、トウモロコシ黒穂病菌は、増殖中に約 20~30 塩基の低分子 RNA を生成することを明らかにした。RNA-seq 解析により、これら低分子 RNA は、tRNA と 5.8S リボソーム RNA に由来することがわかった。興味深いことに、低分子 RNA の大部分は、アスパラギン、グルタミン、グリシンをコードする tRNA から生成されていた。また、tRNA の切断は、主にアンチコドンステムループに近い位置で起きていた。tRNA を切断する候補酵素として RNase T2 に着目し、これをコードする2つの遺伝子 *nucl* および *nuc2* の二重破壊株を作出した。この破壊株では、tRNA 由来の低分子 RNA 蓄積が顕著に低下していた。分泌タンパク質である *Nuc1* と tRNA の細胞内局在を観察したところ、両者とも出芽細胞の先端に共局在し、tRNA 断片が細胞外に分泌される可能性が示唆された。そこで、培養上清から RNA を回収し、ノーザンブロットを行ったところ、完全長 tRNA は検出されなかったが、tRNA 由来低分子 RNA は検出された。以上より、トウモロコシ黒穂病菌は増殖中に特定の tRNA を分泌経路の過程で切断し細胞外に分泌することが示された。このことは、tRNA 由来低分子 RNA が細胞外機能を持っている可能性があることを示唆している。

The production and secretion of tRNA-derived RNA fragments in the corn smut fungus *Ustilago maydis*.

Rei Yoshimoto, Fumiko Ishida, Miyuki Yamaguchi, Shigeyuki Tanaka

(Faculty of Agriculture, Setsunan Univ.)

*P-57

コムギ赤カビ病菌における新規ステロールアミノ酸誘導体の生理機能解析

金子雅弘¹, 横川大祐¹, 佐賀裕亮¹, Frédéric Fischer², Hubert D. Becker², 久城哲夫¹ (¹明治大・院農・農芸化学, ²ストラスブール大)

アミノアシル tRNA 合成酵素 (aaRS) は, アミノ酸を対応する tRNA に結合させるアミノアシル化反応を触媒する酵素である。我々は, 糸状菌においてアスパルチル tRNA 合成酵素 (AspRS) の C 末端に機能未知ドメイン (DUF2156) が付加した遺伝子 (*erdS*) を発見した⁽¹⁾。機能解析の結果, ErdS は糸状菌新規脂質成分であるエルゴステリルアスパラギン酸 (Erg-Asp) を生合成していることが判明した。さらに, Erg-Asp を特異的に加水分解する酵素 (ErdH) も発見し, これらの酵素は真菌に幅広く保存されていることが明らかになった。これまでに, Erg-Asp は動物病原菌 *Aspergillus fumigatus* の感染実験において病原性に関与していることが示唆されたが, そのメカニズムや詳細な機能は明らかになっていない。コムギ赤カビ病菌 *Fusarium graminearum* にも *erdS* 遺伝子が存在するため, Erg-Asp が本菌において植物病原性に関与していることが考えられた。そこで本研究では, *F. graminearum* における Erg-Asp の生理機能の解明を目的とし, *erdS* 欠損体の作製と形態解析, および病原性評価を行った。その結果, *erdS* 欠損体において分生子数が有意に減少し, コムギ子葉鞘に対する感染能が約 6 割にまで減少した。このことから, Erg-Asp が本菌の植物病原性において重要な役割を果たしていることが示唆された。

(1) Nathaniel Yakobov, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2020**, *117*, 14948–14957.

Physiological analysis of a novel aminoacylated sterol derivative in *Fusarium graminearum*

Masahiro Kaneko¹, Daisuke Yokokawa¹, Yusuke Saga¹, Frédéric Fischer², Hubert D. Becker², Tetsuo Kushiro¹

(¹Dept. of Agri. Chem., Sch. of Agri., Meiji Univ., ²Strasbourg Univ.)

