

目次

コンファレンスプログラム		1
発表演題及び講演時間	(11月11日)	2
	(11月12日)	5
特別講演講演要旨		8
シンポジウム講演要旨		10
口頭発表講演要旨		18
ポスター発表講演要旨	1日目	28
	2日目	45
人名索引		62
糸状菌分子生物学研究会会則		66
糸状菌分子生物学研究会運営委員名簿		67

第2回 糸状菌分子生物学コンファレンスプログラム

日時：平成14年11月11日(月)～12日(火)

会場：名古屋大学シンポジオン・豊田講堂
(名古屋市千種区不老町)

主催：糸状菌分子生物学研究会

後援：糸状菌遺伝子研究会

11月11日(月)

12:30-15:00 口頭発表 (O-1～O-10)

15:00-15:15 休憩

15:15-16:45 ポスター発表 (奇数番号)

16:45-17:45 特別講演

How Fungi Tailor Gene Expression to the pH of the Environment

Professor Herb Arst

(Imperial College of Science, Technology and Medicine, UK)

17:45-17:55 総会

18:00- 懇親会 (ユニバーサルクラブ)

11月12日(火)

9:30-11:50 シンポジウム「糸状菌における環境応答の分子機構」

S-1 アスペルギルス属における多糖分解酵素群の誘導調節機構：

CCAAT-box に結合する広域転写促進因子の解析を中心として

加藤雅士 (名古屋大学大学院生命農学研究科)

S-2 麹菌(*Aspergillus oryzae*)の固体培養での遺伝子発現

秦 洋二 (月桂冠総合研究所)

S-3 担子菌きのこにおける環境応答と子実体形成の分子機構

宍戸和夫 (東京工業大学大学院生命理工学研究科)

S-4 病原糸状菌－植物相互作用における宿主オキシダティブースト系を巡る攻防

道家紀志・吉岡博文 (名古屋大学大学院生命農学研究科)

11:50-12:50 昼食

12:50-14:20 ポスター発表 (偶数番号)

14:20-16:50 口頭発表 (O-11～O-20)

16:50-17:00 閉会の辞

11月11日

口頭発表 (O-1~O-10) 12:30-15:00

- 12:30 O-1 イネいもち病菌 3 量体 G 蛋白ベータサブユニットによる
アデニレートシクラーゼの制御
西村麻里江、Jin-Rong Xu (生物研・Purdue University)
- 12:45 O-2 *Gibberella fujikuroi* の三量体 G タンパク質 β サブユニットは
交配における雌性稔性と病原性に関与する
井山真琴, 金子功¹, 寺岡徹, 有江力 (農工大・¹UC Berkeley)
- 13:00 O-3 イネいもち病菌のヒスチジンキナーゼの浸透圧ストレス応答への関与
大平寛大,^{1,2} 本山高幸,¹ 門倉香,³ 一石昭彦,² 藤村真,² 山口勇,³ 工藤俊章¹
(1 理研 2 東洋大・生命科 3 理研 PSC)
- 13:15 O-4 アカパンカビの浸透圧応答 *os-4* (MAPKKK) と *os-5* (MAPKK) 遺伝子
の解析
藤村真, 落合則幸, 高嶋里美, 岡田晃佳, 一石昭彦, 本山高幸*, 山口勇*
(東洋大・生命, *理研)
- 13:30 O-5 白色腐朽菌におけるバニリン添加に応答した NAD(P)H 産生機構
志水元亨、割石博之、田中浩雄 (九大院・農)
- 13:45 O-6 白色木材腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* の菌体外セルロース
分解系におけるセロビオース脱水素酵素と β -グルコシダーゼの機能
五十嵐圭日子, 谷知美, 吉田誠, 鮫島正浩 (東大院・農生科)
- 14:00 O-7 分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* の dikaryon としての分裂様式
岡崎孝映, 丹羽修身 (かずさ DNA 研究所)
- 14:15 O-8 糸状菌 *Aspergillus nidulans* のミオシン様ドメインを持つキチン合成
酵素 (CsmA) の生体内における局在、ミオシン様ドメインの機能解析
竹下典男、堀内裕之、太田明德 (東大院・農生科・応生工)
- 14:30 O-9 Woronin body 形成に関与する *hex-1* 遺伝子の *A. oryzae* ホモログ遺伝子
(*hexA*) の機能解析
丸山潤一*, 三並正芳, 岩崎琢磨, 北本勝ひこ
(東大院・農生科・応生工, *生研機構)
- 14:45 O-10 *Aspergillus oryzae* のテロメア配列
楠本憲一、鈴木聡、柏木豊 ((独) 食総研)

ポスター発表 (奇数番号) 15:15-16:45

- P-1 酵母菌 *Pichia pastoris* による白色木材腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* 由来 β -グルコシダーゼの生産とその性質
川合理恵, 吉田誠, 谷知美, 五十嵐圭日子, 大平剛, 長澤寛道, 鮫島正浩
(東大院・農生科)
- P-3 *Fusarium* sp.5112 株由来リパーゼ遺伝子の麹菌での発現
半谷朗, 茶谷悦司*, 北本則行* (愛知産技研食品工技, *愛知産技研基盤技術部)
- P-5 *Fusarium oxysporum* 26-1 株のアルカリプロテアーゼ遺伝子の麹菌での発現
山澤美緒¹, 茶谷悦司², 半谷朗³, 安田(吉野)庄子³, 山本周治⁴, 北野道雄⁴, 北本則行²
(¹ 椋山女大・² 愛知産技研基盤技術・³ 愛知産技研食品工技・⁴ 愛知産技研尾張繊維)
- P-7 好熱性細菌由来枝付け酵素の麹菌による発現
井原美智子, 篠原真理*, 阿保正伸, 高木忍, トーマス C. ベック
(ノボザイムズジャパン(株), *Harvard Medical School)
- P-9 リグニン分解酵素高生産株の分子育種
塚本晃, 古城敦, 仲亀誠司, 杉浦純 (王子製紙・新技術研究所)
- P-11 *Coprinus cinereus* を宿主とした高発現系の構築
- Glycerinaldehydes-3-phosphate dehydrogenase プロモーターの単離 -
一本木智敬, 割石博之, 田中浩雄 (九大院・農)
- P-13 *Aspergillus nidulans* の protein O-D-mannosyltransferase 遺伝子群の解析
岡拓二, 後藤正利, 古川謙介 (九大院・生資環)
- P-15 麹菌 (*Aspergillus oryzae*) の固体培養特異的遺伝子マンノシダーゼ遺伝子(*manIB*)の解析
矢原明典^{1,2}, 赤尾健^{1,3}, 吉内くみ^{1,4}, 吉田孝⁵, 坂本和俊¹, 山田修¹, 秋田修^{1,2}
(¹ 酒総研, ² 広島大院先端研・分子生命機能, ³ 現国税庁 ⁴ 現白鶴酒造, ⁵ 弘前大農学生命)
- P-17 *Penicillium* 1,2- α -マンノシダーゼの結晶構造と N 型糖鎖プロセッシング
吉田孝¹, 一島英治², P. Lynne Howell³, Annette Herscovics⁴
(¹ 弘前大・農学生命, ² 創価大・工, ³ トロント大・小児病院, ⁴ マギル大・癌センター)
- P-19 *Fusarium oxysporum* の孢子形成関連遺伝子 *RENSA* は酵母様生育にも関与する。
小原敏明, 柘植尚志 (名大院生農)
- P-21 担子菌 *Pleurotus ostreatus* におけるキチン合成酵素遺伝子の解析
西原幹広, 渡邊彰, 麻田恭彦 (香川大・農・生命機能)
- P-23 *Aspergillus nidulans* のキチン合成酵素遺伝子 *chsA csmA* 二重破壊株と *chsC csmA* 二重破壊株の作製とその性質の検討
山田絵美, 堀内裕之, 太田明德 (東大院・農生科・応生工)
- P-25 *Aspergillus nidulans* のマーカー遺伝子 *pyrG* 変異の細胞壁へ与える影響についての解析
山崎晴丈, 堀内裕之, 太田明德 (東大院・農生科・応生工)
- P-27 白色腐朽担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* の酸素ストレス応答性化合物
三浦大典, 割石博之, 田中浩雄 (九大院・農)
- P-29 白色木材腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* のセルロースおよび
キシラン分解系における菌体外酵素の生産パターン
住吉剛史¹, 五十嵐圭日子¹, 片山明², 西野武士², 鮫島正浩¹
(¹ 東大院・農生科, ² 日医大・一生化)
- P-31 マイタケ(*Grifola frondosa*)由来セロピオース脱水素酵素の発現応答
吉田誠, 大平剛, 五十嵐圭日子, 長澤寛道, 鮫島正浩 (東大院・農生科)
- P-33 *Aspergillus oryzae* の生産する無機リン酸遊離酵素群(フィターゼ, フォスファターゼ)の
フィチン酸からのリン酸遊離様式
藤田仁, 山根雄一*, 福田 央**, 木崎康造**, 若林三郎**, 秋庸裕, 重田征子, 小埜和久
(広大院・先端研・分子生命機能, *(株)酔心山根本店, **酒総研)

- P-35 白麴菌の α -アミラーゼ遺伝子及びその発現パターン
加藤拓*、村島健司、下飯仁、伊藤清 (酒類総合研究所、*広大院先端研)
- P-37 糸状菌 *Aspergillus nidulans* セルラーゼ遺伝子の転写誘導配列の同定
森本宗徳、小島美沙子、遠藤良知、加藤雅士、小林哲夫、塚越規弘
(名大院生命農・生物機構)
- P-39 *Aspergillus oryzae* のキシラナーゼ XynG2 遺伝子プロモーターに存在する
XlnR 結合配列および CCAAT 配列の機能解析
松岡寿保、木村哲哉、栗冠和郎、大宮邦雄 (三重大生物資源)
- P-41 麴菌アルカリプロテアーゼ遺伝子のプロモーター転写制御領域の解析
佐野元昭、田中昭光*、高瀬久美子、長谷川要*、町田雅之 (産総研、*ヒゲタ醤油 研)
- P-43 麴菌(*Aspergillus oryzae*)の固体培養特異的な遺伝子のプロモーター解析
花ヶ崎敬資**、赤尾健**、篠田典子**、坂本和俊**、山田修**、秋田修**
(*広島大院・先端研、**酒総研・微生物)
- P-45 トマトアルターナリア茎枯病菌の宿主特異的 AAL 毒素生合成に関与する
遺伝子クラスターの解析
赤松創、尾谷浩、児玉基一郎 (鳥取大農)
- P-47 トマトアルターナリア茎枯病菌におけるスフィンガニンアナログマイコトキシン
(SAM) の生産とその病理学的役割
山岸大輔、赤松創、妹川敏江、尾谷浩、児玉基一郎 (鳥取大・農)
- P-49 イチゴ黒斑病菌とリンゴ斑点落葉病菌の宿主特異的毒素生合成に関与する共通な遺伝子
田中孝欣、伊藤芳、八田理恵子、山本幹博*、秋光和也**、柘植尚志
(名大院生農・*岡山大農・**香川大農)
- P-51 *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* 病原性欠損変異株 REM110 の
キャベツ萎黄病に対する生物防除活性と GFP を用いた挙動観察
宮田雄一郎・吉田隆延*・川部眞登・寺岡 徹・有江 力 (農工大農、*東北農研センター)
- P-53 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* の 3 つのレースに関する系統解析
川部眞登、寺岡徹*、有江力* (農工大農・連農、*農工大・農)
- P-55 *Diaporthe* 属菌の交配型遺伝子
兼松聡子、足立嘉彦、吉田幸二 (果樹研究所)
- P-57 灰色かび病菌のジカルボキシイミド圃場耐性の遺伝子診断法による検出
大島美知代、藤村真、岡田清嗣¹、竹内妙子²、山口勇³
(東洋大生命・大阪農技セ¹・千葉農総研²・理研 PSC³)
- P-59 麴菌 *Aspergillus oryzae* からアデニン要求性株の単離
金鋒傑、石一智、有岡学、北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)
- P-61 *Aspergillus aculeatus* の形質転換系の開発
金政真、川口剛司、炭谷順一、荒井基夫 (阪府大院・応生化、先端研)
- P-63 カルボキシン耐性遺伝子によるシイタケ (*Lentinula edodes*) *sdi1* の相同組換え
齋藤久美子、渡辺久敬、入江俊一*、佐藤利次 (岩手生工研、*滋賀県立大・環境科学)
- P-65 麴菌におけるポリ A トラップと *Agrobacterium* を用いた形質転換
鈴木聡、竹谷博子、楠本憲一、柏木豊 (独法・食総研)

特別講演 16:45-17:45

How Fungi Tailor Gene Expression to the pH of the Environment
Prof. Herb Arst
(Imperial College of Science, Technology and Medicine, UK)

11月12日

シンポジウム「糸状菌における環境応答の分子機構」 9:30-11:50

- S-1 アスペルギルス属における多糖分解酵素群の誘導調節機構：
CCAAT-box に結合する広域転写促進因子の解析を中心として
加藤雅士（名古屋大学大学院生命農学研究科）
- S-2 麹菌(*Aspergillus oryzae*)の固体培養での遺伝子発現
秦 洋二（月桂冠総合研究所）
- S-3 担子菌きのこにおける環境応答と子実体形成の分子機構
宍戸和夫（東京工業大学大学院生命理工学研究科）
- S-4 病原糸状菌－植物相互作用における宿主オキシダティブースト系を
巡る攻防
道家紀志・吉岡博文（名古屋大学大学院生命農学研究科）

口頭発表（O-11～O-20） 14:20-16:50

- 14:20 O-11 *Aspergillus nidulans* の分生子の極性化時における DNA 損傷修復の役割
水谷真也，夏目豊彰，伊藤建夫，伊藤靖夫（信州大・理）
- 14:35 O-12 *Aspergillus nidulans* の RAD51 オーソログ過剰発現系統における
遺伝子ターゲティング
夏目豊彰，江草真由美*，児玉基一郎*，伊藤建夫，伊藤靖夫
（信州大・理，*鳥取大・農）
- 14:50 O-13 麹菌 *A. oryzae* における VAM3 相同遺伝子の単離と解析
正路淳也，有岡学，北本勝ひこ（東大院・農生科・応生工）
- 15:05 O-14 麹菌 *Aspergillus oryzae* 単核分生子変異株を用いた宿主の開発
石 一智，丸山 潤一，中島 春紫，北本勝ひこ
（東大院・農生科・応生工）
- 15:20 O-15 Peptide Mass Finger printing(PMF) 解析による黄麹菌
(*Aspergillus oryzae*)分泌タンパク質のプロテオーム解析
織田健，岩下和裕，柿菌ダララット，家藤治幸，秋田修（酒類総研）
- 15:35 O-16 麹菌(*Aspergillus oryzae*)のレトロトランスポゾンの構造及び発現解析
佐藤元洋，五味勝也，¹秋田修（東北大院農・応生科，¹酒総研）
- 15:50 O-17 Ca²⁺を持たない *Aspergillus saitoi* 1,2- α -D-mannosidase の
触媒中心の決定
多田羅洋太，李秉魯，吉田孝¹，高橋幸資²，一島英治
（創価大院・工，¹弘前大・農学生命，²東農工大・農）
- 16:05 O-18 *Aspergillus oryzae* によるペニシロリシンの発現と亜鉛の配位
土井ゆうこ，李秉魯，丸山昇太，南田広太，池口雅道，一島英治
（創価大学大学院工学研究科）
- 16:20 O-19 *Paecilomyces variotii* IRI017 株由来アルコール酸化酵素遺伝子 cDNA の
麹菌における発現
林直宏，松井淳子，安田（吉野）庄子，近藤徹弥，森川豊*，北本則行*
（愛知産技研食工技，*愛知産技研・基盤技術部）
- 16:35 O-20 麹菌キシラナーゼ・セルラーゼのセルロース誘導への転写活性化因子
AoXlnR の関与
丸井淳一郎，北本則行*，加藤雅士，小林哲夫，塚越規弘
（名大院・生命農学 *愛知産技研基盤技術）

ポスター発表（偶数番号） 12:50～14:20

- P-2 *Aspergillus nidulans* の Phospholipase A₂ 遺伝子の単離と解析
洪思鉉、堀内裕之、太田明徳（東大院農生科・応生工）
- P-4 麹菌の持つ2つの分泌型ホスホリパーゼ A₂ 遺伝子の単離と解析
中西義人、有岡学、北本勝ひこ（東大院・農生科・応生工）
- P-6 コウジ 朮¹由来新規ロシニアミノ² プチターゼ³ *pepE* 遺伝子のクローニングと発現
鯉淵恭子、小島麻里、二宮大記、岡村英喜、丸山潤一¹、北本勝ひこ²
（味の素株 食品研究所、* 東大院農生科 応生工）
- P-8 黒麹菌 *Aspergillus niger* No.12株由来エキソ型イヌリナーゼ遺伝子の構造解析と
酵母 *Pichia pastoris* による分泌発現
森山聡、六車三治男、太田一良（宮崎大・農・応生科）
- P-10 麹菌 *Aspergillus oryzae* の生分解性プラスチック分解に関わる遺伝子群の探索
米田幸世¹、高橋徹¹、前田浩¹、山形洋平^{1, 2}、阿部敬悦^{1, 2}、長谷川史彦²、
五味勝也^{1, 2}、中島佑^{1, 2}（¹ 東北大・院・応生科、² 東北大・NICHe）
- P-12 *Aspergillus nidulans* における *usoA* 遺伝子の機能解析
浅野静、飯島隆、北本勝ひこ、中島春紫（東大院農生科・応生工）
- P-14 麹菌 *Aspergillus oryzae* における ER および Golgi 体の動態解析
菊池聡子、丸山潤一、中島春紫、北本勝ひこ（東大院・農生科・応生工）
- P-16 麹菌 *Aspergillus oryzae* の液胞膜 ATPase VmaC の細胞内局在と機能解析
奈良秀徳、有岡学、北本勝ひこ（東大院・農生研・応生工）
- P-18 麹菌における液胞タンパク質 missort 変異株の原因遺伝子の同定
大根田守、有岡学、北本勝ひこ（東大院・農生科・応生工）
- P-20 *Aspergillus nidulans* の Acetyl-CoA Synthetase(Acs) は嫌氣的 ATP 生成に關与する
高崎一人、高谷直樹（筑波大、応生化）、祥雲弘文（東大院、応生工）
- P-22 アカパンカビ (*Neurospora crassa*) DNA 修復遺伝子 *ncRAD14* の機能解析
佐藤正仁、一石昭彦（東洋大・生命科学）
- P-24 アカパンカビ (*Neurospora crassa*) DNA 修復遺伝子 *ncRAD10* の機能解析
仁木孝治、加藤恭徳、多賀井覚、一石昭彦（東洋大・生命科学）
- P-26 *Penicillium paxilli* における細胞外 DNA の組込み様式の解析
大井一浩、伊藤靖夫（信州大・理）
- P-28 *Aspergillus nidulans* の遺伝的形質転換時における DNA 二重鎖切断と細胞外 DNA の組込み
中岡源、伊藤靖夫（信州大・理）
- P-30 麹菌 CCAAT 結合複合体の分子解剖
田上新次郎、合田秀矢、加藤雅士、小林哲夫、塚越規弘（名大院・生命農）
- P-32 Hap 複合体と相互作用する因子、AnHapX、の解析
長瀬崇、田中昭光、加藤雅士、小林哲夫、塚越規弘（名大・生命農）
- P-34 麹菌のシデロフォア生産調節因子 (*SreAo*) の機能解析
渡辺久敬、佐藤利次（岩手生工研）
- P-36 糸状菌アミラーゼ遺伝子群の転写誘導因子 *AmyR* の機能解析
村越有里子、加藤直樹、牧田智裕、加藤雅士、小林哲夫、塚越規弘（名大院生命農・
生物機構）
- P-38 *Aspergillus nidulans* *AmyR* の局在性に関する解析
北川秀、赤坂祐樹、牧田智裕、加藤直樹、谷修治、加藤雅士、小林哲夫、塚越規弘
（名大院・生命農学）
- P-40 麹菌 *Aspergillus oryzae* 硫黄同化系遺伝子制御因子 *MetR* の機能解析
海附玄龍¹、佐野元昭²、畑本修¹、原精一¹、町田雅之²、増田力¹（野田産研¹、産総研²）
- P-42 *Aspergillus nidulans* の二成分性情報伝達系遺伝子の単離と機能解析
古川健太郎、阿部敬悦、中島佑（東北大院農・応生科）

- P-44 *Aspergillus nidulans* におけるプロテインキナーゼ C ホモログをコードする遺伝子の単離とその機能解析
一宮維幸, 堀内裕之, 太田明德 (東大院・農生科・応生工)
- P-46 *Fusarium oxysporum* の FOW2 遺伝子の植物感染における機能
井上伊織, 柘植尚志 (名大院生農)
- P-48 ナシ黒斑病菌の AK 毒素生合成酵素のペルオキシソーム局在性
今崎亜依, 柘植尚志 (名大院生農)
- P-50 ウリ類炭そ病菌の CST1(*Colletotrichum Ste12* homologue) 遺伝子は付着器貫入に必須である
辻元人・藤井聡・山田大輔・津下誠治・白石友紀・久保康之 (岡山大農・京府大院農)
- P-52 イネいもち病菌の胞子発芽管由来遺伝子の分子生物学的解析
齋藤憲一郎¹, 石井ふみ¹, 有江力¹, 吉田稔², 寺岡徹¹, 鎌倉高志²
(¹農工大・農, ²理研・化学遺伝)
- P-54 日本産イネいもち病菌の非病原性遺伝子の解析
曾根輝雄, 鬼頭英樹, 吹谷智, 佐藤順子, *岩野正敬, 富田房男
(北大院農・応菌, *中央農研)
- P-56 麹菌 *Aspergillus oryzae* の均一化 cDNA ライブラリーの構築
戸田智美¹, カルニンチピエロ², 林崎良英², 佐野元昭¹, 町田雅之¹
(¹産総研・糖鎖センター, ²理研・GSC)
- P-58 麹菌 (*Aspergillus oryzae*) NRIB3000 DNA チップの開発
山田修, 赤尾健, 坂本和俊, 有馬寿英, 岩下和裕, 織田健, 秋田修 (酒総研)
- P-60 プロセッシング酵素遺伝子 (*kexB*) 破壊株を用いた麹菌のトランスクリプトーム解析
水谷治, 藤岡智則, 山形洋平, 阿部敬悦, 中島佑 (東北大院農・応生科)
- P-62 黄麹菌 *Aspergillus oryzae* 細胞外蛋白質のプロテオーム解析
朱立穎, 竹内道雄 (農工大・農・応生科)
- P-64 黄麹菌 菌体内タンパク質のプロテオーム解析
Nguyen Cong Ha 藤本真澄 竹内道雄 (農工大・農・応生科)
- P-66 MALDI-TOF MS による黄麹菌 (*Aspergillus oryzae*) プロテオーム解析システムの構築と新規 In gel deglycosylation 法の開発
織田健, 岩下和裕, 柿菌ダララット, 山田修, 家藤治幸, 秋田修 (酒総研)

How Fungi Tailor Gene Expression to the pH of the Environment

Herb Arst

**Department of Infectious Diseases and Microbiology
Faculty of Medicine,
Imperial College of Science, Technology and Medicine
Ducane Road, London W12 ONN, UK.**

Many fungi have considerable physiological versatility. Frequently this includes the ability to grow over a very wide pH range. Thriving over a wide pH range requires both an efficient internal pH homeostatic system and a system for regulating the production of molecules functioning beyond the reach of the pH homeostatic system such as permeases, secreted enzymes and exported metabolites so that they are present only at an appropriate ambient pH. My talk will focus on the ambient pH-responsive system regulating expression of genes involved in syntheses of molecules functioning beyond the cell permeability barrier in *Aspergillus nidulans*. The work in my own laboratory in London is done in collaboration with the laboratory of Miguel Peñalva in Madrid. Emerging evidence indicates that the pH-responsive gene regulatory system exists in many filamentous fungi and yeasts and that, in addition to its scientific interest, it is of considerable practical importance.

Ambient pH regulation of gene expression in *A. nidulans* is mediated by the PacC transcription factor. PacC contains three Cys₂His₂ zinc fingers of which only fingers 2 and 3 are apparently involved in DNA binding and the PacC core consensus binding site is 5'-GCCARG. The derived amino acid sequence of PacC contains 678 residues but high resolution electrophoretic mobility shift assays (EMSA) show that translation initiates at methionine codon 5 so that the translation product contains 674 residues. This full-length form of PacC is converted to the functional form containing the ~249 N-terminal residues in two proteolytic steps. The first step, removing ~180 C-terminal residues, is catalysed by the signalling protease and requires alkaline ambient pH signal transduction. The product of the signalling protease reaction is a committed intermediate and its conversion to the functional form by the processing protease is ambient pH-independent. The processing protease reaction is apparently independent of the amino acid sequence at the cleavage site whereas the signalling protease reaction requires a conserved 'signalling box' sequence (or at least a portion of it). The committed intermediate and the processed (functional) form are nuclear localised whereas the full-length form is cytosolic. Processing of PacC is prevented under inappropriate (i.e. acidic) conditions by intramolecular interactions involving three regions of full-length pacC. These interactions hold PacC in a 'closed' conformation, making it inaccessible to the processing protease. Under appropriate (i.e. neutral to alkaline) conditions, pH signal transduction culminates in removal of the most C-terminal of the three interactive regions, converting PacC to the 'open' form, which is able to enter the nucleus and is accessible to the processing protease (i.e. it is the committed intermediate). It is not known whether the processing protease reaction occurs in the cytosol, the nucleus or both. Mutations truncating PacC such that one or more of the interaction regions is missing or debilitated lead to an alkalinity-mimicking, pH independent gain-of-function phenotype as do certain single residue interaction-debilitating substitutions within any one of the interactive regions. More severe truncations, mutations interfering with processing (e.g. mutations in the 'signalling protease box') and mutations reducing DNA binding have a partial loss-of-function, acidity mimicking phenotype. Null *pacC* mutations have a more extreme acidity mimicking phenotype.

The functional form of PacC activates expression of genes expressed preferentially at alkaline pH such as those encoding the enzymes for penicillin biosynthesis and prevents expression of genes expressed preferentially at acidic pH

such as that encoding the permease for γ -aminobutyrate (GABA). Repression of the gene encoding GABA permease involves DNA binding competition between the transcriptional activator mediating induction and PacC, as the respective binding sites overlap.

The ambient pH signal transduction pathway involves the products of six genes, *palA*, B, C, F, H and I. The PalB sequence indicates that it is a cysteine protease of the calpain family although there is no evidence for Ca⁺⁺ involvement. PalB is very likely to be the signalling protease, thus catalysing the final step of pH signal transduction. PalA binds to PacC and this binding might enable PalB to cut PacC, a finding first made in the corresponding pH regulatory system of *Saccharomyces cerevisiae*. PalH contains seven putative transmembrane domains followed by a hydrophilic C-terminal moiety of just over 400 amino acids. Interestingly some PalH function is retained even when most of the hydrophilic C-terminal moiety is removed. PalI contains four putative transmembrane domains followed by a hydrophilic C-terminal region accounting for about two-thirds of the protein. A single residue substitution in the acidic loop between the first two transmembrane segments abolishes function. This putative loop region is highly conserved with its *Saccharomyces* homologue and is predicted to be periplasmic. It has been suggested that it might function as a pH sensor. Null mutations in *palI* do not abolish pH signalling. Therefore either there is some redundancy of PalI function or pH signalling can bypass PalI function to some extent. The conceptual translation products of *palC* and *palF* give few clues as to functions. The *S. cerevisiae* genome contains no identifiable *palC* homologue and the limited genome data available suggest that *palC* homologues are present in filamentous fungi but not yeasts. Intriguingly, homologues of PalA and PalB have been identified in the animal kingdom.

Various aspects of the corresponding pH regulatory systems have been studied in the yeasts *S. cerevisiae*, *Candida albicans*, *C. dubliniensis* and *Yarrowia lipolytica* and other filamentous fungi including *A. niger*, *A. parasiticus*, *A. oryzae*, *Penicillium chrysogenum*, *Acremonium chrysogenum*, *Sclerotinia sclerotiorum* and *Fusarium oxysporum*. It is involved in pathogenicity of both plants and animals, in antibiotic synthesis, in toxin (e.g. aflatoxin) production and probably in the production of industrially important exoenzymes.

If you wish to know more about pH regulation of fungal gene expression, the September 2002 issue of *Microbiology and Molecular Biology Reviews* contains a review by Miguel Peñalva and me (Vol. 66, pp. 426-446). This review contains literature citations for the work described here. If reprints arrive promptly, I shall have some for distribution at the meeting.

S-1

アスペルギルス属における多糖分解酵素群の誘導調節機構： CCAAT-box に結合する広域転写促進因子の解析を中心として

加藤雅士（名古屋大学大学院生命農学研究科）

麹菌 *Aspergillus oryzae* に代表される糸状菌は我が国の醸造工業の基盤となった真核微生物群である。糸状菌は酵素の宝庫と呼ばれ、アミラーゼ、キシラナーゼ、セルラーゼ等の多糖分解酵素を始めとした多数の有用酵素を生産している。分解すべき多糖が外界に存在する時に、それに対応する多糖分解酵素が誘導される。多くの場合、それらの誘導は転写レベルで制御されている。我々は麹菌の生産するデンプン分解酵素タカアミラーゼ A を糸状菌のモデル誘導酵素として、その発現制御機構を研究してきた。タカアミラーゼ A はデンプンやマルトースが存在すると誘導され、グルコースが存在すると酵素合成が抑制される典型的な誘導型の酵素である。麹菌に近縁かつ遺伝学的解析に有利な *Aspergillus nidulans* を宿主に麹菌タカアミラーゼ A 遺伝子(*taa*)を導入したところ、麹菌の場合と同様な誘導発現が見られ、*A. nidulans* においても麹菌と同様なアミラーゼ遺伝子の発現調節機構が存在していることが示唆された。以後、この *A. nidulans* の系をモデル系として *taa* の発現調節機構を解析してきた。現在までの解析で、当初の予想通り *A. nidulans* と麹菌とは互いに保存された制御因子が存在し、共通の制御機構が存在することが明らかになっている。

1. *taa* プロモーターに存在するシスエレメントの解析

taa プロモーターを上流より順次欠失させた一連の上流欠失変異遺伝子を *A. nidulans* に導入し、アミラーゼ活性を解析した。その結果、転写誘導、転写促進に関わるシスエレメントの存在が示唆された。転写促進にかかわる領域内には真核生物の代表的なシスエレメントである CCAAT-box が存在していた。そこで、CCAAT 配列内に部位特異的の変異を導入し *A. nidulans* の形質転換に用いたところ、アミラーゼ活性は顕著に低下していることが明らかとなった。この結果より、CCAAT 配列がタカアミラーゼ A 遺伝子の転写量を増加させていると結論し、転写促進因子 CCAAT-box 結合因子の解析に着手した。*taa* プロモーター内にはこの他に、アミラーゼ特異的な誘導制御因子 AmyR の結合部位やグルコース抑制に関わるリプレッサー CreA の結合部位の存在が明らかにされている。

2. CCAAT-box 結合活性を有する因子の解析

プロテアーゼやヌクレアーゼ活性を低く抑えることにより、*A. nidulans* からの核蛋白質の精製法を確立し、ゲルシフトアッセイによりプロモーターとの相互作用を解析した。また、糸状菌としては初めて核蛋白質による DNaseI フットプリント解析に成功し、CCAAT-box 結合因子の結合配列の特性の詳細を調べた。その結果、本因子は CCAAT 配列を含む 36 塩基対の領域に特異的に結合していることが明らかとなった。さらに、この CCAAT-box 結合因子は *taa* 遺伝子のみでなく、アセトアミダーゼ遺伝子をはじめとするいくつかの遺伝子のプロモーターにも特異的に結合し得ることが証明され、この因子が広域転写促進因子であることが判明した。その後、他の多くのグループの研究から *Aspergillus* 属の糸状菌はもとより *Trichoderma*, *Neurospora* など多くの糸状菌で多様な遺伝子の転写促進に関与していることが示されている。

3. 糸状菌 CCAAT-box 結合因子は酵母 Hap 複合体と類似の因子

酵母のヘテロ 4 量体で構成される転写因子 (Hap 複合体) のサブユニット 遺伝子 *hap3* の *A. nidulans* におけるホモログ *hapC* 遺伝子を用いてリコンビナント蛋白質および抗体を調製・解析した結果、HapC が上記の CCAAT-box 結合因子に含まれていることを証明した。同様な解析により、酵母 Hap 複合体サブユニット Hap5 のホモログ HapE も CCAAT-box 結合因子に含まれていることが明らかとなった。これにより糸状菌 CCAAT-box 結合因子が酵母 Hap 複合体と類似の因子であることが強く示唆された。

4. CCAAT-box 結合因子の *in vitro* 再構成系の構築

麹菌より CCAAT-box 結合因子のサブユニット遺伝子 *hapB*, *hapC*, *hapE* を単離し、構造を解析した。

CCAAT-box 結合複合体の3種のサブユニットの中央部分には真核生物間で高度にアミノ酸配列が保存された領域（コア領域）が存在していることが明らかとなった。各サブユニットのリコンビナント蛋白質を大腸菌により発現させ精製をした。これらのリコンビナント蛋白質を用いた *in vitro* 再構成系の構築に成功し、本因子は少なくとも3つのサブユニット HapB, HapC, HapE で構成され、3量体を形成して CCAAT 配列特異的に結合することを示した。

5. CCAAT-box 結合因子のサブユニットのドメイン解析

再構成系を用いて CCAAT-box 結合因子の各サブユニットのドメイン構造を解析した。複合体形成と DNA 結合に必要なドメインを同定するために、N 末、C 末あるいはその両方の非保存領域を欠失した変異 Hap サブユニット遺伝子を作製した。部分欠失リコンビナント蛋白質を調製し、ゲルシフト法により解析をした結果、すべての部分欠失変異サブユニットが DNA 結合能を有する CCAAT-box 結合因子を形成しうることが判明した。この結果より、3つのサブユニットのコア領域のみで、複合体の形成と DNA 結合には十分であることが明らかとなった。さらに、一連の部分欠失サブユニット遺伝子を *A. nidulans*（各サブユニット破壊株）に導入し、タカアミラーゼA遺伝子の発現を指標に転写促進能を評価した。その結果、HapC の N 末端領域と HapB の C 末端領域が CCAAT-box 結合複合体の発現促進能に必要であり、両領域が *in vivo* での CCAAT-box 結合複合体の機能に何らかの重要な役割を果たしていることが判明した。

6. CCAAT-box 結合因子と相互作用する因子の探索

CCAAT-box 結合因子の第4のサブユニットの取得を目的として探索した結果、HapB/C/E 複合体と相互作用して転写を促進する因子 HapX の遺伝子を3種の糸状菌 *A. oryzae*, *A. nidulans*, *N. crassa* から単離することに成功した。酵母ゲノム情報等の既知の塩基配列との比較から、HapX は糸状菌にユニークな転写因子であることが明らかとなった。

7. CCAAT-box 結合因子のアセンブリ機構

A. nidulans の各サブユニット遺伝子欠失株の各サブユニット抗体による解析および、それぞれの核蛋白質を様々な組み合わせた CCAAT-box 結合因子の再構成実験により、CCAAT-box 結合因子のアセンブリ機構の解析を行った。HapE は単独では不安定であるが、HapC とヘテロ2量体を形成して安定化される。従って、HapC によりヘテロ2量体の分子数が決められ、その後に HapB サブユニットがアセンブリしてヘテロ3量体を形成し、DNA 結合能を獲得する。これは真核生物に普遍的に存在する CCAAT-box 結合因子の *in vivo* におけるアセンブリ機構を初めて明らかにしたものである。

参考文献

1. Tsukagoshi N. Kobayashi T. Kato M., *J. Gen. Appl. Microbiol.* 47, 1-19 (2001). Review.
2. Tanaka A. Kamei K. Kato M. Kobayashi T. Tsukagoshi N., *Curr. Genet.* 39, 175-182 (2001).
3. Kato M. Tateyama Y. Hayashi K. Kobayashi T. Tsukagoshi N., *FEBS Lett.* 512, 227-229 (2002).
4. Tanaka A. Kato M. Nagase T. Kobayashi T. Tsukagoshi N., *BBA*, 1576, 176-182 (2002).

Regulatory mechanisms of polysaccharide-degrading enzyme induction in aspergilli: characterization of a wide-domain regulatory factor, the CCAAT-binding complex.

Masashi Kato

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

麹菌(*Aspergillus oryzae*)の固体培養での遺伝子発現

秦 洋二 (月桂冠総合研究所)

【はじめに】

清酒・醤油・味噌などの我が国の発酵産業では、麹菌 (*Aspergillus oryzae*) を様々な穀類で生育させる固体培養 (麹造り) を行いその産物を利用している。固体培養は、簡便な装置で培養が可能で有用な酵素が大量に生産されるなどの醸造産業において重要な特性を有している。一方培養条件のコントロールが困難であり、目的成分以外にも多数の成分が生産されるなどの欠点もある。従って単一成分の発酵生産を目的とする場合は、固体培養より液体培養で行われることが多い。

これまでは産業上重要な固体培養においては詳細な解析が困難だったが、近年の分子生物学的アプローチにより固体培養における解析が飛躍的に進みつつある。すなわち、固体培養でしか発現しない遺伝子がいくつか単離されるなど、固体培養における遺伝子発現機構が徐々に明らかになっている。

【固体培養で特異的に発現する遺伝子】

1984年頃から麹菌をはじめとする*Aspergillus*属で遺伝子解析が始められたが、単離される遺伝子はすべて液体培養で発現する遺伝子であった。しかしながら我々はこれらの遺伝子では、清酒醸造で重要な酵素生産を説明することが困難であり、固体培養での遺伝子発現を検討する必要があると考えた。

1つはグルコアミラーゼであり、清酒醸造では澱粉からグルコースを生成させる重要な役割を担っている。本酵素は固体培養では大量に生産されるが、液体培養ではほとんど生産されない。我々は液体培養で発現するグルコアミラーゼ遺伝子 (*glaA*) 以外に、固体培養でのみ発現する遺伝子 (*glaB*) の単離に成功した。この*glaB*遺伝子は液体培養に比べて、固体培養で200倍以上の高発現することを見いだした。

さらに固体培養で特異的に発現する遺伝子としてチロシナーゼ遺伝子の単離にも成功した。麹を使用する食品は褐変し外観品質が低下することが知られているが、その原因はチロシナーゼによるメラニン合成の促進である。麹菌のチロシナーゼ遺伝子については、既に液体培養で発現する*melO*遺伝子が単離されていた。しかし遺伝子発現解析の結果、麹などの固体培養では*melO*とは異なる新規チロシナーゼ遺伝子(*melB*)が発現していることを見いだした。この*melB*遺伝子は固体培養でのみ発現し、固体培養での発現能を強化させると麹の褐変性はさらに増加した。

これらの遺伝子単離は、いずれも長年の清酒醸造における醸造技術がヒントとなっている。

【EST情報による遺伝子発現特性の解析】

固体培養で発現する遺伝子を網羅的に解析するため、麹菌EST情報からの発現特性の検討を行った。液体培養 (富栄養)、液体培養 (貧栄養)、固体培養から得られたEST情報をクラスタリングし、約3300のcontigに集約した。これらのcontigについて各培養条件での頻度情報を当てはめたところ、液体培養に比べて固体培養の方が、より多くの種類の遺伝子が発現していることが明らかとなった。次にこの遺伝子発現情報に基づき、それぞれの培養に特異的に発現している遺伝子 (10~20種類) を抽出した。これら培養特異的発現を示す遺伝子について、さらにプロモーター領域を単離し、GUSレポーターアッセイにより発現特性を詳細に検討した。その結果、固体培養での特異的に発現する遺伝子の中でも、その発現特性は数種類に分類することができることがわかった。

【固体培養での転写因子解析】

固体培養での遺伝子発現をより詳細に解析するため、転写因子の検討を行った。まず固体培養で高発現する*glaB*遺伝子のプロモーターからシス因子の同定を行った。様々なデレーション解析から開始コドン上流

350bp付近に存在する24塩基の配列が、固体培養での高発現に重要であることを見いだした。これらの遺伝子配列のみを置換した場合、固体培養での発現能が欠失した。さらにこの配列を多コピーで麹菌に導入したところ、プロモーターのタイトレーション効果と見られる固体培養でのグルコアミラーゼ生産性が低下した。またゲルシフトアッセイなどにより、このシス因子に結合する蛋白についても検出することができた。

【固体培養で生産される有用ペプチドの全合成遺伝子】

固体培養ではタンパク質だけでなく多くの機能性物質が生産される。麹培養で生産される環状ペプチドであるフェリクリシン(Fcy)は、非常に強力な鉄イオンのキレートであり清酒中での着色原因物質として知られている。この環状ペプチドは通常のタンパクのようにリボソームで合成されるのではなく、ペプチドシンテターゼと呼ばれる巨大酵素蛋白によって合成される。また鉄イオンをキレートする「腕」の部分は、オルニチンに対してヒドロキシル化・アセチル化などの修飾が必要である。我々はこのフェリクリシンのペプチド合成酵素、修飾酵素、膜輸送タンパク、転写制御因子などFcy合成に必要な遺伝子群が、染色体麹菌染色体上で約63 kbの大規模な遺伝子クラスターを形成していることを明らかにした。

【おわりに】

麹菌のような糸状菌において固体培養は、本来の生育により近い培養法であり、糸状菌の持つ機能を最大限に発揮できることが期待される。今後このような固体表面での微生物活動の解明は、発酵産業だけでなく、広く微生物利用の発展に寄与できるものと考えている。

【謝辞】

なお本研究は、以下にあげる多くの共同研究機関の協力のもと行われたものである。酒総研・秋田修室長、赤尾健研究員、産総研・町田雅之博士、創価大・一島英治教授、東京大・北本勝ひこ教授、東北大・五味勝也教授、ヒゲタ醤油・高木広明博士、月桂冠総合研究所・小畑浩氏・石田博樹博士・久田博元氏・嘉屋正彦氏・松村憲吾氏・東田克也氏・川戸章嗣所長・安部康久専務。

Gene expression in solid-state culture of *Aspergillus oryzae*

Yoji Hata

(Research Institute, Gekkeikan Co.)

担子菌きのこにおける環境応答と子実体形成の分子機構

宍戸和夫（東京工業大学大学院生命理工学研究科）

担子菌きのこの子実体形成は顕微鏡サイズの菌糸細胞が集合・分化して肉眼ではっきりと見える構造物をつくる劇的なイベントであり、真核微生物における代表的な形態形成の一つである。これは次のようである。交配型の異なる一核菌糸(n)の接合により生じた二核菌糸(n+n)が伸長と枝分かれ、菌糸間の接着により菌糸体となる。光、温度などの条件が整うと栄養成長から生殖成長へと切り換わり、膜状菌糸、菌糸塊、そして子実体原基をつくる。子実体原基から柄と傘ができ未成熟子実体となり、成熟して子実体となる。傘の裏側には子実層、子実下層および実層からなる子実層托(ひだ)があり、子実層の先端細胞が膨らんで担子器となり、ここで担子胞子がつくられる。担子胞子が発芽・成長して一核菌糸となる。このような子実体形成の分子機構を解明すべく、演者らはシイタケ (*Lentinula edodes*) を材料として研究を進めてきた。以下にこれまでに得られた研究成果をまとめる。

1. 子実体形成を誘導する環境因子、光、温度

シイタケの場合、27℃、暗黒下である程度まで栄養増殖した菌糸体を近紫外から青色の波長領域(330~520 nm)の光を照射し培養すると菌糸体が茶褐色に着色する。茶褐色となった菌糸体を湿度75~85%に保ちながら、16~20℃(低温)、光照射下で培養すると子実体が発生する。なお、27℃、暗黒下で培養を続けた場合には、菌糸体が劣化するだけで子実体の発生は見られない。これらのことは、子実体発生に青色光受容器や低温で誘導される何らかのタンパク質が関わっていることを示唆する。

2. cAMP と A キナーゼの活性化

光、温度などの環境因子と応答した菌糸が栄養成長から生殖成長に切り換わる子実体形成の誘導期には細胞内 cAMP 濃度が急に高まる。子実体原基および初期の未成熟子実体でも高濃度が維持され、濃度がその後しだいに低下する。このように cAMP は子実体形成のトリガー物質の一つと考えられるが、これを合成するアデニル酸シクラーゼは G タンパク質により活性化される。そして、cAMP は cAMP-依存性タンパク質リン酸化酵素 (A キナーゼ) を活性化する。

3. A キナーゼによりリン酸化される DNA 結合性転写因子とその標的遺伝子

(i)PRIB (565 アミノ酸) : 子実体原基・初期未成熟子実体で高程度に発現し、子実体成熟期でも発現している *priB* 遺伝子の産物で、DNA 結合性 Zn(II)₂Cys₆ モチーフと、bZIP モチーフ(塩基性アミノ酸配列とそれに続くロイシンジッパー部分からなる)、3つの核移行シグナルと考えられる配列、1つの A キナーゼによるリン酸化部位を持つ。bZIP および A キナーゼリン酸化部位を含む N-末端側断片が *S. cerevisiae* 細胞内で bZIP を介して二量体を形成し、試験管内で A キナーゼによりリン酸化されることが分かった。大腸菌内で生産させた PRIB タンパク質(リン酸化されていない)が 16 bp 配列(コンセンサス配列: 5'-GGGGGGGACAGGANCC-3')に結合することが分かった。リン酸化が PRIB の DNA 結合性にどのような影響を及ぼすかについては今のところ不明である。*priB* の上流域にコンセンサス配列に似た配列が 4 つ存在し、それらに PRIB が結合することから *priB* 遺伝子の自己転写調節が考えられる。PRIB の標的と考えられる遺伝子として他に 2 つあることが分かった。1つは *uck1* (UMP-CMP キナーゼ (227 アミノ酸) の遺伝子で、*priB* の約 2 kb 下流に同じ転写

方向で存在する。その 5'上流には上記 16 bp コンセンサス配列に似た配列が 2 つあり、PRIB がそれらに結合した。*uck1* は子実層において高発現し、実層と子実下層の菌糸細胞分岐領域においても中程度発現していることから、孢子形成および菌糸細胞分岐への関与が示唆される。標的遺伝子ではないが、*uck1* と同様にヌクレオチド代謝に関わるリボヌクレオチドレダクターゼの小サブユニット遺伝子 *rnr2* も子実層、および実層と子実下層の分岐領域において高発現していた。もう 1 つは *S. cerevisiae* YJ40 (YJL070C) (機能不明) のホモログである。本遺伝子は子実体の成熟時に特に高程度に発現しており、その発現産物と YJ40 (YJL070C) タンパク質には *S. cerevisiae* 26S プロテアソームの SEN3 サブユニットにある程度の相同性を示す領域が 2 回繰り返して存在していた。遺伝子の特定、具体的機能については今後の解析に待たねばならない。

(ii) Le.CDC5 (842 アミノ酸) : *priB* と同様の発現パターンを示し、*priB* の直ぐ上流に逆向きの転写方向で存在する *Le.cdc5* 遺伝子の産物で、その N 末 約 200 アミノ酸が *Sch. pombe cdc5* 遺伝子産物 Sp.CDC5 の N 末領域と特に高い相同性を有し、その中に Myb-型 DNA 結合ドメインがある。Le.CDC5 は中央にプロリンに富む活性化ドメイン、C 末側に 2 つの A キナーゼリン酸化部位、それらに挟まる形でロイシンジッパーが存在する。DNA 結合ドメインと活性化ドメインの間に 3 つの核移行シグナルと考えられる配列がある。A キナーゼリン酸化部位とロイシンジッパーを含む C 末側断片は *S. cerevisiae* 細胞内でロイシンジッパーを介して二量体を形成し、試験管内で A キナーゼによりリン酸化されることが分かった。Le.CDC5 の大腸菌内生産を試みたがうまくいかなかった。そこで DNA 結合ドメインを含む N 末断片を調製し調べたところ、7 bp 配列 (コンセンサス配列: 5'-GCAATGT-3') に結合することが分かった。Le.CDC5 の標的遺伝子を含むと考えられる DNA 断片を 2 つ分離し、それらの塩基配列を決定した。うち 1 つについては、実際に Le.CDC5 が結合することが確認されたコンセンサス配列に似た配列の下流に、NADH-ユビキノンオキシドレダクターゼに部分的に類似したアミノ酸配列をコードする領域が存在することが分かった。現在、残る 1 つの DNA 断片にコードされる遺伝子を特定すべく解析中である。

参考文献 (総説)

1. K. Shishido: The application of molecular genetics to oriental mushrooms. In: J. R. Kinghorn and G. Turner (Eds.), *Applied Molecular Genetics of Filamentous Fungi*, Blackie Academic and Professional, Glasgow, p.201-213 (1992)
2. 宍戸和夫: きこの分子生物学—最近の進歩—、蛋白質核酸酵素、39: 906-919 (1994)
3. 宍戸和夫: 担子菌きのこの子実体形成の分子機構 (ミニレビュー)、日本農芸化学会誌、76 巻 10 号、17 ~19 頁 (2002)
4. 宍戸和夫 (編著): キノコとカビの基礎科学とバイオ技術、アイピーシー刊 (2002)

Molecular mechanism of environmental response and fruiting-body formation in the basidiomycete mushroom

Kazuo Shishido (Graduate School of Bioscience and Biotechnology, Tokyo Institute of Technology)

病原糸状菌—植物相互作用における宿主オキシダティブースト系を巡る攻防

道家紀志・吉岡博文（名古屋大学大学院生命農学研究科）

一概に植物病原糸状菌の感染といっても、その戦略・戦術は菌の種類により異なりその菌と植物の攻防の機構は多様である。植物のクチクラ・細胞壁を突破し侵入する菌に対する植物の防御応答には、共通に、過敏反応とよぶ急速な細胞死・褐変反応が見られ、早かれ遅かれ侵入菌の増殖が止まる。そこには健全状態では起こっていない各種の防御に貢献すると考えられる代謝が、遺伝子の転写・翻訳あるいは酵素の活性レベルで、時間的な流れを伴って誘導され活性化されてくる。しかし、侵入してくる菌に対して感染の進展を許し発病する場合には、防御代謝が誘導されないか、低いレベルか遅れて誘導されるのが一般的である。

本シンポジウムで話題にするナス科植物と *Phytophthora* 属菌との間にも、非宿主と宿主の関係ならびに宿主関係にあっても品種レベルで非親和性と親和性関係があり、抵抗性と罹病性の関係となるが、それぞれ前者では過敏反応が見られ、後者ではそれが無く全身的感染と発病に到る。

ジャガイモ疫病菌 (*P. infestans*) は典型的なレース—品種特異的關係を示し、それは宿主側の真性抵抗性遺伝子と菌レースの遺伝子との関係で成立し、前者はメンデルの法則に従い優性形質として遺伝することが判明している。一方、菌の交配実験が困難なため菌側の非病原性遺伝子または病原性遺伝子の実態は不明な状態である。宿主には種に渡って、*P. infestans* に対して 1 1 種の真性性抗生遺伝子 (Rn) があることが判明している。*Solanum demissum* には 4 種の真性抵抗性遺伝子 (R_1, R_2, R_3, R_4) があり、それぞれの 4 つの組合せで組み込まれた変異種 (品種) が存在する。それぞれの品種には、それを侵すことができるレース (たとえば、 R_1 や $R_1R_2R_3R_4$ 侵すレースをそれぞれレース 1 やレース 1.2.3.4 と命名)。*P. infestans* はいずれのレースも各種のトマト品種に対して親和性で侵すが、ピーマンやタバコには非宿主であるが侵入し過敏反応を誘導する。ピーマンやタバコには、それぞれ病原菌の *P. capsici*, *P. nicotiana*, var. *nicotianae* などの病原性疫病菌があり、それぞれでもレース分化が見られる。これらは、非宿主にも侵入力をもち過敏反応を誘導する。

これらの例において、非宿主関係および非親和性の宿主関係においては、いずれも過敏細胞反応が見られ、菌の宿主内増殖を極限化する抗菌的環境が生じる。*P. infestans* の非親和性レースおよび親和性レースの感染において、極端に異なる宿主細胞応答が見られるが、上流における分岐点において寄生の成立・非成立を方向づける決定的な反応があるはずである。演者は 1983 年、この特徴をもつ反応として急速な活性酸素種を生成する反応である「オキシダティブースト (OXB)」現象を見出した。この反応は非親和性レースの侵入直後の感染現場で、宿主の原形質膜に局在する O_2 生成 NADPH 酸化酵素が活性化することにより起こることが判明した。親和性レースの侵入現場では、その反応は起こらない。ナス科植物細胞は菌に対する真性抵抗性の有無または種類に関わりなく、いずれの *Phytophthora* 属の非病原菌および病原菌の細胞壁成分 (HWC, グルカンセルロースからなる) を認識し、非病原菌あるいは非親和性レースの感染と酷似した過敏反応を示す。HWC と接触した植物細胞 (切断面細胞、培養細胞、プロトプラスト) は 1—2 分のラグタイムの後、急激な活性酸素生成反応を一過性に起こす。感染では過敏反応を起こすことのない親和性レースでも、それ由来の HWC に対しても同様な応答が起こり、その下流では防御に関連する代謝が誘導される。

真性抵抗性遺伝子が関与する感染の特異性は、遺伝子対遺伝子説に合致し、真性抵抗性遺伝子産物は受容体で菌側の非病原性遺伝子の産物は特異的エリシターに対応するものと理解されている。いくつかの菌と宿主の間でその証拠も得られてきている。非病原性遺伝子産物の特異的エリシターは宿主に OXB を誘導する活性をもっている。ジャガイモ疫病菌とジャガイモ植物の関係でも、この説に従えば、非親和性レースにあって親和性レースにないエリシター成分が予想されるが、説通りには事は運んでいない。逆に、非親和性レースの感染や HWC 処理により起こる過敏反応や OXB 反応を抑制するレース特異的な因子が胞子発芽液中に分泌されることが確認された。

その活性成分はホスホ β -1,3, 1-6-グルカン (平均重合度: 20) であり、これをレース特異的サブプレッサーグルカンとして提案した。侵入菌糸と宿主原形質膜とが直接接触する現場を想定し、宿主組織のプロトプラストに HWC を添加すると速やかに原形質の凝集応答が起こるが、サブプレッサーグルカンが親和性関係にある品種の HWC 誘導性の細胞応答を抑制することが明らかとなった。また、HWC 誘導の原形質凝集反応の抑制は宿主に対しては起こるが、非宿主に対しては起こさないことも示された。この因子は、宿主および品種における感染の特異性の方向を決める因子として注目されたが、さらに、HWC 処理は原形質凝集反応のみならず原形質膜外に O_2 を生産する反応を活性化させることも確認され、同時に、この反応も親和性レース由来のサブプレッサーグルカンにより阻害されることも明らかとなった。

OXB 反応が起こるか起こらないかが下流の防御反応を誘導するかどうかを証明すれば、サブプレッサーグルカンの機能が寄生関係の特異性の機構解明に決定的な意味をもつことになる。菌の接種や HWC 処理による OXB の誘導系で、 O_2 生成 NADPH 酸化酵素系の活性化阻害 (EGTA 処理)、酵素の特異的阻害 (DPI 処理)、活性酸素種の消去 (SOD とカタラーゼ、Tiron などの処理) などにより、過敏反応の抑制や防御遺伝子の発現や代謝誘導の抑制が確認され、薬理的には OXB が防御関連代謝の誘導と密接に関連することが推定された。

ジャガイモとタバコ植物より、OXB の活性を担う NADPH 酸化酵素複合体の反応中心と思われるタンパク

質の cDNA、StrbohA と StrbohB および NbrbohA と NbrbohB をクローニングし、それらのアミノ酸アライメントより酵素ユニットの構造を推定するとともに、A タイプは常時発現、B タイプは応答誘導性であることを示した。それらのシークエンスの一部を PVX ベクターにアンチセンス方向に組み込み感染させることにより、それぞれがサイレンシングされる状態になり、エリシターに対しても OXB の発現が激減した状態であることを確認した。このような組織で、非親和性レースを接種し、菌の感染行動と宿主組織応答を調べると、菌の感染が親和性レース型の感染行動に変わり、宿主組織は菌の全身的な侵攻を受けて疫病病徴を示すようになった。このように、OXB の発生系をつぶすと、防御応答が消失または低下し、罹病型に変換することから、OXB の発生の有無が宿主の動的防御が成功裏に発現するかどうかにおいて決定的な意味をもつことが明らかとなってきた。この意味で、菌の分泌するサブプレッサーグルカンの OXB の発生抑制機能は、感染戦略上、決定的に重要な意味をもつことが示唆される。

切断面組織や培養細胞に、サブプレッサーグルカンを前処理し非親和性レースを接種または HWC を処理する方法で、OXB の発生への影響を調べると、それぞれ単独で誘導される一過性の OXB 反応が、親和性レース菌由来のサブプレッサーグルカンの処理に限って強い阻害作用が見られる。しかし、果たしてこの原理が菌の侵入現場で起こっているかは不確定である。菌の感染現場では、付着器下で細胞壁を貫入する侵入糸が形成され、そこから可塑性のある菌体が挿入されて、まず球形の第一次侵入菌糸嚢が形成される。侵入菌糸嚢は直接宿主細胞の原形質膜と密着するが、この時点で、OXB も原形質凝集反応が始まっているのである。細胞壁を持たない遊走子の磨砕物にはエリシター活性が無いが、遊走子懸濁液を振とうし、同調的に被嚢胞子化（細胞壁形成）処理した 10 分後の磨砕物にはエリシター活性が生じることから、第一次侵入菌糸嚢には初期には細胞壁は完成しておらず、侵入完了後、速やかに細胞壁を形成し表面にエリシター因子が生じると推定している。そうであるならば、侵入菌糸嚢が完成しエリシター分子が受容体と反応する以前に、サブプレッサー分子がその反応を抑制しなければならない。この仮定をもとに、モデル感染系として、付着器を形成し侵入するセロファン透析膜上に遊走子を接種し、侵入菌糸嚢を形成したセロファン膜内液より、ホスホグルカンを精製し、また、侵入菌糸嚢を膜内面からかき取り、グルタルアルデヒド固定し、脱脂処理したものを宿主原形質膜表面と接触する侵入菌糸エリシターとして用いた。宿主植物より酵素的に調製したプロトプラストに侵入菌糸嚢を添加すると、表面に付着し、OXB 反応とともに原形質凝集反応が速やかに起こった。プロトプラストにサブプレッサーグルカンを、侵入菌糸嚢を加える 5 分前に添加すると、親和性レース由来のグルカンは OXB 反応も原形質凝集反応も抑制した。非親和性レース由来のグルカンはほとんど抑制作用は見られなかった。さらに、その抑制効果を示す処理のタイミングを見ると、侵入菌糸嚢エリシターの添加 10 秒前にグルカン処理することで有意な抑制効果が見られ、10 秒後にはその効果は激減した。

このモデル実験は、OXB 反応が宿主細胞が侵入者を異物として認識し防御のための代謝の誘導を統御す機能をもつことから、その活性の抑制を戦略として菌の寄生性が進化している可能性を示唆している。OXB 系は罹病性であろうと抵抗性品種であろうと、植物共通にセットされたシステムで、その酵素系の上流に位置する活性化制御系に防御のための橋頭堡が築かれていることになる。菌はこの橋頭堡の機能を抑制することを基本的戦略とし、サブプレッサーのような戦術因子を獲得したものである。さしあたり宿主の真性抵抗性遺伝子は、橋頭堡を築く基盤因子の設計図で、菌の戦術に対応しているのと考えられ、興味ある研究課題として残されている。

この OXB の発生は、*Phytophthora* 属菌のみならず、他の糸状菌や細菌あるいはウイルス感染においても、過敏反応が見られ場合に起こっており、寄生が成立するような場合には、その OXB 反応が起こらないか、または遅延が見られている。植物の誘導抵抗性応答における上流に位置し発生する OXB 反応は、下流の各種の防御反応を統御する重要な反応である。寄生菌が OXB 系を標的とする寄生戦略は極めて有効な戦略ではある。しかし逆に、その戦略に対抗できる戦術を宿主に付与できれば植物は自力で感染を防御できるシステムを有効に発現できるはずである。菌と植物は OXB を巡り攻防を繰り返し進化していることが考えられ、その分子機構を解明する中で進化の法則が明らかになってくると思われる。その解明は、耐病性植物の作出あるいは植物免疫誘導剤の開発などによる病害防除技術の開発の重要な基盤になると考えられる。

Offense and defense around the oxidative burst system in plant-pathogenic fungus interactions

Noriyuki Doke and Hirohumi Yoshioka

(Grad. School of Bioagricultural Sci., Nagoya Univ.)