P-58

ウリ類炭疽病菌の細胞内ステロール輸送機構は膜湾曲と付着器侵入に必要である

小玉紗代¹, 梶河直起², 深田史美^{2,3}, 久保康之¹ (¹摂南大・農, ²京府大院・生環, ³岡山大・資源植物研)

これまでに, ウリ類炭疽病菌の細胞周期制御に関与する GTPase CoTem1 の相互作用因子として CoNpc2 を同定し, CoNpc2 が本菌の細胞内ステロール輸送, 付着器侵入および病原性に関与することを報告した。今回, 哺乳類で NPC2 と共にステロール輸送に関与する NPC1 のホモログ CoNpc1 が CoNpc2 と液胞に共局在し, $\Delta conpc1$ は付着器侵入欠損となることがわかった。さらに, $\Delta conpc1$ および $\Delta conpc2$ は液胞への異常なステロール蓄積により液胞が肥大化し, 細胞膜完全性に欠損を示すが, 付着器の膨圧は野生株と同様であり付着器侵入の欠損は膨圧低下によるものではないことが示唆された。次に, TEM 観察により $\Delta conpc2$ の付着器底部の漏斗型 cone 構造および貫穿糸に欠損が示された。本菌の cone 構造を伴う貫穿糸の形成には細胞膜の貫入および突出の複雑な制御が行われていると推測され, 破壊株の表現型から CoNpc1, CoNpc2 が付着器侵入時の細胞膜の貫入や突出に寄与する可能性が考えられた。そこで, 膜湾曲形成とそれに続くアクチン重合に必要な Bin/Amphiphysin/Rvs (BAR) ドメインを持つ CoRvs161, CoRvs167 およびアクチン重合を制御する Arp2/3 複合体 CoLas17 の局在を観察した。その結果, 野生株では付着器貫入孔に顕著に集積した一方で, $\Delta conpc1$ $\Delta conpc2$ 二重破壊株では CoRvs161, CoRvs167, CoLas17 の集積は見られなかった。以上の結果から, CoNpc1, CoNpc2 を介したステロールの輸送と適切な分配が付着器貫穿糸形成に繋がる細胞膜の完全性と湾曲に必要であることが明らかになった。

Intracellular sterol transport system is required for membrane curvature and appressorium-mediated plant penetration of *Colletotrichum orbiculare*

Sayo Kodama¹, Naoki Kajikawa², Fumi Fukada^{2,3}, Yasuyuki Kubo¹

(¹Fac. of Agriculture, Setsunan Univ., ² Grad. Sch. of Life & Env. Sci., Kyoto Pref. Univ., ³ IPSR, Okayama Univ.)

* P-59

平板培養時に高頻度で生じるイネいもち病菌の雌性稔性の喪失

喜多光徹¹, 内田百岳¹, 寺岡徹², 有江力², 荒添貴之¹, 鎌倉高志¹ (¹東理大・理工, ²農工大・農)

イネに重要病害を引き起こすイネいもち病菌は、本病原菌の発生源とされる一部の地域を除き、多くの圃場分離株が有性器官を形成できない雌性不稔性を示す。これまでに本菌の有性胞子が自然界で確認されていないことから、いもち病菌の雌性は病原菌としての進化の過程で失われていく可能性も考えられる。我々は中国雲南省から分離した稔性株を長期単独培養(4週間)することにより、視覚的に判別可能な様々な菌叢形態へと変化することを見出した。そこで、変化がみられた菌叢の特徴に基づいて単離し、各菌株の交配能を調査したところ、雌性稔性・不稔性の形質と菌糸形態に相関がみられた。交配能を保持している菌株においては、親株と同様に培養過程で様々な菌糸形態へと変化し続けるのに対し、雌性不稔性を示した菌株は親株の菌糸形態へと戻ることはなく、継代培養レベルでは不可逆的であった。またこれらの菌株では生育速度や胞子形成数に差異がみられたが、当研究室で同定した雌性不稔化遺伝子の変異は確認されなかった。雌性不稔性株と稔性株との交配実験では、稔性型または雌性不稔性型の菌叢形態を示す後代株の分離比がおおよそ1:1から2:1の間となる傾向がみられたことから、培養過程で生じるイネいもち病菌の雌性不稔化は遺伝子変異やエピジェネティックな制御により引き起こされている可能性が示された。

Rapid and frequent loss of female fertility under culture condition in the rice blast fungus *Pyricularia oryzae*

Kohtetsu Kita¹, Momotaka Uchida¹, Tohru Teraoka², Tsutomu Arie², Takayuki Arazoe¹, Takashi Kamakura¹