O-1

イネいもち病菌 3 量体 G 蛋白ベータサブユニットによるアデニレートシクラーゼの制御

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

イネいもち病菌において cAMP は付着器 (感染時特異的器官) 形成や胞子発芽に重要な役割を果たしている。これまでに作成した 3 量体 G 蛋白 β サブユニット欠損変異株 (mgb1) では胞子発芽の遅れや、付着器形成ができなくなるといった形質を示されたが、これらの欠損形質は cAMP の添加により部分的に回復することが観察されてきた。そこで、MGB1 の菌体 cAMP 量を測定したところ、野生型の約 30% まで低下していた。また、MGB1 を多コピーで導入した菌株では、付着器形成が非誘導条件下で観察され、菌体 cAMP 量が野生型の 3 倍以上まで増加した。これらの結果は、Mgb1 により adenylate cyclase が制御を受けていることを示唆していると考えられる。

Heterotrimeric G-protein beta subunit is upregulating adenylate cyclase in *Magnaporthe grisea*

Marie Nishimura & Jin-Rong Xu

(NIAS, Japan, Purdue Univ. USA)

O-2

Gibberella fujikuroi の三量体 G タンパク質 β サブユニットは交配における雌性稔性と病原性に関与する

井山真琴, 金子功¹, 寺岡徹, 有江力 (農工大・¹UC Berkeley)

サトウキビしょう頭腐敗病の病原菌 *Gibberella fujikuroi* mating population B (anamorph *Fusarium sacchari*) FGSC7610 株 (MAT1-2), FGSC7611 株 (MAT1-1) の, 三量体 G タンパク質 β サブユニット遺伝子 (*gfgb1*) (井山ら, H14 年度日本植物病理学会大会) をそれぞれ二回相同組換えにより破壊した株は, 分生子の形成や生育速度等の菌学的性状については, 親株および対照株と殆ど差異が見られなかった. ところが両菌株の *gfgb1* 遺伝子破壊株でサトウキビ切葉に対する病原性が低下した. ところで, 本菌は平板培地で生育させた菌叢 (♀) 上に交配型が異なる株の分生子懸濁液 (♂) をかけることによって交配し, 完全世代を形成する. 雌性稔性・雄性稔性である FGSC7611 株の *gfgb1* 遺伝子破壊株を♀として FGSC7610 株 (♂) と交配したところ, 完全世代が形成されなくなることを見出した. 一方, 雌性稔性不全・雄性稔性である FGSC7610 株の *gfgb1* 遺伝子破壊株を♂として FGSC7611 株 (♀) と交配した場合には正常に子嚢殻, 子嚢及び子嚢胞子を形成した. 以上より, 三量体 G タンパク質 β サブユニットは, 交配時の雌性稔性とサトウキビに対する病原性に関与していることが示唆された.

G protein β -subunit is related to female fertility in mating and pathogenicity to sugarcane

Makoto Iyama, Isao Kaneko¹, Tohru Teraoka, Tsutomu Arie

(Tokyo Univ. Agric. & Tech., ¹California Univ. at Berkeley)

O-3

イネいもち病菌のヒスチジンキナーゼの浸透圧ストレス応答への関与

大平寛大,^{1,2} 本山高幸,¹ 門倉香,³ 一石昭彦,² 藤村真,² 山口勇,³ 工藤俊章,¹

(1 理研 2 東洋大・生命科 3 理研 PSC)

イネいもち病菌のイネへの感染において細胞内の膨圧の制御が重要であることから、このような制御に関わる可能性があるヒスチジンキナーゼの機能に注目して解析している。この研究の過程でイネいもち病菌のヒスチジンキナーゼ遺伝子 *HIK1* の破壊株は親株と比較して高濃度の糖による浸透圧ストレスに対する感受性が高まるが、高濃度の塩に対する感受性は変化しないという現象を見いだした。これは近縁の糸状菌アカパンカビにおいて *HIK1* の機能ホモログ *os-1* の変異株が糖と塩の2種類の浸透圧ストレス両方に対して感受性に変わるのと対照的である。この現象を解析するため、イネいもち病菌の *HIK1* 破壊株とその親株の糖および塩ストレスに対する細胞内応答を比較した。高浸透圧に対する細胞内応答は通常は細胞内のグリセロールやアラビトールなどの溶質濃度を上昇させることによりなされるため、これらの溶質の蓄積パターンをGC/MSにより解析した。その結果、まず親株において糖および塩ストレスに対するグリセロールやアラビトール等の蓄積パターンが異なることが明らかになり、更に破壊株では糖ストレスに対するグリセロールの蓄積レベルのみが低下する傾向が認められた。

Involvement of a putative two-component histidine kinase of the rice blast fungus in osmotic stress response

Tomohiro Ohira,^{1,2} Takayuki Motoyama,¹ Kaori Kadokura,³ Akihiko Ichiishi,² Makoto Fujimura,² Isamu Yamaguchi,³ Toshiaki Kudo¹

(¹ Mol. Microbial Ecol. Div., RIKEN; ² Fac. Of Life Sci., Univ. of Toyo; ³ Environmental Plant Res. Group, RIKEN PSC)

O-4

アカパンカビの浸透圧応答 *os-4* (MAPKKK) と *os-5* (MAPKK) 遺伝子の解析

藤村真, 落合則幸, 高嶋里美, 岡田晃佳, 一石昭彦, 本山高幸*, 山口勇* (東洋大・生命, *理研)

アカパンカビの *os-1* 遺伝子産物は、二成分ヒスチジンキナーゼ (HK) であり、浸透圧のシグナル伝達に関与すると同時に、農業用殺菌剤の耐性に関与している。*os-1* 遺伝子の下流に存在すると考えられる MAP キナーゼカスケードを明らかにするため、分裂酵母の浸透圧応答 HOG 経路の *SSK22/SSK2* と *PBS2* に相同性を示す遺伝子をアカパンカビのゲノム情報から検索し、*NcSSK22* (MAPKKK) と *NcPBS2* (MAPKK) 遺伝子としてクローニングした。*NcSSK22* (MAPKKK) の破壊株は浸透圧感受性となり、殺菌剤耐性となった。*NcSSK22* 遺伝子を形質転換した *os-4* 変異株は、浸透圧、薬剤感受性が野生株型に回復した。さらに、*NcPBS2* 遺伝子は、*os-5* 変異株を野生株型に形質転換した。*os-5* 変異株から *NcPBS2* (MAPKK) 遺伝子をクローニングし、遺伝子配列を解析したところキナーゼドメインの上流に5塩基の欠失がみられ、直後に終止コドンが存在することが判明した。*os-2* 遺伝子が *HOG1* のホモログであることが報告されており、*os-1* 遺伝子の下流には、*os-4*, *os-5*, *os-2* 遺伝子からなる MAP キナーゼカスケードが存在すると考えられた。アカパンカビのゲノム情報を検索したところ、少なくとも11種類のHK遺伝子が存在し、その多くがイネいもち病菌のゲノムにも存在している。これらのHKの機能は未解明であるが、糸状菌は酵母と比較して多種のHKを利用していると考えられる。これらのHKと*os-4*, *os-5*と*os-2*からなるMAPキナーゼカスケードとの関連についても考察する。

The *os-4* and *os-5* gene encode the components of MAP kinase cascade in *Neurospora crassa*

Makoto Fujimura, Noriyuki Ochiai, Satomi Takashima, Akiyoshi Okada, Akihiko Ichiishi, Takayuki Motoyama

, Isamu Yamaguchi (Life Sciences, Univ. of Toyo, *Riken PSC)

O-5

白色腐朽菌におけるバニリン添加に応答した NAD(P)H 産生機構

志水元亨、割石博之、田中浩雄（九大院・農）

【目的】白色腐朽菌は細胞外に強力な一電子酸化酵素を分泌し、非特異的にリグニンの断片化を行う。これらは細胞内に取り込まれた後、種々の細胞内酵素の関与により完全に無機化されると考えられる。すでに本研究室において、芳香族化合物添加により誘導されるシトクローム P450 の存在が明らかとなっている。また、代表的なリグニン分解フラグメントであるバニリン添加により、*Phanerochaete chrysosporium* の細胞内タンパク質発現挙動変化を追跡したところ、キノンレダクターゼおよびジオキシゲナーゼの発現量が増加していた。バニリンの変換に関与しているとされるシトクローム P450 やキノンレダクターゼは補酵素として NAD(P)H を必要としていることが知られていることから、白色腐朽菌における芳香族化合物応答的な NAD(P)H 産生系に興味を持たれた。NAD(P)H 産生系の一つとして、isocitrate dehydrogenase が知られているが、シュウ酸合成能が高い担子菌においては isocitrate lyase 活性が非常に高く isocitrate dehydrogenase および 2-oxoglutarate dehydrogenase 活性が低いことが報告されている。そこで、バニリンを添加した担子菌から無細胞抽出液を調製し、それらの活性を測定した。

【方法および結果】バニリンを添加し培養した菌体から抽出したタンパク質を二次元電気泳動に供した。コントロールと比較して発現量が増加したタンパク質を同定した結果、芳香族化合物代謝に関与する酵素、抗酸化酵素、解糖系に関与する酵素をはじめ、種々のタンパク質が同定された。さらに、無細胞抽出液を用いて細胞内酵素活性を測定したところ、バニリンを添加した場合 isocitrate dehydrogenase および 2-oxoglutarate dehydrogenase 活性が増加していた。芳香族化合物代謝に関与する酵素の多くは補酵素として NAD(P)H を必要としていることから、白色腐朽菌はバニリンの添加に応答して解糖系および TCA 回路中の NAD(P)H 産生系を活性化していると考えられた。

NAD(P)H production in *Phanerochaete chrysosporium* responsive to exogenously added vanillin.

Motoyuki Shimizu, Hiroyuki Wariishi, Hiroo Tanaka

(Faculty of Agriculture, Kyushu Univ.)

O-6

白色木材腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* の菌体外セルロース分解系におけるセロビオース脱水素酵素と β -グルコシダーゼの機能

五十嵐圭日子、谷知美、吉田誠、鯨島正浩（東大院・農生科）

糸状菌によるセルロースの分解は、セルラーゼや β -グルコシダーゼ (BGL) などの菌体外の加水分解酵素系によって、セルロースがセロビオースを経てグルコースに変換され菌体内に取り込まれると考えられてきた。しかし、木材腐朽担子菌などの多くの糸状菌は、セルロース分解時にこれらの加水分解酵素に加えてセロビオース脱水素酵素 (CDH) を菌体外に生産することから、セルロース分解における酸化還元反応の重要性が指摘されている。CDH はセロビオースやセロオリゴ糖の還元末端を酸化してラクトンを生成する反応を触媒することが知られており、その存在は BGL の活性に影響を与えられられる。そこで本研究では、白色木材腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* 由来の CDH と BGL の生化学的および分子生物学的解析を行い、菌体外セルロース分解系における二つの酵素の機能を考察した。

セロビオースに対する CDH と BGL の反応効率を比較したところ、CDH の反応効率は BGL の 150 倍以上に達した。また、BGL が CDH の反応生成物であるセロビオノラクトンを基質とはできなかったこと、BGL 遺伝子の発現がセルロース分解に対応していなかったことから、*P. chrysosporium* による菌体外セルロース分解系に BGL が関与していない可能性が示唆された。さらに、種々の β -グルカンに対する反応効率の比較から、BGL は菌糸壁を構成するグルカン層の分解に関与していると考えられた。

Function of cellobiose dehydrogenase and β -glucosidase in extracellular cellulose degradation by the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*

Kiyohiko Igarashi, Tomomi Tani, Makoto Yoshida, Masahiro Samejima (Univ. Tokyo)

O-7

分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* の dikaryon としての分裂様式

岡崎孝映, 丹羽修身 (かずさ DNA 研究所)

我々は分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* で dikaryon として増殖する変異株を取得した。分裂酵母は通常 monokaryon としてしか増殖しないが、その変異株は窒素源が乏しい培地で dikaryon となり、窒素源を与えて再び増殖させると dikaryon のまま比較的安定に増殖できる。その核分裂を録画解析したところ、細胞軸に対して縦に離れて位置していた A, B 二つの核は、分裂前に細胞の中心部に移動して接近し、同調して分裂期に入った。分裂前期ではそれぞれの核のスピンダル極の片方は互いに近接していた。分裂後期に入るとスピンドルが交差して、A, B それぞれの核が分裂した娘核は細胞軸に対して A, B, A, B と並んだ。細胞隔壁は細胞の中心に一枚だけ形成され、二つの娘細胞はいずれも A, B 両方の核を受け継いだ。今後分裂酵母の dikaryon としての分裂様式を制御する因子を分子遺伝学的に解析してゆくつもりであるが、元来 dikaryon としての生活環を有する糸状菌における分裂様式との比較関連についてなど、ご意見を賜りたい。

Mode of division as a dikaryon of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*.

Koei Okazaki, Osami Niwa

(Kazusa DNA Res. Inst.)

O-8

糸状菌 *Aspergillus nidulans* のミオシン様ドメインを持つキチン合成酵素 (CsmA) の生体内における局在、ミオシン様ドメインの機能解析

竹下典男, 堀内裕之, 太田明徳 (東大院・農生科・応生工)

キチンは糸状菌の細胞壁の主要構成成分であり、菌糸状の形態形成、維持に関わると考えられる。*A. nidulans* の *csmA* はキチン合成酵素ドメインのN末端側にミオシン様ドメインを持つ 1852 アミノ酸からなる特異な構造をしたタンパク質 (CsmA) をコードしている。*csmA* の破壊株では菌糸の途中が膨らむ balloon の形成、菌糸の中に新たに菌糸が生じる菌糸内菌糸の形成、低浸透圧感受性などが観察される。CsmA の生体内での局在について検討するため、*csmA* の ORF の C 末端側に 9 xHA の tag がつながった形のタンパク質 CsmA-HA を野生型のかわりに発現できる株 (CA2 株) を作製し、間接蛍光抗体法により解析したところ、菌糸の先端付近に小胞状に局在していることが観察された。CsmA のミオシン様ドメインの機能を *in vivo* で解析するため、ミオシンでよく保存されており ATP との結合において重要な領域の 1 つのアミノ酸を置換した改変体を発現する株を 2 株作製したが、表現型は野生株と同様であった。このことから、CsmA のモーター活性が生育に必須な機能ではないことが示唆された。現在、C 末端側に 9 xHA の tag が連結し CsmA のキチン合成酵素ドメインだけを発現する株を作製し、ミオシン様ドメインの CsmA の局在化における役割、ミオシン様ドメインとアクチンとの関わりについて検討中である。

Localization of CsmA (chitin synthase with a myosin motor-like domain) in *Aspergillus nidulans* and functional characterization of its myosin motor-like domain.

Norio Takeshita, Hiroyuki Horiuchi, and Akinori Ohta

(Dept. Biotechnol., Univ. Tokyo)

O-9

Woronin body 形成に關与する *hex-1* 遺伝子の *A. oryzae* ホモログ遺伝子(*hexA*) の機能解析

丸山潤一^{*}、三並正芳、岩崎琢磨、北本勝ひこ（東大院・農生科・応生工、^{*}生研機構）

[目的] Woronin body は子囊菌類および不完全菌類に存在するオルガネラであり、菌糸損傷時に溶菌がほかの細胞に伝播しないように隔壁孔をふさぐ働きを有する。*N. crassa* などいくつかの糸状菌では、Woronin body の形成に關与する *hex-1* 遺伝子の存在が最近明らかになった。麹菌 *Aspergillus oryzae* は培養条件により溶菌することが経験的に知られているが、その分子機構についてはほとんどわかっていない。演者らは溶菌の分子機構の解明を目的として、*hex-1* 遺伝子ホモログ (*hexA* 遺伝子) を *A. oryzae* よりクローニングした¹⁾。今回は、*hexA* 遺伝子の機能解析をしたので報告する。

[方法と結果] 演者らはこれまでに、*hexA* 遺伝子産物の局在を調べるために *egfp* 遺伝子と融合して発現したところ、隔壁近傍に点状の EGFP 蛍光を観察した。さらに、菌糸を損傷させたところ、損傷したコンパートメントに隣接する隔壁の中央に EGFP 蛍光が集中した。このことから、HexA タンパク質が溶菌時に隔壁孔をふさぐ働きを有することが示唆された。また、*hexA* 遺伝子の機能解析を目的として遺伝子破壊を行った。*hexA* 遺伝子破壊株では、野生株と比べて生育は著しく低下し、ほとんど分生子を形成しなかった。現在、その表現型について詳細な解析を行っている。

1) 丸山ら、日本農芸化学会 2002年度大会要旨集 p.170

Functional analysis of *A. oryzae* homologue of *hex-1* gene involved in formation of Woronin body.

Jun-ichi Maruyama^{*}, Masayoshi Minami, Takuma Iwasaki, Katsuhiko Kitamoto

(Dept. of Biotechnology, Univ. of Tokyo, ^{*}BRAIN)

O-10

Aspergillus oryzae のテロメア配列

楠本憲一、鈴木聡、柏木豊（(独)食総研）

Aspergillus oryzae NFRI1599 の4種類のテロメア様配列をクローニングした。本菌の染色体DNAに対して、BAL31 エキソヌクレアーゼ消化試験を行ったところ、染色体内部配列である18S rDNAと比較して、これらのテロメア様配列はすみやかに消化された。従って、得られたテロメア様配列は染色体最末端に存在するテロメアそのものであることが明らかになった。*A. oryzae* のテロメア繰り返し配列は12塩基よりなり、その配列はTTAGGGTCAACAであった。この繰り返し配列のうち、最初の6塩基TTAGGGは *Aspergillus nidulans* をはじめ数種の糸状菌のテロメア繰り返し配列と同じ配列であった。しかし、後半6塩基TCAACAは、他の生物のテロメア繰り返し配列としての報告はなく、今回新たに得られた *A. oryzae* のテロメア配列は本種に独特のものであった。テロメア繰り返し配列をプローブとした染色体DNA EcoRI 消化物のサザン解析では、約15個のシグナルが検出されたため、得られた繰り返し配列は *A. oryzae* 染色体の全ての末端領域に位置していると考えられた。テロメア繰り返し領域の長さは114~136bpであり、これは12塩基の繰り返し配列の9~11回分に相当する。この長さは *A. nidulans* で報告されているものに近いため、テロメアの長さを制御する機構は、繰り返し配列が異なっているにもかかわらず *Aspergillus* 属菌で保存されていることが示唆された。

Telomere sequence of *Aspergillus oryzae*

Ken-Ichi Kusumoto, Satoshi Suzuki, Yutaka Kashiwagi

(National Food Research Institute)

O-11

Aspergillus nidulans の分生子の極性化時における DNA 損傷修復の役割

水谷真也, 夏目豊彰, 伊藤建夫, 伊藤靖夫 (信州大・理)

A. nidulans の分生子 (無性胞子) は、周囲の水分と炭素源を認識すると、膨潤 (非極性成長) し、その後、発芽 (極性成長) する。この非極性成長から極性成長への移行には最初の核分裂が必須である。しかし、栄養条件の変化や核分裂の阻害によって、この依存性は失われる場合がある。このような核分裂と極性化の脱共役が起こる時期は、異数性、及び致死性が生じる時期と一致することが指摘されている。出芽酵母 *RAD51* のオーソログである *uvsC* の破壊系統において、メチルメタンスルホン酸 (MMS) 処理を行ったところ、核分裂と極性化の脱共役が観察された。出芽酵母 Rad51 は、減数分裂および DNA 二重鎖切断 (DSB) 部位の組換え修復の際に、DNA 鎖間の相同性検索に関与している。また、MMS はアルキル化剤であるが、本剤による DNA 損傷の修復系は遺伝学的に DSB 修復系と強く連鎖していることが知られている。これらのことから、*uvsC* 系統においては、MMS による損傷が効率的に修復されず、核分裂周期の特定の時期に異数性および致死性に至ると考えられた。*uvsC* 系統において、直接的に DSB を引き起こすフレオマイシンや S 期進行阻害剤であるヒドロキシ尿素を処理した際にもこれらの脱共役が観察されたことから、DNA 損傷の修復と分生子の極性化との関連が示唆された。

Role of DNA damage repair on polarization of conidia of *Aspergillus nidulans*

Shinya Mizutani, Toyoaki Natsume, Tateo Itoh, Yasuo Itoh

(Fac. of Science, Univ. of Shinshu)

O-12

Aspergillus nidulans の *RAD51* オーソログ過剰発現系統における遺伝子ターゲティング

夏目豊彰, 江草真由美*, 児玉基一朗*, 伊藤建夫, 伊藤靖夫 (信州大・理, *鳥取大・農)

出芽酵母の Rad51 は、減数分裂時および DNA 二重鎖切断部位の修復時に、DNA 鎖間の相同性の検索と鎖交換反応に重要な役割を果たす。*A. nidulans* における本遺伝子のオーソログ、*uvsC* の欠失系統では、*argB* 座において、1.7-kb 断片の相同組込みが検出されない。本研究では、*uvsC* の転写量を上げることによって、遺伝子ターゲティング頻度を上昇させることを試みた。*uvsC* の上流域を、グリセルアルデヒド 3 リン酸デヒドロゲナーゼ、およびタカアミラーゼ A のプロモーターで置換した系統を構築した。前者は、一般的に恒常的な発現用に用いられており、今回構築した系統では転写量が約 180 倍に上昇していた。しかし、DNA 損傷を引き起こすメチルメタンスルホン酸に対する感受性は、対照系統と同程度であった。野生型の *argB* を部分的に含む断片を用いて、ターゲティング頻度を測定した結果、上昇の程度は 2-3 倍であった。一方、後者はマルトース等によって誘導が可能であり、これによって構築した系統では、転写量が約 650 倍に上昇した。しかし、誘導条件下ではコロニー形成が著しく抑制された。現在、*argB* 座よりターゲティングの頻度が低い *pyroA* 座において、これらの系統のターゲティング頻度を検定している。

Gene targeting in overexpressing strains of *RAD51* ortholog in *Aspergillus nidulans*

Toyoaki Natsume, Mayumi Egusa*, Motoichiro Kodama*, Tateo Itoh, Yasuo Itoh

(Fac. of Science, Univ. of Shinshu and *Fac. of Agriculture, Univ. of Tottori)

O-13

麹菌 *A. oryzae* における *VAM3* 相同遺伝子の単離と解析

正路淳也、有岡学、北本勝ひこ（東大院・農生科・応生工）

【目的】液胞は細胞内イオンの恒常性維持、膨圧の調節、タンパク質などの分解、再利用など重要な機能を有しているが、植物や酵母に比べ麹菌においては研究が遅れている。また、産業的に重要な液胞内局在酵素の輸送という観点からも興味を持たれる。本研究では麹菌の液胞機能に関する知見を得ることを目的とし、*S. cerevisiae* の液胞膜 t-SNARE をコードする *VAM3* 遺伝子の、麹菌 *A. oryzae* における相同遺伝子のクローニングを試みた。

【方法及び結果】*A. oryzae* EST database の情報をもとに、*S. cerevisiae* *VAM3* 相同遺伝子ならびに cDNA を取得した。この遺伝子は一つのイントロンを含み 271 アミノ酸からなるタンパク質をコードすると推定された。予想されるアミノ酸配列は、*S. cerevisiae* の *Vam3* と 24%、プレ液胞コンパートメントの t-SNARE である *Pep12* と 29% の相同性を有していた。単離した cDNA は、*S. cerevisiae* *vam3* 破壊株の液胞形態の異常、 Ca^{2+} 感受性および *pep12* 破壊株の CPY 活性欠損、温度感受性の形質をそれぞれ相補した。また、この遺伝子産物の N 末に EGFP を融合して *A. oryzae* において発現させたところ、蛍光は液胞膜およびより小さな丸い構造体に観察された。現在機能解析を目的として、遺伝子破壊株の作製を行っている。

Cloning and characterization of a putative homologue of yeast *VAM3* gene from *A. oryzae*.

Junya SHOJI, Manabu ARIOKA, Katsuhiko KITAMOTO

(Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo)

O-14

麹菌 *Aspergillus oryzae* 単核分生子変異株を用いた宿主の開発

石一智、丸山潤一、中島春紫、北本勝ひこ（東大院・農生科・応生工）

（目的）麹菌 *A. oryzae* が多核の分生子を形成する性質は醸造特性の遺伝的安定性に寄与しているが、変異株取得及び形質転換体からのホモカリオン体取得が容易ではない。演者らは *A. oryzae* *niaD300* 株に *h2b-egfp* 融合遺伝子を *niaD* を選択マーカーとするプラスミドにより導入し核を可視化した。今回、この株を親株として取得した単核分生子を約 80% 形成する変異株 uni10¹⁾ を用いた形質転換用宿主の開発を行った。

（方法および結果）*niaD*⁺ 株では生育できない塩素酸塩を含み、窒素源をロイシンにしたポジティブセレクション用の培地に uni10 を植菌し、生育してきたコロニーより硝酸塩を資化できず、EGFP 蛍光を有さない株 (UT-N1) を取得した。この株について、サザン解析および PCR により、染色体に組み込まれていたプラスミドの脱落により *niaD* に戻っていることを確認した。この株に *niaD* を持つプラスミドを導入したところ、形質転換体が取得できた。現在、この株における形質転換効率とホモカリオン体取得効率を検討中である。また、sC との 2 重栄養要求性株の取得を試みている。

1) 石ら、日本農芸化学会 2002 年度大会（仙台）講演要旨集 p 198

Breeding of host strain using uninucleate conidia mutant of *Aspergillus oryzae*

Kazutomo Ishi, Jun-ichi Maruyama, Harushi Nakajima, Katsuhiko Kitamoto

(Dept. of Biotechnology, Univ. of Tokyo)

O-15

Peptide Mass Finger printing(PMF) 解析による黄麹菌(*Aspergillus oryzae*)分泌タンパク質のプロテオーム解析

織田健、岩下和裕、柿菌ダララット、家藤治幸、秋田修 (酒類総研)

麹菌は、清酒などの伝統的発酵食品の醸造に不必要可欠で、食品産業を中心とした様々な酵素の供給源としても利用されている安全性の高い重要な微生物である。また、近年では異種タンパク質生産の強力なホストとしても注目されている。このような麹菌酵素の重要性から、アミラーゼ類、プロテアーゼ類等を中心に多くの解析がなされているが、そのような詳細な解析がなされている麹菌酵素は、わずか一部であろうと考えられており、網羅的なプロテオーム解析が求められている。近年、麹菌の EST 解析やゲノム解析が行われ、DNA 情報を利用した網羅的なプロテオーム解析が可能となってきた。そこで本研究では、PMF 解析による麹菌分泌タンパク質のプロテオーム解析を試みた。

小麦フスマを培地として、30℃一定で、40 時間固体培養をおこない、国税庁所定分析法に従い分泌粗酵素液を調製した。1 次元目を pH3.0-10.0 の範囲で展開した 2 次元電気泳動を行い、CBB 染色により比較的明瞭なスポットについて PMF 解析を行った。In gel digestion はトリプシンより、検索は麹菌 EST データベースおよび NCBI データベースに対し行った。その結果、analyl dipeptidyl peptidase や α -amylase 等が同定された。しかしながら、広範囲にわたって α -amylase のペプチドシグナルが見られるなど、多くのスポットの同定が困難であった。そこで、疎水クロマトグラフィーにより各ピークを分画し、その後 SDS-PAGE を行ったところ、数多くの明瞭なバンドが見られた。そこで、当研究所で開発した方法により In gel deglycosylation を行った後、定法により PMF 解析を行った。その結果、95 バンド中、21 個同定する事が出来た。現在、同定タンパク質数を増やすため、微量タンパク質の同定等試みている。

Proteome analysis of extracellular proteins from *Aspergillus oryzae* by Peptide Mass finger printing analysis.

Ken Oda, Kazuhiro Iwashita, Dararat Kakizono, Haruyuki Iefuji, Osamu Akita

(NRIB)

O-16

麹菌(*Aspergillus oryzae*)のレトロトランスポゾンの構造及び発現解析

佐藤元洋¹、五味勝也¹、秋田修¹ (東北大院農・応生科,¹ 酒総研)

【目的】我が国の代表的な産業微生物である *A.oryzae* からレトロトランスポゾンを探索しその構造・機能を明らかにすると同時に、効率的な変異株の作成と変異遺伝子の解析を可能にするレトロトランスポゾンタギング法の確立を目的とした。

【結果】*Ascobolus immersus* など多くの生物の LINE 型レトロトランスポゾンに相同性を示す EST クローンをプローブとして *A.oryzae* のゲノムライブラリーからスクリーニングを行い 2 種の陽性フェージクローンを取得し、配列の解析を行った。1 つのクローンからは EST に由来するレトロトランスポゾン(*Aoret1*)を、もう 1 つのクローンからは *Aoret1* の一部と新規の LINE 型レトロトランスポゾン(*Aoret2*)を見出した。サザン解析を *A.oryzae* の RIB40 とその他の strain、及び近縁種に対しておこなったところ、RIB40 内部に *Aoret1* は 2 コピー、*Aoret2* は約 10 コピー存在しており、また *A.oryzae* の他の strain と *A.sojae* おいて *Aoret1*、*Aoret2* 共に多コピー存在することが示された。一方、*A.flavus* と *A.parasiticus* においてはマイナーなバンドしか検出できなかったことから、*A.flavus* と *A.parasiticus* において *Aoret1* と *Aoret2* は存在していないか、存在していたとしても相同性が低いことが示唆された。ノーザン解析によると *Aoret1*、*Aoret2* 共に内部にある 2 つの遺伝子が 1 本の mRNA として発現していることが示された。また、現在進行中の *A.oryzae* 全ゲノム配列解析プロジェクトの結果、上記の 2 種以外にも LTR 型も含めた 3 種のレトロトランスポゾン様配列が見出されており、解析が期待される。

Structural and expressional analysis of retrotransposons in *Aspergillus oryzae*

Motohiro Sato, Katuya Gomi, Osamu Akita¹

(Division of Life Science, Graduate school of Agricultural Science, Tohoku Univ.,¹ National Research Institute of Brewing)

O-17

Ca²⁺を持たない *Aspergillus saitoi* 1,2- α -D-mannosidase の触媒中心の決定

多田羅洋太, 李秉魯, 吉田孝¹, 高橋幸資², 一島英治 (創価大院・工, 1 弘前大・農学生命, 2 東農工大・農)

Aspergillus saitoi 1,2- α -D-mannosidase の活性中心によく保存されている酸性アミノ酸残基について部位特異的変異を行い、触媒アミノ酸残基を決定する。

Man α 1,2 Man-OMe を基質としてカイネティックパラメーターを測定した。E124Q の変異酵素は kcat 値の著しい減少が見られた。E411Q の変異酵素は完全に失活した。D269E、E273D、E414D、E474D の変異酵素は Km 値が著しく増加した。これらの結果から、本酵素の触媒中心残基は E124 と E411 であると推定される。D269、E273D、E414D、E474D は基質との結合部位であるといえる。

哺乳類や酵母の 1,2- α -mannosidase では Ca²⁺が活性に必須であると報告されている。原子吸光によりリコンビナント酵素の Ca²⁺結合数を解析したところ、本酵素は Ca²⁺を結合していなかった。本酵素を Ca²⁺で処理すると、タンパク質 1 mol 当たり 1 mol の Ca²⁺を結合することがわかったが、活性にはほとんど影響を与えなかった。酵素活性に Ca²⁺が必須ではない 1,2- α -mannosidase を初めて見出した。

結論として、*A. saitoi* 1,2- α -D-mannosidase の触媒反応は E124 と E411 の 2 つのグルタミン酸残基によって行われ、Ca²⁺は触媒反応に関与しない。

Identification of catalytic residues of Ca²⁺-independent 1,2- α -D-mannosidase from *Aspergillus saitoi* by site-directed mutagenesis

Yota Tataru, Byung Rho Lee, Takashi Yoshida¹, Koji Takahashi², Eiji Ichishima

(Graduate School of Bioeng., Soka Univ., ¹Faculty of Agric. and Life Sci., Hirosaki Univ., ²Dept. of Appl. Biol. Science, Tokyo Univ. of Agric. and Technol.)

O-18

Aspergillus oryzae によるペニシロリシンの発現と亜鉛の配位

土井ゆうこ, 李秉魯, 丸山昇太, 南田広太, 池口雅道, 一島英治 (創価大学大学院工学研究科)

ペニシロリシンは、*Penicillium citrinum* が分泌生産する亜鉛金属プロテアーゼ (M35)であり、分子質量は 19kDa で 3 つの S-S 結合を有する。今回 *Aspergillus oryzae* を宿主とした同酵素遺伝子 *plnC* の大量発現系の構築を行い、リコンビナントペニシロリシンの分子的、酵素的特性を調べた。低分子合成基質を用いた実験の結果、基質の P₁-P₂ サイトが 2 残基とも塩基性アミノ酸である場合にその C 末端側をよく加水分解することがわかった。さらに PLN の亜鉛の配位を部位特異的変異によって調べたところ、His¹²⁸、His¹³²、Asp¹⁴³ が亜鉛のリガンドであることが確認され、また HEXXH モチーフ中の Glu¹²⁹ が触媒残基としても、亜鉛のリガンドとしても重要な残基であることが明らかにされた。ペニシロリシンは、アスプジンシンという HEXXH+D からなる亜鉛結合モチーフを持つファミリーに属することを明らかにした。

Overexpression and zinc-ligands of penicillolysin identified by site-directed mutagenesis

Yuko Doi, Byung Rho Lee, Syota Maruyama, Kota Minamida, Masamichi Ikeguchi, Eiji Ichishima (Department of Bioengineering, Graduate School of Soka University)

O-19

***Paecilomyces variotii* IRI017 株由来アルコール酸化酵素遺伝子 cDNA の麹菌における発現**

林直宏、松井淳子、安田（吉野）庄子、近藤徹弥、森川豊*、北本則行*

（愛知産技研食工技、*愛知産技研・基盤技術部）

我々は、シックハウス症候群の原因となる揮発性有機化合物(VOC)の除去を目指してホルムアルデヒド分解酵素の検索を行い、*Paecilomyces variotii* IRI017 株由来のアルコール酸化酵素(AOX)がホルムアルデヒドを酸化することを確認した。本酵素を精製し諸性質の解析をした。¹⁾今回は AOX 遺伝子のクローニングを行い、麹菌に高発現させることを試みた。精製 AOX の N 末端アミノ酸配列より合成したプライマーを用いて AOX 誘導培地で培養した菌体より抽出した全 RNA を鋳型とする RT-PCR を行った。AOX 遺伝子由来する約 2.5kb の cDNA 断片の塩基配列を解析した結果、AOX は 665 アミノ酸からなり、その配列は既知のカビ AOX アミノ酸配列と約 80%の相同性が認められた。tagG2 遺伝子プロモーターを用いて AOX 遺伝子 cDNA を麹菌において発現させたところ、菌体内に高い AOX 活性を有する形質転換体が得られた。

本研究は、文部科学省の平成 14 年度科学技術振興調整費による「地域先導研究」：「カビの酵素高生産能を利用した環境調和型工業プロセス技術の基盤研究」の一環として行ったものである。

1) 日本農芸化学会 2002 年度大会講演要旨集、p.118

cDNA cloning of alcohol oxidase from *Paecilomyces variotii* IRI017 and its expression in *Aspergillus oryzae*
Naohiro Hayashi, Junko Matsui, Shoko Yoshino-Yasuda, Tetsuya Kondo, Yutaka Morikawa*, Noriyuki Kitamoto*
(Food Res. Cent., Aichi Indus. Technol. Ins., *Res. and Dev. Div., Aichi Indus. Technol. Ins.)

O-20

麹菌キシラナーゼ・セルラーゼのセルロース誘導への転写活性化因子 AoXlnR の関与

丸井淳一郎、北本則行*、加藤雅士、小林哲夫、塚越規弘（名大院・生命農学 *愛知産技研基盤技術）

AoXlnR (*Aspergillus oryzae* XlnR) は、麹菌 *A. oryzae* 主要キシラナーゼ遺伝子 *xynF1* のキシランによる誘導発現に必須の転写活性化因子として単離された。我々はこれまでに、Cys₆Zn₂ 型 DNA 結合ドメインを有する本因子が、*xynF1* プロモーター内の親和性の異なる二か所の部位に互いに独立して結合し、同遺伝子の発現を誘導することを明らかにしている。今回、AoXlnR が麹菌キシラナーゼ・セルラーゼ遺伝子のセルロースによる誘導発現にも関与することを新たに見だし、詳細な解析を行った。

A. oryzae 野生株・*AoxlnR* 遺伝子破壊株・同遺伝子高発現株を用いたノーザン解析から、AoXlnR は *A. oryzae* に存在する複数のキシラナーゼ・セルラーゼ遺伝子のキシランによる誘導発現を広く仲介する転写因子であることが確認された。更に、*AoxlnR* 高発現株では、セルロースを炭素源とした場合にキシラナーゼ・セルラーゼ遺伝子群の発現が顕著に誘導された。AoXlnR 結合配列に変異を導入した *xynF1* プロモーターと *lacZ* との融合遺伝子を用い、β-ガラクトシダーゼ活性を指標に *A. oryzae* 野生株内での発現を解析した結果、*xynF1* 遺伝子のセルロースによる誘導発現に AoXlnR が関与していることが明らかとなった。以上の結果から AoXlnR はキシランに加えて、セルロースからの誘導シグナルによってもキシラナーゼ・セルラーゼ遺伝子群の発現を誘導することが示された。

Transcriptional activator, AoXlnR, mediates cellulose-inductive expression of the xyylanolytic and cellulolytic genes in *Aspergillus oryzae*

Junichiro Marui, Noriyuki Kitamoto*, Masashi Kato, Tetsuo Kobayashi, Norihiro Tsukagoshi
(Dept. of Biological Mechanisms/fun, Nagoya Univ. *Res. & Devel. Div., Aichi Ind. Technol. Inst.)

ポスター 1 日目

P-1

酵母菌 *Pichia pastoris* による白色木材腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* 由来 β -グルコシダーゼの生産とその性質

川合理恵, 吉田誠, 谷知美, 五十嵐圭日子, 大平剛, 長澤寛道, 鮫島正浩 (東大院・農生科)

セルロース分解性糸状菌において、菌体外 β -グルコシダーゼ (BGL) はセルラーゼにより加水分解され生成したセロピオースなどのセロオリゴ糖をグルコースに変換する酵素として位置づけられてきた。しかし、白色木材腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* の BGL は、その反応特性から本質的には β -1,3-グルカン分解する酵素であることが我々の最近の研究より明らかになっている*。更に BGL の機能を詳細に解析していくためには高純度の BGL を手に入れることが必要であるが、従来の *P.chrysosporium* 培養系においては生産量も少なく精製も容易ではない。そこで本研究においては、メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* を用いて組換え BGL の大量発現系の構築を行った。その結果、得られた組換え BGL の生産量は従来の培養系における生産量と比較しておよそ 40 倍に及んだ。また、精製後の酵素を用いて基質に対する反応特性を速度論的に解析したところ、触媒定数 (K_m , k_{cat}) が天然型 BGL と近似していたことから、この組換え BGL は天然型と同様の触媒機構を保持していると考えられた。

*谷ら、第 52 回日本木材学会年次大会 研究発表要旨集 (2002) p.320

Production and characterization of recombinant *Phanerochaete chrysosporium* β -glucosidase in yeast *Pichia pastoris*

Rie Kawai, Makoto Yoshida, Tomomi Tani, Kiyohiko Igarashi, Tsuyoshi Ohira, Hiromichi Nagasawa, Masahiro Samejima (Univ. of Tokyo)

P-3

Fusarium sp.5112 株由来リパーゼ遺伝子の麹菌での発現

半谷朗、茶谷悦司*、北本則行* (愛知産技研食品工技、*愛知産技研基盤技術部)

【目的】ポリエチレンテレフタレート(PET)繊維のアルカリ減量加工で排出される濃厚なアルカリ廃液は環境に負荷を与え、問題となっている。そこで酵素を用いた PET 繊維の減量加工技術の確立を最終的に目指して、土壌より PET 分解酵素生産糸状菌 *Fusarium* sp.5112 株を分離した。¹⁾今回は *Fusarium* sp.5112 株リパーゼの効率的な生産を目的として、*Fusarium* sp.5112 株リパーゼ遺伝子を麹菌 *Aspergillus oryzae* において高発現させることを試みた。

【方法及び結果】*Fusarium solani* などの既知の糸状菌リパーゼの塩基配列に基づき合成した複数のプライマーを用いて *Fusarium* sp.5112 株の染色体 DNA を鋳型とする PCR を行い、2 種類のリパーゼ遺伝子に由来する DNA 断片を得た。これらは共に *F.solani cutA* と高い相同性が認められた。これらのリパーゼ遺伝子を麹菌用発現ベクターに挿入し、*A.oryzae* を形質転換した結果、培養液中にリパーゼを分泌する形質転換株が得られた。現在、発現させたりパーゼによる PET 繊維の特性変化について検討を行っている。本研究は文部科学省の平成 14 年度科学技術振興調整費による「地域先端研究：カビの酵素高生産能を利用した環境調和型工業プロセス技術の基盤研究」の一環として行ったものである。

1)日本農芸化学会 2001 年度大会講演要旨集、p.153

Expression two *Fusarium* sp.5112 lipase genes in *Aspergillus oryzae*.

Akira Hanya, Etsushi Chaya*, Noriyuki Kitamoto*

(Food Res. Center, AITEC, *Res. Dev. Div., AITEC)

P-5

***Fusarium oxysporum* 26-1 株のアルカリプロテアーゼ遺伝子の麴菌での発現**

山澤美緒¹, 茶谷悦司², 半谷朗³, 安田(吉野)庄子³, 山本周治⁴, 北野道雄⁴, 北本則行²

(¹ 椋山女大・² 愛知産技研基盤技術・³ 愛知産技研食品工技・⁴ 愛知産技研尾張繊維)

【目的】羊毛繊維の防縮性や風合い改良加工に適用できる新規ケラチン分解酵素が望まれている。演者らは、羊毛に作用し、キューティクルエッジの剥離などの外観変化をもたらすケラチン分解酵素生産菌、*Fusarium oxysporum* 26-1 株を分離した。本菌の粗酵素液で処理した羊毛布帛は、優れた防縮性能を示し、繊維強度の低下も少ないことから、本菌のケラチン分解酵素は羊毛加工用として好適であると考えられた。そこで今回、本菌のアルカリプロテアーゼ遺伝子 (PrtA 遺伝子) の麴菌での発現を試みたので報告する。

【方法及び結果】*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Prt1 遺伝子とほぼ同一のアルカリプロテアーゼ遺伝子 (PrtA 遺伝子) が *F. oxysporum* 26-1 株において存在し、その遺伝子発現も確認することができた。タカアミラーゼ A 遺伝子プロモーターと PrtA 遺伝子との融合遺伝子を麴菌に導入し、PrtA を高生産する形質転換体を取得した。麴菌で生産された PrtA で羊毛繊維を処理したところ、キューティクルエッジの剥離などの効果が確認された。

Expression of an alkaline protease gene from *Fusarium oxysporum* 26-1 in *Aspergillus oryzae*

Mio Yamasawa¹, Etsushi Chaya², Akira Hanya³, Shoko Yoshino-Yasuda³, Shuji Yamamoto⁴, Michio Kitano⁴, Noriyuki Kitamoto² (¹Sugiyama Jogakuen Univ., ²Res. & Dev. Div., Aichi Ind. Technol. Inst., ³Food Res. Center, Aichi Ind. Technol. Inst., ⁴Owari Textile Res. Center, Aichi Ind. Technol. Inst.)

P-7

好熱性細菌由来枝付け酵素の麴菌による発現

井原美智子, 篠原真理*, 阿保正伸, 高木忍, トーマス C. ベック

(ノボザイムズジャパン(株), *Harvard Medical School)

既知の細菌由来枝付け酵素のアミノ酸配列における保存領域を利用した PCR 反応により、好熱性細菌 *Rhodothermus obamensis* から新規の耐熱性枝付け酵素遺伝子の単離に成功した。PCR 断片を用いて得られた構造遺伝子 *glgB* は、アミノ酸 621 残基からなるタンパク質をコードする ORF を有し、その ORF は大腸菌内で 72kD の活性型の酵素タンパク質を産生した。大腸菌で発現された酵素の反応至適温度は 65°C、85°C-30 分の熱処理後の残存活性は 85%であった。

改良型 TAKA アミラーゼプロモーターを用いて、この *glgB* 遺伝子の麴菌による発現を試みたところ、菌体内に酵素タンパク質の蓄積が見られ、その培地容量あたりの生産量は大腸菌を用いた場合の約 100 倍であった。このことから、細菌由来の酵素タンパク質も麴菌により高発現が得られることがわかった。麴菌内で発現された枝付け酵素の性質は、大腸菌で発現されたものと比べて差は見られなかった。*glgB* 産物の分泌を目的として、TAKA アミラーゼ由来の分泌シグナル配列の付与や分泌性タンパク質との融合タンパク質をもたらす遺伝子配列を構築し、麴菌による発現を試みたが、いずれの場合も酵素タンパク質の分泌はみられず、今後の課題となった。

Novel thermostable branching enzyme from *Rhodothermus* and its expression in *Aspergillus oryzae*

Michiko Ihara, Mari Shinohara*, Masanobu Abo, Shinobu Takagi, Thomas C. Beck

(Novozymes Japan Ltd., *Dana-Farber Cancer Institute of Harvard Medical School)

P-9

リグニン分解酵素高生産株の分子育種

塚本晃, 古城敦, 仲亀誠司, 杉浦純 (王子製紙・新技術研究所)

キノコの中でも白色腐朽菌はリグニン分解能力の高い微生物として知られている。アラゲカワラタケはリグニン分解酵素としてラッカーゼ(Lac)、リグニンペルオキシダーゼ(LiP)、そしてマンガンペルオキシダーゼ(MnP)を分泌生産する。我々はこの微生物のリグニン分解能力を、パルプ製造工程の省エネルギー化や環境負荷の低減、また難分解性物質の分解による環境浄化技術に応用する目的で開発を進めている。これらの酵素の生産性を向上させるため、これまでにアラゲカワラタケの形質転換系の開発を行い、担子菌の中で形質転換効率が非常に高い、分裂子を用いる遺伝子導入系の開発に成功し、これまでにマンガンペルオキシダーゼやラッカーゼの生産性を向上させた。

我々はこの形質転換系を用いて、本来、低窒素、高酸素分圧下条件でしか生産が認められないLiPを、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(Gpd)遺伝子プロモーターを初め、種々の遺伝子プロモーターを用いて、グルコースを含む高窒素培地で培養すること、またLiP遺伝子のleader peptide内に認められるpro-構造部分の有無が酵素生産に及ぼす影響、さらに種々の基質存在下での酵素生産性の検討を行った。

その結果、1)Gpdプロモーター領域を用いた形質転換体では高いLiP活性を検出することができたが、その他の検討したLac遺伝子やornithine carbamoyltransferase遺伝子のプロモーターではほとんど活性を検出することができなかった。2) Pro構造の有無は組換え体において、有意な差を示さなかった。3)誘導基質としてヘムの前駆体となるheminやアミノレブリン酸の添加による生産性の向上は認められなかったのに対し、LiPの基質となるveratryl alcoholが存在下で安定的にLiP活性が検出された。宿主ではveratryl alcoholによりLiPは誘導されなかったことより、プロモーターの置換によりLiPの生産性が向上し、さらにveratryl alcoholによって酵素が安定化している可能性が示唆された。

The Molecular Breeding of High Production strain for Ligninolytic Enzymes

Akira Tsukamoto, Atushi Furujo, Seiji Nakagame, Jun Sugiura

(Adv. Technol. Res. Labo., Oji Paper Co., Ltd.)

P-11

Coprinus cinereus を宿主とした高発現系の構築

- Glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase プロモーターの単離 -

一本木智敬, 割石博之, 田中浩雄 (九大院・農)

白色腐朽担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* ゲノムプロジェクトの終了が間近に迫っている。それに伴い 100 個を越す P450 遺伝子や機能未知の遺伝子が次々に同定されている。これら新規遺伝子の機能解明にはタンパク質高発現システムの構築が必要不可欠となる。腐生担子菌ネナガノヒトヨタケ(*Coprinus cinereus*)は一般に生育速度が速く、また、木材腐朽能がなく酵素分泌能が高いことから、担子菌遺伝子とりわけリグニン代謝に関連する遺伝子発現の宿主として優れていると考えられた。高発現ベクターのプロモーターを獲得するため、宿主 *C. cinereus* LT2-44 株(Trp ミュータント)から強力なプロモーター活性を有する glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GPD) プロモーターを単離した。また、タンパク質コード領域についても同定した。

プロモーター解析の結果、*C. cinereus* GPD プロモーターは GC rich は配列であることが判明した(G+C 含量; 64.2%)。またこのプロモーターには TATA box は含まれていたが、CAAT box に関しては類似した配列しか含まれていなかった。このようなプロモーター構造は他のホモ担子菌 GPD にはみられず、*C. cinereus* 独自の構造であると認められた。イントロン配置より、ホモ担子菌で保存されているイントロンポジションからの 3 つのイントロンの脱落が *C. cinereus* GPD で確認された。GPD アミノ酸配列より作製した進化系統樹より *C. cinereus* GPD は *P. chrysosporium* GPD と共に進化してきたことが示唆された。

Construction of Heterologous Expression System Using *Coprinus cinereus* as a Host

- Cloning of Glyceraldehydes-3-phosphate Dehydrogenase Gene -

Tomotaka Ippongi, Hiroyuki Wariishi, Hiroo Tanaka

(Faculty of Agriculture, Kyushu Univ.)

P-13

Aspergillus nidulans の protein O-D-mannosyltransferase 遺伝子群の解析

岡拓二, 後藤正利, 古川謙介 (九大院・生資環)

【目的】O-マンノース型糖鎖生合成は protein O-D-mannosyltransferase(Pmt)によるペプチド鎖の Ser/Thr 残基へのマンノース転移に始まる。本報では、麹菌の O-型糖鎖生合成機構の解明を目的として O-型糖鎖生合成の初発酵素である麹菌 *pmt* 遺伝子の構造及び機能解析を行った。

【方法及び結果】*A. nidulans* から *pmt* と推定される3つの遺伝子 (*pmtA*, *pmtB*, *pmtC*) を取得した。*pmtA*, *pmtB* は、それぞれ740, 761 アミノ酸をコードしていた。分子進化系統樹解析の結果、PmtA は ScPmt2p, PmtB は ScPmt1p, PmtC は ScPmt4p のサブグループに属していた。また、ノーザンブロット法により転写解析を行った結果、*pmtA*, *pmtB* は、培養24時間から48時間まで一定の転写を示した。*A. nidulans pmtA* 破壊株(P3株)のマンノースシルトランスフェラーゼ活性は野生株の6%にまで低下した。また、同株において菌糸の途中が膨らむバルーン構造の形成、分生子形成能の低下、菌糸成長阻害などの野生株とは異なった表現形が認められた。以上の結果より、Pmt タンパク質は細胞の正常な分化、形態形成に必須であると考察した。

Functional analyses of the *pmt* genes from *Aspergillus nidulans*.

Takuji Oka, Masatoshi Goto, Kensuke Furukawa

(Dept. of Bioscience and Biotechnology, Kyushu univ.)

P-15

麹菌 (*Aspergillus oryzae*) の固体培養特異的遺伝子マンノシダーゼ遺伝子(*man1B*)の解析

矢原明典^{1,2}, 赤尾健^{1,3}, 吉内くみ^{1,4}, 吉田孝⁵, 坂本和俊¹, 山田修¹, 秋田修^{1,2}

(¹酒総研, ²広島大院先端研・分子生命機能, ³現国税庁 ⁴現白鶴酒造, ⁵弘前大農学生命)

麹菌の産業利用は、酵素の生産性の高さなどから主に固体培養によるものである。既に我々は、固体培養特異的に発現する遺伝子断片を AOS シリーズとして多数単離している。そのうちの AOS22 の配列をもとに α -1,2-マンノシダーゼ様タンパク質をコードする遺伝子を見いだした。麹菌での本遺伝子の強制発現株を作成し、解析したところ、 α -1,2-マンノシダーゼ活性の上昇を確認できたため、*man1B* と命名した。活性は、主として菌体内可溶性画分に存在したが、一部菌体外にも認められた。また、ノーザン解析の結果、*man1B* は、固体培養のほか、液体培養の後期においても高レベルで転写されていた。

man1B 産物の機能としては、近縁種ホモログの詳細な反応解析や、タンパク質分泌量が多くなるような条件下において転写が増加していることなどから、N 結合型糖鎖のゴルジ型プロセッシングへの関与も推察されるが、強制発現株においては、菌体外でも活性の上昇が認められるため、依然議論の余地がある。そこで、*man1B* の機能を明らかにするために、破壊株の作成を試みた。*sC* をマーカーとして用いて、*A. oryzae* NS4 株を形質転換し、*man1B* 破壊株の候補を取得した。最終的に、約250の候補株から、サザン解析によって2株の破壊株を同定した。この破壊株は、野生株と比べ最少培地上での生育が非常に遅かった。現在、得られた破壊株の性質について、さらに詳細な解析を行っている。

Molecular analysis of α -1,2-mannosidase encoding gene(*man1B*) in *Aspergillus oryzae*

Akinori Yahara^{1,2}, Takeshi Akao³, Kumi Yoshiuchi⁴, Takashi Yoshida⁵, Kazuhiro Sakamoto¹, Osamu Yamada¹, Osamu Akita^{1,2}
(¹NRIB, ²ADSM, Hiroshima Univ., ³NTA, ⁴Hakutsuru SAKE Brewing co. LTD., ⁵Hirosaki Univ.)

P-17

***Penicillium* 1,2- α -マンノシダーゼの結晶構造と N 型糖鎖プロセッシング**

吉田孝¹、一島英治²、P. Lynne Howell³、Annette Herscovics⁴

(¹弘前大・農学生命、²創価大・工、³トロント大・小児病院、⁴マギル大・癌センター)

1,2- α -マンノシダーゼはアスパラギン結合型 (N 型) 糖鎖生合成系において初期の糖鎖トリミングを行なう酵素であり、糸状菌ではこれまでに *Penicillium*、*Aspergillus*、*Trichoderma* などについて酵素ならびに遺伝子の解析が行なわれている。今回、*P. citrinum* の 1,2- α -マンノシダーゼ (MsdCp) の結晶構造解析ならびに高マンノース型糖鎖に対する作用様式の詳細について報告する (*JBC* **277**, 5620-5630, 2002)。

<結晶構造解析> *P. citrinum* 1,2- α -マンノシダーゼ遺伝子 (*msdC*) にて麹菌を形質転換して得た高生産株により MsdCp を分泌生産し、結晶解析に用いた。hanging-drop 式蒸気拡散法にて得られた結晶から分解能 2.2 Å の X 線回折データが得られた。タイプの異なるヒト小胞体 (ER) マンノシダーゼを参考に分子置換法により MsdCp の三次構造が明かとなった。MsdCp は ($\alpha\alpha$) γ -バレル型構造を有し、活性中心付近のアミノ酸残基の配置はヒト ER マンノシダーゼとほぼ重複したが、高マンノース基質がより多くの様式で活性中心に適合できると推定された。<N 型糖鎖プロセッシング> ピリジルアミノ化した高マンノース型糖鎖 (Man9GlcNAc2-PA 又は Man7GlcNAc2-PA) に対し MsdCp を作用させ、糖鎖構造の変化を経時的に HPLC で調べた。各々について生成するオリゴマンノースのアイソマー分析より、MsdCp は動物細胞内ゴルジ体の 3 種の 1,2- α -マンノシダーゼ (IA, IB, IC) のうち、IB と同様の特異性を有する事が示された。

***Penicillium* 1,2- α -mannosidase; crystallographic structure and N-glycan processing**

Takashi Yoshida¹, Eiji Ichishima², P. Lynne Howell³, and Annette Herscovics⁴ (¹Hirosaki Univ., ²Soka Univ., ³Toronto Univ., The Hospital for Sick Children, ⁴McGill Cancer Centre)

P-19

***Fusarium oxysporum* の孢子形成関連遺伝子 *RENSA* は酵母様生育にも関与する。**

小原敏明, 柘植尚志 (名大院生農)

Fusarium oxysporum は、大型孢子、小型孢子および厚膜孢子という 3 種の無性孢子を形成する。また、本菌は寒天培地上では菌糸状に生育するが、液体培地中で振とう培養した場合には、酵母様に生育し、bud cell を形成する。先に、REMI (Restriction Enzyme-Mediated Integration) 法によってメロンつる割病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *melonis*) から大型孢子と小型孢子を欠損した孢子形成変異株 B50-19 を分離し、その変異遺伝子 *RENSA* (*RENI*) を同定した。*RENI* は、孢子形成関連遺伝子である *Aspergillus nidulans* の *medA* および *Magnaporthe grisea* の *ACRI* と相同性が認められた。部位特異的遺伝子破壊法によって作出した *RENI* 破壊株は、B50-19 と同様に、正常な小型孢子と大型孢子を形成せず、棍棒状細胞を連鎖して形成した。しかしながら、*RENI* 破壊株は、形態的に正常な厚膜孢子を形成し、各種培地上での菌糸生育 (コロニー直径) も野生株と有意な差は認められなかった。以上の結果は、*RENI* が小型および大型孢子形成には不可欠な遺伝子であるが、厚膜孢子形成や寒天培地上での菌糸生育には関与しないことを示した。野生株と *RENI* 破壊株をジャガイモ煎汁液体培地中で振とう培養し、bud cell の形成数と形態を比較した。その結果、野生株では菌糸生育はほとんど認められず、卵形の bud cell を大量に形成した。一方、*RENI* 破壊株は、菌糸状に生育するとともに、少数の棍棒状細胞を形成した。棍棒状細胞形成数は、野生株の bud cell 形成数の約 16 分の 1 であった。さらに、*RENI* が液体培養時にも発現することを RNA ゲルプロット解析によって確認した。以上の結果は、*RENI* が孢子形成だけでなく、液体培地中での酵母様生育にも関与することを示した。

The conidiation gene *RENSA* of *Fusarium oxysporum* also controls yeast-like growth.