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

P-60

Bipolaris maydis の菌糸表面疎水性におけるハイドロフォビンの関与についての調査

辻健也¹, 佐波雅史¹, 寺内裕貴², 吉見啓¹, 田中千尋^{1,2}, 本田与一¹, 河内護之¹ (¹京大院・農, ²京大院・学堂)

糸状菌における菌糸表面の疎水性には、両親媒性の分泌タンパク質ハイドロフォビンが強く関与することが知られている。ハイドロフォビンはその疎水度の違いから主に Class I および Class II に分類されており、トウモロコシごま葉枯病菌 *Bipolaris maydis* はゲノム中に Class I である *HYP1* および Class II である *HYP2*, *HYP3*, *HYP4* の合計 4 つの推定ハイドロフォビン遺伝子を保持している。一方、いずれの遺伝子の単独破壊株も野生株と同等の菌糸撥水性を示したことから、本菌の菌糸表面特性にハイドロフォビンが寄与するか否かについては結論を得るに至っていない。そこで本研究では、本菌におけるハイドロフォビンの機能と菌糸疎水性への寄与度を明らかにするため、ハイドロフォビン遺伝子の多重欠損株を作出し、その表現型解析を試みた。まず、 $\Delta hyp3$ 株を親株として *HYP2* 遺伝子を破壊し、続いて *HYP4* 遺伝子を破壊した。得られた Class II ハイドロフォビン全欠損株(三重破壊株)の菌糸体に SDS 溶液を滴下して菌糸疎水性を評価するとともに、菌糸生育および病原性を評価した。その結果、いずれの形質についても野生株と三重破壊株との間に顕著な差異は認められなかった。現在、ハイドロフォビン全欠損株の形質を明らかにするため、三重破壊株を親株として *HYP1* 遺伝子の破壊を試みている。また、先行研究によって本菌の菌糸疎水性には *NRPS4*(non-ribosomal peptide synthetase 4) 遺伝子が強く関与することが明らかになっていることから(第20回糸状菌コンファレンス)、*NRPS4* 遺伝子破壊株における疎水性低下とハイドロフォビンとの関係についても考察したい。

Investigation of the involvement of hydrophobins in hyphal surface hydrophobicity of *Bipolaris maydis*

Kenya Tsuji¹, Masafumi Saba¹, Yuki Terauchi², Akira Yoshimi¹, Chihiro Tanaka^{1,2}, Yoichi Honda¹, Moriyuki Kawauchi¹

(¹Grad. Sch. Agric. Kyoto Univ., ²Grad. Sch. Glob. Env. Stud., Kyoto Univ.)

* P-61

北海道のテンサイ褐斑病菌に感染する新規マイコウイルス探索および薬剤感受性への影響の調査

津金朋代¹, 栢森美幸², 福原敏行³, 森山裕充¹ (¹農工大・農, ²北海道立総合研究機構)

北海道のテンサイ栽培においてテンサイ褐斑病菌 *Cercospora beticola* の耐性菌の発生が問題となっている。本研究ではテンサイ褐斑病菌に感染するマイコウイルスの探索を試み、薬剤感受性との関連について調査した。セルロースを担体としたアフィニティー精製法によるマイコウイルス2本鎖 RNA ゲノム探索の結果、DMI 剤耐性を有する北海道の *Cercospora beticola* の中に 12 kbp の α - エンドルナウイルス様の 2 本鎖 RNA ウイルスが、調査した 77 菌株中 4 菌株で検出された。また、通常は 25°C で行う培養を 30°C で培養する、もしくは Ribavirin 添加培地での培養によってウイルスフリー化株が容易に得られることを見出した。さらに、ウイルス感染株は非感染株やフリー化株と比較して DMI 剤に対し高感受性になる傾向が得られた。DMI 剤耐性株の CYP51 遺伝子は 11 塩基、4 アミノ酸の Haplotype が存在し、N 末端から 144 位、387 位、464 位の 3 カ所であミノ酸多型が報告されている。(144 位は F または L, 387 位は I または M, 464 位は Y または S) (Kayamori et al., 2019)。感染株と非感染株のゲノム DNA を PCR 増幅後に塩基配列を調査し Haplotype を比較したところ、両者の Haplotype は F144, I 387, Y464 で同一であった。DMI 耐性は CYP51 遺伝子の過剰発現では生じないという以前の結果を考慮すると(Kayamori et al., 2019), α -エンドルナウイルス感染は CYP51 遺伝子が関与する以外のメカニズムで宿主菌の DMI 剤感受性を変動することが示唆された。

Novel endornaviruses infecting in *Cercospora beticola*, a pathogen of sugar beet with fungicide resistant traits.

Tomoyo Tsugane¹, Miyuki Kayamori², Toshiyuki Fukuhara¹, Hiromitsu Moriyama¹

(¹Fac. Agric., Tokyo Univ. of Agric and Technol., ²Hokkaido Reserch Organization)

発表者索引

- A*
- Amy Gladfelter39
- Antonio Di Pietro...28,
58
- C*
- Chan Lu.....25, 45
- F*
- Frédéric Fischer 57, 59
- H*
- Hubert D. Becker...57,
59
- J*
- Jun-ichi Maruyama 25,
45
- K*
- Kanae Sakai31
- Kazuhiro Iwashita..25,
45
- Ken-Ichi Kusumoto.31
- L*
- Liyun Liu31
- R*
- Ryota Saito.....25, 45
- S*
- Scott E. Baker55
- Shivani39
- T*
- Takumi Tanaka.....31
- Takuya Katayama ..25,
45
- Y*
- Yahong Zou.....25, 45
- あ*
- 赤井大介..... 43
- 浅村太郎..... 47
- 阿部敬悦... 34, 37, 43,
54
- 阿部多恵..... 37
- 阿部晴紀..... 27, 50
- 阿部雅広..... 43
- 天久まどか..... 29, 56
- 荒添貴之..... 42, 60
- 有江力..... 60
- 有岡学..... 31
- 栗根志織..... 42
- い*
- 石田弘樹..... 47
- 石田史子..... 28, 58
- 井谷綾花... 28, 30, 40,
55, 58
- 一石昭彦... 38, 52, 54
- 一ノ瀬恵..... 30, 55
- 井上太雅..... 26, 49
- 岩波明季..... 50
- 岩間亮.. 24, 41, 44, 51
- う*
- 上地敬子..... 37
- 内田百岳..... 60
- 梅山隆..... 43
- 浦山俊一... 40, 42, 50,
56
- お*
- 及川英秋..... 24, 35
- 大島侃..... 36
- 大西みはる..... 50
- 岡拓二..... 47
- 岡本綾子..... 47
- 小川真弘..... 51
- 荻野千秋..... 44
- 奥津果優... 26, 37, 49
- 刑部敬史..... 52
- 織田健..... 30, 55
- 小野大暉..... 44
- か*
- 甲斐建次..... 13
- 開田有紗..... 36
- 柿崎哲哉..... 39
- 梶河直起..... 59
- 片瀬徹..... 47
- 片山琢也... 23, 24, 27,
32, 33, 35, 53
- 加藤志穂..... 52
- 加藤大志..... 29, 57
- 加藤雅士... 29, 46, 57
- 門岡千尋... 26, 29, 37,
47, 49, 56
- 金子雅弘..... 59
- 鎌倉高志... 42, 56, 60
- 亀山綾音..... 46
- 栢森美幸..... 61
- 河内護之..... 39, 60
- 川崎淳平..... 27, 53
- き*
- 菊間隆志..... 45
- 喜多光徹..... 60
- 木下颯也..... 54
- く*
- 草山泰和..... 34
- 具志堅結香..... 23, 35
- 久城哲夫..... 57, 59
- 楠本憲一... 30, 47, 48,
54, 55
- 楠屋陽子..... 51
- 久保康之..... 59
- 熊倉直祐..... 15
- 樽林一皓..... 39
- 黒木美沙..... 40
- 黒田裕樹..... 32
- こ*
- 黄梅昌朗 31
- 小島才卓 48
- 小玉紗代 59
- 小峠優佳 39
- 後藤正利 26, 49
- 五味勝也 ... 23, 32, 33,
34, 36
- 近藤昭彦 44
- さ*
- 齋藤直也 ... 24, 32, 35
- 酒井香奈江 30, 48, 55
- 坂本正弘 39
- 坂本裕一 46, 52
- 佐賀裕亮 57, 59
- 佐藤育男 16
- 佐藤志穂 52
- 佐藤壮一 39
- 佐藤良勝 28, 58
- 佐野元昭 55
- 佐波雅史 60
- し*
- 椎崎一宏 54
- 塩谷達弘 39
- 志水元亨 ... 29, 46, 48,
57
- 白石敦士 53
- 新谷尚弘 ... 23, 32, 33,
36
- す*
- 菅生麻友 39
- 須澤徹生 24, 41
- 須澤文生香 38
- 鈴木康太 48
- 鈴木忠宏 48
- 鈴木智大 44
- 鈴木裕満 ... 29, 46, 57
- 須藤快 56