Toshiaki Ohara, Takashi Tsuge

(Grad. Sch. Bioagric. Sci., Nagoya Univ.)

P-21

担子菌 *Pleurotus ostreatus* におけるキチン合成酵素遺伝子の解析

西原幹広, 渡邊彰, 麻田恭彦 (香川大・農・生命機能)

担子菌類の子実体形成は、顕著な形態変化を伴った興味深い生命現象である。この形態変化には、キチンを主成分とする細胞壁の合成制御が深く関わっている。そこで、我々はキチン及びキチン合成酵素の活性発現を指標に、担子菌類の形態形成機構を細胞壁の動態から詳細に解明することを目的とした。その端緒として、本研究ではキチン合成酵素遺伝子の単離および機能解析を行った。現在までのところ、担子菌 *Pleurotus ostreatus* において、クラスⅡに分類されるキチン合成酵素遺伝子の全長とクラスⅣに分類されるキチン合成酵素遺伝子の部分断片を取得した。更に、子実体の異なる部位における各遺伝子の発現量をノーザンハイブリダイゼーション解析に供した結果、本酵素遺伝子は子実体傘部より子実体柄部において高い発現量が確認された。一方、*Agaricus bisporus* 由来のクラスⅢキチン合成酵素は、子実体傘部および子実体柄部において、転写レベルでその発現量に差がないことが確認されている¹⁾。以上のことは、担子菌類においてクラスⅡ、Ⅲ、Ⅳに分類されるキチン合成酵素間の発現量が転写レベルで異なることを示唆するものである。現在、生育段階と各遺伝子の発現との相関性について解析中である。

1) Sreenivasaprasad, S., Burton, K. S., and Wood, D. A. (2000) *FEMS Microbiol. Lett.* **189** 73-77

Molecular analysis of chitin synthase genes of basidiomycetous fungi, *Pleurotus ostreatus*.

Mikihiro Nishihara, Akira Watanabe, Yasuhiko Asada

P-23

Aspergillus nidulans のキチン合成酵素遺伝子 *chsA csmA* 二重破壊株と *chsC csmA* 二重破壊株の作製とその性質の検討

山田絵美, 堀内裕之, 太田明徳 (東大院・農生科・応生工)

A. nidulans の細胞壁の主要構成成分の一つはキチンであり、キチンの合成・分解の制御が形態形成の制御に重要な役割を果たしていることが予想される。当研究室では現在までにキチン合成酵素遺伝子である *chsA* ~ *chsD*、*csmA* を単離している。*chsA*、*chsC* については現在までの解析により、それぞれの遺伝子の単独破壊株は野生型株と比較して明確な表現型の違いを示さないことが明らかにされていた。しかし *chsA chsC* 二重破壊株は菌糸生長、分生子柄形成に異常を示し、細胞壁中のキチン含量の増加や細胞壁の肥厚化などが観察されており、*chsA* と *chsC* は機能が重複していることが考えられた。また、*csmA* はキチン合成酵素ドメインの N 末端側にミオシン様ドメインを持つたんぱく質をコードする遺伝子である。*csmA* 単独破壊株 ($\Delta csmA$ 株) では菌糸の途中が膨らむ *ballon* の形成、菌糸の中に新たに菌糸が生じる菌糸内菌糸の形成、低浸透圧感受性などが観察されている。今回、*chsA*、*chsC* と、*csmA* との機能上の相関関係を調べるために *chsA*、*csmA* と *chsC*、*csmA* それぞれの二重破壊株を作製した。 $\Delta csmA$ 株と比較して *chsC csmA* 二重破壊株 (ΔCM 株) は低浸透圧に感受性を示したが、*chsA csmA* 二重破壊株 (ΔAM 株) は $\Delta csmA$ 株や ΔCM 株よりもさらに低浸透圧に対し感受性を示すことが観察された。また、 $\Delta csmA$ 株や ΔCM 株で見られるコロニー中央部の褐変が ΔAM 株では見られず、色素生産にも差異があると考えられた。これらのことから *chsA* は *chsC* よりも *csmA* との機能上の相関が強いことが示唆された。

Construction and characterization of *chsA csmA* double mutants and *chsC csmA* double mutants of *Aspergillus nidulans*

Emi Yamada, Hiroyuki Horiuchi, and Akinori Ohta (Dept. Biotechnol., Univ. Tokyo)

P-25

Aspergillus nidulans のマーカー遺伝子 *pyrG* 変異の細胞壁へ与える影響についての解析

山崎晴文, 堀内裕之, 太田明德 (東大院・農生科・応生工)

A. nidulans の栄養要求性マーカーとして用いられる *pyrG* の遺伝子産物 (PyrG) は、OMP から UMP の合成を触媒する OMP デカルボキシラーゼであり、細胞壁キチン合成、N-link の糖鎖合成、GPI-anchor の合成等に関わる UDP-GlcNAc の前駆体の合成に関与している。*pyrG* 変異は培地にウリジンとウラシルの両方を添加することにより補うことができるとされているが、*pyrG* 変異株は、培地にウリジンのみを添加した場合と、ウリジンに加えウラシルをも添加した場合とで生育に差はなかった。しかし、キチナーゼをコードする遺伝子である *chiA* と *pyrG* との二重変異株は、比較的低浸透圧の培地において培地にウリジンのみを添加した場合には、菌糸が太く溶菌するといった異常な表現型を示したが、十分量のウリジン、ウラシルを両方添加すると、その表現型は抑圧された。このことから、*pyrG* に変異がある状態では細胞壁の構造に何らかの欠損を生じている可能性が考えられた。そこで今回、*pyrG* 単独変異株で培地にウリジンのみを添加した場合(1)、また、ウリジンとウラシルの両方を添加した場合(2)、さらに *pyrG* 変異を野生型の遺伝子で相補した場合(3)で SDS, Congo Red, Calcofluor White に対する感受性の検討を行った。その結果、1 の場合が一番感受性が高く、3 の場合が一番感受性が低かったことから、*pyrG* 変異はウリジンとウラシル両方の添加でも完全には補うことができないことが示され、*pyrG* 変異は細胞壁の組成の変化、もしくは構造の変化を引き起こしていることが示唆された。

Effect of *pyrG* mutation on the cell wall integrity of *Aspergillus nidulans*

Harutake Yamazaki, Hiroyuki Horiuchi and Akinori Ohta

(Dept. Biotech., Univ. Tokyo)

P-27

白色腐朽担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* の酸素ストレス応答性化合物

三浦大典, 割石博之, 田中浩雄 (九大院・農)

【目的】 白色腐朽担子菌は不定形芳香族高分子であるリグニンを単独で無機化する唯一の生物である。リグニン分解の初発反応は細胞外に分泌される強力な一電子酸化酵素によるリグニンの断片化であることが知られている。また、*Phanerochaete chrysosporium* によるリグニン分解は、100% 酸素雰囲気下という生物にとって非常に毒性の高い条件が至適となることが明らかとなっている。このことから、担子菌の有する酸化ストレス応答・防御機構に興味をもたれた。そこで、メタボローム解析の手法を用いて担子菌の有するストレス応答機構の解明を目指した研究を開始した。

【方法および結果】 空気下および 100% 酸素雰囲気下で所定時間培養した菌体のメタノール抽出物をそれぞれ GCMS 分析に供し、メタボロームディフュージョンディスプレイ解析を行ったところ、多数のストレス応答性化合物の存在が示された。二次代謝物であるベラトリルアルコール (VA) 合成系はストレス下での培養一時間以内に活性化され、細胞内 VA 濃度が二倍以上になることが示された。また、トレオン酸およびエリトロン酸が酸素ストレス応答性化合物として同定された。

Identification of oxygen stress responsive compounds from the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*

Daisuke Miura, Hiroyuki Wariishi, Hiroo Tanaka

(Faculty of Agriculture, Kyushu Univ.)

P-29

白色木材腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* のセルロースおよびキシラン分解系における菌体外酵素の生産パターン

住吉剛史¹、五十嵐圭日子¹、片山明²、西野武士²、鮫島正浩¹ (¹東大院・農生科、²日医大・一生化)

白色木材腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* 由来のセルラーゼは、これまで、セルロースを唯一の炭素源としたモデル培養系を用いて研究されてきた。しかし、麴菌における最近の研究では、キシランによる転写因子がいくつかのセルラーゼ遺伝子の発現も制御することが明らかとなっている。また、セルラーゼの中にはキシラン分解能力を持つものがあることも広く知られている。したがって、遺伝子発現および酵素活性の双方においてセルロース分解系とキシラン分解系を互いに独立したものとして扱うことはできない状況となっている。このことを踏まえて本研究では、セルロースおよびキシランを混合して炭素源とした培地を用いて *P.chrysosporium* を培養し、菌体外酵素の生産パターンについて、それぞれを単独の炭素源とした場合と比較しながら多角的に解析を試みた。その結果、培養 10 日目では、菌体成長量、酵素活性などに大きな差が認められた。また、菌体外液について SDS-PAGE および 2 次元電気泳動解析を行うと、菌体外酵素の生産パターンにいくつかの違いが認められることが分かった。現在、菌体外酵素を 2 次元電気泳動で分離し質量分析を行うことでいくつかの蛋白質の同定を試みている。

Production pattern of extracellular enzymes in cellulose and xylan degrading cultures of the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*

Takeshi Sumiyoshi¹, Kiyohiko Igarashi¹, Akira Katayama², Takeshi Nishino², Masahiro Samejima¹

(¹ Univ. of Tokyo ² Nihon Medical School)

P-31

マイタケ (*Grifola frondosa*) 由来セロピオース脱水素酵素の発現応答

吉田誠、大平剛、五十嵐圭日子、長澤寛道、鮫島正浩 (東大院・農生科)

マイタケはオガクズ木粉にコーンプランを添加した培地で商業的に栽培されているが、この過程で大量の廃菌床が廃棄物として生じる。近年、農林廃棄物などのエネルギー化が強く望まれるようになったが、本研究はその目的のために農林水産省が立ち上げたプロジェクトの中で位置付けられており、その最終目標は、セルロース分解能を抑制したマイタケ変異株を作出し、その菌株により栽培過程で木粉から選択的脱リグニンを行い、廃菌床の酵素糖化効率の向上を図ることである。その手始めとして、今回は、セルロース分解に関与していると考えられているセロピオース脱水素酵素(CDH)遺伝子をマイタケからクローニングし、さらにその発現応答を RT-PCR 法により調べた。その結果、CDH 遺伝子は、セロピオース培養およびセルロース培養では発現が明確に検出されたのに対し、グルコース培養では発現が認められなかった。この結果から、マイタケ由来 CDH 遺伝子はセルロース分解系に対応して発現していることが明らかとなった。したがって、セルロース分解系を抑制された変異株を作出するために、CDH 遺伝子の破壊がひとつのターゲットとなりうるかと判断した。現在、菌床培地でのマイタケ培養における CDH 遺伝子の発現応答についても調べている。

Regulation of cellobiose dehydrogenase from Maitake (*Grifola frondosa*).

Makoto Yoshida, Tsuyoshi Ohira, Kiyohiko Igarashi, Hiromichi Nagasawa, Masahiro Samejima

(Univ. of Tokyo)

P-33

Aspergillus oryzae の生産する無機リン酸遊離酵素群(フィターゼ, フォスファターゼ)のフィチン酸からのリン酸遊離様式

藤田仁, 山根雄一*, 福田央**, 木崎康造**, 若林三郎**, 秋庸裕, 重田征子, 小埜和久
(広大院・先端研・分子生命機能, *(株)酔心山根本店, **酒総研)

【目的】フィチン酸(ミオイノシトール1,2,3,4,5,6ヘキサリン酸)は, 植物の主要貯蔵リン酸源で全リン酸源の60~80%存在し, またリン酸遊離に関与する酵素はフィターゼ(Phy)とフォスファターゼ(IPase)で, これらの酵素は植物のほか微生物でも存在が確認されている. しかし, フィチン酸からのリン酸遊離メカニズムは解明されていない. そこで麴中に含まれるPhyとIPaseのフィチン酸分解のメカニズムを解析した.

【方法・結果】*A. oryzae* RIB-128 を蒸米に植菌し IPase を追跡したところ, 21 時間より活性が検出され培養とともに IPase 活性は増加した. 次に各培養時間の IPase 活性の酵素量をそろえ, Phy 活性を測定すると, 培養時間とともに Phy 活性は増加した. 麴米(培養 45 時間)から IPase の精製後, 5 種類 (IPase A, B, C, D, E)に分離した. 各 IPase の Phy 活性は, IPase C, D, E は高く, IPase A, B はほとんどなかった. IPase の基質特異性は, イノシトールのリン酸結合部位により反応性の違いがみられた. 複数の IPase 混合時はリン酸遊離の相乗効果を示した. 以上の結果から, リン酸遊離に際して, イノシトールの OH 基に結合するリン酸の位置に対して基質特異性が異なる事, 複数の IPase が協調的にフィチン酸に作用しリン酸を遊離する事が示唆された.

The releasing mechanism of phosphate from phytic acid by phosphohydrolase, such as phytase and phosphatase, produced from *Aspergillus oryzae*.

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

P-35

白麴菌の α -アミラーゼ遺伝子及びその発現パターン

加藤拓*, 村島健司, 下飯仁, 伊藤清 (酒類総合研究所, *広大院先端研)

【目的】白麴菌 (*Aspergillus kawachii*) は焼酎醸造に広く用いられている実用菌株である. 本菌株は, 黄麴菌 (*A. oryzae*) と異なり, タカアミラーゼ類似の α -アミラーゼ (非耐酸性 α -アミラーゼ) の他に, 耐酸性 α -アミラーゼを生産するが, これらの生産パターンは黄麴菌タカアミラーゼのそれとは大きく異なることを既に報告している. また, 機能は不明であるが, 非耐酸性 α -アミラーゼとは構造がやや異なる α -アミラーゼ遺伝子も有する. 今回, これら遺伝子の構造を詳細に検討するとともに, 非耐酸性 α -アミラーゼを中心に発現パターンの詳細な解析を行ったので報告する.

【結果】耐酸性 α -アミラーゼ及び新規な α -アミラーゼ遺伝子は染色体上に 1 コピーのみ存在したが, 非耐酸性 α -アミラーゼ遺伝子は 2 コピー存在した. 新規な α -アミラーゼ遺伝子は, α -グルコシダーゼ遺伝子及び amyR 遺伝子の近傍に存在したが, 調べた限りでは, 発現が確認できなかった. 耐酸性 α -アミラーゼは固体培養特異的に発現した. 非耐酸性 α -アミラーゼは, 澱粉・マルトースは勿論のこと, グリセリンやキシロース, またグルコースでさえも発現した. 本遺伝子のプロモーターを検討したところ, region I と呼ばれる部分を中心に約 60bp の欠失があることがわかった. 本遺伝子を黄麴菌に導入すると, 白麴菌同様にグルコースを含む各種炭素源で発現し, かつ非常に高発現した. これは, 麴にした場合でも同様であった. 本プロモーターを利用すれば, グルコースリプレッションを受けず, かつ種々の炭素源での遺伝子高発現を行うことが出来るので, 醸造のみならず異種遺伝子発現系にも応用可能であると思われる.

α -amylase gene families in *Aspergillus kawachii* and their expression mode

Taku kato, Kenji Murashima, Hitoshi Shimoi, Kiyoshi Ito

(Res. Inst. of Brewing, Hiroshima University)

P-37

糸状菌 *Aspergillus nidulans* セルラーゼ遺伝子の転写誘導配列の同定

森本宗徳, 小島美沙子, 遠藤良知, 加藤雅士, 小林哲夫, 塚越規弘 (名大院生命農・生物機構)

【目的】 *A.nidulans* は主要なエンド型セルラーゼとして EG A、EG B を有している。これらの遺伝子 (*eglA*, *eglB*) の発現は、CMC、セロピオースにより誘導されるが、*A.niger*、*A.oryzae* と異なり、キシラン、キシロースでは誘導されない。我々は、*eglA* プロモーターの変異解析により、CMC、セロピオース誘導に特異的に関わるシスエレメントの同定を試みてきた。現在までに-220~-81 領域が CMC、セロピオース誘導に必要であることが明らかとなっている。本報告ではこの領域を対象とし、さらに制御配列の絞り込みを試みた。

【方法と結果】 -220~-81 領域を 5'側から順次欠失させると段階的な誘導能の減少が観察された。これは、この領域に複数の転写誘導配列が存在することを示唆している。本領域内で類似配列を検索したところ複数の CGGN4CGG 配列が存在していた。CGGN4CGG 配列の転写誘導への関与を明らかにするため、この配列を含むプロモーター断片を *A.oryzae* 由来タカアミラーゼ A 遺伝子 (*taaG2*) のプロモーター領域に導入した。ここで用いた *taaG2* 遺伝子は-138 から上流を欠失しており、単独では基底レベルの発現しか起こらない。二つの CGGN4CGG 配列を持つ-220~-81 領域の導入により、CMC によるアミラーゼ誘導が観察され、この領域内に転写誘導配列が存在することが確認された。さらに、単一の CGGN4CGG 配列の導入によっても、弱いながら CMC によるアミラーゼ誘導が起こったことから、CGGN4CGG 配列が CMC による転写誘導に関与していることが示唆された。

cis-Elements involved in transcriptional regulation of *Aspergillus nidulans* cellulase genes

Munenori Morimoto, Misako Kojima, Yoshikazu Endo, Masashi Kato, Tetsuo Kobayashi, Norihiro Tsukagoshi

(Dept. of Biological Mechanisms and Functions, Graduate School of Bioagricultural Science, Nagoya Univ.)

P-39

Aspergillus oryzae のキシラナーゼ *XynG2* 遺伝子プロモーターに存在する XlnR 結合配列および CCAAT 配列の機能解析

松岡寿保, 木村哲哉, 粟冠和郎, 大宮邦雄 (三重大生物資源)

【目的】 産業上重要な *Aspergillus oryzae* はキシランを主要な炭素源としたときに、複数のキシラン分解酵素を生産することが知られている。我々はこれらの中で主要なキシラナーゼをコードする *xynG2* 遺伝子を単離している。この *xynG2* の発現制御機構における各転写因子の遺伝子発現に与える影響を見た。

【方法及び結果】 *xynG2* のプロモーター上にはキシラン存在下でキシラナーゼ発現を正に制御する転写因子 XlnR の結合配列が 2 個存在していた。この配列の相互関係を明らかにするために、それぞれの結合配列に変異を入れた *xynG2* のプロモーターを作成した。このプロモーターと大腸菌 β -グルクロニダーゼ (GUS) 遺伝子および EGFP 遺伝子をつないだ融合遺伝子を *A.oryzae* および *A.nidulans* に導入した形質転換体について各種培養条件での発現量を検討した。その結果 fructose を炭素源とした培養では GUS または GFP の発現は見られなかったが、xylan を炭素源とした培養では GUS または GFP の発現において顕著な違いが示された。この結果より正の制御には下流の XlnR 結合配列のほうが影響が大きいことが示唆された。また *xynG2* のプロモーターには糸状菌において、転写量の増大に重要な役割を果たしていることが知られている CCAAT 配列が 2 個存在していた。この配列が *xynG2* の発現制御に関わっているかを調べるために、CCAAT 配列に変異を入れた *xynG2* のプロモーターを作成し、レポーター遺伝子として EGFP 遺伝子をつないだ融合遺伝子を *A.nidulans* に導入した形質転換体について、発現量を検討した。

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

Toshiyasu Matsuoka, Tetsuya Kimura, Kazuo Sakka and Kunio Ohmiya

(Faculty of Bioresources, Univ. of Mie)

P-41

麹菌アルカリプロテアーゼ遺伝子のプロモーター転写制御領域の解析

佐野元昭、田中昭光*、高瀬久美子、長谷川要*、町田雅之（産総研、*ヒゲタ醤油 研）

<目的> 麹菌 *Aspergillus oryzae* の生産するアルカリプロテアーゼ(ALP)は、醤油醸造において重要な酵素の一つである。ALP の生産量を適正にコントロールすることは醤油醸造において極めて重要である。そこで今回、ALP プロモーターの転写制御領域に関する詳細な解析を行ったので報告する。

<方法および結果> これまでの解析により ALP プロモーター領域には、ALP の制御に関与する転写因子 pacC¹⁾ の結合領域があり、ALP の制御に関与することが明らかとなっている²⁾。今回、我々は ALP プロモーター領域に、pacC 結合領域以外の転写制御領域の有無について検討を行った。上流より順次欠失させた ALP プロモーターに β-グルクロニターゼ遺伝子を挿入した系を構築し、醤油麹菌 *A. oryzae* F427 株を用いて解析を行った。その結果、転写制御に関与すると推測される部分を数ヶ所見つけ、現在詳細な解析を行っている。

1) 田中ら：日本生物工学会大会講演要旨 P 302 (2000)

2) 佐野ら：日本農芸化学会大会講演要旨 P 192 (2002)

Deletion analysis of the alkaline protease promoter from *Aspergillus oryzae*

Motoaki Sano, Akimitsu Tanaka*, Kumiko Takase, Kaname Hasegawa*, Masayuki Machida

(AIST, *R&D Dept. Higeta Shoyu Co., Ltd.)

P-43

麹菌(*Aspergillus oryzae*)の固体培養特異的な遺伝子のプロモーター解析

花ヶ崎敬資**、赤尾健**、篠田典子**、坂本和俊**、山田修**、秋田修**

(*広島大院・先端研、**酒総研・微生物)

通常、微生物の産業利用における培養様式は、液体培養がほとんどであるが、麹菌の場合、酵素の生産性の高さなどの理由から穀類基質上での固体培養が主である。このような培養様式による酵素生産性の違いには多数の遺伝子の発現に差があると考えられ、実際我々は、これまでにサブトラクション法によって、固体培養時に特異的に転写が促進される遺伝子群 (AOS 系列) を数多く単離し、それらの多くについて、遺伝子構造を決定している。本研究では、これらの遺伝子群の固体培養での詳細な発現プロファイリング、及び固体培養環境への応答に関与するシス因子の同定を目的として、レポーターアッセイによるプロモーター解析を行った。AOS 系列の中からノーザン解析による発現パターンの類似したものを 9 つ選択し、これらのプロモーター領域を PCR によって増幅後、GUS レポーターアッセイ用ベクター pNGS1 (月桂冠株より分譲) に連結し、クローン化した。これらを用いて、それぞれ *A. oryzae* niaD300 株を形質転換し、単コピー相同組換え株を選択した。これらの株について、様々な固体、寒天、液体培地等の上で培養した後、菌体内の GUS 活性を測定し、比較を行った。その結果、いずれのプロモーターについても、ふすまあるいは米麹の固体培養において液体培養よりも活性が高く、ノーザン解析の結果と一致した傾向であった。引き続き、プレート培地を用いたモデル系で諸条件の影響について検討を行っている。

Promoter analysis of solid-state culture specific genes of *Aspergillus oryzae*

Takashi Hanagasaki, Takeshi Akao, Noriko Shinoda, Kazutoshi Sakamoto, Osamu Yamada, Osamu Akita

(adsm, Hiroshima Univ., NTA, NRIB)

P-45

トマトアルターナリア茎枯病菌の宿主特異的 AAL 毒素生合成に関与する遺伝子クラスターの解析

赤松創, 尾谷浩, 児玉基一郎 (鳥取大農)

トマトアルターナリア茎枯病菌 *Alternaria alternata* tomato pathotype (茎枯病菌) は, 宿主特異的 AAL 毒素を生産する. 一方, AAL 毒素類縁体であるマイコトキシン, フモニシンの生合成に関与する PKS 遺伝子 *FUM5* を含む生合成遺伝子クラスターは, *Gibberella moniliformis* において解析されている. そこで, 茎枯病菌より AAL 毒素生合成に関与する PKS 遺伝子のクローニングを試みた. その結果, 6つのイントロンと 7.8-kb の ORF をもつ PKS 遺伝子 *ALT1* が AAL 毒素生合成および菌の病原性に必要とされることが明らかとなった. *ALT1* は *FUM5* と高い相同性を示し, その推定アミノ酸配列より, 糸状菌の PKS 遺伝子において一般的に見い出される KS, AT, DH, MT, ER, KR, ACP の 7 ドメインを有する I 型の PKS 遺伝子をコードしていると考えられる. 茎枯病菌のゲノムライブラリーを用いて *ALT1* を含むゲノム領域を解析した結果, フモニシン生合成遺伝子クラスターを構成する 3 遺伝子, すなわち cytochrome P450 fusion protein, type III alcohol dehydrogenase および class-II alpha-aminotransferase をコードする *FUM6*, *FUM7* および *FUM8* にそれぞれ相同性の高い ORF の存在を見出した. これら 3 遺伝子を *ALT2*, *ALT3* および *ALT4* とし, それぞれの特異的プライマーを用いて PCR を行った結果, 本遺伝子群は *ALT1* 同様, 茎枯病菌のみに存在することが確認された. さらに, 病原性および非病原性 *A. alternata* 菌株の染色体のパルスフィールドゲル電気泳動による解析の結果, *ALT1* を含む遺伝子クラスターは, 茎枯病菌のみが特異的に保有する 1.0-Mb の conditionally dispensable 染色体に座乗していることが明らかとなった.

Analysis of a Gene Cluster Required for Biosynthesis of Host-Specific AAL-Toxin in *Alternaria alternata* Tomato Pathotype.

Hajime Akamatsu, Hiroshi Otani and Motoichiro Kodama (Fac. of Agriculture, Tottori Univ.)

P-47

トマトアルターナリア茎枯病菌におけるスフィンガニンアナログマイコトキシン (SAM) の生産とその病理学的役割

山岸大輔, 赤松創, 妹川敏江, 尾谷浩, 児玉基一郎 (鳥取大・農)

トマトアルターナリア茎枯病菌 (茎枯病菌) は宿主特異的 AAL 毒素を生産する。本毒素の構造類縁体として、マイコトキシンであるフモニシンが知られている。これら両化合物はスフィンガニンアナログマイコトキシン (SAM) と呼称され、その生物活性も非常に類似している。さらに、茎枯病菌の特定の系統は AAL 毒素とともにフモニシンも生産することが報告されている。そこで、世界各地から分離された茎枯病菌株を用いて、培養時における SAM 生産能と病原性の関連を調査した。SAM の定量は、OPA 蛍光誘導体化による HPLC 法と、AAL 毒素ポリクローナル抗体を用いた CI-ELISA 法を組み合わせを行った。その結果、供試したすべての茎枯病菌ではフモニシンは検出されず、AAL 毒素生産のみが確認された。さらに、茎枯病菌における AAL 毒素の病理学的意義を明確にするために、毒素代謝遺伝子 (*ESPI*) の導入ならびに毒素生合成遺伝子 (*ALT1*) のノックアウトにより毒素生産能を特異的に欠失させた形質転換体を作成し、病原性に対する影響を検討した。その結果、両手法により得られた形質転換体の培養液中からは AAL 毒素が検出されず、宿主トマト葉に対しても孢子接種による病斑形成が顕著に抑制された。以上の結果は、茎枯病菌において AAL 毒素が病原性発現の決定因子であることを示している。

Pathological role of sphinganine-analogue mycotoxins (SAMs) produced by *Alternaria alternata* tomato pathotype

Daisuke Yamagishi, Hajime Akamatsu, Toshie Segawa, Hiroshi Otani and Motoichiro Kodama (Fac. Agric., Tottori Univ.)

P-49

イチゴ黒斑病菌とリンゴ斑点落葉病菌の宿主特異的毒素生合成に関与する共通な遺伝子

田中孝欣, 伊藤芳, 八田理恵子, 山本幹博*, 秋光和也**, 柘植尚志 (名大院生農・*岡山大農・**香川大農)

イチゴ黒斑病菌 (*Alternaria alternata* strawberry pathotype) は, イチゴ品種盛岡 16 号だけでなく, ニホンナシ品種二十世紀にも病原性を示す. この宿主範囲は, 本菌が生産する宿主特異的 AF 毒素 (デカトリエン酸エステル化合物) によって決定されている. 本菌は構造類似の AF 毒素 I と II を生産し, 毒素 I がイチゴとナシに, 毒素 II がナシにそれぞれ毒性を示す. 先に, AF 毒素生合成遺伝子クラスターから, 毒素 I の生産性とイチゴに対する病原性に不可欠な *AFTSI* 遺伝子を同定した. さらに, *AFTSI* 相同配列が, AM 毒素 (環状ペプチド) を生産するリンゴ斑点落葉病菌 (*A. alternata* apple pathotype) にも存在することを見出した. そこで, リンゴ斑点落葉病菌の染色体 DNA ライブラリーから, *AFTSI* 相同配列を含むクローンを単離した. *AFTSI* 相同領域の塩基配列を決定し, *AFTSI* と 78% の塩基配列が一致する読み枠を見出した. そこで, この読み枠をコードする遺伝子を *AMDEH* と命名した. *AMDEH* と *AFTSI* の機能を比較するために, イチゴ黒斑病菌の *afSI* 変異株に *AMDEH* を導入した. その結果, AF 毒素 I の生産性とイチゴに対する病原性を回復した形質転換体が得られ, *AMDEH* と *AFTSI* が同一機能を持つことが明らかとなった. 両遺伝子が aldo-keto reductase ファミリーの酵素をコードすること, AF 毒素 I と AM 毒素には共通な部分構造が存在することから, これら遺伝子の毒素生合成における機能を推定した.

The common gene involved in host-specific toxin biosyntheses of the strawberry and apple pathotypes of *Alternaria alternata*

Takayoshi Tanaka, Kaoru Ito, Rieko Hatta, Mikihiro Yamamoto*, Kazuya Akimitsu**, Takashi Tsuge (Grad. Sch. Bioagric. Sci., Nagoya Univ., *Fac. Agric., Okayama Univ., **Fac. Agric., Kagawa Univ.)

P-51

Fusarium oxysporum f. sp. *conglutinans* 病原性欠損変異株 REMI10 のキャベツ萎黄病に対する生物防除活性と GFP を用いた挙動観察

宮田雄一郎・吉田隆延*・川部眞登・寺岡 徹・有江 力 (農工大農, *東北農研センター)

キャベツ萎黄病の病原菌である *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* Cong:1-1 を親株として REMI 法による形質転換で取得した病原性欠損変異株 REMI10 では, アスパラギン酸プロテイナーゼ遺伝子 *fap1* の内部に形質転換用ベクター pCSN43 が挿入されている (吉田ら, 2001 年度本コンファレンス). この REMI10 はキャベツ (品種, 四季穫) に接種しても病原性を全く示さないが, 今回, 病原菌の接種前に予めキャベツに接種しておくこと, 萎黄病に対する生物防除効果を示し, 発病を低減させることを見出した. そこで, Cong:1-1 と REMI10 にそれぞれ GFP 発現ベクター (pHYG-EGFP および pNEO-EGFP) を導入し, キャベツ根部における挙動を観察した. Cong:1-1 は表皮から侵入し, 接種 3 日目には皮層の細胞間隙に沿って菌糸を伸長し, 皮層の内側の内皮の細胞間隙を通り, 根の維管束木部まで進展していたのに対して, REMI10 は内皮に達した所で進展が阻まれ, 維管束中には観察されなかった. 以上より, REMI10 は病原性に関与する因子を喪失しているもののキャベツ根部への定着能を維持していること, 根の内皮が病害に対する植物の抵抗性反応に関与していることが推測された.

REMI10, a pathogenicity deficient mutant from *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*-Biocontrol activity on cabbage yellows and behavior on cabbage root.

Yuichiro Miyata, Takanobu Yoshida*, Masato Kawabe, Tohru Teraoka, Tsutomu Arie (Tokyo Univ. Agric. & Tech., *Natl. Agric. Res. Ctr., Tohoku)

P-53

Fusarium oxysporum f. sp. *lycopersici* の 3 つのレースに関する系統解析

川部眞登, 寺岡徹*, 有江力* (農工大院・連農, *農工大・農)

トマト萎凋病の病原菌である *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* には 3 つのレース(1, 2, 3)の発生が国内, 海外で確認されている. 国内外の罹病トマトより分離された菌株を用いて, rDNA intergenic spacer (IGS) 領域, 交配型遺伝子(MAT), endopolygalacturonase 遺伝子(*pg1*)の塩基配列情報に基づき系統樹を作成した. その結果, IGS 領域に基づく系統樹上にはトマト萎凋病菌を含む 3 つのクラスターが見出され, それぞれを C1, C2, C3 と名づけた. C1 は国内で分離されたレース 1, レース 2 と海外で分離されたレース 1 菌株によって, C2 は国内で分離されたレース 1 と海外で分離されたレース 1, レース 2, レース 3 菌株によって, C3 は国内, 海外で分離されたレース 3 菌株によって構成された. MAT 又は *pg1* に基づく系統樹もこのクラスターを支持した. また, 菌糸和合群 (vegetative compatibility group; VCG) と交配型の分布を上記の系統樹と比較すると, クラスター C1 は VCG0031 で交配型が MAT1-1 である菌株より構成されていた. C2 は VCG0030, 0032 または 0030+0032 で交配型が MAT1-2 である菌株より構成されていた. C3 は VCG0033 で交配型は MAT1-2 である菌株より構成されていた. 以上のことより, トマト萎凋病菌には 3 つのクラスターが存在し, それぞれのクラスターは交配型と VCG が同一の菌株によって構成されているため, ある時点より交配を行わずに無性生殖や菌糸融合を行いながら世代を繰り返して独立してできた系統である可能性が示唆された. また, 近年発生した国内のレース 3 (C3 の構成員)は在来のレース 1 や 2 (C1 又は C2 の構成員)より派生したのではなく, 海外より持ち込まれたことが考えられた.

Phylogenetic analysis of three races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

Masato Kawabe, Tohru Teraoka, Tsutomu Arie

(Tokyo Univ. of Agric. & Tech.)

P-55

Diaporthe 属菌の交配型遺伝子

兼松聡子, 足立嘉彦, 吉田幸二 (果樹研究所)

子のう菌類 Pyrenomycetes 綱 Diaporthe 目に属する *Diaporthe* 属菌 (anamorph : *Phomopsis*) は, 植物病原菌から腐生菌まで多くの種を含む属である. 本属菌は草本, 木本植物ともに寄生し, 果樹においても本属菌による病害が 2 2 種類報告されている. 伝染源として伝搬に関与すると考えられる子実体の形成機構を明らかにするため, 本属菌の交配型遺伝子の構造について検討した. *Diaporthe* sp. (W-type) の異なる交配型を持つ 1 組の菌株 (MAT1 株と MAT2 株) の交配型遺伝子領域 (イディオモルフ) を Arie ら(1997)の方法によりクローニングし, 構造解析した. その結果, MAT1 株, MAT2 株とも交配型遺伝子領域にそれぞれ 3 つずつ ORF を有していた. これらのうち 1 つは, MAT1 株の場合 α -box を有する ORF(MAT1-1-1), MAT2 株は HMG-box を有する ORF(MAT1-2-1)が他の子のう菌類と同様に存在した. これまでに交配型遺伝子領域が決定されたヘテロタリックな子のう菌類においては, 酵母を除き, 異なる交配型株のイディオモルフの配列と, そこに存在する ORF はそれぞれ異なることが知られている. しかし, *Diaporthe* 属菌においては, 上述の MAT1-1-1 および MAT1-2-1 以外に, クリ胴枯病菌 *Cryphonectria parasitica* の MAT1 株で見いだされた MAT1-1-2 と相同性のある ORF(MAT1-1-2 とする), および他の Pyrenomycetes 綱の菌の MAT1 株に存在する MAT1-1-3 が, MAT1 株だけでなく, MAT2 株にも存在した. 以上の結果, *Diaporthe* 属菌の交配型遺伝子領域は, 近縁菌とは異なり, 異なる交配型遺伝子領域に, 1 組の異なる遺伝子と, 2 つの相同な遺伝子を持つ特徴があることが明らかとなった.

Analysis of mating type genes in *Diaporthe* sp.

Satoko Kanematsu, Yoshihiko Adachi, Kouji Yoshida

(Natl. Inst. of Fruit Tree Sci.)

P-57

灰色かび病菌のジカルボキシイミド圃場耐性の遺伝子診断法による検出

大島美知代, 藤村真, 岡田清嗣¹, 竹内妙子², 山口勇³

(東洋大生命・大阪農技セ¹・千葉農総研²・理研 PSC³)

・灰色かび病菌は多犯性の植物病原菌であり、農作物に感染し重大な被害を引き起こす。灰色かび病を防除するためにジカルボキシイミド剤が使用されているが耐性菌が出現し大きな問題となっている。我々は灰色かび病菌の二成分ヒスチジンキナーゼ *BcOS1* 遺伝子のクローニングを行い、耐性変異として1アミノ酸置換 (TypeI, ³⁶⁵Ile→Ser) を同定した。この変異が制限酵素部位内におこっていることを利用してジカルボキシイミド耐性を検出するためPCR-RFLP 遺伝子診断系を構築した。日本の26圃場から105菌株を収集しPCR-RFLP 分析を行った。その結果、日本の圃場には³⁶⁵Serを持つ耐性菌が広く分布していることが分かった。しかし、大阪で分離された耐性菌株では、薬剤耐性とPCR-RFLPの結果が一致しないものが含まれていた。これらの耐性菌の *BcOS1* 遺伝子の解析から新たに2種の耐性変異、TypeII (²²⁵His→Pro, ³⁶⁸Val→Phe, ³⁶⁹Gln→His, ⁴⁴⁷Thr→Ser)・TypeIII(³⁶⁹Gln→Pro, ³⁷³Asn→Ser)を同定した。TypeIIの変異部位が連続した2つのアミノ酸置換をもつことに着目し、13bpのプライマーを作成した。このプライマーを用いてAS-PCRを行ったところTypeIIの変異を特異的に検出することができた。TypeIIIについても同様の系を構築中である。

Molecular diagnosis of dicarboximide-resistance in field strains of *Botrytis cinerea*

Michiyo Ohsima, Makoto Fujimura, Kiyotsugu Okada¹, Taeko Takeuchi², Isamu Yamaguchi³

(Univ.of Toyo, Osaka prefectural agri. res. cen.1, Chiba prefectural agri. res. cen.2, PSC Riken³)

P-59

麹菌 *Aspergillus oryzae* からアデニン要求性株の単離

金鋒傑, 石一智, 有岡学, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)

【目的】麹菌 *A. oryzae* の宿主ベクター系として、*argB*, *niaD*, *sC* などのマーカーが使用されている。しかしながら、酵母などと比べて、使用できるマーカーは十分ではない。今回、新たな宿主ベクター系を構築することを目的として、アデニン要求性株の単離を試みた。

【方法と結果】親株として、麹菌 *A. oryzae* 単核分生子変異株 UT-N1 (*niaD*)¹⁾ を用いた。アデニン要求性株の単離は次の2つの方法により行った。1) UV処理による変異株の単離 ; 分生子をUV照射処理し、アデニンを含まないM培地 (N源としてアンモニウム塩を含む) で約10~14時間の培養を行い、ミラクロス濾過により生育しない分生子を回収した。この操作を繰り返し行うことによりアデニン要求性株の濃縮を行った。回収した分生子を、栄養培地 DPY プレートでシングルコロニーを形成させ、これらの株の中からアデニン添加M培地で生育し、M培地では生育しないものをアデニン要求性株とした。2) ade 遺伝子破壊による単離 ; 酵母 *ADE1* 遺伝子ホモログ (*adeA*, E value=4.00E-98) をPCRでクローニングした。変異 *adeA* 遺伝子を作成し、遺伝子破壊による *adeA* 変異株の単離も試みている。

1) 石ら 糸状菌分子生物学コンファレンス要旨集 (2002)

Isolation of adenine auxotrophic mutants from *Aspergillus oryzae*

Fengjie Jin, Kazutomo Ishi, Manabu Arioka, Katsuhiko Kitamoto

(Dept. of Biotechnology, Univ. of Tokyo)

P-61

Aspergillus aculeatus の形質転換系の開発

金政真、川口剛司、炭谷順一、荒井基夫 (阪府大院・応生化、先端研)

【目的】 *Aspergillus aculeatus* は高いセルラーゼ分泌生産能を有し、そのセルロース糖化能はバイオマスの有効利用の観点から極めて有用である。これまでに各セルラーゼの酵素学的性質は明らかとなっているが、各酵素遺伝子の発現制御機構等の遺伝子レベルでの解析が待たれている。また本菌株の持つ優れたタンパク分泌能は異種タンパク生産の宿主としても期待できることから、形質転換系の確立が必要となっている。

今回、5-フルオロオロチン酸 (5-FOA) による逆選択も可能なウラシル要求性株 (*pyrG*) を取得して本菌株の形質転換を可能とし、本システムを用いて異種タンパク質を分泌させたことを報告する。

【方法と結果】 *Aspergillus aculeatus* No.F-50 の孢子懸濁液に 1 分間紫外線照射を行った後、0.12% 5-FOA および 20 mM ウリジンを含む最少培地プレートにて 5-FOA 耐性株を選択した。得られた 200 株のうち 30 株のウリジン要求性を調べ、生育が極端に遅かった 20 株をウリジン要求性株とした。これらのうち、orotidine-5'-phosphate-decarboxylase をコードする *pyrG* 遺伝子の欠損株を選択するために、*A. nidulans* 由来 *pyrG* 遺伝子を含むプラスミド pPL6 をプロトプラスト-PEG 法にて導入した。この結果、*pyrG* を導入した場合にウラシル資化能が相補される *A. aculeatus pyrG* 株を得た。また、この株に糸状菌において自立複製が可能な *AMA1* 配列を持つプラスミドを導入したところ、染色体組込型プラスミドと比して数十～数百倍の効率で形質転換体を得られたことから、*A. aculeatus* においても *AMA1* 配列が機能することが示唆された。さらに、本菌株を宿主として、本菌株由来 β -マンノシダーゼ遺伝子の高発現を試みたところ、分泌タンパクの大部分が発現させたタンパク質であることが電気泳動にて確認された。

Transformation of *Aspergillus aculeatus* using the *pyrG* gene of *Aspergillus nidulans*

Shin Kanamasa, Takashi Kawaguchi, Jun-ichi Sumitani and Motoo Arai

(Grad. Sch. Agric. and Biol. Sci., and Res. Inst. Adv. Sci. Technol., Osaka Pref. Univ.)

P-63

カルボキシン耐性遺伝子によるシイタケ (*Lentinula edodes*) *sdil* の相同組換え

齋藤久美子、渡辺久敬、入江俊一*、佐藤利次 (岩手生工研、*滋賀県立大・環境科学)

担子菌類における遺伝子破壊法を用いた新規遺伝子の機能解明については、*Ustilago maydis* で最も多く報告されているが、食用担子菌類についてはまだ例がない。我々は、シイタケ (*Lentinula edodes*) における遺伝子破壊法の確立を目的に、人工的に変異導入したシイタケ由来 DNA が染色体 DNA と相同組換えを生じるか否か調べた。

我々は昨年、ヒラタケでの報告をもとにしてシイタケ iron-sulfer protein (IP) subunit 遺伝子 (*sdil*) に 1 塩基変異を加え、カルボキシン耐性遺伝子 (*cbx^R*) を構築した¹⁾。そこで今回、1.3, 2.0, 2.8, 3.2, 3.6 および 3.9 kb の *cbx^R* 部分断片を PCR により増幅し、それぞれシイタケ SR-1 株に導入した。その結果、3.6 kb 以上の長さの部分断片を導入した場合にカルボキシン耐性株が得られ、その形質転換効率は 0.1~0.2 個/ μ g であった。*cbx^R* における変異部位を認識する制限酵素を用いた PCR-RFLP 解析により、これらの耐性株はいずれも相同組換え体であることが確認された。さらに形質転換体についてサザン解析を行った結果、*sdil* 座での遺伝子置換のみが起こった株と、これに加えてランダム挿入された株が見出された。以上の結果から、シイタケにおいても相同組換えが生じることが明らかとなった。

1) 入江ら, 第 1 回糸状菌分子生物学コンファレンス講演要旨集, P18

2)

Homologous recombination of carboxin resistant gene at the *sdil* locus in *Lentinula edodes*

Kumiko Saito, Hisayuki Watanabe, Toshikazu Irie*, Toshitsugu Sato (Iwate Biotech. Res. Center, *Dept. Env. Sci., Shiga Pref. Univ.)

P-65

麹菌におけるポリ A トラップと *Agrobacterium* を用いた形質転換

鈴木聡, 竹谷博子, 楠本憲一, 柏木豊 (独法・食総研)

我々はすでに麹菌用の 2 種類の gene trap vector (gene trap vector, pPTR-EGFP1 及び polyA trap vector, pUsCdelPA1)を開発し、pPTR-EGFP1 を用いた形質転換により得られた約 300 の形質転換株のうちの一つが糸状菌における新規遺伝子、酵母 *DUR3* のホモログをトラップしていたことを報告した(鈴木ら,農芸化学会大会要旨集,p169,2002)。一方、polyA trap vector, pUsCdelPA1 を用いた形質転換株は得られなかった。この原因として、ポリ A トラップにおける、1. ゲノム内へのベクター挿入効率の問題。2. ゲノム内へのベクター挿入のうち、遺伝子内への挿入の起こる確率の問題。3. 哺乳類と糸状菌の 3'制御領域の構造等の違いによる原理的な問題、の 3 点が考えられた。Gene trap が遺伝子の特異的な発現に基づいて選抜できるのに対し、polyA trap はより網羅的な未知遺伝子の単離と機能解析に利点がありポストゲノム機能解析に役立つと考えられるため麹菌への応用は重要である。

今回我々は pUsCdelPA1 の制限サイトを改良し遺伝子内への挿入確率を高めた pUsCdelPA2 を用いて 25 回の形質転換を行い、計 500 μ g のベクターを用いて 1 株の形質転換株を得た。これによりポリ A トラップが糸状菌においても機能し得ることが明らかとなり、ポリ A トラップを用いてポストゲノム機能解析に実用上十分な数の形質転換株を得るためには正味の形質転換効率の上昇が必須であるとの認識を得た。

我々は形質転換効率を上昇させるため、*Agrobacterium tumefaciens* を用いた形質転換法の検討を行なっている。

PolyA trap transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in *Aspergillus oryzae*

Satoshi Suzuki, Hiroko Taketani, Ken-ichi Kusumoto, Yutaka Kashiwagi

(Natl.Food Res.Inst.)

ポスター 2 日目

P-2

***Aspergillus nidulans* の Phospholipase A₂ 遺伝子の単離と解析**

洪思鉉、堀内裕之、太田明徳（東大院農生科・応生工）

〔目的〕 ホスホリパーゼ A₂ (PLA₂) は分泌性 PLA₂ (sPLA₂) と非分泌性の cytosolic PLA₂ (cPLA₂) の isoform が存在し、cPLA₂ は膜リン脂質の 2 位のアシル鎖を加水分解して脂肪酸とリゾリン脂質を生産する酵素である。cPLA₂ は哺乳類などの高等真核生物においては アラキドン酸カスケードの初発酵素であると同時に、膜リン脂質の代謝回転、膜構築にも役割をもつ。しかしながら糸状菌における機能は全く未解明である。そこで、*Aspergillus nidulans* の PLA₂ をコードする遺伝子を単離し機能解析することを目的とした。

〔方法と結果〕 哺乳類、植物の cPLA₂ の sequence data を用いて cPLA₂ によく保存されている lipase 領域を本に primer を design し、*A. nidulans* FGSC26 株の genome DNA より PCR により断片を増幅した。この断片をプローブとして *A. nidulans* genomic library より cPLA₂ をコードすると考えられる遺伝子を単離した。さらに 5'-RACE, 3'-RACE を行いイントロンの位置の決定、N 末端の推定を行った。その結果、長さ 2743bp のこの遺伝子は 744aa よりなるタンパク質をコードすることは予想され、intron は存在しなかった。その ORF には現在まで報告された植物の cPLA₂ からヒトの cPLA₂ に至るまで高度に保存されている GGGR, GXSGX Motif など lipase 活性を持つ領域が存在することを確認した。それでこの遺伝子を *plaA* と命名した。*plaA* の遺伝子産物である PlaA についてホモロジー解析を行ったところ哺乳類の cPLA₂ と一番高い相当性を示し PlaA はヒトの cPLA₂ と 21.9% の identity を示した。カビは哺乳類のようにアラキドン酸を細胞内に持たないことから PlaA はアラキドン酸カスケードの初発酵素以外の役割を持つことが予想された。

Isolation and Characterization of a Gene Encoding Phospholipase A₂ (*plaA*) of *Aspergillus nidulans*

Sahyun Hong, Hiroyuki Horiuchi and Akinori Ohta (Department of Biotechnology, The University of Tokyo)

P-4

麹菌の持つ 2 つの分泌型ホスホリパーゼ A₂ 遺伝子の単離と解析

中西義人、有岡学、北本勝ひこ（東大院・農生科・応生工）

ホスホリパーゼ A₂ (PLA₂) はグリセロリン脂質の 2 位のエステル結合を加水分解し脂肪酸とリゾリン脂質を遊離する酵素である。その局在から細胞内型と分泌型に大別されるが、このうち分泌型 (sPLA₂) はその活性に mM オーダーの Ca²⁺ を要求する、分子量が約 13-15kDa の S-S 結合に富む小さなタンパク質である。sPLA₂ はこれまでヘビやハチの毒成分として、また動物の各組織から非常に多くの種類が見いだされており、特に動物由来の sPLA₂ はアラキドン酸の生成を介して生理活性脂質であるエイコサノイド類の産生に関与する酵素として注目されている。また最近我々は sPLA₂ が神経細胞への分化誘導に重要な働きをすることを見出している。これに対して微生物由来の sPLA₂ は放線菌、糸状菌からその存在が報告されているが、その生理的機能についてはほとんど明らかにされていない。本研究では微生物における sPLA₂ の生理機能を解明することを目的として、麹菌を対象に sPLA₂ 遺伝子の単離と解析を行った。

麹菌ゲノム配列から sPLA₂ と相同性の高い配列を検索した結果、2 つの配列を見出した。両遺伝子を麹菌ゲノムから PCR を用いて単離し、塩基配列を決定した。各々は N 末端にシグナル配列を持つ 133, 222 アミノ酸をコードすると予想され、sPLA₂ の活性中心に共通して認められる His-Asp ペア配列、4 ないし 6 個のシステイン残基を有していた。また活性中心を含む中央部分 33 アミノ酸においては他の微生物由来 sPLA₂ との相同性は 60-70% だった。各々を発現用ベクターに連結して sPLA₂ を持たない酵母 *S. cerevisiae* および大腸菌 Origami(DE3) 株に導入した。現在、組換え体の sPLA₂ 活性の確認を [³H] オレイン酸標識した大腸菌膜画分および合成基質を用いて行っている。

Molecular cloning and characterization of two secretory phospholipase A₂ genes from *Aspergillus oryzae*.

Yoshito Nakanishi, Manabu Arioka, and Katsuhiko Kitamoto (Department of Biotechnology, Univ. of Tokyo)

P-6

コウジ 朶 由来新規ロイシンアミノペプチダーゼ *pepE* 遺伝子のクローニングと発現

鯉淵恭子、小島麻里、二宮大記、岡村英喜、丸山潤一^{*}、北本勝ひこ^{*}

(味の素(株) 食品研究所、^{*}東大院農生科 応生工)

【目的】ロイシンアミノペプチダーゼは醤油製造において、うま味を呈するグルタミン酸を遊離させる重要な酵素である。本研究ではコウジ 朶 由来新規ロイシンアミノペプチダーゼの遺伝子クローニングおよび高発現化を目的とした。

【方法】発芽大豆より単離されたアミノペプチダーゼ GX の遺伝子配列をもとに、*A. nidulans*、*A. oryzae* よりゲノム DNA、cDNA をクローニングした (*pepE*)。さらに *A. oryzae pepE* cDNA を高発現プロモーター下に連結し、*pepE* 高発現ベクターを構築して *A. oryzae* に導入した。高発現株を小麦アサ培地で培養し、培養抽出液から PepE を精製して酵素学的諸性質を解析した。

【結果】*A. nidulans*、*A. oryzae* の *pepE* 遺伝子の ORF は各々 1560bp、1530bp で各々 520 アミノ酸、510 アミノ酸をコードしていると予想された。高発現株から精製した PepE を用いて、様々なペプチドに対する分解活性を解析したところ、Zn²⁺ または Co²⁺ 存在下で Leu-pNA を分解することを見出した。また、本酵素は食塩存在下で Leu-pNA 分解活性が促進されることから、好塩性酵素である可能性が推定された。以上の結果から本酵素はこれまでに報告のない新規ロイシンアミノペプチダーゼであることが判明した。

Molecular cloning and over expression of novel leucine amino peptidase *pepE* from *Aspergillus sp.*

Kyoko Koibuchi, Mari Kojima, Daiki Ninomiya, Hideki Okamura, Jun-ichi Maruyama^{*}, Katsuhiko Kitamoto^{*}
(Ajinomoto, ^{*}) Univ. of Tokyo)

P-8

黒麹菌 *Aspergillus niger* No.12 株由来エキソ型イヌリナーゼ遺伝子の構造解析と酵母 *Pichia pastoris* による分泌発現

森山聡、六車三治男、太田一良 (宮崎大・農・応生科)

【目的】*A. niger* No.12 株は、エキソ型イヌリナーゼ P-I と P-II およびエンド型イヌリナーゼ P-III を細胞外に著量生産する。本報は、エキソ型酵素 P-I をコードする遺伝子 *inuE* の構造解析と分泌発現を目的とする。

【方法と結果】染色体 DNA から *inuE* 遺伝子を含む BamHI 断片 (3660 bp) をクローニングした。その ORF はアミノ酸 19 残基のシグナル・ペプチドと 518 残基の成熟タンパク質をコードし、ORF 内に 60 bp のイントロンが存在した。また、翻訳開始コドンの 75 bp 上流に TATA ボックス (TATAAA) が認められた。成熟タンパク質には 1 個のシステイン残基、9 個の N-グリコシド結合型糖鎖付加部位が存在し、その推定分子量は 59,142 Da、等電点は 5.14 であった。分泌シグナルを含む *inuE* cDNA をベクター pPIC3.5 によりメタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* GS115 株に導入した結果、エキソ型イヌリナーゼが分泌発現した。近隣結合法により推定アミノ酸配列をもとに作成した分子系統樹では、作用様式の異なる糸状菌由来のエキソ型とエンド型イヌリナーゼは互いに進化距離の離れた位置にクラスターを形成したことから、両酵素の起源は異なることが示唆された。

Sequence analysis of an exoinulinase gene from *Aspergillus niger* strain 12 and its expression in *Pichia pastoris*

Satoshi Moriyama, Michio Muguruma, Kazuyoshi Ohta (Dept. Biochem. Appl. Biosci., Miyazaki Univ.)

P-10

麹菌 *Aspergillus oryzae* の生分解性プラスチック分解に関わる遺伝子群の探索

米田幸世¹, 高橋徹¹, 前田浩¹, 山形洋平^{1, 2}, 阿部敬悦^{1, 2}, 長谷川史彦², 五味勝也^{1, 2}, 中島佑^{1, 2}

(¹東北大・院・応生科, ²東北大・NICHe)

【目的】環境への配慮から従来の石油化学系プラスチックから生分解性プラスチックへの転換が進められているが、使用量が急増した場合にはより高速で高効率な分解システムの開発が必要とされる。我々は、生分解性プラスチックの分解システムにわが国の発酵産業が有している固体培養技術を活用することを考え、安全性が高い麹菌 *Aspergillus oryzae* の利用について検討したところ、生分解性プラスチックを分解資化することを見出した。本研究では、麹菌 EST 情報をもとに我々が試作した cDNA マイクロアレイを用いて、生分解性プラスチックを基質とした麹菌の培養において特異的に発現する遺伝子群を探索し、分解に関与すると考えられる遺伝子の人為的制御により高分解活性の麹菌株を育種することを目指している。

【方法及び結果】生分解性プラスチックとしては 1,4-butanediol と succinate のポリマーである polybutylene succinate (PBS)を用いた。乳化 PBS を単一炭素源とする寒天平板培地上に麹菌が生育しコロニー周辺に明瞭なハローを形成することから、麹菌が PBS を分解資化することを確認した。そこで、乳化 PBS、PBS 顆粒、1,4-butanediol ならびに succinate のそれぞれを炭素源とした液体培養を行い、菌体から抽出精製した mRNA を用いて cDNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析を行った。その結果、PBS を基質にした培養においてのみ特異的に発現する遺伝子を 2 種類見出した。それらの遺伝子の構造と機能等を解析し PBS 分解に関わる役割を考察した結果を報告する。

1) 丸山ら：日本農芸化学会大会講演要旨 p.192 (2002)

Identification of genes involved in the degradation of biodegradable plastics from *Aspergillus oryzae*

Sachiyo Yoneda¹, Tohru Takahashi¹, Hiroshi Maeda^{1,2}, Youhei Yamagata^{1,2}, Keietsu Abe^{1,2}, Fumihiko Hasegawa², Katsuya Gomi^{1,2}, Tasuku Nakajima^{1,2}

(¹Division of Life Science, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku Univ, ²NICHe, Tohoku Univ)

P-12

Aspergillus nidulans における *usoA* 遺伝子の機能解析

浅野静, 飯島隆, 北本勝ひこ, 中島春紫 (東大院農生科・応生工)

【目的】*Aspergillus* 属をはじめとする糸状菌は有用物質生産の宿主として注目されているが、タンパク質の細胞内輸送については解析は進んでいない。酵母 *S.cerevisiae* より単離された *USO1* 遺伝子産物 USO1p は ER-Golgi 体間において、ER から出芽した輸送小胞をターゲット膜にひきよせて繋ぎとめる繋留(tethering)の役割を担っていると考えられている。演者らは、糸状菌における細胞内タンパク質輸送機構を解析する目的で、*Aspergillus nidulans* における *USO 1* 遺伝子ホモログである *usoA* を単離し構造を決定している。今回は *usoA* 遺伝子の条件発現株を構築することにより *usoA* 遺伝子の機能解析を行った。

【方法と結果】*usoA* 遺伝子のプロモーターを *alcA* プロモーターに置換し、培地中の C 源によって *usoA* 遺伝子の発現が制御される株を構築し、*usoA* 発現抑制下での形態観察を行なった。分生子発芽時では、菌糸先端が膨潤し、DAPI 染色により多数の核が観察された。また、Calcofluor white 染色によって菌糸体のキチンの局在を観察したところ、隔壁形成の異常が確認された。このプロモーター置換株を *usoA* 発現誘導培地から抑制培地に移行して培養し、細胞内タンパク質を抽出し CpyA 抗体を用いて Western 解析を行なったところ、前駆体と考えられる分子量のバンドが検出された。

Analysis of *usoA* gene in *Aspergillus nidulans*

Shizuka ASANO, Takashi IJIMA, Katsuhiko KITAMOTO, Harushi NAKAJIMA

(Department of Biotechnology, the University of Tokyo)

P-14

麹菌 *Aspergillus oryzae* における ER および Golgi 体の動態解析

菊池聡子, 丸山潤一, 中島春紫, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)

【目的】 麹菌はタンパク質分泌能力の高さから異種タンパク質生産の宿主として注目されているが、その分泌経路についての細胞生物学的解析はほとんど進んでいない。演者らはこれまでに、ER 内腔の分子シャペロン BiP をコードする *bipA* を用いた EGFP による ER の可視化を行った¹⁾。今回は、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の cis Golgi t-SNARE をコードする *SED5* の相同遺伝子(*sedF*)を *A. oryzae* からクローニングし、Golgi 体の可視化を行った。

【方法と結果】 Golgi 体の可視化を試みるため、*A. oryzae* EST database の情報より、*S. cerevisiae* *SED5* と相同性をもつ遺伝子および cDNA を取得した。*A. oryzae* *sedF* cDNA を *S. cerevisiae* *sed5-1* 変異株において発現させたところ、SedF タンパク質は *S. cerevisiae* Sed5 タンパク質の機能を相補せず、発現を強くするとその生育を阻害した。また、SedF タンパク質の局在の解析を目的として、その N 末に EGFP を連結して *A. oryzae* で発現させたところ、菌糸内にドット状の蛍光が観察された。現在、BipA タンパク質と赤色蛍光タンパク質 DsRed2 との融合タンパク質を合わせて発現し、ER および Golgi 体の動態を同時に解析することを試みている。

1) 菊池ら, 第 1 回糸状菌分子生物学コンファレンス要旨集, p43

Studies on the dynamics of ER and Golgi body in *Aspergillus oryzae*

Satoko Kikuchi, Jun-ichi Maruyama, Harushi Nakajima, Katsuhiko Kitamoto

(Dept. of Biotechnology, Univ. of Tokyo)

P-16

麹菌 *Aspergillus oryzae* の液胞膜 ATPase VmaC の細胞内局在と機能解析

奈良秀徳, 有岡学, 北本勝ひこ (東大院・農生研・応生工)

【目的】 酵母 *S. cerevisiae* の液胞膜 ATPase(V-ATPase)は 13 種類のサブユニットから構成され、細胞質側の親水性サブユニット群 V_1 ドメインと膜内在性の疎水性サブユニット群 V_0 ドメインが結合してプロトンポンプを形成する。当研究室において *A. oryzae* RIB40 株のアルカリ、種麹製造条件下の EST 解析により、酵母の液胞膜 ATPase V_0 ドメインのサブユニットをコードする *VMA3* 遺伝子のホモログ(*vmaC*)をクローニングした。今回は、VmaC の詳細な機能解析を目的とした。

【方法と結果】 VmaC タンパク質の局在を調べるために、その C 末に EGFP を連結した融合タンパク質発現プラスミドを作製し、*A. oryzae* に導入した。蛍光顕微鏡による観察の結果、EGFP 蛍光が液胞膜上にも観察されたが、多くは細胞質にドット状に観察された。これらの観察像は、培地の pH により異なる挙動を示した。現在、*vmaC* 遺伝子破壊株の表現型を詳細に解析することにより、VmaC タンパク質の機能解析を試みている。

Localization and functional analysis of VmaC, a subunit of vacuolar ATPase in *Aspergillus oryzae*.