せ	土屋慧..... 51	平松健太郎..... 37	三村玲..... 27, 50
芹澤知子.....40	て	ふ	宮崎義継..... 43
た	出川洋介..... 26, 49	深澤遊..... 40, 43	宮澤拳..... 43, 47
高塚翔吾.....43, 47	寺内裕貴..... 34, 60	深田史美..... 59	む
高橋尚央.....34	寺岡徹..... 60	福田紗弓..... 33	村長保憲..... 43
高橋弘喜.....51	と	福田良一..... 24, 41	村口元..... 27, 39, 50
高峯和則....26, 37, 49	渡嘉敷直杏 23, 34, 35	福原敏行..... 61	も
高谷直樹...28, 29, 30,	外山博英.... 23, 35, 37	福森文康..... 52	本山高幸..... 18
33, 40, 48, 55, 56,	豊田正嗣..... 40	藤田翔貴..... 23, 33	森一樹..... 37
58	な	藤村真..... 38, 52, 54	守田湧貴..... 25, 41
高山晴香.....55	中沢威人.....11, 39	二神泰基... 26, 36, 37,	森山裕充..... 61
田久陽子.....47	中村宏江..... 39	49	や
竹内道夫.....47	中村燎..... 23, 35	へ	矢口貴志..... 40
竹川薫.....25, 38, 41	永山聖樹..... 51	別役重之..... 40	八十川さえ子..... 55
竹下典男...28, 30, 33,	に	ほ	藪浩..... 34
39, 40, 55, 58	西岡佐和子..... 53	星野泰隆..... 43	山形洋平... 36, 47, 53
武田陽一.....45	西尾讓一郎..... 45	細田柊志..... 30, 55	山口正晃..... 26, 49
武樋孝幸.....43	二宮章洋..... 42	堀井悠一郎..... 48	山口美幸..... 28, 58
田代綾子.....42	ぬ	堀内裕之... 24, 41, 44,	山下秀行..... 30, 55
田代康介.....37	沼澤里佳..... 53	51	山田修..... 21
立松俊祐.....57	の	本田与一..... 39, 60	山本里穂... 28, 33, 40,
田中茂幸.....28, 58	野坂亮仁..... 42	本間ちはる..... 39	58
田中拓未...30, 34, 54,	は	ま	よ
55	萩原大祐... 40, 42, 50,	前田浩..... 47	横川大祐..... 57, 59
田中千尋....26, 49, 60	56	榊尾俊介... 29, 40, 48,	與古田佳世..... 37
田中瑞己....36, 47, 53	橋本真宇..... 31	56	横山将己..... 32
田中優花子.....53	畑中こずえ..... 27, 50	升本宙..... 26, 49	吉崎由美子 26, 37, 49
田中大.....47	浜中祐弥..... 32	松渕美月..... 39	吉田裕史..... 46, 52
玉置尚徳....26, 37, 49	早坂実夏..... 29, 57	丸山潤一... 23, 24, 27,	吉野航..... 38
玉野孝一.....55	ひ	32, 33, 35, 53	吉橋佑馬..... 26, 49
ち	日浅怜子..... 38	み	吉見啓..... 34, 60
陳心怡.....52	樋口絵莉香..... 42	三上力輝..... 42	芳本玲..... 28, 58
つ	樋口裕次郎 25, 38, 41	酒造ひなた 28, 33, 58	わ
塚越まどか.....29, 56	平井献士..... 52	三澤恒汰..... 36	若井暁..... 44
津金朋代.....61	平大輔..... 47	水谷治..... 23, 35, 37	和久豊..... 48
附田浩基.....39		南篤志..... 24, 35	
辻健也.....60		峯岸悠也..... 36	
辻遼太郎.....53			

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
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
Spiber 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
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