Hidenori NARA, Manabu ARIOKA, Katsuhiko KITAMOTO

(Department of Biotechnology, the University of Tokyo)

P-18

麹菌における液胞タンパク質 missort 変異株の原因遺伝子の同定

大根田守, 有岡学, 北本勝ひこ (東大院・農生科・応生工)

【背景と目的】液胞には産業上有用な多種類の加水分解酵素が含まれている。我々はこれまでに、醸造産業に長年用いられ、タンパク質高分泌能を有する麹菌において、液胞型 carboxypeptidase Y と EGFP の融合タンパク質 CPY::EGFP を発現させることにより、液胞タンパク質の挙動を可視化する系を構築した¹⁾。更に、培地中に CPY::EGFP を分泌する変異株を取得し、それらの表現型を解析した²⁾。本研究では、糸状菌における液胞機能及びタンパク質輸送機構を解明し、麹菌を液胞タンパク質分泌生産の宿主として利用することを目的として、これら変異株の原因遺伝子の同定を試みた。

【方法と結果】麹菌野生株から単離したゲノム DNA を用いてコスミドライブラリーを作成した。このコスミドライブラリーを、自律複製領域 *AMA1* 及び選択マーカーとして *niaD* 遺伝子を含むプラスミドと共に、変異株の親株 (NSCE1; *cpyA-egfp, niaD*) に co-transformation した。その結果、*AMA1* プラスミド 10⁶g 当たり約 50 個の *niaD*⁺-transformants が得られ、それらのうち約半数がコスミドの一部を含むプラスミドを有することことが分かった。同様に、液胞タンパク質 missort 変異株のうちアルカリ性培地 (pH 8.0) で生育が極度に低下する変異株 (*hfc-1*) を co-transformation することによって、約 1,000 個の *niaD*⁺-transformants を得ることに成功した。これらをアルカリ性の培地で培養したところ、*hfc-1* と比較して旺盛な生育を示す形質転換体が認められた。現在、表現型が回復した形質転換体から *AMA1* とコスミドの融合プラスミドを回収し、相補断片の同定を試みている。

1) Ohneda *et al.* (2002) Fungal Genet. Biol. 37, pp.22-28

2) 大根田ら 日本生物工学会 2001 年度大会講演要旨集 p.231

Identification of mutations in *vps* (vacuolar protein sorting) mutants from *Aspergillus oryzae*.

Mamoru Ohneda, Manabu Arioka, and Katsuhiko Kitamoto

(Dept. of Biotechnology, Univ. of Tokyo)

P-20

Aspergillus nidulans の Acetyl-CoA Synthetase(Acs) は嫌氣的 ATP 生成に関与する

高崎一人, 高谷直樹 (筑波大, 応生化), 祥雲弘文 (東大院, 応生工)

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

【方法および結果】*A. nidulans* をエタノールを唯一の炭素源として嫌氣的に培養したところ、経時的に培地中の硝酸が還元されアンモニアと酢酸が生成し、アンモニア醗酵することが示された。*A. nidulans* の様々な変異株中のアンモニア醗酵に関わる酵素活性を測定したところ、この異化的硝酸還元系には硝酸同化系酵素遺伝子(*niaD, niiA*)及びエタノールの同化に関与する遺伝子(*facA, aldA*)が重要であることが示唆された。acetyl-CoA synthetase (Acs)をコードする遺伝子(*facA*)の変異株では、Acs だけでなくこのアンモニア醗酵の鍵反応であり嫌氣的 ATP 生成を触媒する acetate kinase(Ack)の活性も検出されなかった。Ack は Acs の逆反応を触媒することから、両酵素は同一の遺伝子(*facA*)によりコードされる可能性が考えられた。一方、Ack 活性は、嫌気条件下で培養した場合に高いのに対し、Acs 活性は好気条件下で高かった。以上の結果より、酵素の反応方向が培養の際の通気条件によって制御されている可能性が示唆された。さらに、シクロヘキシミドを添加して培養を行ない、Acs と Ack の両酵素活性を測定した。その結果、通気による反応方向の制御に新たなタンパク合成が必要である可能性が示唆された。

Anaerobic ATP synthesis by Acetyl-CoA Synthetase(Acs) in *Aspergillus nidulans*

Kazuto Takasaki, Naoki Takaya, Hirofumi Shoun* (Applied Biochemistry, Univ. Tukuba, Grad. School of Agricultural and Life Science, The Univ. Tokyo*)

P-22

アカパンカビ (*Neurospora crassa*) DNA 修復遺伝子 *ncRAD14* の機能解析

佐藤正仁, 一石昭彦 (東洋大・生命科学)

DNA 修復機構には除去修復、組換え修復、複製後修復があるが、除去修復に関してはヒトや出芽酵母においてそのメカニズムが明らかになりつつある。特にヒトにおけるNER機構の異常による遺伝子疾患として色素性乾皮症(XP)やコケイン症候群(CS) が知られる。これらの原因遺伝子に相同な遺伝子が様々な生物で発見されており、修復機構の性質から、種を越えて同様の機能を発現する遺伝子が存在していると考えられる。

今回我々は、出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)における除去修復遺伝子である *RAD14* のアカパンカビホモログ *ncRAD14* を単離し、遺伝子破壊株を作成した。

ncRAD14 変異株は紫外線に対して感受性を示し、*ncRAD14* 遺伝子が DNA 修復において重要な役割を果たしていることが示唆された。現在さらに解析を進めているので、その結果についても報告する。

Cloning and Characterization of DNA repair gene *ncRAD14* in *Neurospora crassa*

Masahito Sato, Akihiko Ichiishi

(Lab. Of Mol. Genet., Fac. Life Sciences, Toyo Univ.)

P-24

アカパンカビ (*Neurospora crassa*) DNA 修復遺伝子 *ncRAD10* の機能解析

仁木孝治, 加藤恭徳, 多賀井覚, 一石昭彦 (東洋大・生命科学)

生物のもつDNAは様々な内的、外的要因により絶えず損傷を受けている。しかし、生物にはそれらの損傷を効率よく修復する機構を複数備えており、細胞の突然変異や個体の死を防いでいる。出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) *RAD10* は様々な生物において広く保存されており、DNA 修復機構の中でも広範囲な損傷を修復するヌクレオチド除去修復機構において損傷部位の5'側に切れ込みを入れるエンドヌクレアーゼをコードしていることが分かっている。

今回我々は、アカパンカビにおけるヌクレオチド除去修復機構の解明を目指し、出芽酵母 *RAD10* のホモログ遺伝子をアカパンカビから単離し、これを *ncRAD10* とした。また、アカパンカビ特有の現象である RIP (Repeat Induced Point-mutation) を用いて *ncRAD10* 遺伝子破壊株を作成した。

ncRAD10 変異株は紫外線に対して感受性を示し、*ncRAD10* 遺伝子がDNA 修復において重要な役割を果たしていることが示唆された。現在さらに解析を進めているので、その結果についても報告する。

Cloning and Characterization of DNA repair gene *ncRAD10* from *Neurospora crassa*

Takaharu Niki, Yasunori Kato, Satoru Tagai, Akihiko Ichiishi

(Lab. of Mol. Genet., Fac. Life Sciences, Toyo Univ.)

P-26

Penicillium paxilli における細胞外 DNA の組み込み様式の解析

大井一浩, 伊藤靖夫 (信州大・理)

P. paxilli は神経毒素パキシリンを生成する。パキシリンは *Neotyphodium* 属エンドファイトが生成する神経毒素ロリトリム B の前駆体である。これまでに、遺伝子タギングおよびターゲティング法によって、本毒素の生合成に関与する遺伝子群がクローニングされた。この過程で、遺伝的形質転換時における細胞外 DNA の染色体への組み込み機構に関し、知見が得られている。本研究では、出芽酵母 *RAD51* のオーソログ、*pprad51* 欠失系統を構築し、細胞外 DNA の組み込み様式を解析した。*Rad51* は、減数分裂時および DNA の二重鎖切断部位の組換え修復時に、DNA 鎖間の相同性の検索に主要な役割を果たす。*pprad51* の欠失系統において、アセトアミド利用性をマーカーとした形質転換時には、対照系統と比較して、染色体上の複数部位に組み込みが起こった形質転換体の頻度が有意に増加した。また、そのような形質転換体では、逆方向反復配列(IR)としての組み込みの頻度が増加していた。このことから、細胞外 DNA の同方向反復配列(DR)の形成に対する *Pprad51* の関与が示唆された。しかし、染色体上の 1 カ所で組み込みが起こった形質転換体では、IR の形成頻度の上昇は認められなかった。この原因を説明するために、継代培養時における IR の不安定性について検証した。IR は複製時に 2 次構造を形成し、染色体上から欠失することが知られている。しかし、異なった検定系において、継代培養では IR の不安定性は検出されなかった。現在、形質転換操作時における不安定性について検討を行っている。

Analysis of extra-cellular DNA integration in *Penicillium paxilli*

Kazuhiro Ooi, Yasuo Itoh

(Fac. of Science, Univ. of Shinshu)

P-28

Aspergillus nidulans の遺伝的形質転換時における DNA 二重鎖切断と細胞外 DNA の組み込み

中岡源, 伊藤靖夫 (信州大・理)

遺伝的形質転換時における細胞外 DNA の異所的組み込みには、染色体上の DNA 二重鎖切断(DSB)部位が基質となると考えられる。DSB 量が増加すると考えられる、REMI(Restriction Enzyme-Mediated Integration)法や DSB の修復系の欠失系統における形質転換時には、それぞれ、形質転換頻度と形質転換体あたりの組み込み頻度が上昇する。これらの結果は、DSB 量が細胞外 DNA の組み込みの制限要因である可能性を示唆している。本研究では、両者の関係を定量的に解析することを試みている。REMI 法では、染色体上の制限酵素消化部位において高頻度で組み込みが起こるので、検出を試みる染色体上の DSB 部位を絞り込むことが可能であると考えた。本菌において、エレクトロポレーション法による形質転換時には、頻度が数十倍上昇することがすでに Sanchez らによって報告されている。今回用いた PEG 法では、頻度の上昇は数倍程度であった。この時、組み込んだ DNA 断片の両端の制限酵素部位が再生されている、狭義の REMI も確認した。また、アダプターを用いた Ligation-mediated PCR によって、形質転換操作時の DSB を検出することができた。現在、本法の定量性に関して、検討を行っている。

DSB and extra-cellular DNA integration during the genetic transformation of *Aspergillus nidulans*

Hajime Nakaoka, Yasuo Itoh

(Fac. of Science, Univ. of Shinshu)

P-30

麹菌 CCAAT 結合複合体の分子解剖

田上新次郎,合田秀矢,加藤雅士,小林哲夫,塚越規弘 (名大院・生命農)

【目的】CCAAT 配列結合因子は真核生物において多数の遺伝子の転写促進因子であることが知られている。我々はこれまでに、麹菌 *Aspergillus oryzae* CCAAT 配列結合因子(Hap 複合体)を構成する3種のサブユニット遺伝子 *AohapB,C,E* を分離し、AoHapB,C,E がヘテロライマーを形成して DNA に結合することを明らかにしてきた。各サブユニットは真核生物間で高度に保存された領域(コア領域)を有しており、この領域は複合体の形成及び DNA 結合に必須の領域であると考えられている。各種リコンビナントサブユニットを用いた解析から、コア領域のみで複合体を形成し、DNA 結合能を有することを明らかとしている。本研究では、AoHapB,C,E のコア領域に含まれない領域の、転写促進活性への関与を解析した。

【方法及び結果】*in vivo* における Hap 複合体の機能は、*A.nidulans hapB* 欠失株、*hapC* 欠失株、*hapE* 欠失株それぞれに *AohapB,C,E* の全長及び部分欠失 cDNA を導入して解析した。Endo- β -1,4-glucanaseA 遺伝子および Taka-amylaseA 遺伝子が、Hap 複合体により転写促進されることから、これらの酵素活性を指標に各サブユニットの転写活性化能に関与する領域を解析した。その結果、AoHapB の C 末側領域及び、AoHapC の N 末側領域に、麹菌 Hap 複合体の転写促進機能保持に重要な領域が存在することが示唆された。AoHapB の C 末側領域は核移行に関与することが示唆されたため、同領域内に存在する推定核移行シグナルに点変異を導入し解析を進めている。AoHapC の N 末側領域は N 末端から順次アミノ酸を欠失させ、転写活性化に必要とされる領域の特定を行っている。

Molecular dissection of the *Aspergillus oryzae* CCAAT-binding complex

Shinjiro Tanoue, Hideya Gouda, Masashi Kato, Tetsuo Kobayashi, and Norihiro, Tsukagoshi

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

P-32

Hap 複合体と相互作用する因子, AnHapX, の解析

長瀬崇, 田中昭光, 加藤雅士, 小林哲夫, 塚越規弘 (名大・生命農)

【目的】真核生物の遺伝子プロモーター領域には約 30% の頻度で CCAAT 配列が存在する。酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の Hap 複合体は4種類のサブユニット Hap2p/3p/4p/5p からなる。Hap2p/3p/5p で3量体を形成して CCAAT 配列への結合能を有し、更に Hap4p がアセンブリして遺伝子の転写を促進する。我々はこれまでに糸状菌 *Aspergillus nidulans* 及び *A. oryzae* の Hap 複合体が少なくとも3種類のサブユニット HapB/C/E からなることを明らかにした。しかし、*S. cerevisiae* Hap4p ホモログは *Kluyveromyces lactis* 以外では発見されておらず、糸状菌 Hap 複合体に第4の因子が含まれているのかが不明であった。我々は、酵母 two-hybrid システムの原理を応用して *A. nidulans* cDNA ライブラリーをスクリーニングし、Hap 複合体と相互作用し、転写を促進する可能性のある因子の遺伝子 *AnhapX* のクローニングに成功した。今回は AnHapX の機能解析を行ったので報告する。

【方法及び結果】AnHapX は475アミノ酸残基からなり、*S. cerevisiae* や *K. lactis* の Hap4p と N 末で高い相同性を有する14アミノ酸の領域が見られた。しかし、その他で似た配列は存在せず、全体としての相同性は低かった。LexA と Hap 複合体のそれぞれのサブユニットの融合遺伝子 (LexA - *hapB*, LexA - *hapC*, LexA - *hapE*) を用いて、Hap サブユニットと AnHapX との相互作用を β -ガラクトシダーゼ活性を指標に定量的に評価した。その結果 AnHapX は Hap 複合体との相互作用を介して転写を促進することが明らかとなった。

Analysis of a novel factor ,AnHapX, which interacts with the Hap complex

Takashi Nagase, Akimitsu Tanaka, Masashi Kato, Tetsuo Kobayashi, Norihiro Tsukagoshi

(Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya Univ.)

P-34

麹菌のシデロフォア生産調節因子(SreAo)の機能解析

○渡辺久敬、佐藤利次（岩手生工研）

麹菌(*A.oryzae*)は清酒の潜在的な着色原因となっている、シデロフォアの一種であるフェリクリシンを分泌する。麹菌においてフェリクリシンは鉄欠乏時に誘導的に分泌生産されることが知られているが、分子レベルでの生産制御機構は完全には明らかでない。一方で数種の糸状菌から単離されている SRE ホモログは GATA-1 型転写因子であり、シデロフォア合成系遺伝子群の発現を転写レベルで制御していることが報告されている。我々もフェリクリシン分泌制御機構の解明を目的として、麹菌から同遺伝子のホモログ (*sreAo*) を単離し解析を行ってきた。それにより *sreAo* は鉄余剰環境下でフェリクリシン合成の第一段階であるオルニチン-N⁵-オキシゲナーゼ遺伝子 (*dffA*) を転写レベルで抑制していることを明らかにした。しかし *sreAo* は鉄欠乏下においても常に一定量発現しており、SreAo が *dffA* 遺伝子転写の ON/OFF をどの様に制御しているかは不明である。我々はこの機構の解明を目指して SreAo の機能解析に取り組んでいる。今回は大腸菌で発現させた組換え SreAo と Electrophoretic gel mobility shift analysis によって SreAo が DNA 結合因子であることを確認した。現在、*dffA* プロモータ領域に対する SreAo の結合領域を探索中である。

Functional analysis of SreAo, a siderophore regulator of *Aspergillus oryzae*.

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

P-36

糸状菌アミラーゼ遺伝子群の転写誘導因子 AmyR の機能解析

村越有里子、加藤直樹、牧田智裕、加藤雅士、小林哲夫、塚越規弘（名大院生命農・生物機構）

【目的】*Aspergillus* 属におけるアミラーゼ遺伝子群の発現は、デンプンやマルトースが α -グルコシダーゼの糖転移活性により、真の誘導物質であるイソマルトースに変換されることにより誘導される。イソマルトースはなんらかの経路を経て、転写活性化因子である AmyR にシグナルを伝達する。*A.nidulans* AmyR は Cys₂Zn(II) タイプの DNA 結合モチーフを有し、*S.cerevisiae* Mal63p と相同な領域 5 箇所 (Zn, MH1~MH4) を持つ。これまでの機能ドメインの解析より、AmyR の MH3 から C 末端にはシグナルに応答する領域や、転写活性化の抑制機能に関与する領域があることが示唆された。これを検証するため、AmyR の MH3 から C 末端領域を高発現させ、イソマルトースシグナルのタイトレーションを試みた。

【方法及び結果】PCR により増幅した *A.nidulans* AmyR の MH3 から C 末 (AmyRC3) をコードする DNA 断片を、構成的高発現を示す *A.nidulans* *gpdA* プロモーター下流に結合し、*gpdA::amyRC3* を作成した。本融合遺伝子を有するプラスミドを、*A.nidulans* α -グルコシダーゼ (*agdB*) 遺伝子破壊株の *pyroA* 座位に導入し AmyRC3 を高発現させた。*agdB* 遺伝子破壊株を用いたのは誘導物質イソマルトースの分解活性が微弱なためである。*gpdA::amyRC3* 導入株におけるアミラーゼの誘導生産を、段階的な濃度のイソマルトースを誘導物質として検討した。低濃度のイソマルトースを用いた場合、*gpdA::amyRC3* 導入株のアミラーゼ生産量は宿主に比べ、顕著に低下した。一方、濃度が高くなるにつれアミラーゼ生産性は回復し、3mM と高濃度になると宿主とほぼ同程度の生産量を示した。これは、イソマルトースシグナルの伝達あるいは AmyR 機能が AmyRC3 の高発現により阻害されることを示している。

Functional analysis of AmyR involved in transcriptional regulation of amylase genes.

Yuriko Murakoshi, Naoki Kato, Tomohiro Makita, Masashi Kato, Tetsuo Kobayashi, Norihiro

Tsukagoshi (Dept. of Biological Mechanisms and Functions, Grand. Sch. of Bioagricultural Sciences, Nagoya Univ.)

P-38

Aspergillus nidulans AmyR の局在性に関する解析

北川秀、赤坂祐樹、牧田智裕、加藤直樹、谷修治、加藤雅士、小林哲夫、塚越規弘 (名大院・生命農学)

【目的】 *A. nidulans* AmyR はアミラーゼ遺伝子の発現誘導に必須な転写活性化因子であり、Cys6Zn(II)₂ タイプの DNA 結合モチーフを有している。このタイプの転写活性化因子には、合成後直ちに核へ移行し、誘導シグナルを感知して転写を活性化するものと、シグナル受容後、細胞質から核へ移行して転写活性化へ至るものの 2 通りが存在する。本報告では、AmyR がいずれの核移行パターンを示すかを明らかにするために、GFP を AmyR の N 末端にフュージョンさせた改変 AmyR を *A. nidulans* 内で発現させ、落射蛍光顕微鏡で観察した。

【方法及び結果】 *alcA* プロモーターの下流に GFP::AmyR をコードする遺伝子を連結したプラスミドを構築し、AmyR 変異株である *A. nidulans* MA1 株に導入した。MA1 株がマルトース、デンプンを含む培地上で生育できないのに対して、GFP::AmyR 発現株はデンプンを含む培地上で正常な生育を示した。

また、GFP::AmyR 発現株はイソマルトース存在下、非存在下と比較して約 3 倍のアミラーゼ生産を引き起こしたことから、GFP::AmyR が AmyR の機能を相補することが示された。蛍光顕微鏡により観察した結果、GFP::AmyR はイソマルトースの有無に関わらず核に局在していた。よって AmyR は翻訳後、直ちに核移行することが示唆された。

Subcellular localization of AmyR, a transcriptional activator of *Aspergillus nidulans*

Shu Kitagawa, Yuki Akasaka, Tomohiro Makita, Naoki Kato, Shuji Tani, Masashi Kato, Tetsuo Kobayashi, and Norihiro Tsukagoshi

(Dept. of Biological Mechanisms and Functions, Grad. Sch. of Bioagricultural Sciences, Nagoya Univ.)

P-40

麹菌 *Aspergillus oryzae* 硫黄同化系遺伝子制御因子 MetR の機能解析

海附玄龍¹、佐野元昭²、畑本修¹、原精一¹、町田雅之²、増田力¹ (野田産研¹、産総研²)

[背景]

麹菌は、外界の条件に応じて必要な栄養素を効率よく利用するために、遺伝子発現を制御する多様な仕組みを持つことが知られている。我々は、硫黄同化系遺伝子の発現制御において中心的な役割を担うと考えられる *A. nidulans* MetR、*N. crassa* Cys-3 のホモログを麹菌 *A. oryzae* よりクローニングし(MetR)、DNA 結合蛋白質としての機能を解析してきた。今回、硫黄同化系遺伝子の発現に与える影響について検討した。また、麹菌の菌体外プロテアーゼは、炭素源・窒素源・硫黄源のいずれかの制限により発現が誘導されることが知られているので、硫黄源の制限による発現誘導と MetR との関係についても検討した。

[方法と結果]

A. oryzae の *metR* 遺伝子を *A. oryzae* の α -アミラーゼのプロモーターにつないだ発現ベクターを構築し、*A. oryzae* を形質転換して、*metR* 強制発現株を得た。この *metR* 強制発現株及び野性株を、メチオニン存在下及び非存在下で培養し、細胞破碎上清を解析した。親株ではメチオニンの存在により完全に抑制されたアシルスルファターゼ活性が、*metR* 強制発現株ではメチオニン存在下でも非存在下の 30%以上の活性を示した。また、*metR* 強制発現株及び野性株を培養し、菌体外プロテアーゼ活性を測定したところ、*metR* 強制発現株は野性株に比べて活性が向上していた。これらの結果より、*A. oryzae* の MetR は、硫黄同化系遺伝子の正の制御因子としての機能を持ち、菌体外プロテアーゼの発現制御にも関与することが示された。

Functional Analysis of the *Aspergillus oryzae* Sulfur Assimilation Gene Regulator, MetR

Genryou Umitsuki¹、Motoaki Sano²、Osamu Hatamoto¹、Seiichi Hara¹、Masayuki Machida²、Tutomu Masuda¹
(Noda Inst. for Sci. Res.¹, Natl. Inst. of Adv. Ind. Sci. Tech. (AIST)²)

P-42

Aspergillus nidulans の二成分性情報伝達系遺伝子の単離と機能解析

古川健太郎、阿部敬悦、中島佑 (東北大院農・応生科)

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、高浸透圧に曝されると high-osmolarity glycerol response 1 (HOG1) MAPK cascade を活性化し、浸透圧差をなくすべくグリセロールを蓄積する。これには浸透圧センサーヒスチジンキナーゼ Sln1p、リン酸基伸介因子 Ypd1p、レスポンスレギュレーター Ssk1p の二成分性情報伝達系が関与している。*A. nidulans* HOG 経路 (AnHOG 経路) の構成遺伝子は、*hogA* (*HOG1* ホモログ) と我々が単離した *tcsB** (*SLN1* ホモログ) しか報告がない。本研究では AnHOG 経路と二成分性情報伝達系の関連性を明らかにする事を目的とした。はじめに *A. nidulans* の cDNA ライブラリーより *YPD1*、*SSK1* ホモログを単離し、それぞれ *ypdA*、*sskA* と名付けた。これらの遺伝子について、酵母の *ypd1*Δ 株 (致死性を抑制)、*ssk1*ΔΔ*ho1*ΔΔ 株 (高浸透圧感受性を抑制) を用いて機能相補性を確認した。この結果から、AnHOG 経路は酵母と類似の二成分性情報伝達系によって制御を受けることが示唆された。現在、AnHOG 経路依存的な高浸透圧応答遺伝子群について調べるため、AnHOG 経路の構成的活性化株の取得を試みている。

* Furukawa *et al.*, Appl. Environ. Microbiol., 2002, *in press*

Isolation and functional analysis of two-component signaling genes from *Aspergillus nidulans*

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

P-44

Aspergillus nidulans におけるプロテインキナーゼ C ホモログをコードする遺伝子の単離とその機能解析

一宮維幸、堀内裕之、太田明徳 (東大院・農生科・応生工)

細胞壁は、糸状菌が菌糸状の形態を維持する上で必須の器官である。細胞壁合成は糸状菌の生長・分化の各段階において厳密に制御されていると考えられるが、その機構は不明である。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* では、細胞壁に対するストレスにより、細胞壁の完全性を維持するための機構が活性化することが知られている。プロテインキナーゼ C (PKC) ホモログ (Pkc1p) は、この機構において中心的な役割を果たしている。そこで本研究では、糸状菌の細胞壁合成制御と PKC ホモログとの関連を調べるために、*Aspergillus nidulans* より PKC ホモログをコードする遺伝子 (*pkcA*) を単離し解析することを目的とした。まず *A. nidulans* EST データベースより PKC ホモログをコードすると思われる二つの配列を見いだした。これらの配列をもとに PCR 法により PkcA の C 末端側約 600 a.a. をコードする領域と 3' 非コード領域を含む配列を得た。またインバース PCR 法により、PkcA の N 末端側約 400 a.a. をコードする領域と開始コドンの上流約 1.8 kb を含む配列を取得した。cDNA 配列や他の糸状菌のホモログとの比較から、*pkcA* は八つのイントロンを持つことが予想された。真菌類の PKC ホモログの N 末端側にはよく保存された複数の領域が存在し、その機能の制御に関わっていると予想されている。PkcA においてもこれらの領域はよく保存されていた。PkcA は、*A. niger* の PkcA と全長にわたり 82.5%の相同性を示した。現在、*pkcA* 欠失変異株の作製を試みている。

Isolation of a protein kinase C gene from *Aspergillus nidulans*

Masayuki Ichinomiya, Hiroyuki Horiuchi and Akinori Ohta

(Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo)

P-46

Fusarium oxysporum の FOW2 遺伝子の植物感染における機能

井上伊織, 柘植尚志 (名大院生農)

Fusarium oxysporum 病原菌は、宿主植物の根から侵入し、維管束組織に蔓延した後、全身的な萎ちょう症状を引き起こす。先に、REMI (Restriction Enzyme-Mediated Integration) 法を用いて、メロンつる割病菌 (*F. oxysporum* f.sp *melonis*) から 43 株の病原性変異株を分離した。さらに、それらのうち 3 株のタギング領域の解析によって、アルギニン生合成遺伝子 (*ARG1*)、ミトコンドリア運搬体タンパク質遺伝子 (*FOW1*) および転写制御因子遺伝子 (*FOW2*) を同定した。今回、*FOW2* 遺伝子の植物感染における機能について解析した。*FOW2* は 638 アミノ酸をコードし、その産物には Zn(II)2Cys6 ファミリーの転写制御因子に特徴的な DNA 結合ドメインが存在する。*FOW2* の部位特異的破壊株は、各種培地上での生育、胞子形成などは正常であるが、メロンに対する病原性を完全に失う。そこで、野生株と *FOW2* 破壊株に *EGFP* 遺伝子を導入し、それらの感染行動を観察した。*EGFP* 発現株の bud cell 懸濁液をメロン苗の根に接種し、3 日後に接種菌の感染行動を観察した。その結果、野生株の bud cell は根面で発芽し、組織内に侵入、蔓延するが、*FOW2* 破壊株は根面で正常に発芽するものの、組織内に侵入できないことが明らかとなった。さらに、野生株と *FOW2* 破壊株の bud cell 懸濁液をメロン胚軸に注入接種し、12 日後の病徴と接種菌の感染行動を観察した。その結果、野生株を接種した胚軸には壊死が引き起こされ、組織内には蔓延菌糸が観察されたが、*FOW2* 破壊株を接種した組織には壊死はみられず、菌糸も観察されなかった。以上の結果から、*FOW2* が本菌の植物組織への侵入と定着に必要な病原性遺伝子 (群) の転写制御因子をコードすることが強く示唆された。

Function of the *FOW2* gene of *Fusarium oxysporum* in plant pathogenesis

Iori Inoue, Takashi Tsuge

(Grad. Sch. Bioagric. Sci., Nagoya Univ.)

P-48

ナシ黒斑病菌の AK 毒素生合成酵素のペルオキシソーム局在性

今崎亜依, 柘植尚志 (名大院生農)

ナシ黒斑病菌は少数特定のニホンナシ品種にのみ病害を引き起こす。この宿主選択的な病原性は、本菌が生産する宿主特異的毒素 (AK 毒素) によって決定される。先に、AK 毒素生合成に関与する遺伝子 (*AKT* 遺伝子) クラスターを同定した。*AKT* 遺伝子群のうち、*AKT1*、*AKT2* および *AKT3* がコードするタンパク質の C 末端にはペルオキシソームへの局在シグナル配列 (PTS1) が存在し、これらがペルオキシソームに局在することが推定された。そこで、これら遺伝子のコード領域上流に緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子を連結した GFP 融合タンパク質発現用ベクターを作製し、本菌 15A 株に導入した。形質転換体の菌糸における GFP 蛍光の局在性を観察したところ、どのベクターによる形質転換体からも微粒子状に緑色蛍光が観察され、*AKT1*、*AKT2* および *AKT3* 産物がペルオキシソームに局在することが示唆された。AK 毒素生合成におけるペルオキシソームの役割をさらに明らかにするために、15A 株からペルオキシソーム形成に関与する *AaPEX6* 遺伝子を単離した。菌類の *PEX6* 遺伝子群の保存配列を用いて、15A 株の全 DNA から *PEX6* 相同配列を PCR 増幅し、増幅断片をプローブとして *AaPEX6* を単離した。*AaPEX6* は 1445 アミノ酸をコードし、その配列は *Colletotrichum lagenarium* の Pex6 と 52.1% 一致した。部位特異的遺伝子破壊によって 15A 株から *aapex6* 変異株を作出したところ、変異株はコロニー生育が低下するとともに、毒素生産能を失った。以上の結果は、AK 毒素生合成にペルオキシソームが関与することを示した。

Peroxisome localization of the enzymes involved in AK-toxin biosynthesis of the Japanese pear pathotype of *Alternaria alternata*

Ai Imazaki, Takashi Tsuge

(Grad. Sch. Bioagric. Sci., Nagoya Univ.)

P-50

ウリ類炭そ病菌の *CST1* (*Colletotrichum Ste12* homologue) 遺伝子は付着器貫入に必須である

辻元人・藤井聡・山田大輔・津下誠治・白石友紀・久保康之 (岡山大農・京府大院農)

ウリ類炭そ病菌(*Colletotrichum lagenarium*)の FUS3/KSS1 MAP キナーゼホモログ CMK1 は胞子発芽, 付着器形成, 宿主内進展に多面的に関与している. 一方, 出芽酵母では FUS3/KSS1 MAP キナーゼ下流に位置する制御因子 STE12 が同定されている. 今回, ウリ類炭そ病菌における STE12 ホモログ *CST1* 遺伝子の構造・機能解析について報告する. まず, 保存配列に基づいて設計したプライマーを用いた PCR によって *CST1* を本菌から分離し, その構造解析を行った. その結果, *CST1* が3つのイントロンを含む 697 アミノ酸からなる ORF を有することが明らかとなった. つづいて相同組換えを利用して *cst1* 破壊株を作出し, その性状解析を行った. *cst1* 破壊株のコロニー生育, 胞子形成は野生株と同等であったが, 胞子を無傷キュウリ葉に接種しても全く病斑は形成されなかった. 一方, 有傷処理したキュウリ葉では病斑形成が認められた. そこで破壊株の感染行動について調べた. その結果, 破壊株胞子は野生株同様に発芽し, メラニン化した付着器を形成した. しかしながらキュウリ葉, セルロース人工膜上のいずれにおいても付着器からの侵入菌糸形成は認められなかった. これらの結果から *cst1* 破壊株の病原性欠失が, 宿主への侵入能欠損に起因していると考えられた. 以上より *CST1* が付着器からの侵入菌糸形成に強く関与していることが示唆された.

The *Colletotrichum lagenarium CST1* (*Colletotrichum Ste12* homologue) gene is essential for appressorium penetration

Gento Tsuji, Sotoshi Fujii, Daisuke Yamada, Seiji Tsuge, Tomonori Shiraishi and Yasuyuki Kubo
(Univ. of Okayama, Univ. of Kyoto Pref.)

P-52

イネいもち病菌の胞子発芽管由来遺伝子の分子生物学的解析

齋藤憲一郎¹, 石井ふみ¹, 有江力¹, 吉田稔², 寺岡徹¹, 鎌倉高志² (¹農工大・農, ²理研・化学遺伝)

イネいもち病菌の感染初期過程, 特に付着器への分化についての分子生物学的解析を行うため, 本菌の付着器形成条件下で発現する cDNA ディファレンシャルライブラリーを構築し, 解析を進めている. ライブラリー中の候補クローンについて既知配列との相同性, および発現特異性の検討により, 優先的に解析を行うクローンを選択した. 注目したいいくつかの遺伝子について遺伝子破壊株の作出による逆遺伝学的アプローチを試みている. 本年は候補クローン中から取得した2つの遺伝子 *CBP1* と *Mg-NCS-1* について報告する.

CBP1 は栄養菌糸での発現がほぼ完全に抑制される遺伝子である. *CBP1* の推定 ORF は既知配列に対して全体的な相同性を示さなかったが, キチン結合モチーフなどの特徴的なドメインをもっており, また細胞外領域への移行が予想された. *CBP1* 遺伝子破壊株は人工基質上で付着器形成能を欠損していたが植物体上では付着器を形成し, 細胞内シグナル系の活性化ならびに植物クチクラの微量成分添加によっても付着器を形成した. レポータ遺伝子による発現特性の検討などにより, *CBP1* 産物が胞子-付着器形成の段階において特異的に発現し, 発芽管の辺縁部に局在する接着因子もしくは物理的センサーである可能性が示唆された.

Mg-NCS-1 は neuronal calcium sensor 1(NCS-1)と高い相同性を示す遺伝子である. *NCS-1* の遺伝子破壊は酵母や線虫において行われており異なる形質が報告されているが, 糸状菌では未報である. *Mg-NCS-1* の遺伝子破壊株は通常条件における生育や付着器形成, 病原性に関しては野生株との間に顕著な差異はなかったが, 過剰のカルシウム添加によって生育が阻害され, pH 3.5 以下の酸性条件下においても成長遅延の傾向が認められた.

Molecular Biological Analysis of Genes Expressed in Germ Tubes of *Magnaporthe grisea*.

Ken-ichiro Saitoh¹, Fumi Ishii¹, Tsutomu Arie¹, Minoru Yoshida², Tohru Teraoka¹, Takashi Kamakura²
(¹Fac. Agri., Tokyo Univ. of Agri. and Technol., ²Chem. Genet. Lab., RIKEN)

P-54

日本産イネいもち病菌の非病原性遺伝子の解析

曾根輝雄, 鬼頭英樹, 吹谷智, 佐藤順子, *岩野正敬, 富田房男 (北大院農・応菌, *中央農研)

いもち病菌 (*Magnaporthe oryzae*) はイネの最重要病害いもち病の原因菌である。いもち病の防除において、いもち病抵抗性イネ品種の使用が有効であるが、しばしばそのような品種に対する病原性を獲得した菌が出現し、抵抗性の崩壊を起こすことが知られている。この現象の分子的な説明は gene-for-gene 説によって、宿主側の抵抗性遺伝子 (レセプター) が認識する因子の遺伝子である、非病原性遺伝子の変異によることが知られている。従って、抵抗性の崩壊に対する有効な対策の確立のためには、非病原性遺伝子の解析は必須である。

日本産イネいもち病菌株はイネにおける多くのいもち病抵抗性遺伝子の解析に用いられ、非病原性遺伝子の解析に用いるのに適している。しかし、現在一般的に行われるポジショナルクローニングにはその年製の低さから適さない。そこで、我々は変異株を利用することで、日本産イネいもち病菌株から非病原性遺伝子をクローニングすることを試みた。

日本産イネいもち病菌株 Ina168 (イネ品種愛知旭に対して非病原性) とその変異株, m95-1 (愛知旭に対して病原性) のゲノム DNA を RAPD 法によって比較し、変異株から欠失した DNA 断片 PM1 を得た。この PM1 断片と、愛知旭に対する非病原性の分離を交配 5307 (Ina168 由来株 xGuy11) において調べたところ完全に一致し、PM1 が愛知旭に対する非病原性遺伝子の近傍に位置することが示唆された。PM1 と相同な DNA を含むコスミドクローン 46F3 を用いて、m95-1 を形質転換したところ、変異の相補が認められ、このクローンに目的とする非病原性遺伝子が含まれることが強く示唆された。

Study on Avirulence Genes in Japanese strains of *Magnaporthe oryzae*

Teruo Sone, Hideki Kito, Satoru Fukiya, Junko Sato, *Masataka Iwano and Fusao Tomita
(App. Microbiol. Grad. Sch. Agr. Hokkaido Univ., *NARC)

P-56

麹菌 *Aspergillus oryzae* の均一化 cDNA ライブラリーの構築

戸田智美¹, カルニンチピエロ², 林崎良英², 佐野元昭¹, 町田雅之¹ (¹産総研・糖鎖センター, ²理研・GSC)

近年、麹菌の遺伝子レベルでの解析が急速に進み、遺伝子の機能や発現制御に関する統括的な知見が益々重要になっている。本研究では、転写制御因子をはじめとする低発現遺伝子や新規遺伝子など、様々な遺伝子を網羅的に効率よく獲得するための有力なツールとして、高品質な麹菌 cDNA ライブラリーを構築することを目的とした。

まず、麹菌 RIB40 株から調製した poly(A) mRNA を鋳型に SMART™ 法による cDNA 合成を行い、完全な 5'末端配列を含む cDNA ライブラリーを作製した。一般に、極めて発現量の低い遺伝子を cDNA ライブラリーから効率的に収集するためには、ライブラリー中の cDNA 存在比率格差を解消することが有力な手段である。そこで、cDNA サブトラクション技術に基づいて cDNA の均一化 (normalization) を行った。均一化前後のライブラリー中に含まれるターゲット DNA をそれぞれ competitive PCR により定量したところ、均一化前には検出限界以下であった希少遺伝子が検出可能となり、高発現遺伝子の量は減少した。このような低発現遺伝子と高発現遺伝子を同程度に確実に検出することができる均一化 cDNA ライブラリーは、機能による遺伝子のスクリーニングなど、遺伝子産物の機能解析を行う上で強力なツールになると期待される。

Construction of a normalized cDNA library from the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*

Tomomi Toda¹, Piero Carninci², Yoshihide Hayashizaki², Motoaki Sano¹ and Masayuki Machida¹
(¹AIST, ²RIKEN)

P-58

麹菌 (*Aspergillus oryzae*) NRIB3000 DNA チップの開発

山田修, 赤尾健, 坂本和俊, 有馬寿英, 岩下和裕, 織田健, 秋田修 (酒総研)

麹菌 (*Aspergillus oryzae*) は、その米麹などの固体培養における高いタンパク質生産・分泌能力から、醸造産業、酵素生産などの分野で古くから広く利用されている。この特徴は、麹菌が固体培養という環境に応答し、分泌に関与するタンパク質や酵素などの遺伝子発現を制御しているためと考えられるが、その分子生物学的背景は、いまだ詳細には解明されていない。近年、産学協同による EST プロジェクトやゲノム解析プロジェクトにより、麹菌においても膨大な核酸塩基配列情報が蓄積されつつあり、これらの情報を利用して、すでに東北大グループによる 2000 クローンを搭載した DNA チップが開発されている。今回、麹菌固体培養における遺伝子発現制御機構の解明を目的として、東北大チップとあわせ各種培養条件による網羅的遺伝子発現解析を行うため、さらに 3000 クローンを搭載した NRIB3000 DNA チップを作成することとした。

東北大グループによる DNA チップは、EST 情報より発現頻度の高いクローンを選択し搭載している。そこで NRIB3000 DNA チップには、すでに公開されている EST 情報に、当研究所で独自に解析したふすま及び米麹由来の配列情報約 5,000 を加えたライブラリより、固体培養において発現の確認されたクローンを重複することなく選択することとした。21,735 EST クローンを Aopro システムによるクラスタリング解析に供したところ、7,714 の配列へコンティグ化された。この全コンティグに対して東北大チップ搭載クローンをマッピングしたところ、5,797 がチップ化候補コンティグとして抽出された。さらに、ゲノムドラフトシークエンスより 5'及び3'非翻訳領域を含む推定 ORF 核酸配列データベースを作成し、候補コンティグをマッピングすることにより e-value -10 以下の 5,013 を最終候補コンティグとした。この中より、固体培養において発現の確認された 2,723 クローンを含む 3,008 クローンを選択し NRIB3000 DNA チップを作成、東北大チップと合わせて、約 13,000 と予想される麹菌全 ORF の約 1/3 をカバーすることができた。

Development of *Aspergillus oryzae* NRIB3000 DNA chip

Osamu Yamada, Takeshi Akao, Kazutoshi Sakamoto, Toshihide Arima, Kazuhiro Iwashita, Ken Oda and Osamu Akita (NRIB)

P-60

プロセッシング酵素遺伝子(*kexB*)破壊株を用いた麹菌のトランスクリプトーム解析

水谷治, 藤岡智則, 山形洋平, 阿部敬悦, 中島佑 (東北大院農・応生科)

我々は、麹菌の分泌タンパク質のプロセッシング機構の解明を目的とし、既にサチライシン様プロセッシング酵素 *kexB* のクローニング、発現を行ってきている。さらに破壊株を造成し、その表現型を観察した。その結果、破壊株は固相培養では、分生子形成能が著しく低下し、多分岐な菌糸を形成していた。また液相培養でも、破壊株は多分岐な菌糸を形成していた。しかし、破壊株は高浸透圧条件下では固相培養、液相培養のどちらにおいても野生株と同様の表現型を示した。そこで、麹菌 *KexB* の欠損が菌体内に及ぼす影響、特に形態形成に関する遺伝子群の挙動を明らかにするために、固相及び液相培養、さらに浸透圧の有無による野生株と破壊株の転写の様子を DNA マイクロアレイを用いて解析した。その結果、通常的环境条件下では、破壊株の遺伝子発現種、発現量とも野生株と比較して非常に多くなっていた。一方で、高浸透圧条件下では破壊株は、遺伝子発現種、発現量が野生株と同等になることが明らかになった。さらに、詳しく解析を行ったところ *kexB* 遺伝子破壊によって分生子形成や細胞壁合成に関与する遺伝子群を含む大規模な発現変化が生じていた。

Transcriptome analysis using the disruption mutant of protein processing enzyme gene (*kexB*) from *Aspergillus oryzae*.

Osamu Mizutani, Tomonori Fujioka, Youhei Yamagata, Keietsu Abe, Tasuku Nakajima (Tohoku Univ., Grad.Sch.Agri.Sci.)

P-62

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* 細胞外蛋白質のプロテオーム解析

朱立穎, 竹内道雄 (農工大・農・応生科)

A.oryzae は多くの酵素を菌体外に分泌し、醸造及び酵素生産において重要な役割を果たしている。本研究では、黄麹菌発芽初期分生子が菌体外に分泌する蛋白質について、プロテオミクスの方法を用い、その全様を解析し、蛋白質と遺伝子の関係及び分生子発芽との関係を明らかにすることを目的とする。

A.oryzae RIB40 の分生子を液体培地中で発芽し、分泌蛋白質を経時的に調べた。グルコースまたは澱粉を含む培地を使用した。蛋白質の同定は MALDI-TOF-MS を用いたペプチドマスフィンガープリント法により行った。両発芽培地とも分生子では蛋白質は検出されなかったが、発芽管の出現と同時に、いくつかの蛋白質が認められ、菌糸の成長とともにその数及び濃度が増加した。分泌蛋白質を同定したところ、タカアミラーゼ A とグルコアミラーゼが主成分であり、これはグルコースを C 源として得た分生子をグルコースを C 源とした培地で発芽した場合にも認められた。以上の結果から、グルコースを C 源としても黄麹菌は分生子発芽初期にタカアミラーゼ A とグルコアミラーゼを分泌することが明らかになった。

Proteome analysis of *Aspergillus oryzae* extracellular proteins

Liyang Zhu, Michio Takeuchi (Tokyo Univ. of Agriculture & Technology)

P-64

黄麹菌 菌体内タンパク質のプロテオーム解析

Nguyen Cong Ha 藤本真澄 竹内道雄 (農工大・農・応生科)

(目的)黄麹菌の生活環において発芽の制御メカニズムは不明である。そこで発芽時に重要な因子として機能するタンパク質を同定することを目的に分生子・発芽分生子の菌体内タンパク質および核画分タンパク質をペプチドマスフィンガープリント法を用いて解析した。

(方法・結果) *Aspergillus oryzae* RIB40 の分生子・発芽分生子の菌体タンパク質および核画分タンパク質について二次元電気泳動を行った。菌体内・核画分タンパク質ともに分生子・発芽分生子でスポットのパターンが異なっていた。抗体を用いたウエスタンブロッティングから菌体内タンパク質において分生子では 22 以上の、発芽分生子では 38 以上の特異的なスポットがあることが分かった。これらのスポットを MALDI-TOF MS を用いて分析し MS-FIT データベースで検索して、発芽分生子に特異的に見られる 16 のスポットを同定した。今後はさらに分生子・発芽分生子に特異的なスポットを分析していく予定である。

Proteome analysis of intracellular protein of *Aspergillus oryzae*

Nguyen Cong Ha Masumi Fujimoto Michio Takeuchi (Tokyo Univ. of Agriculture and Technology)

MALDI-TOF MS による黄麹菌 (*Aspergillus oryzae*) プロテオーム解析システムの構築と新規 In gel deglycosylation 法の開発

織田健, 岩下和裕, 柿菌ダララット, 山田修, 家藤治幸, 秋田修 (酒総研)

【目的】 麹菌は多種多様なタンパク質を大量に生産する能力を有す事から、産業的利用価値の極めて高い有用微生物である。そのため麹菌のタンパク生産に関する研究においては、プロテオーム解析が非常に重要であると考えられ、まずは MALDI-TOF MS によるタンパク質同定解析システムを構築した。また、麹菌分泌タンパク質では糖鎖修飾、プロテアーゼ難分解性等、解析が困難となる要素が多いことより、新たなサンプル調製法の開発を試みた。

【方法および結果】 まず麹菌コンソーシアムにより集積された *A. oryzae* RIB 40 株の EST 情報および NCBI database を利用し、MALDI-TOF MS による PMF(peptide mass finger printing)解析システムを構築した。つづいて、白麹菌の β -glucosidase Ex-2 をモデルタンパク質として PMF 解析を行ったところ、得られるスペクトルが少なく同定が困難であった。これは麹菌分泌タンパク質のほとんどが糖鎖修飾を受けていることより、トリプシンによる切断効率が低い事および MS のずれの原因であると考えられた。そこで、Glycopeptidase F により N 結合型糖鎖の除去を行った後にトリプシン消化を行ったところ、数多くのスペクトルが検出され、精度、信頼性とも高く同定することが可能となった。しかしながら実際にプロテオーム解析を主眼として、モデルタンパク質と同条件下で麹菌分泌粗酵素液の糖鎖除去を行なうとその後の操作においてタンパク質の凝集が引き起こされた。そこで、2次元電気泳動にて分離後のゲル内におけるタンパク質の糖鎖除去とそれに続くトリプシンによる In gel digestion 法の検討を行い、サンプル調製法の改良を行なった。

Establishment of *A. oryzae* proteome analysis system by MALDI-TOF MS and development of in gel deglycosylation method for PMF analysis of extracellular proteins.

Ken oda, Kazuhiro Iwashita, Dararat Kakizono, Osamu Yamada, Haruyuki Iefuji, Osamu Akita (NRIB)

人名索引

Herb Arst	8	井上伊織	56
Nguyen Cong Ha	60	井原美智子	29
Annette Herscovics	32	今崎亜依	56
P. Lynne Howell	32	井山真琴	18
Jin-Rong Xu	18	入江俊一	43
赤尾健	31, 38, 59	岩崎琢磨	22
赤坂祐樹	54	岩下和裕	25, 59, 61
赤松創	39	岩野正敬	58
秋田修	25, 31, 38, 59, 61	海附玄龍	54
秋庸裕	36	江草真由美	23
秋光和也	40	遠藤良知	37
麻田恭彦	33	大井一浩	51
浅野静	47	大島美知代	42
足立嘉彦	41	太田明德	21, 33, 34, 45, 55
阿部敬悦	47, 55, 59	太田一良	46
阿保正伸	29	大根田守	49
荒井基夫	43	大平剛	28, 35
有江力	18, 40, 41, 57	大平寛大	19
有岡学	24, 42, 45, 48, 49	大宮邦雄	37
有馬寿英	59	岡崎孝映	21
飯島隆	47	岡田晃佳	19
家藤治幸	25, 61	岡田清嗣	42
五十嵐圭日子	20, 28, 35	岡拓二	31
池口雅道	26	岡村英喜	46
石井ふみ	57	織田健	25, 59, 61
石一智	24, 42	尾谷浩	39
一島英治	26, 32	落合則幸	19
一宮維幸	55	小埜和久	36
一石昭彦	19, 50	柿菌ダララット	25, 61
一本木智敬	30	柏木豊	22, 44
伊藤芳	40	片山明	35
伊藤清	36	加藤直樹	53, 54
伊藤建夫	23	加藤拓	36
伊藤靖夫	23, 51	加藤雅士	10, 27, 37, 52, 53, 54

加藤恭徳	50	栗冠和郎	37
門倉香	19	佐藤順子	58
金子功	18	佐藤利次	43, 53
兼松聡子	41	佐藤正仁	50
鎌倉高志	57	佐藤元洋	25
カルニンチピエロ	58	佐野元昭	38, 54, 58
川合理恵	28	鮫島正浩	20, 28, 35
川口剛司	43	重田征子	36
川部眞登	40, 41	宍戸和夫	14
菊池聡子	48	篠田典子	38
木崎康造	36	篠原真理	29
北川秀	54	志水元亨	20
北野道雄	29	下飯仁	36
北本勝ひこ	22, 24, 42, 45, 46, 47, 48, 49	朱立穎	60
北本則行	27, 28, 29	祥雲弘文	49
鬼頭英樹	58	正路淳也	24
木村哲哉	37	白石友紀	57
金政真	43	杉浦純	30
金鋒傑	42	鈴木聡	22, 44
楠本憲一	22, 44	炭谷順一	43
工藤俊章	19	住吉剛史	35
久保康之	57	妹川敏江	39
鯉淵恭子	46	曾根輝雄	58
洪思鉉	45	多賀井覚	50
合田秀矢	52	高木忍	29
小島麻里	46	高崎一人	49
小島美沙子	37	高嶋里美	19
児玉基一朗	23, 39	高瀬久美子	38
後藤正利	31	高橋幸資	26
小林哲夫	27, 37, 52, 53, 54	高橋徹	47
小原敏明	32	高谷直樹	49
五味勝也	25, 47	竹内妙子	42
近藤徹弥	27	竹内道雄	60
齋藤久美子	43	竹下典男	21
齋藤憲一郎	57	竹谷博子	44
坂本和俊	31, 38, 59	多田羅洋太	26

田中昭光	38, 52	八田理恵子	40
田中孝欣	40	花ヶ崎敬資	38
田中浩雄	20, 30, 34	林崎良英	58
谷修治	54	林直宏	27
谷知美	20, 28	原精一	54
田上新次郎	52	半谷朗	28, 29
茶谷悦司	28, 29	吹谷智	58
塚越規弘	27, 37, 52, 53, 54	福田央	36
塚本晃	30	藤井聡	57
津下誠治	57	藤岡智則	59
柘植尚志	32, 40, 56	藤田仁	36
辻元人	57	藤村真	19, 42
寺岡徹	18, 40, 41, 57	藤本真澄	60
土井ゆうこ	26	古川謙介	31
道家紀志	16	古川健太郎	55
戸田智美	58	古城敦	30
富田房男	58	トーマス C. ベック	29
中岡源	51	堀内裕之	21, 33, 34, 45, 55
仲亀誠司	30	前田浩	47
長澤寛道	28, 35	牧田智裕	53, 54
中島佑	47, 55, 59	増田力	54
中島春紫	24, 47, 48	町田雅之	38, 54, 58
長瀬崇	52	松井淳子	27
中西義人	45	松岡寿保	37
夏目豊彰	23	丸井淳一朗	27
奈良秀徳	48	丸山潤一	22, 24, 46, 48
仁木孝治	50	丸山昇太	26
西野武士	35	三浦大典	34
西原幹広	33	水谷治	59
西村麻里江	18	水谷真也	23
二宮大記	46	南田広太	26
丹羽修身	21	三並正芳	22
長谷川要	38	宮田雄一郎	40
長谷川史彦	47	六車三治男	46
畑本修	54	村越有里子	53
秦洋二	12	村島健司	36

本山高幸	19	山本周治	29
森川豊	27	山本幹博	40
森本宗徳	37	吉内くみ	31
森山聡	46	吉岡博文	16
安田庄子	27, 29	吉田幸二	41
矢原明典	31	吉田孝	26, 31, 32
山形洋平	47, 59	吉田隆延	40
山岸大輔	39	吉田誠	20, 28, 35
山口勇	19, 42	吉田稔	57
山崎晴丈	34	米田幸世	47
山澤美緒	29	李秉魯	26
山田絵美	33	若林三郎	36
山田修	31, 38, 59, 61	渡邊彰	33
山田大輔	57	渡辺久敬	43, 53
山根雄一	36	割石博之	20, 30, 34

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。
- 3) 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。
- 4) 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。
- 5) 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。
- 6) 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。
- 7) 本会はその運営のため、会長、運営委員若干名および会計監査1～2名をおく。任期は2年とし、改選は運営委員の推薦と総会の承認による。
 - (1) 会長は本会を代表し、会務を統括する。
 - (2) 運営委員は運営委員会を構成し会務を審議する。運営委員には庶務、会計、編集担当、広報担当をおく。
 - (3) 会計監査は本会の会計を監査する。
- 8) 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。
- 9) 本会の事務年度は研究会の開催準備開始から「次期」研究会の開催準備開始直前までとする。
- 10) 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。
- 11) 本会則の改定には総会出席者過半数の賛成を必要とする。

以上

補則

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

糸状菌分子生物学研究会運営委員会名簿

会 長

北本 勝ひこ

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

運営委員

秋田 修

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

五味 勝也

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

鮫島 正浩

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

会計担当

有江 力

東京農工大学農学部 (〒183-8509 東京都府中市幸町 3-5-8)

竹内 道雄

東京農工大学農学部 (〒183-8509 東京都府中市幸町 3-5-8)

編集担当

小林 哲夫

名古屋大学大学院生命農学研究科 (〒464-8601 名古屋市千種区不老町)

広報担当

川口 剛司

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

庶務担当

堀内 裕之

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

第2回糸状菌分子生物学コンファレンス要旨集

平成14年10月20日印刷

平成14年10月20日発行

発行者 糸状菌分子生物学研究会

編集者 小林哲夫

〒464-8601 名古屋市千種区不老町
名古屋大学大学院生命農学研究科